**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

ANDERSON MELO GAIA

**Metabólitos secundários e ontogenia em
espécies de *Piper***

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

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

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

03/11/2014

ANDERSON MELO GAIA

**Metabólitos secundários e ontogenia em espécies
de *Piper***

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

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo

2014

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

Gaia, Anderson Melo
G137m Metabólitos secundários e ontogenia em espécies de *Piper* /
Anderson Melo Gaia. -- São Paulo, 2014.
121p.

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

1. Química orgânica 2. Produtos naturais I. T. II. Kato, Massuo
Jorge, orientador.

546 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Metabólitos secundários e ontogenia em espécies de *Piper*”

ANDERSON DE MELO GAIA

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

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
IQ - USP

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos
IQ - USP

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes
FCFRP-USP

Prof. Dr. Alberto José Cavalheiros
IQ - UNESP - Araraquara

SÃO PAULO
11 de dezembro de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais,
Antonio e Nereide.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química pela oportunidade oferecida para a realização do trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, pela orientação, compreensão, apoio e ensinamentos ao longo desses anos de trabalho.

À FAPESP pela bolsa e aos auxílios financeiros concedidos.

Aos funcionários da SPG do Instituto de Química pela atenção e apoio.

Aos funcionários da Central Analítica do IQUSP pela realização dos experimentos e atenção.

Aos amigos e colegas do LQPN, Alberto, Aline, Augusto, Camila, Celso, Cristina, Diana, Edgard, Eduardo, Elisabeth, Erica, Fábio Chaves, Fábio Rodrigues, Gerardo, Giovana, Harold, Igor, Joca Marques, Joca Matheus, Karina, Lucas, Ludmila, Lydia, Marcílio, Marianna, Mauro, Natali, Nídia, Renata, Tara, Vitor Bueno, Yasmin, Welber e Wilman, pela ajuda, amizade e convivência.

À Profa. Dra. Elsie F. Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro) pela identificação das espécies vegetais.

Ao Prof. Dr. Paolo de Mascio pela utilização do equipamento para análises de LC-MS.

À Profa. Dra. Eny I. S. Floh do Instituto de Biociências da USP pela utilização de seu laboratório (Biocel).

Ao Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos e aos membros do seu grupo de pesquisa pelo apoio técnico e convivência.

Aos professores que contribuíram para a minha formação.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo desde a graduação até hoje.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

"A natureza reservou para si tanta liberdade que não
a podemos nunca penetrar completamente
com o nosso saber e a nossa ciência."

(Johann Wolfgang von Goethe)

RESUMO

Gaia, A.M. **Metabólitos secundários e ontogenia em espécies de *Piper***. 2014. 121p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Estudos fitoquímicos em geral são realizados com indivíduos adultos visando isolar e caracterizar substâncias em quantidade para testes de atividade biológica e por isso, há poucos estudos de metabólitos secundários em estágios iniciais do desenvolvimento das plantas. Assim, o trabalho foi realizado com objetivo de analisar o perfil de metabolitos secundários ao longo da ontogenia de espécies do gênero *Piper*. Os extratos brutos de plântulas e plantas adultas de diversas espécies de *Piper* foram analisados por técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas (RMN de ^1H , CLAE-UV-EM, CG-EM). Os dados submetidos à análise de componentes principais (PCA) revelaram três grupos, sendo que no primeiro grupo contendo amidas (*P. tuberculatum*, *P. amalago* e *P. reticulatum*) não foi observada diferença significativa no perfil químico nos diferentes estágios de desenvolvimento. No segundo grupo (*P. gaudichaudianum*, *P. solmsianum*, *P. regnellii*, *P. caldense* e *P. hemmendorffii*) foi observado o acúmulo de alilfenóis nas folhas das plântulas contrastando com as folhas adultas que produzem lignanas, neolignanas ou ácidos benzóicos prenilados. No terceiro grupo (*P. richardiaefolium* e *P. permucronatum*) observou-se o predomínio de amidas nas folhas das plântulas enquanto que lignanas ou flavonoides constituem-se nos metabólitos predominantes no estágio adulto. A diferenciação observada na produção de metabólitos secundários ao longo da ontogenia fornece indícios de possíveis estratégias de defesa contra fitopatógenos ou herbívoros.

Palavras-chave: Piperaceae, *Piper*, plântulas, metabólitos secundários, ontogenia.

ABSTRACT

Gaia, A.M. **Secondary metabolites and ontogeny in *Piper* species**. 2014. 121p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Phytochemical studies are usually carried out with adult plants for isolation and characterization of compounds in large amounts especially when bioactivity is involved and thus remarkably little is known about the production of secondary metabolites in *Piper* species at early developmental stages. Therefore, this study was carried out in order to describe the secondary metabolites profile of plants during the ontogeny of the *Piper* species. Crude extracts from seedlings and adult plants of several *Piper* species were analyzed by chromatographic, spectrometric and spectroscopic techniques (^1H NMR, HPLC-DAD-MS, GC-MS). The analysis with the aid of principal component analysis (PCA) revealed three groups: the first group containing amides (*P. tuberculatum*, *P. amalago* and *P. reticulatum*) no significant differences were observed in the chemical profile at different developmental stages. In the second group (*P. gaudichaudianum*, *P. solmsianum*, *P. regnellii*, *P. caldense* and *P. hemmendorffii*) allylphenols were detected as major compounds in the seedling leaves while adult leaves contained lignans, neolignans or prenylated benzoic acids. Additionally, in a third group (*P. richardiaefolium* and *P. permucronatum*) amides were observed as major compounds in the seedling leaves instead of lignans or flavonoids found in the adult leaves. The differentiation observed in the secondary metabolite production suggests a plant defensive strategy against phytopathogens and herbivores.

Keywords: Piperaceae, Piper, seedlings, secondary metabolites, ontogeny.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta
ESI-EM	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
IE-EM	Espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
m/z	Relação massa carga
PC	<i>Principal Component</i> (Componente principal)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de componentes principais)
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Hum
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
S	Singleto
D	Dubleto
Dd	duplo dubleto
T	Tripleto
Q	Quarteto
M	Multipleteo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de formação de alilfenóis e propenilfenóis a partir do acetato de coniferila (Koeduka et al., 2006).....	25
Figura 2 . Exemplos de fenilpropanoides encontrados em plantas.....	26
Figura 3. Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies de <i>Piper</i>	28
Figura 4. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de <i>P. tuberculatum</i> , <i>P. amalago</i> e <i>P. reticulatum</i>	39
Figura 5. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados no gráfico de loadings.	40
Figura 6. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV dos extratos brutos das folhas das plântulas e folhas adultas das espécies <i>P. tuberculatum</i> ; <i>P. amalago</i> ; e <i>P. reticulatum</i>	41
Figura 7. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) dos metabólitos detectados nas plantas adultas e plântulas de <i>Piper</i> (A: piplartina, B: nigrinodina, C: diidrowisanidina).	42
Figura 8. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de <i>P. gaudichaudianum</i> ; <i>P. regnellii</i> ; <i>P. solmsianum</i> , <i>P. hemmendorffii</i> e <i>P. caldense</i>	44
Figura 9. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados no gráfico de loadings.	45
Figura 10. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV dos extratos brutos de folhas de plântulas e folhas adultas das espécies <i>P. gaudichaudianum</i> , <i>P. regnellii</i> , <i>P. solmsianum</i> , <i>P. hemmendorffii</i> e <i>P. caldense</i>	46
Figura 11. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) dos metabólitos detectados nas plantas adultas e plântulas de <i>Piper</i> (A: conocarpano, B: grandisina, C: apiol, D: dilapiol, E: isoasarona).	48
Figura 12. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de <i>P. permucronatum</i> e <i>P. richardiaefolium</i>	50

Figura 13. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados no gráfico de loadings.	51
Figura 14. Metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de <i>P. permucronatum</i> e <i>P. richardiaefolium</i>	52
Figura 15. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas de <i>P. permucronatum</i>	53
Figura 16. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) atribuídos aos metabólitos detectados nos extratos brutos das folhas das plântulas e das folhas adultas de <i>P. permucronatum</i> (A: 4b , B: 4g , C: 3i).....	54
Figura 17. Espectros de massas de alta resolução no modo positivo atribuídos aos metabólitos secundário detectados no extrato das folhas das plântulas de <i>P. permucronatum</i>	55
Figura 18. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) atribuídos às lignanas detectadas nas folhas adultas de <i>P. richardiaefolium</i> .(A: cubebina, B: hinokinina, C: kusunokinina, D: 3h).....	56
Figura 19. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) atribuídos às amidas detectadas nas folhas das plântulas de <i>P. richardiaefolium</i> (A: pelitorina, B: piperina, C: piplartina).....	57
Figura 20. Espectros de massas de alta resolução no modo positivo das lignanas encontradas no extrato das folhas adultas de <i>P. richardiaefolium</i> (A: cubebina, B: hinokinina, C: kusunokinina, D: 3h).	59
Figura 21. Espectros de massas de alta resolução no modo positivo atribuídos às amidas detectadas nas folhas das plântulas de <i>P. richardiaefolium</i> (A: piperina; B: piplartina).	60
Figura 22. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais das amostras de <i>P. gaudichaudianum</i> (folhas adultas e folhas das plântulas em diversos estágios).....	62
Figura 23. Metabólitos secundários identificados nos extratos brutos (folhas) de <i>P. gaudichaudianum</i>	63

Figura 24. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de <i>P. gaudichaudianum</i> ($\lambda = 260$ nm).....	64
Figura 25. Gráficos de scores e de loadings da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de <i>P. regnellii</i> (folhas adultas e folhas das plântulas em diversos estágios).....	66
Figura 26. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H encontrados no gráfico de loadings de PCA das amostras de <i>P. regnellii</i>	66
Figura 27. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de <i>P. regnellii</i>	68
Figura 28. Metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de <i>P. regnellii</i> em diversos estágios de desenvolvimento.....	68
Figura 29. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de <i>P. solmsianum</i> (folhas adultas e folhas das plântulas em diversos estágios).....	71
Figura 30. Estruturas dos metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de <i>P. solmsianum</i> e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados.....	72
Figura 31. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de <i>P. solmsianum</i>	73
Figura 32. Metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de <i>P. solmsianum</i>	73
Figura 33. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) dos metabólitos secundários encontrados nos extratos brutos das folhas de <i>P. solmsianum</i> (A: apiol, B: miristicina, C: elemicina, D: grandisina).	75
Figura 34. Espectro de massas de alta resolução no modo positivo das substâncias: apiol (A), elemicina (B) e grandisina (C).	77

Figura 35. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de <i>P. caldense</i> (folhas adultas e folhas das plântulas em diversos estágios).....	80
Figura 36. Estruturas dos metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de <i>P. caldense</i> e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados.....	80
Figura 37. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de <i>P. caldense</i> ($\lambda = 260 \text{ nm}$).	82
Figura 38. Cromatograma (CLAE-UV) da fração contendo a substância 2d	84
Figura 39. Curva no UV-visível da substância 2d	84
Figura 40. Espectro de massas de alta resolução no modo negativo da substância 2d	84
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 2d	88
Figura 42. Correlações de HMBC observadas para a substância 2d	88
Figura 43. Correlações no HMBC (500 MHz) da substância 2d	89
Figura 44. Cromatogramas do extrato bruto das folhas de <i>P. gaudichaudianum</i> (15 meses) e da fração contendo a substância 2e	90
Figura 45. Curva no UV-visível da substância 2e	90
Figura 46. Espectro de massas de alta resolução no modo negativo da substância 2e	91
Figura 47. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 2e	94
Figura 48. Correlações de HMBC observadas para a substância 2e	94
Figura 49. Correlações no HMBC (500 MHz) da substância 2e	95
Figura 50. Cromatograma (CLAE-UV) da fração contendo a substância 4g	96
Figura 51. Espectro de massas de alta resolução no modo positivo das substância 4g	97
Figura 52. Curva no UV-visível da substância 4g	97
Figura 53. Espectro de massas (ionização por impacto eletrônico) da substância 4g	98
Figura 54. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 4g	99
Figura 55. Correlações de HMBC observadas para a substância 4g	100
Figura 56. Correlações no HMBC (500 MHz) da substância 4g	100
Figura 57. Curva no UV-visível da substância 1c	101

Figura 58. Espectro de massas de alta resolução no modo positivo da substância 1c	102
Figura 59. Espectro de massas (ionização por impacto eletrônico) da substância 1c	102
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância 1c	103
Figura 61. Representação dos metabólitos secundários encontrados nos diferentes estágios de desenvolvimentos das espécies de <i>Piper</i> analisadas.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de concentrações para obtenção dos perfis cromatográficos em CLAE das espécies de <i>Piper</i>	33
Tabela 2. Metabolitos secundários detectados nos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de <i>P. regnellii</i>	69
Tabela 3. Dados dos metabolitos secundários detectados nos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de <i>P. solmsianum</i>	78
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e estrutura da substância 2d	87
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), de ^{13}C (75 MHz) e estrutura da substância 2e	93
Tabela 6. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância 4g	99
Tabela 7. Dados do espectro de RMN de ^1H e estrutura da isoasarona (1c).....	103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Metabólitos secundários em plantas.....	19
1.2. Ontogenia de plantas e o metabolismo secundário	20
1.3. Análise do perfil metabólico de plantas.....	22
1.4. Metabolismo fenilpropanoídico em plantas.....	24
1.5. Gênero <i>Piper</i> (Piperaceae).....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Solventes utilizados.....	31
3.2. Material vegetal	31
3.2.1. Cultivo da plântulas	31
3.2.2. Plantas adultas.....	31
3.2.3. Obtenção dos extratos brutos	32
3.3. Equipamentos utilizados.....	32
3.4. Análises por CLAE	33
3.5. Análises por RMN de ¹ H.....	34
3.6. Análise de componentes principais	34
3.7. Isolamento das substâncias	35
3.7.1. Ácidos benzoicos de <i>P. gaudichaudianum</i>	35
3.7.2. Éster de <i>P. permucronatum</i>	35
3.7.3. Isoasarona de <i>P. caldense</i>	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Análise do perfil químico das plântulas e plantas adultas de espécies de <i>Piper</i>	37
4.1.1. Espécies de <i>Piper</i> que produzem amidas	38
4.1.2. Alilfenóis em plântulas de espécies de <i>Piper</i>	43
4.1.3. Padrão de produção de amidas em plântulas de <i>P. permucronatum</i> e <i>P. richardiaefolium</i>	49

4.2. Variações ontogenéticas e perfil químico das folhas das plântulas de espécies de <i>Piper</i>	61
4.2.1. <i>P. gaudichaudianum</i>	61
4.2.2. <i>P. regnellii</i>	65
4.2.3. <i>P. solmsianum</i>	70
4.1.4. <i>P. caldense</i>	79
4.3. Determinação estrutural das substâncias isoladas	83
4.3.1. Ácidos benzoicos prenilados de <i>P. gaudichaudianum</i>	83
4.3.2. Metabólitos secundários de <i>P. permucronatum</i>	96
4.3.3. Metabólitos secundários de <i>P. caldense</i>	101
5. CONCLUSÕES.....	104
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabólitos secundários em plantas

As plantas possuem uma diversidade de substâncias que são essenciais para a manutenção da sua vida. Entre essas substâncias existem aquelas que são comuns à todos organismos vivos como as proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, denominados de metabólitos primários. Por outro lado existem outras substâncias orgânicas que possuem distribuição limitada em famílias e gêneros do reino vegetal, esses são denominados de metabólitos secundários (Pichersky and Gang, 2000).

As substâncias produzidas pelo metabolismo secundário possuem grande notoriedade devido à imensa variedade de estruturas bem como por muitos delas serem bioativas e com grande aplicabilidade (Newman and Cragg, 2012). Entretanto, os metabólitos secundários demonstram possuir funções ecológicas importantes para as plantas como atração de polinizadores, deterrence de herbívoros, defesa contra fungos e bactérias patogênicos ou podem ser essenciais para sua sobrevivência em ambientes estressantes (Cseke et al., 2006). O perfil de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário pode sofrer modificações em função de fatores que possam interferir no processo biossintético da planta como, por exemplo, os diferentes órgãos da planta, ação de predadores, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura e altitude ou diferentes estágios de crescimento (Gobbo-Neto and Lopes, 2007).

1.2. Ontogenia de plantas e o metabolismo secundário

O início do desenvolvimento de uma planta ocorre logo após o final da germinação em que a partir de uma semente ocorre a transformação de um embrião em uma plântula, a qual poderá se desenvolver até tornar-se uma planta adulta. O final da germinação é marcado pelo emergir da radícula que é uma espécie de raiz primaria que cresce, lança ramificações e desenvolve pelos radiculares, iniciando a absorção de nutrientes do solo (Castro et al., 2002).

Estudos mostram que os metabólitos secundários encontrados em plântulas podem estar relacionados com a defesa contra inimigos naturais (Barton and Hanley, 2013). Em contrapartida, o custo para a biossíntese dessas substâncias pode ser alto para as plântulas considerando que nos estágios iniciais de vida há limitação devido à limitada área fotossintética e biomassa de raiz (Boege and Marquis, 2005). Há indícios mostrando que a ontogenia da planta pode influenciar na composição do seu perfil químico como o observado em estudos onde comparou-se a composição química de plântulas e plantas adultas de *Cannabis sativa* e evidenciando que o perfil dos canabinoides é bastante diferenciado (Vogelmann et al., 1988).

Diferenças significativas podem ser observadas no perfil metabólico quando compara-se as plântulas de *Virola sebifera* onde observa-se a predominância da lignana hidroxiotobaina e as sementes em que a substância é encontrada em quantidade traço (Danelutte et al., 2000). Além disso, pode ser constatado em *Araucaria angustifolia*, que no estágio de plântula são encontrados dímeros de apigenina em seus caules e na fase adulta observa-se a presença de isoflavonoides,

lignanas e também outros fenólicos como coniferaldeído e *p*-hidroxibenzaldeído (Fonseca et al., 2000). O perfil químico em diversos estágios de crescimento da planta após sua germinação pode envolver variação quantitativa dos metabólitos secundários durante o desenvolvimento como o constatado para as naftoquinonas em plântulas de *Euclea natalensis* (Bapela et al., 2007). Outras diferenças significativas podem ser observadas no perfil químico ao comparar diferentes estágios de desenvolvimento da planta como em plântulas de *V. sebifera* onde observa-se a predominância da lignana hidroxiotobaina e nas sementes a substância é encontrada em quantidade traço (Danelutte et al., 2000).

O estágio de desenvolvimento da planta também pode alterar o sistema de defesa contra predadores, como o observado em *Brassica juncea* em que a composição do sistema defensivo mirosinase-glicosinolato é alterada (Wallace and Eigenbrode, 2002). Adicionalmente, estudos apontam diferenciação entre o sistema de defesa de plantas adultas e o de plântulas em *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) quando predadas pelas lagartas especialistas *Junonia coenia* (Nymphalidae), sendo que nas plântulas é observada a compensação por crescimento, mas não a indução química, como estratégia de defesa (Barton, 2008).

Estudos recentes envolvendo *Eucalyptus froggattii* mostraram que a ontogenia pode influenciar a constituição química das folhas, indicando que nas fases iniciais de desenvolvimento há o predomínio de metabólitos fenólicos ocorrendo o aumento do acúmulo de terpenoides ao longo do desenvolvimento da planta (Goodger et al., 2013).

1.3. Análise do perfil metabólico de plantas

A caracterização de metabólitos secundários de plantas geralmente envolve métodos clássicos de fitoquímica que consistem na purificação e posterior determinação estrutural das substâncias isoladas. Esses métodos são bastante eficientes, mas consomem muito tempo e fornecem pouca informação quando é necessário analisar um número grande de amostras. Por outro lado, com a grande quantidade de informação disponível atualmente sobre os metabólitos secundários isolados de plantas associada à disponibilidade de técnicas espectroscópicas e espectrométricas é possível analisar grande quantidade de amostras com uma caracterização razoável das principais classes de metabólitos secundários.

Com o desenvolvimento contínuo das técnicas de análise, os estudos envolvendo metabólitos secundários de plantas tornaram-se mais diversificados gerando quantidade elevada de dados, tornando necessário a utilização de ferramentas capazes de permitir a interpretação desses dados de forma simples e rápida, sendo que para isso tem sido amplamente utilizada a análise multivariada de dados (Ge et al., 2008; Jansen et al., 2010; Kim et al., 2011; Okada et al., 2010). A análise de componentes principais (PCA) é uma dessas ferramentas que aplicada à análise de metabolitos de plantas, tem se mostrado bastante eficaz para a classificação de amostras de acordo com as diferenças metabólicas observadas entre variados tipos de espécimes (Cardoso-Taketa et al., 2008; Choi et al., 2004; Kim et al., 2005; Kim et al., 2010b; Madala et al., 2013; Palomino-Schätzlein et al., 2011; Widarto et al., 2006; Xie et al., 2008). Para o estudo do perfil metabólico de plantas podem ser utilizadas diversas técnicas de análise, sendo que tem sido amplamente utilizada a combinação entre RMN de ^1H e PCA (Flores-Sanchez et al.,

2009; Frédérich et al., 2004; Kim et al., 2010a; Liu et al., 2010; Schripsema, 2010; Schripsema et al., 2012; Simoh et al., 2009). A razão da utilização de dados de RMN de ^1H ser bastante explorada no estudo do perfil metabólico de plantas está na vantagem dessa técnica como a reprodutibilidade, qualidade da informação estrutural dos constituintes, simplicidade na preparação das amostras e rapidez na análise (Schripsema, 2010). Entretanto, a utilização de RMN de ^1H também tem suas limitações, pois é uma técnica que possui baixa sensibilidade quando comparada, por exemplo, com a espectrometria de massas (Kim et al., 2011; Schripsema, 2010).

Geralmente o extrato bruto obtido de uma planta apresenta uma mistura complexa de metabólitos e para uma análise mais acurada há a necessidade da utilização de outras técnicas de análise com o objetivo de obter o máximo de informação possível para identificá-los (Wolfender et al., 2013). Além da RMN de ^1H , a espectrometria de massas é uma alternativa que pode ser utilizada de forma complementar e que normalmente é utilizada acoplada à separação cromatográfica, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EM) e a cromatografia gasosa (CG-EM) (Barrett, 2012; Lee et al., 2013; Wolfender et al., 2009; Wolfender et al., 2013). Levando em consideração as perspectivas apresentadas, considerou-se promissor a utilização dos dados de RMN de ^1H combinado com a análise de componentes principais (PCA) para a análise do perfil metabólico de plantas em diferentes estágios de desenvolvimento. Outras técnicas selecionadas para realização das análises foram a CLAE-UV-EM e CG-EM.

1.4. Metabolismo fenilpropanoídico em plantas

Os fenilpropanoides são metabólitos secundários encontrados com muita frequência em plantas e são derivados do aminoácido *L*-fenilalanina. A biossíntese dos fenilpropanoides inicia-se com a conversão da *L*-fenilalanina em ácido *E*-cinâmico que é catalisada pela enzima *L*-fenilalanina amônia liase. Em etapas posteriores da via biossintética são formados diversos ácidos hidroxicinâmicos, aldeídos e alcoóis a partir do ácido *E*-cinâmico por meio de uma série de reações de hidroxilação e metoxilação. Alguns desses derivados podem ser convertidos em substâncias voláteis como os alilfenóis e propenilfenóis que são fenilpropanoides que diferem entre si apenas na posição da dupla ligação. Estudos recentes mostram a elucidação da provável via biossintética responsável pela formação dos alilfenóis e propenilfenóis a partir de experimentos com eugenol e isoeugenol (Koeduka et al., 2006). Os resultados obtidos mostraram que esses fenilpropanoides são obtidos a partir de um precursor comum, o acetato de coniferila, e que a diferenciação ocorre de acordo com a posição em que o hidreto ataca a dupla ligação (Figura 1). O mecanismo proposto mostra que o hidreto originado do NADPH pode atacar a posição C-7 formando o alilfenol ou a posição C-9 dando origem ao propenilfenol (Koeduka et al., 2006; Vassão et al., 2006).

Figura 1. Mecanismo de formação de alilfenóis e propenilfenóis a partir do acetato de coniferila (Koeduka et al., 2006).

Alilfenóis e propenilfenóis (Figura 2) destacam-se por apresentarem atividade biológica principalmente contra insetos (Bernard et al., 1995; Boulogne et al., 2012). O dilapiol é um alilfenol presente no óleo essencial de várias espécies de plantas, sendo encontrado com frequência em espécies de *Piper* como, por exemplo, *P. aduncum* chegando a constituir mais de 80% do óleo essencial (Silva et al., 2013). O dilapiol destaca-se principalmente por apresentar atividade inseticida, fungicida e antimicrobiana (Bernard et al., 1995; Rafael et al., 2008; Razzaghi-Abyaneh et al., 2007). Observou-se em estudos de avaliação da atividade carrapaticida com óleos essenciais de espécies de *Piper* que os alilfenóis apiol e safrol tenham sido os responsáveis pela atividade contra os carrapatos *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Ferraz et al., 2010). Outros fenilpropanoides como elemicina, miristicina, eugenol, (*Z*)-asarona e safrol também são reportados como potenciais agentes inseticidas (Boulogne et al., 2012; Huang et al., 1999; Liu et al., 2011; Srivastava et al., 2001; Yao et al., 2008).

Figura 2 . Exemplos de fenilpropanoides encontrados em plantas.

Substâncias voláteis emitidas por plantas, como os fenilpropanoides, podem desempenhar um papel importante nas relações ecológicas, podendo agir na comunicação com outras plantas, com insetos ou ainda com patógenos. A biossíntese dessas substâncias nas plantas pode ser induzida pela herbivoria, mas também podem ter a função direta de repelir os herbívoros ou indireta de atração dos seus inimigos naturais (Das et al., 2013). Interessantes resultados obtidos com folhas de *Mangifera indica* L. (manga, Anacardiaceae) mostraram que tanto a injúria mecânica das folhas e a predação por gafanhotos são capazes de induzir a produção de fenilpropanoides como miristicina, dilapiol e eugenol (da Silva et al., 2012).

1.5. Gênero *Piper* (Piperaceae)

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae e destaca-se por conter um número de espécies acima de 1000, sendo um dos maiores gêneros entre as angiospermas basais (Scott et al., 2008). Espécies de *Piper* encontradas em regiões tropicais e subtropicais têm sido amplamente estudadas devido à presença de inúmeras substâncias biologicamente ativas, o que justifica seu amplo uso na medicina popular, como preparações para dores no estômago, agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e contra asma, e também como repelentes de insetos (Parmar et al., 1997).

Os estudos realizados com espécies do gênero *Piper* tem resultado no isolamento de substâncias de diversas classes de metabólitos secundários, muitas dessas substâncias com destacada atividade biológica. Entre essas substâncias, podem ser citadas amidas (da Silva et al., 2002; Ghosal et al., 2012; Marques et al., 2007; Navickiene et al., 2000), ácidos benzoicos prenilados (Baldoqui et al., 1999; Freitas et al., 2009; Lago et al., 2009; Lago et al., 2004; Puhl et al., 2011), neolignanas (Benevides et al., 1999; Chauret et al., 1996; Jiang et al., 2003), hidroquinonas preniladas (Danelutte et al., 2003; Yamaguchi et al., 2006), flavonoides (de Queiroz et al., 2014; Freitas et al., 2014) e lignanas (Cabral et al., 2009; Martins et al., 2003; Martins et al., 2000).

Figura 3. Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies de *Piper*.

Estudos recentes tem mostrado que os metabólitos secundários encontrados em espécies de *Piper* podem ser importantes nas relações ecológicas dessas plantas com insetos (Bernard et al., 1995; Ramos and Kato, 2009, 2012, 2013; Ramos et al., 2012a; Ramos et al., 2012b). Observações em campo têm demonstrado frequentemente a presença de diversas espécies de insetos predando as plantas adultas (Vanin et al., 2008). Diversas interações ecológicas entre insetos e espécies de *Piper* tem sido estudadas como o sequestro de ácidos benzoicos de *P. gaudichaudianum* por *Naupactus bipes* (Ramos et al., 2009) e também o metabolismo da lignana (-)-grandisina encontrada nas folhas de *P. solmsianum* por insetos da ordem Coleoptera e Lepidoptera (Ramos et al., 2008).

Investigações sobre as vias biossintéticas de alguns metabólitos secundários presentes em espécies de *Piper* já foram realizadas, como por exemplo, a origem do ácido gaudichaudiânico em *P. gaudichaudianum* (Lopes et al., 2007). Outro estudo mostra que a biossíntese da neolignana didrobenzofurânica (+)-conocarpano presente nas folhas de *P. regnellii* é enantiosseletiva, gerando o isômero dextrógiro a partir do precursor *p*-hidroxipropenilbenzeno (Sartorelli et al., 2001).

Os estudos fitoquímicos envolvendo espécies de *Piper* geralmente são realizados utilizando plantas adultas e ainda muito pouco foi investigado com o objetivo de analisar o perfil metabólico em diferentes estágios de crescimento. Esse tipo de abordagem pode ser observada em *P. tuberculatum* onde as folhas, caule e raízes de plântulas e plantas adultas foram analisadas por CLAE (Navickiene et al., 2003). Estudos utilizando dados de ESI-EM de extratos de espécies de *Piper* e análise multivariada de dados tem mostrado que a composição de metabólitos secundários das folhas de plântulas pode ser bem diferente da planta adulta para algumas espécies de *Piper* (Yamaguchi et al., 2011). Adicionalmente, analisando-se culturas de suspensões celulares observou-se a predominância de feniletilaminas em *P. cernuum* e de alcanidas em *P. crassinervium* enquanto em espécies adultas foi encontrado majoritariamente a presença de fenilpropanoides e ácidos benzoicos prenilados, respectivamente (Danelutte et al., 2005).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto foi o estudo do perfil químico de espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) com a finalidade de comparar o metabolismo secundário de plantas adultas e de plântulas em diferentes estágios de desenvolvimento. Para isso, os extratos brutos obtidos foram analisados por técnicas cromatográficas e espectrométricas (CLAE-UV-EM, CG-EM, RMN de ^1H) com o auxílio de análise multivariada dos dados (PCA), bem como o isolamento e determinação estrutural dos principais constituintes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Solventes utilizados

O metanol (MeOH) utilizado para as análises por CLAE da marca J.T. Baker (EUA) e Tedia Brazil (EUA) foi utilizado após filtração em malha de PTFE 0,5 μm modelo FHLP 04700 da Millipore. O acetato de etila (AcOEt) grau p.a. utilizado nas extrações foi comercializado pela LabSynth (Brasil), sendo destilados pela Central de Solventes do Instituto de Química – USP. O clorofórmio deuterado utilizado nas análises de RMN de ^1H foi adquirido junto a Tedia Brazil (EUA).

3.2. Material vegetal

3.2.1. Cultivo da plântulas

As sementes das espécies de *Piper* foram coletadas de exemplares adultos e utilizadas para germinação em terra comum. Essa terra era composta de uma mistura de partes iguais de terra adubada comercial e areia. Durante e após a germinação as plântulas foram mantidas sob condições controladas com temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 horas (com lâmpadas fluorescentes de 85 W).

3.2.2. Plantas adultas

O maior contingente das amostras de espécies adultas de *Piper* foram coletadas de exemplares cultivados no próprio Instituto de Química da USP, São Paulo (SP). Duas amostras de *P. gaudichaudianum* foram coletadas no Parque Estadual do Jaraguá (São Paulo – SP). As espécies foram coletadas com a

autorização para atividades com finalidade científica do Instituto Florestal (SMA nº 40.272/2006) e Sisbio/MMA (nº 15780-2).

3.2.3. Obtenção dos extratos brutos

O material vegetal das plântulas e plantas adultas foi congelado utilizando N₂ líquido, liofilizado, triturado e submetido a extração exaustiva por maceração em AcOEt a temperatura ambiente e com ausência de luz. Após filtração, o solvente foi evaporado a pressão reduzida em evaporador rotativo – Buchi Rotavapor (R-215)/ Buchi Heating Bath (B-490) e os extratos foram secos para retirada de traços de solvente e de água em concentrador a vácuo (Centri Vap – Labconco).

3.3. Equipamentos utilizados

As análises por CLAE-UV foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (Japão), equipado com sistema binário de bombas LC-20 ADVP, detector com arranjo de diodos SPD-M20A VP operando num intervalo de 200-800 nm, auto-injetor SIL-20A, unidade controladora CBM-20 A VP e um forno CTO-20AS VP para coluna. Os cromatogramas foram registrados e reprocessados utilizando o software LC Solution (Shimadzu - Japão).

As análises de espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI) foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas Bruker micrOTOF – QII,. A interface ESI foi operada no modo positivo com 4,5 kV no capilar e 0,5 kV no *end plate offset*. A pressão do gás de nebulização foi de 0,4 Bar; o gás secante foi mantido com vazão de 4L/min a 200°C. A voltagem dos cones do hexapolo e da câmara de colisão foram mantidos com 150 Vpp.

As amostras foram dissolvidas em MeOH numa concentração de 1mg/mL e filtradas em filtros PTFE 0,45 μ m, sendo que em cada análise eram injetados 40 μ L da amostra. Os padrões utilizados nas análises para comparação com os extratos brutos foram purificados e identificados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química da USP.

3.5. Análises por RMN de ^1H

Os extratos brutos foram dissolvidos na mesma concentração (7,0 mg em 700 μ L de solvente deuterado) em CDCl_3 contendo tetrametilsilano (TMS, 0,05% v/v) como padrão interno. A análise dos extratos brutos foram realizadas em triplicata e os espectros de RMN de ^1H foram obtidos na frequência de 500 MHz com 128 scans, PW = 8,0 μ s (30°) e RD = 6,0 s.

3.6. Análise de componentes principais

Os dados de RMN de ^1H foram processados utilizando o programa Mestre-C (versão 4.8.6.0, Mestrelab). A faixa de valores de deslocamento químico utilizada foi de δ 1,40-12,40 que foram reduzidas em intervalos de integração de igual valor (0,02 ppm). As intensidades absolutas dos intervalos integrados foram normalizadas pela área total e utilizadas para a análise multivariada. A região de δ 7,20-7,30 foi excluída da análise por fazer parte da região do sinal residual do clorofórmio. A análise de componentes principais foi realizada utilizando o programa The Unscrambler (versão 9.5, CAMO Process AS, Noruega).

3.7. Isolamento das substâncias

3.7.1. Ácidos benzoicos de *P. gaudichaudianum*

Raízes secas e trituradas (1,5 g) de *P. gaudichaudianum* foram extraídas utilizando AcOEt (3 X 60 mL) resultando em 295 mg de extrato bruto. O extrato bruto foi fracionado em coluna cromatográfica com sílica flash eluída em hexano com crescentes quantidades de AcOEt resultando em 41 frações (1-41). O ácido benzóico **2d** foi detectado nas frações 15-17 (23 mg) e essas frações reunidas foram submetidas a cromatografia de camada delgada preparativa (clorofórmio:AcOEt - 4:1, duas eluições) obtendo-se 11 mg de **2d**. O ácido benzóico **2e** (3 mg) foi obtido das frações 28 e 29 (12 mg) após purificação em cromatografia de camada delgada preparativa (clorofórmio:AcOEt - 9:1, duas eluições).

3.7.2. Éster de *P. permucronatum*

Para a obtenção da substância **4g**, folhas das plântulas de *P. permucronatum* (300 mg) liofilizadas e trituradas com N₂ líquido foram extraídas com AcOEt (3 X 30 mL), resultando em 60 mg de extrato bruto. O extrato bruto obtido foi submetido a cromatografia de camada delgada preparativa (hexano:AcOEt - 4:1, três eluições) obtendo-se 6 frações, sendo detectado em uma delas o isolamento de 5 mg da substância **4g**.

3.7.3. Isoasarona de *P. caldense*

Para o isolamento e identificação do constituinte majoritário das folhas das plântulas de *P. caldense* foi realizado o fracionamento cromatográfico do extrato bruto. O extrato bruto foi obtido pela extração das folhas das plântulas previamente liofilizadas (200 mg) e trituradas com N₂ líquido que foram extraídas utilizando AcOEt (3 X 20 mL), resultando em 45 mg de extrato bruto. O extrato bruto foi submetido a cromatografia de camada delgada preparativa tendo como eluente a mistura Hex:AcOEt (1:1, quatro eluições), sendo obtido 5 frações. Em uma dessas frações verificou-se o isolamento da isoasarona **1c** (3 mg).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do perfil químico das plântulas e plantas adultas de espécies de *Piper*

Para a análise do perfil químico de metabólitos secundários das espécies de *Piper* foram utilizados os extratos brutos das folhas das plântulas e das folhas de plantas adultas. Os extratos brutos foram submetidos a análise de componentes principais (PCA) a partir de dados obtidos por RMN de ^1H , além de análises por CLAE-UV-EM e CG-EM. Com as análises dos extratos brutos foram identificados três grupos principais de espécies de acordo o tipo de metabólitos secundários observado nas folhas nos diferentes estágios de desenvolvimento. O primeiro grupo apresentou espécies de *Piper* que produziam exclusivamente amidas nos dois estágios de desenvolvimento analisados. O segundo grupo possui espécies que nos estágios iniciais de desenvolvimento apresentaram o acúmulo majoritário de alilfenóis nas folhas enquanto as folhas no estágio adulto produziam outras classes de metabólitos como ácidos benzoicos prenilados, lignanas e neolignanas. O terceiro grupo é constituído por espécies que também apresentaram diferenciação do perfil químico nos diferentes estágios de desenvolvimento, indicando como constituintes majoritários a presença de lignanas ou flavonoides nas folhas adultas e nas folhas das plântulas a presença de amidas como principais constituintes.

4.1.1. Espécies de *Piper* que produzem amidas

Realizou-se a análise de componentes principais com os dados de RMN de ^1H dos extratos brutos das folhas das espécies *P. tuberculatum*, *P. amalago* e *P. reticulatum*. O gráfico de scores obtido (Figura 4A) com PC1 e PC2 (explicando 79 % da variância dos dados) mostrou que as folhas das plântulas e as folhas adultas dessas espécies de *Piper* possuem perfis metabólicos bem similares com exceção da *P. reticulatum* onde foi possível observar uma separação mais significativa entre as amostras das folhas das plântulas e as folhas adultas. De acordo com o gráfico de loadings (Figura 4B) as principais variáveis responsáveis pela separação das folhas de *P. tuberculatum* foram os deslocamentos químicos atribuídos à piplartina que foram observados em δ 3,86 e 3,88 (hidrogênios metoxílicos) e em δ 6,80 (hidrogênios aromáticos). Para as amostras de *P. amalago* foram observados valores em δ 5,92 que corresponde aos hidrogênios do grupo metilenodioxila da nigrinodina (**4d**). Adicionalmente, observou-se para as amostras de *P. reticulatum* valores em δ 5,86 e 3,74 relativos aos grupos metilenodioxila e metoxila da diidrowisanidina (**4e**). Também foram observados valores em δ 2,02 e 2,04 relativos aos hidrogênios metilênicos da cadeia carbônica insaturada da (3*E*, 5*E*, 14*E*)-*N*-pirrolidileicosa-3,5,14-trienamida (**4f**).

Figura 4. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de *P. tuberculatum*, *P. amalago* e *P. reticulatum*.

Figura 5. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados no gráfico de loadings.

As análises cromatográficas por CLAE-UV dos extratos brutos das folhas de *P. tuberculatum*, *P. amalago* e *P. reticulatum* (Figura 6) mostraram a presença predominante de amidas, sendo que as folhas das plântulas e as folhas adultas apresentaram um perfil metabólico bem similar entre os conjuntos. Observou-se a piplartina (**4a**) e nigrinodina (**4d**) como metabólitos majoritários de *P. tuberculatum* e *P. amalago*, respectivamente. Para *P. reticulatum* foi observado um perfil um pouco mais diferenciado, mas ainda com o predomínio de amidas, apresentando como constituinte principal para as folhas adultas a amida **4f** e para as folhas das plântulas a diidrowisanidina (**4e**). Os resultados apresentados pelas análises por CLAE-UV foram consistentes com os que haviam sido observados por PCA.

Figura 6. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV dos extratos brutos das folhas das plântulas e folhas adultas das espécies *P. tuberculatum*; *P. amalago*; e *P. reticulatum*.

As análises por CG-IE-EM dos extratos brutos das folhas das plântulas e folhas adultas de *P. tuberculatum*, *P. amalago* e *P. reticulatum* também confirmaram a presença dos metabólitos majoritários piplartina, nigrinodina e diidrowisanidina,

respectivamente. Os espectros de massas indicaram para a piplartina (Figura 7A) o íon molecular em m/z 317 e um pico base em m/z 221 correspondente a formação do íon acilium contendo a porção do anel aromático. No caso da nigrinodina (Figura 7B) observou-se o íon molecular em m/z 299 e um pico base em m/z 135 correspondente ao íon tropílio metilenodioxilado. Para a diidrowisanidina (Figura 7C) foi observado o íon molecular em m/z 303 e um pico base em m/z 165 correspondente ao íon tropílio substituído com um grupo metilenodioxila e uma metoxila.

Figura 7. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) dos metabólitos detectados nas plantas adultas e plântulas de *Piper* (A: piplartina, B: nigrinodina, C: diidrowisanidina).

4.1.2. Alilfenóis em plântulas de espécies de *Piper*

Inicialmente realizou-se a análise dos extratos brutos das espécies de *Piper* por análise de componentes principais (PCA) utilizando dados de RMN de ^1H com objetivo de verificar as possíveis diferenças comparando o perfil químico de folhas de plântulas e plantas adultas de espécies de *Piper*. As espécies analisadas foram *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. solmsianum*, *P. hemmendorffii* e *P. caldense*.

Através do gráfico de scores (Figura 8A) com PC1 e PC2 (explicando 61 % da variância dos dados) foi possível observar clara discriminação entre as folhas das plântulas e as folhas adultas das espécies de *Piper*. O gráfico de loadings (Figura 8B) observa-se as principais variáveis correspondentes aos deslocamentos químicos responsáveis pela separação das amostras que foram atribuídos aos hidrogênios dos metabólitos secundários encontrados nas amostras (Figura 9). Para as folhas adultas de *P. gaudichaudianum* verificou-se deslocamentos químicos correspondentes ao ácido gaudichaudiânico com valores em δ 1,40 relativos aos hidrogênios do grupo metila e também em δ 1,56, 1,64 e 1,72 relativos aos hidrogênios dos grupos prenila. Para as folhas adultas de *P. solmsianum* foram observados sinais relativos aos hidrogênios dos grupos metoxila da grandisina (**3a**) com valores em δ 3,82 e 3,88 e também de hidrogênios aromáticos em δ 6,62. Além disso, para as folhas adultas de *P. regnellii* foram observados sinais correspondentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios do conocarpano (**3b**) com valores em δ 1,86 pertencentes aos hidrogênios metílicos e em δ 6,74, 6,82, 7,12 e 7,30 correspondentes aos hidrogênios aromáticos. Já no caso das folhas das plântulas dessas espécies de *Piper* analisadas foram encontrados os deslocamentos químicos que foram atribuídos aos hidrogênios do apiol e dilapiol (**1b**) como os

responsáveis pela a distinção das amostras. Foram observados sinais para o apiol em δ 3,30, 3,84, 3,86, e 5,94 e para o dilapiol em δ 3,74, 4,00 e 5,88 (Figura 9).

Figura 8. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de *P. gaudichaudianum*; *P. regnellii*; *P. solmsianum*, *P. hemmendorffii* e *P. caldense*.

Figura 9. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados no gráfico de loadings.

As análises cromatográficas por CLAE-UV (Figura 10) dos extratos brutos das folhas adultas de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. solmsianum* e *P. caldense* mostraram o ácido gaudichaudiânico (**2a**) (Lago et al., 2004), o conocarpano (**3b**) (Benevides et al., 1999), a grandisina (**3a**) (Martins et al., 2000) e o ácido caldensínico (**2f**) (Freitas et al., 2009) como principais metabólitos secundários, respectivamente. Com as análises dos extratos brutos das folhas das plântulas foi observado como constituintes majoritários os fenilpropanoides isoasarona (**1c**) para *P. caldense* e apiol (**1a**) e dilapiol (**1b**) para as demais espécies analisadas.

Figura 10. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV dos extratos brutos de folhas de plântulas e folhas adultas das espécies *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. solmsianum*, *P. hemmendorffii* e *P. caldense*.

As análises por CG-IE-EM (Figura 11) dos extratos brutos das folhas de *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii* e *P. solmsianum* também revelaram os principais metabólitos secundários detectados anteriormente por CLAE-UV. A análise dos extratos brutos das folhas adultas revelou para *P. regnellii* um metabólito majoritário com íon molecular em m/z 266 compatível com o conocarpano (Pessini et al., 2005) e para *P. solmsianum* revelou um metabólito principal com íon molecular em m/z 432 compatível com a grandisina (Ramos et al., 2008). Já para o extrato bruto das folhas das plântulas também observou-se a predominância de fenilpropanoides. As análises dos extratos das folhas das plântulas das espécies apresentaram um pico majoritário com íon molecular em m/z 222 que foi atribuído ao apiol para *P. gaudichaudianum* e *P. solmsianum*, ao dilapiol para *P. regnellii* e *P. hemmendorffii* e íon molecular em m/z 208 atribuído à isoasarona (Santos et al., 1998) para *P. caldense*.

Essa diferenciação observada na produção de metabólitos secundários para essas espécies de *Piper* é bastante interessante do ponto de vista ecológico, pois há diversos estudos evidenciando que esses alilfenóis possuem atividade biológica contra insetos e microorganismos (Ferraz et al., 2010; Rafael et al., 2008; Razzaghi-Abyaneh et al., 2007). Isso leva a crer que este mecanismo seja uma possível estratégia de defesa contra fitopatógenos.

Figura 11. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) dos metabólitos detectados nas plantas adultas e plântulas de *Piper* (A: conocarpano, B: grandisina, C: apiol, D: dilapiol, E: isoasarona).

4.1.3. Padrão de produção de amidas em plântulas de *P. permucronatum* e *P. richardiaefolium*

As análises por PCA dos dados de RMN de ^1H das amostras de *P. permucronatum* e *P. richardiaefolium* foram realizadas por comparação com as espécies *Piper* que já tinham sido analisadas anteriormente, as quais já eram conhecidas os perfis metabólicos das folhas das plântulas e das folhas adultas. As comparações foram realizadas utilizando as amostras das folhas das plântulas e folhas adultas de *P. tuberculatum*. Com o gráfico de scores (Figura 12A) com PC1 e PC2 (explicando 76 % da variância dos dados) observou-se significativa discriminação entre as folhas das plântulas e as folhas adultas das espécies analisadas. A partir do gráfico de loadings (Figura 12B) foi possível observar as variáveis responsáveis pela distinção dos grupos, sendo observado que as folhas das plântulas de *P. permucronatum*, *P. richardiaefolium* e *P. tuberculatum* apresentaram agrupamento bem similar. Os valores de deslocamentos químicos observados para essas amostras foram atribuídos às amidas piperina (**4c**) e piplartina (**4a**), sendo confirmado posteriormente por análises cromatográficas. Para a piperina foram observados valores em δ 5,98 correspondente aos hidrogênios metilenodioxílicos e em δ 6,60 e 6,72 dos hidrogênios aromáticos. Os valores observados para a piplartina foram em δ 3,86 e 3,88 correspondentes aos hidrogênios metoxílicos e em δ 6,80 para os hidrogênios aromáticos (da Silva et al., 2002; Ee et al., 2009).

As variáveis que influenciaram na separação das folhas adultas de *P. permucronatum* foram atribuídas aos deslocamentos químicos dos hidrogênios da flavanona sakuranetina (**3i**), sendo observado valores de deslocamentos químicos

Figura 12. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de *P. permucronatum* e *P. richardiaefolium*.

Figura 13. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados no gráfico de loadings.

As análises cromatográficas por CLAE-UV (Figura 15) dos extratos brutos de *P. permucronatum* apresentaram para as folhas das plântulas dois metabólitos majoritários que não foram detectados no extrato das folhas adultas. O extrato bruto das folhas adultas apresentou como constituinte principal a flavanona sakuranetina confirmando o que foi evidenciado por PCA. Uma das substâncias encontradas no extrato bruto das folhas das plântulas de *P. permucronatum* foi identificada por análises de CG-IE-EM e CLAE-ESI-EM como sendo a amida isobutílica pelitorina (**4b**) de acordo com dados da literatura (Leitão da-Cunha and de Oliveira Chaves, 2001). Para a identificação da outra substância encontrada no extrato foi necessário o isolamento para posterior identificação e após a determinação estrutural (ver seção 4.3.2) a substância **4g** foi identificada como sendo um novo produto natural.

As análises por CLAE-UV dos extratos brutos de *P. richardiaefolium* indicaram para as folhas adultas a predominância de lignanas, sendo duas dibenzilbutirolactônicas e duas dibenzilbutirolactólicas. As lignanas já descritas foram identificadas com base nos dados descritos na literatura (Yamaguchi et al., 2011) correspondentes às lignanas hinokinina (**3g**), cubebina (**3e**), kusunokinina (**3f**) e **3h**. Para as folhas das plântulas foi encontrado um perfil bem diferente, apresentando constituição majoritário de amidas com piplartina (**4a**), pelitorina (**4b**), piperina (**4c**), piperina (**4c**).

Figura 14. Metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de *P. permucronatum* e *P. richardiaefolium*.

Figura 15. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas de *P. permucronatum*.

As análises de CG-EM dos extratos brutos das folhas das plântulas das folhas de *P. permucronatum* foram importantes para auxiliar na identificação dos metabólitos detectados sendo encontrados dois picos apresentando espectro de massas com ion molecular em m/z 223 (Figura 16A) e m/z 260 (Figura 16B) atribuídos às substâncias **4b** e **4g**, respectivamente. Para o extrato bruto das folhas adultas foi observado um pico majoritário com espectro de massas com ion molecular em m/z 286 (Figura 16C) sendo atribuído à sakuranetina (**3i**) conforme dados da literatura (Vinciguerra et al., 2003; Yamaguchi et al., 2011).

Figura 16. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) atribuídos aos metabólitos detectados nos extratos brutos das folhas das plântulas e das folhas adultas de *P. permucronatum* (A: **4b**, B: **4g**, C: **3i**).

As análises por CLAE-ESI-EM das folhas de *P. permucronatum* apresentaram espectros de massas (Figura 17) que confirmaram a identificação das substâncias detectadas nos extrato bruto. O espectro de massas de alta resolução no modo positivo de **4b** apresentou um pico atribuído ao íon protonado $[M+H]^+$ (calculado m/z = 224,2014) da pelitorina em m/z = 224,2032 e outro em m/z = 246,1825 atribuído ao seu íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado m/z = 246,1833) que se mostraram compatíveis com a fórmula molecular $C_{14}H_{25}NO$. O espectro de massas de alta resolução no modo positivo de **4g** apresentou um pico com m/z = 261,1118 um pico atribuído ao seu íon protonado $[M+H]^+$ (calculado m/z = 261,1126) e outro em m/z = 283,0937 que foi atribuído ao íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$

(calculado $m/z = 283,0946$) compatível com uma substância de fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_4$.

Figura 17. Espectros de massas de alta resolução no modo positivo atribuídos aos metabólitos secundário detectados no extrato das folhas das plântulas de *P. permucronatum*.

As análises dos extratos brutos de *P. richardiaefolium* por CG-EM mostrou para as folhas adultas a predominância de lignanas, sendo detectadas duas dibenzilbutirolactônicas e duas dibenzilbutirolactólicas. As lignanas foram identificadas conforme os dados descritos na literatura (Elfahmi et al., 2007; Okunishi et al., 2000; Yamaguchi et al., 2011) onde observou-se picos que apresentaram espectros de massas (Figura 18) com íons moleculares em m/z 354, 356, 370 e 372 correspondentes às lignanas já descritas hinokinina (**3g**), cubebina (**3e**), kusunokinina (**3f**) e **3h**, respectivamente.

Figura 18. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) atribuídos às lignanas detectadas nas folhas adultas de *P. richardiaefolium*. (A: cubebina, B: hinokinina, C: kusunokinina, D: **3h**).

Com as análises do extrato bruto das folhas das plântulas, foi possível observar picos cujos espectros de massas (Figura 19) indicavam a predominância de amidas. Algumas dessas amidas apresentaram padrão de fragmentação bem similar às que já foram isoladas em outras espécies de *Piper*. Detectou-se um pico com espectro de massas (Figura 19B) de íon molecular em m/z 285 e que segundo a biblioteca eletrônica de substâncias (Wiley 229) trata-se da piperina (**4c**) apresentando similaridade de 93%, sendo que também foram detectados outros 2 picos com o mesmo padrão de fragmentação e que foram atribuídos à isômeros da

piperina (Ternes and Krause, 2002). Outras amidas detectadas que chamaram a atenção foram aquelas com espectros de massas (Figura 19A e Figura 19C) que apresentaram íons moleculares em m/z 317 e 223 as quais o padrão de fragmentação mostrou tratar-se da piplartina (**4a**) (Chang-Yih et al., 1990) e da pelitorina (**4b**) (Leitão da-Cunha and de Oliveira Chaves, 2001).

Figura 19. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) atribuídos às amidas detectadas nas folhas das plântulas de *P. richardiaefolium* (A: pelitorina, B: piperina, C: piplartina).

As análises por CLAE-ESI-EM confirmaram o que já havia sido observado anteriormente com as outras técnicas de análise, ou seja, revelaram metabólitos com espectros de massas (modo positivo) indicando o predomínio de lignanas para as folhas adultas (Figura 20) e de amidas para as folhas das plântulas (Figura 21). A presença das lignanas foi confirmada observando os espectros de massas de alta resolução (modo positivo) das substâncias detectadas no extrato bruto das folhas adultas. Para a hinokinina (**3g**) observou-se um pico em $m/z = 379,1151$ (Figura 20A) atribuído ao seu íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado $m/z = 379,1157$), para a cubebina (**3e**) foi observado um pico em $m/z = 355,1166$ (Figura 20B) correspondente ao seu íon protonado $[M+H]^+$ (calculado $m/z = 355,1181$) e em $m/z = 377,0990$ atribuído ao seu íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado $m/z = 377,1001$). Para a kusunokinina (**3f**), detectou-se um pico em $m/z = 371,1488$ (Figura 20C) correspondente ao seu íon protonado $[M+H]^+$ (calculado $m/z = 371,1494$) e em $m/z = 393,1314$ atribuído ao seu íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado $m/z = 393,1314$), já para a lignana **3h**, observou-se um pico em $m/z = 395,1474$ (Figura 20D) atribuído ao seu íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado $m/z = 395,1470$) (Messiano et al., 2008).

Figura 20. Espectros de massas de alta resolução no modo positivo das lignanas encontradas no extrato das folhas adultas de *P. richardiaefolium* (A: cubebina, B: hinokina, C: kusunokina, D: **3h**).

O espectro de massas de alta resolução no modo positivo de **4c** (Figura 21A) apresentou um pico atribuído ao seu íon protonado $[M+H]^+$ (calculado m/z = 286,1443) da piperina em m/z = 286,1448 e outro em m/z = 308,1261 atribuído ao íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado m/z = 308,1263) que se mostraram compatíveis com a fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_3$. Observou-se também outros metabólitos com espectros de massas bem similares e que provavelmente pertencem à isômeros e derivados da piperina. Os picos supostamente pertencentes aos íons protonados $[M+H]^+$ dessas amidas foram observados nos espectros de alta

resolução em $m/z = 284,1217$, $286,1448$ e $288,1611$. O espectro de massas de alta resolução no modo positivo de **4a** (Figura 21B) apresentou um pico com $m/z = 340,1158$ que foi atribuído ao seu íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado $m/z = 340,1161$) da piplartina sendo compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_5$.

Figura 21. Espectros de massas de alta resolução no modo positivo atribuídos às amidas detectadas nas folhas das plântulas de *P. richardiaefolium* (A: piperina; B: piplartina).

4.2. Variações ontogenéticas e perfil químico das folhas das plântulas de espécies de *Piper*

Com o objetivo de acompanhar as alterações com a produção de metabólitos secundários ao longo do desenvolvimento das plântulas das espécies de *Piper*, foram selecionadas algumas espécies em que observou-se a diferenciação dos perfis metabólicos entre as plantas adultas e as respectivas plântulas. As espécies de *Piper* monitoradas periodicamente foram *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. solmsianum* e *P. caldense*.

4.2.1. *P. gaudichaudianum*

O monitoramento periódico do metabolismo secundário de *P. gaudichaudianum* foi realizado a partir de coletas das folhas das plântulas em períodos de 3 meses, partindo de 6 meses até 15 meses de idade. Para a análise das amostras utilizou-se análise de componentes principais utilizando dados de RMN de ^1H dos extratos brutos.

O gráfico de scores (Figura 22A) com PC1 e PC2 (explicando 86% da variância dos dados) mostrou clara discriminação entre as folhas das plântulas e as folhas adultas. O gráfico de loadings (Figura 22B) mostrou as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos. Observa-se para as folhas das plântulas valores correspondentes aos deslocamentos químicos do apiol em δ 3,84 e 3,86 relativos aos grupos metoxila e em δ 5,94 relativo ao grupo metilenodioxila. Para as folhas adultas foram observados valores em δ 1,40 relativos ao grupo metila e também em δ 1,64 e 1,72 relativos aos grupos prenila.

Figura 22. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais das amostras de *P. gaudichaudianum* (folhas adultas e folhas das plântulas em diversos estágios).

As análises por CLAE-UV (Figura 24) das folhas adultas indicaram que o principal constituinte é o ácido gaudichaudiânico o que já havia sido indicado com a análise por PCA. Para as folhas das plântulas com 6 meses de idade foi observado o apiol como componente majoritário no extrato bruto. O perfil cromatográfico do extrato das folhas com 9 meses de idade apresentou ainda o apiol com constituinte principal mas com quantidade relativa menor. Analisando o extrato bruto das folhas com 12 meses de idade observou-se além do apiol a presença de dilapiol e também em pequena proporção relativa o ácido gaudichaudiânico. Para o extrato bruto das folhas com 15 meses de idade foi possível observar o aumento na proporção relativa de ácido gaudichaudiânico e diminuição na proporção do apiol e dilapiol. Além disso, nesse estágio foi detectada a presença de algumas substâncias (**2d** e **2e**) que não apareceram em outros estágios e tão pouco nas plantas adultas. Essas substâncias foram isoladas e caracterizadas como sendo dois novos produtos naturais (ver seção 4.3.1).

Figura 23. Metabólitos secundários identificados nos extratos brutos (folhas) de *P. gaudichaudianum*.

Figura 24. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de *P. gaudichaudianum* ($\lambda = 260$ nm).

Utilizando-se PCA e dados de RMN de ^1H e também com o auxílio de análises por CLAE-UV para o monitoramento periódico ao longo do desenvolvimento das folhas de *P. gaudichaudianum* foi possível evidenciar as mudanças metabólicas ocorridas durante o crescimento da planta, mostrando assim que o acúmulo de ácido gaudichadiânico nas folhas é iniciado por volta de 12 meses de idade.

4.2.2. *P. regnellii*

O monitoramento periódico do perfil químico das folhas das plântulas de *P. regnellii* foi realizado com o objetivo de acompanhar as variações ocorridas com a produção de metabólitos secundários durante o desenvolvimento das plântulas. Para tal foram analisadas folhas das plântulas em períodos de 3 meses, iniciando aos 3 meses e prosseguindo até 15 meses de idade. Foram obtidos espectros de RMN de ^1H (500 MHz) dos extratos brutos cujos dados foram submetidos a análise de componentes principais.

O gráfico de scores (Figura 25A) com PC1 e PC2 (explicando 80% da variância dos dados) indicou clara distinção entre as folhas das plântulas e as folhas adultas. O gráfico de loadings (Figura 25B) mostrou quais foram as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos. Observou-se para as folhas das plântulas valores correspondentes aos deslocamentos químicos do dilapiol (Figura 26), sendo observado valores em δ 3,74 e 4,00 atribuídos aos grupos metoxílicos, em δ 5,88 relativo ao grupo metilenodioxílico e em δ 3,30 para o grupo metilênico. Para as folhas adultas foram observados sinais correspondentes aos deslocamentos químicos do conocarpano em δ 1,84 atribuído ao grupo metílico e também em δ 6,82 e 7,12 relativos a hidrogênios aromáticos.

Figura 25. Gráficos de scores e de loadings da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de *P. regnellii* (folhas adultas e folhas das plântulas em diversos estágios).

Figura 26. Estruturas dos metabólitos secundários e atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H encontrados no gráfico de loadings de PCA das amostras de *P. regnellii*.

As análises por CLAE-UV (Figura 27) das folhas adultas mostraram que os constituintes principais são neolignanas como o conocarpano (**3b**) e os eupomatenoides 6 (**3c**) e 5 (**3d**), sendo que a presença do conocarpano já havia sido indicada pela análise por PCA. Para as folhas das plântulas com 3 meses de idade foi observado o dilapiol como componente majoritário no extrato bruto. O perfil cromatográfico do extrato das folhas com 6 meses de idade apresentou ainda o dilapiol como constituinte principal. Analisando-se o extrato bruto das folhas com 9 meses de idade além de dilapiol, observou-se também em pequena proporção relativa a presença das neolignanas conocarpano, eupomatenoides 5 e 6. Para o extrato bruto das folhas com 12 meses de idade foi possível observar o aumento na proporção relativa das neolignanas além do surgimento de outros picos minoritários. O perfil cromatográfico do extrato das folhas com 15 meses de idade foi o que apresentou a maior riqueza de picos, sendo que nesse estágio observou-se o aumento na proporção relativa das neolignanas (**3b**, **3c** e **3d**) em relação ao dilapiol.

Figura 27. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de *P. regnellii*.

Figura 28. Metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de *P. regnellii* em diversos estágios de desenvolvimento.

Através de análises por espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons e com ionização por electrospray foram obtidos dados (Tabela 2) que foram utilizados para a identificação dos metabólitos encontrados nos extratos brutos.

Tabela 2. Metabólitos secundários detectados nos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de *P. regnellii*.

Metabólitos	Tempo de retenção (min)	UV $\lambda_{\max}$ (nm)	Íons fragmentos observados	
			IE-EM (m/z)	ESI-EM+ (m/z)
apiol (1a)	17,4	207, 277	222 [M^+], 177, 149, 121, 106, 91	245 [$M+Na$], 223 [$M+H$], 208, 193, 182, 167, 150
dilapiol (1b)	17,9	205, 286	222 [M^+], 207, 177, 149, 133, 121, 106	245 [$M+Na$], 223 [$M+H$], 208, 193, 182, 167, 150
conocarpano (3b)	22,5	263, 301	266 [M^+], 251, 237, 223, 207, 181, 172, 159, 145	267 [$M+H$], 218, 175, 149
eupomatenóide-6 (3c)	25,7	224, 254, 294	-	265 [$M+H$], 251, 237, 221, 205, 179, 172, 159,
eupomatenóide-5 (3d)	25,8	225, 254, 309	294 [M^+], 279, 267, 251, 235, 207, 178, 165, 152	295 [$M+H$], 267, 217, 173, 149

4.2.3. *P. solmsianum*

O monitoramento periódico do perfil químico das folhas das plântulas de *P. solmsianum* foi realizado com o objetivo de verificar as possíveis variações da produção de metabólitos secundários durante o desenvolvimento das plântulas. Para o monitoramento foram coletadas as folhas das plântulas em intervalos de 3 meses, com a primeira coleta sendo aos 3 meses de idade e prosseguindo até os 15 meses. Para a análise das amostras foram utilizados os dados de RMN de ^1H (500 MHz) dos extratos os quais foram submetidos a análise de componentes principais.

O gráfico de scores (Figura 29A) com PC1 e PC2 (explicando 89% da variância dos dados) indicou significativa discriminação entre as folhas das plântulas e as folhas adultas. O gráfico de loadings (Figura 29B) revelou as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos, sendo observado para as folhas das plântulas valores correspondentes aos deslocamentos químicos do apiol (**1a**). Os valores observados foram em δ 3,84 atribuído aos hidrogênios do grupo metoxílico, em δ 5,94 relativo ao grupo metilenodioxílico e em δ 3,30 para os hidrogênios do grupo metilênico. Também foram observados para as folhas das plântulas valores de deslocamentos químicos correspondentes a miristicina (**1d**) em δ 5,92 (hidrogênios metilenodioxílicos), δ 5,04 (hidrogênios olefínicos) e δ 3,28 (hidrogênios metilênicos). Para as folhas adultas foram observados sinais correspondentes aos deslocamentos químicos da grandisina (**3a**) em δ 6,62 atribuído a hidrogênios aromáticos e também em δ 3,82 e 3,88 correspondentes aos grupos metoxíla.

Figura 29. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de *P. solmsianum* (folhas adultas e folhas das plântulas em diversos estágios).

Figura 30. Estruturas dos metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de *P. solmsianum* e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados.

O cromatograma das análises por CLAE-UV (Figura 31) das folhas adultas mostrou como principais constituintes a lignana grandisina (**3a**) e o alilfenol miristicina (**1d**), sendo que a presença desses metabólitos já havia sido verificada por PCA. As análises dos extratos bruto das folhas das plântulas com 3 e 6 meses de idade apresentaram o apiol (**1a**) como constituinte majoritário o qual também havia sido evidenciado por PCA. Os perfis cromatográficos dos extratos das folhas com 9 e 12 meses de idade também apresentaram o apiol como constituinte principal além de traços de miristicina (**1d**) e elemicina (**1e**). Com a análise do extrato bruto das folhas com 15 meses de idade observou-se a maior diversidade de picos mas ainda apresentando o apiol como majoritário. Neste estágio também observou-se o início da acumulação de grandisina que é o constituinte majoritário das folhas adultas e além disso, foi observado a presença de elemicina e miristicina.

Figura 31. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de *P. solmsianum*.

Figura 32. Metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de *P. solmsianum*.

Os extratos brutos das folhas das plântulas e das folhas adultas de *P. solmsianum* foram também analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico (CG-IE-EM). A análise por CG-EM dos extratos brutos folhas de 3 a 12 meses de idade apresentou um pico majoritário em que o espectro de massas (Figura 33A) apresentou íon molecular em m/z 222 compatível com a massa molecular do apiol, estando também de acordo com os resultados observados por PCA e CLAE-UV. Para os extratos das folhas de 6, 9 e 12 meses de idade foi observado o surgimento de um pico com espectro de massas (Figura 33B) de íon molecular em m/z 192 que foi atribuído à miristicina (**1d**). Adicionalmente, observou-se que nos extratos das folhas de 9 e 12 meses surgiu um pico que foi atribuído a elemicina, identificada pelo espectro de massas (Figura 33C) que revelou um íon fragmentário em m/z 208 correspondente ao seu íon molecular. A análise do extrato bruto das folhas com 15 meses apresentou picos correspondentes a íons moleculares em m/z 192, 208, 222 e 432 que foram atribuídos a miristicina (**1d**), elemicina (**1e**), apiol (**1a**) e grandisina (**3a**), respectivamente. A elemicina foi identificada (com 92% de similaridade) de acordo com a biblioteca eletrônica de substâncias (Wiley 229) disponível no equipamento e também de acordo com o padrão de fragmentação observado.

Figura 33. Espectros de massas (ionização por impacto eletrônico) dos metabólitos secundários encontrados nos extratos brutos das folhas de *P. solmsianum* (A: apiol, B: miristicina, C: elemicina, D: grandisina).

As análises por CLAE-ESI-EM dos extratos brutos das folhas de *P. solmsianum* também confirmaram a presença dos metabólitos observados anteriormente. As análises do extrato das folhas das plântulas de *P. solmsianum* apresentaram um pico majoritário cujo espectro de massas (Figura 34A) apresentou um pico em $m/z = 245,0780$ que foi atribuído ao íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado $m/z = 245,0789$) do apiol e a partir desse dado foi deduzida a fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_4$ compatível com a do apiol. Além disso, foi possível observar a presença elemicina em parte dos extratos brutos analisados, conforme já havia sido anteriormente constatado. A elemicina apresentou espectro de massas (Figura 34B) com seu íon protonado $[M+H]^+$ (calculado $m/z = 209.1158$) em $m/z = 209,1146$ e íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado $m/z = 231.0997$) em $m/z = 231,0987$. Para os extratos brutos das folhas com 15 meses de idade e das folhas adultas foram detectados picos correspondentes a grandisina que apresentaram espectro de massas (Figura 34C) com picos correspondentes ao seu íon protonado $[M+H]^+$ (calculado $m/z = 433,2226$) em $m/z = 433,2217$ e ao íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ (calculado $m/z = 455.2046$) em $m/z = 455,2073$ de onde pode-se deduzir a fórmula molecular $C_{24}H_{32}O_7$.

Figura 34. Espectro de massas de alta resolução no modo positivo das substâncias: apiol (A), elemicina (B) e grandisina (C).

Com o auxílio das análises por espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons e com ionização por electrospray foram obtidos dados que foram utilizados para a identificação dos metabólitos encontrados nos extratos brutos (Tabela 3). Até o momento não foi possível identificar alguns dos metabólitos minoritários detectados nos extratos, sendo necessário o fracionamento dos extratos para posterior caracterização.

Tabela 3. Dados dos metabólitos secundários detectados nos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de *P. solmsianum*.

Metabólitos	Tempo de retenção (min)	UV $\lambda_{\max}$ (nm)	Íons fragmentos observados	
			IE-EM (m/z)	ESI-EM+ (m/z)
apiol (1a)	24,2	223, 277	222 [M^+], 177, 149, 121, 106, 91	245 [$M+Na$], 223 [$M+H$], 208, 193, 182, 167, 150
miristicina (1d)	26,7	267	192 [M^+], 177, 161, 147, 131, 119, 103, 91	-
grandisina (3a)	25,6	236, 269	432 [M^+], 236, 224, 208, 190, 168, 146, 121	455 [$M+Na$], 433 [$M+H$], 415, 401, 349, 305, 289, 265, 247, 232, 216, 181
elemicina (1e)	22,0	264	208 [M^+], 193, 177, 150, 133, 105, 91, 77	231 [$M+Na$], 209 [$M+H$], 194, 179, 168, 163, 153, 147, 133

4.1.4. *P. caldense*

O monitoramento periódico durante o desenvolvimento das plântulas de *P. caldense* foi realizado a partir da coletas das folhas das plântulas em períodos de 3 meses, partindo de 3 meses até 15 meses de idade. Para a análise das amostras utilizou-se inicialmente análise de componentes principais utilizando dados de RMN de ^1H dos extratos brutos.

O gráfico de scores (Figura 35A) com PC1 e PC2 (explicando 79% da variância dos dados) evidenciou clara distinção entre as folhas das plântulas e as folhas adultas. O gráfico de loadings (Figura 35B) mostrou as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos. Observou-se para as folhas das plântulas valores correspondentes aos deslocamentos químicos da isoasarona (Figura 36). Foram observados valores em δ 3,80, 3,82 e 3,88 pertencentes aos hidrogênios dos grupos metoxila, em δ 3,32 relativo aos hidrogênios alílicos e ainda em δ 6,52 e 6,68 pertencentes aos hidrogênios aromáticos (Santos et al., 1998). Para as folhas adultas foram observados valores correspondentes aos deslocamentos químicos do ácido caldensínico (Figura 36). Observou-se valores em δ 1,56, 1,62, 1,64 e 1,72 relativos a hidrogênios de grupos metila pertencentes a unidades prenila. Também observou-se sinais de hidrogênios metilênicos das unidades prenila em δ 2,04, 2,12, 2,22, 3,36 e 1,72 (Freitas et al., 2009).

Figura 35. Gráficos de scores (A) e de loadings (B) da análise de componentes principais dos dados de RMN de ^1H das amostras de *P. caldense* (folhas adultas e folhas das plântulas em diversos estágios).

Figura 36. Estruturas dos metabólitos secundários identificados nos extratos brutos das folhas de *P. caldense* e atribuição dos deslocamentos químicos encontrados.

As análises por CLAE-UV (Figura 37) das folhas adultas indicaram que o principal constituinte é o ácido caldensínico (**2f**) o que já havia sido indicado com a análise por PCA. Para as folhas das plântulas com 3 meses de idade foi observado um constituinte majoritário que não havia sido detectado no extrato das folhas adultas. O metabólito secundário foi identificado como sendo a isoasarona (**1c**) (Santos et al., 1998). Para os extratos brutos das folhas com 6, 9 e 12 meses também foi observado a isoasarona como sendo o constituinte majoritário sendo que para o extrato das folhas com 12 meses foi detectado um pico minoritário indicando o início do acúmulo do ácido caldensínico pelas folhas de *P. caldense* (Freitas et al., 2009).

Figura 37. Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas adultas e das folhas das plântulas em diversos estágios de *P. caldense* ($\lambda = 260$ nm).

4.3. Determinação estrutural das substâncias isoladas

4.3.1. Ácidos benzoicos prenilados de *P. gaudichaudianum*

➤ Ácido benzoico 2d

O fracionamento cromatográfico para o isolamento dos metabólitos não identificados das folhas de *P. gaudichaudianum* com 15 meses de idade foi realizado após a comparação com o extrato das raízes adultas onde foi observado a presença de algumas das substâncias de interesse. O extrato bruto das raízes adultas foi submetido a coluna cromatográfica em sílica flash da qual obteve-se 40 frações. Utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector no UV-visível foi possível detectar o isolamento da substância **2d**. O espectro na região do UV-visível de **2d** apresentou máximos de absorção em 202, 242, 269 e 340 nm (Figura 39).

A fração contendo a substância **2d** (Figura 38) foi submetida a análise por espectrometria de massas de alta resolução e RMN de ^1H para a caracterização de sua estrutura. O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 40) mostrou um pico correspondente ao seu íon desprotonado $[\text{M-H}]^-$ com $m/z = 355,1916$ (calculado $m/z = 355,1909$) e a partir dessa informação foi deduzida a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$ para a substância.

Figura 38. Cromatograma (CLAE-UV) da fração contendo a substância **2d**.

Figura 39. Curva no UV-visível da substância **2d**.

Figura 40. Espectro de massas de alta resolução no modo negativo da substância **2d**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 41) da substância **2d** mostrou sinais bem característicos que possuíam um padrão muito parecido com o espectro do ácido gaudichaudiânico (**2a**). Foram observados singletos característicos em δ 1,65; 1,73 e 1,77 relativos as metilas dos grupos prenila e em δ 2,23 referente a uma metila ligada a um carbono olefínico conjugado a uma carbonila. O hidrogênio olefínico ligado ao carbono α a carbonila foi detectado como um singlete em δ 6,85. Foram detectados dois dubletos atribuídos a hidrogênios na região dos aromáticos em δ 8,45 e 8,01 com padrão *meta* de substituição ($J = 1,8$ Hz). Os dois tripletos referentes aos hidrogênios olefínicos de grupos prenila foram observados em δ 5,34 e 5,13 ($J = 7,4$ Hz). Também foram observados um dublete em δ 3,39 ($J = 7,4$ Hz) correspondente aos hidrogênios adjacentes ao carbono olefínico do grupo prenila e um singlete referente a um hidrogênio bem desprotegido em δ 13,80 que possivelmente deve ser de uma hidroxila aromática adjacente a um carbono com uma carbonila substituída. De acordo com os dados obtidos por RMN de ^1H foi possível propor uma estrutura (Tabela 4) compatível com o resultado observado por espectrometria de massas.

Os dados de RMN de ^{13}C (Tabela 4) mostraram sinais característicos, onde foi observado um carbono de carbonila α , β - insaturada em δ 196,3 e de carboxila conjugada ao anel aromático em δ 171,5. Os carbonos aromáticos foram encontrados em δ 130,9 (C-2), δ 136,1 (C-6), δ 119,2 (C-1 carboxila), δ 119,6 (grupo prenila), δ 166,0 (hidroxila) e δ 131,5 (carbonila conjugada). O carbono metílico ligado à posição β - carbonila foi apresentado em δ 20,3 e o carbono metilênico em δ 41,9. Os carbonos α - e β - carbonílicos foram observados em δ 118,8 e δ 163,0, respectivamente. Os carbonos do grupo prenila ligado ao anel aromático foram

observados em δ 134,0 (carbono olefínico 3''), δ 120,9 (carbono olefínico 2''), δ 27,7 (carbono metilênico), δ 25,7 (carbono metílico 4'') e δ 17,8 (carbono metílico 5''). Os carbonos do outro grupo prenila foram observados em δ 133,0 (carbono olefínico 7'), δ 122,8 (carbono olefínico 6'), δ 26,2 (carbono metilênico 5'), δ 25,9 (carbono metílico 8') e δ 17,9 (carbono metílico 9').

O experimento de HMBC auxiliou na determinação da posição de ligações dos grupos prenila em relação ao anel aromático e à de carbonila α , β - insaturada. O espectro de HMBC apresentou as correlações (Figura 42) entre os sinais em 3,39 (H-1'') e δ 130,9 (C-6), entre 5,34 (H-2'') e 119,6 (C-5), entre 2,35 (H-4') e 122,8 (C-6') e entre 6,85 (H-2') e 131,5 (C-3) (Gaia et al., 2014).

Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **2d**.

Figura 42. Correlações de HMBC observadas para a substância **2d**.

Figura 43. Correlações no HMBC (500 MHz) da substância **2d**.

➤ Ácido benzoico **2e**

Analisando-se outras frações obtidas com o fracionamento cromatográfico do extrato das raízes de *P. gaudichaudianum* foi possível detectar mais uma substância que ainda não havia sido identificada. Utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector na região do UV-visível foi possível detectar o isolamento da substância **2e** (Figura 44). O espectro na região do UV-visível de **2e** apresentou máximos de absorção em 243 e 339 nm (Figura 45).

Figura 44. Cromatogramas do extrato bruto das folhas de *P. gaudichaudianum* (15 meses) e da fração contendo a substância **2e**.

Figura 45. Curva no UV-visível da substância **2e**.

A fração contendo a substância **2e** foi submetida a análise por espectrometria de massas de alta resolução, RMN de ^1H e de ^{13}C para a caracterização de sua estrutura. O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 46) revelou um pico correspondente ao seu íon desprotonado $[\text{M-H}]^-$ com $m/z = 355,1927$ (calculado $m/z = 355,1909$) e a partir dessa informação foi deduzida a

fórmula molecular $C_{22}H_{28}O_4$ para a substância, sendo a mesma fórmula molecular encontrada para a substância **2d**.

Figura 46. Espectro de massas de alta resolução no modo negativo da substância **2e**.

Além disso, o espectro de RMN de 1H obtido da fração contendo **2e** (Figura 47) apresentou sinais bem similares com os encontrados para a substância **2d**, sugerindo ser um possível isômero. Observou-se singletos intensos em δ 1,64; 1,73 e 1,77 atribuídos às metilas dos grupos prenila e em δ 2,08 referente a uma metila ligada a um carbono na posição β conjugado a uma carbonila. O hidrogênio olefínico ligado ao carbono α a carbonila foi observado como um singlete em δ 6,84. Foram detectados dois dubletos atribuídos a hidrogênios na região dos aromáticos em δ 8,46 e 8,02 com padrão *meta* de substituição ($J = 2,0$ Hz), assim como o apresentado para **2d**. Os dois tripletos referentes aos hidrogênios olefínicos de grupos prenila foram observados em δ 5,34 ($J = 7,0$ Hz) e 5,15 ($J = 7,5$ Hz). Também foram observados um dublete em δ 3,39 ($J = 7,5$ Hz) correspondente aos hidrogênios adjacentes ao carbono olefínico do grupo prenila e um singlete atribuído a um hidrogênio bem desprotegido em δ 13,82 que provavelmente deve ser de uma hidroxila aromática adjacente a um carbono com uma carbonila substituída. Adicionalmente, observou-se dois sinais que foram importantes para a proposta da

estrutura de **3b**, sendo um multiplete em δ 2,23 e um triplete em δ 2,65 ($J = 7,5$ Hz) correspondentes a hidrogênios metilênicos adjacentes a carbonos olefínicos.

Com os dados de RMN de ^{13}C (Tabela 5) observou-se sinais bem similares aos observados para a substância **2d**, como um carbono de carbonila α , β insaturada em δ 196,2 e de carboxila ligada a anel aromático em δ 169,6. Os carbonos aromáticos foram encontrados em δ 131,1 (C-2), δ 136,3 (C-6), δ 119,4 (C-1 carboxila), δ 120,1 (C-5 prenila), δ 166,1 (C-4 hidroxila) e δ 131,7 (C-3 carbonila conjugada). O carbono metílico ligado à posição beta carbonila foi apresentado em δ 26,6 e o carbono metilênico em δ 35,0. Os carbonos alfa e beta carbonílicos foram observados em δ 119,8 e δ 163,0, respectivamente. Os carbonos do grupo prenila ligado ao anel aromático foram observados em δ 134,2 (C-3'' olefínico), δ 121,2 (C-2'' olefínico), δ 28,0 (C-1'' metilênico), δ 26,1 (C-4'' metílico) e δ 18,1 (C-5' metílico'). Os carbonos do outro grupo prenila foram observados em δ 133,0 (C-7' olefínico), δ 123,7 (C-6' olefínico), δ 27,2 (C-5' metilênico), δ 25,9 (C-8' metílico) e δ 17,9 (C-9' metílico).

Baseado nos dados obtidos por RMN de ^1H , de ^{13}C e por espectrometria de massas foi proposta a estrutura para a substância **2e** (Tabela 5) que também é um novo produto natural. Em contraste com **2d**, o carbono C10' (δ 26,6) é mais desprotegido o que sugere que o grupo metila tem configuração *trans* em relação a carbonila sendo caracterizado como o isômero *Z* de **2d** em relação a dupla ligação entre os carbonos 2' e 3'.

Figura 47. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **2e**.

O experimento de HMBC auxiliou na determinação da posição de ligações dos grupos prenila em relação ao anel aromático e à de carbonila α , β insaturada. O espectro de HMBC apresentou as correlações (Figura 48) entre os sinais em 3,39 (H-1'') e δ 136,3 (C-6), entre 5,34 (H-2'') e 120,1 (C-5), entre 2,65 (H-4') e 123,7 (C-6') e entre 6,84 (H-2') e 131,7 (C-3) (Gaia et al., 2014).

Figura 48. Correlações de HMBC observadas para a substância **2e**.

Figura 49. Correlações no HMBC (500 MHz) da substância **2e**.

4.3.2. Metabólitos secundários de *P. permucronatum*

Para a identificação de **4g** foi realizado o fracionamento cromatográfico do extrato das folhas das plântulas de *P. permucronatum* utilizando cromatografia de camada delgada preparativa, tendo como eluente a mistura Hex:AcOEt (7:3) onde foram obtidas 3 frações. Obteve-se uma fração concentrada contendo a substância **4g** de acordo com a análise por CLAE-UV (Figura 50).

Figura 50. Cromatograma (CLAE-UV) da fração contendo a substância **4g**.

A fração contendo a substância foi submetida a análise por espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-ESI-EM) e o espectro de massas de alta resolução no modo positivo de **4g** (Figura 51) mostrou um pico correspondente ao seu íon protonado $[M+H]^+$ em $m/z = 261,1118$ (calculado $m/z = 261.1127$) e outro pico correspondente ao íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ em $m/z = 283,0937$ (calculado $m/z = 283.0946$) e a partir dessa informação foi deduzida a fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_4$.

Figura 51. Espectro de massas de alta resolução no modo positivo das substância **4g**.

O espectro na região do UV-visível de **4g** apresentou máximos de absorção em 262 e 259 nm, respectivamente (Figura 52).

Figura 52. Curva no UV-visível da substância **4g**.

O extrato bruto das folhas das plântulas também foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico (CG-IE-EM) e revelou dois picos com íons moleculares em m/z 223 e 260, confirmando o que havia sido observado com as análises de espectrometria de massas de alta resolução. O espectro de massas referente à substância **4g** (Figura 53) apresentou um pico base em m/z 135, assim como o observado para a análise com ionização por electrospray.

Figura 53. Espectro de massas (ionização por impacto eletrônico) da substância **4g**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 54) mostrou um singlete intenso em δ 3,73 atribuído aos hidrogênios de uma metoxila de um éster e um singlete em δ 5,93 atribuído aos hidrogênios de um grupo metilenodioxílico. Também foram observados um dubleto em δ 5,79 ($J = 15,0$ Hz) e um multiplete em δ 6,09 correspondentes a hidrogênios olefínicos. Sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos foram observados como um dubleto em δ 6,73 ($J = 8,0$ Hz), um dubleto em δ 6,66 ($J = 1,5$ Hz) e um duplo dubleto em δ 6,66 ($J = 1,5$ e $8,0$ Hz) mostrando um padrão de anel aromático trissubstituído. Com os dados obtidos foi proposto a provável estrutura para a substância **4g** (Tabela 6).

Tabela 6. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **4g**.

Posição	δ ^1H , (J em Hz)	δ ^{13}C
1	-	134,9
2	6,66 (1H, d, 1,5)	108,8
3	-	147,4
4	-	146,1
5	6,73 (1H, d, 8,0)	108,2
6	6,61 (1H, dd, 8,0 e 1,5)	121,2
7	2,67 (2H, t, 7,5)	34,8
8	2,44 (2H, m)	35,0
9	6,14 (1H, m)	143,2
10	6,14 (1H, m)	129,0
11	7,25 (1H, dd, 15,0 e 10,0)	145,7
12	5,79 (1H, d, 15,0)	119,2
13	-	167,2
13-OMe	3,73 (3H, s)	51,5
O-CH ₂ -O	5,93 (2H, s)	100,8

Figura 54. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **4g**.

Com o experimento de HMBC foi possível observar as correlações (Figura 55) entre os sinais em 6,73 (H-5) e δ 134,9 (C-1), entre 2,67 (H-7) e 121,2 (C-6), entre 6,66 (H-2) e 34,8 (C-7) e entre 6,14 (H-9) e 34,8 (C-7).

Figura 55. Correlações de HMBC observadas para a substância **4g**.

Figura 56. Correlações no HMBC (500 MHz) da substância **4g**.

4.3.3. Metabólitos secundários de *P. caldense*

Foi realizado o fracionamento cromatográfico do extrato das folhas das plântulas de *P. caldense* com o objetivo de isolar e identificar o seu constituinte majoritário. O extrato bruto foi submetido a cromatografia de camada delgada preparativa tendo como eluente a mistura hexano:AcOEt (1:1) da qual obteve-se 5 frações. Em uma dessas frações verificou-se o isolamento da substância **1c** utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector na região do UV-visível. O espectro na região do UV-visível de **1c** apresentou máximos de absorção em 206, 229 e 289 nm (Figura 57).

A fração contendo a substância **1c** foi submetida a análise por espectrometria de massas de alta resolução e RMN de ^1H para a caracterização de sua estrutura. O espectro de massas de alta resolução no modo positivo (Figura 58) mostrou um pico correspondente ao íon cationizado com sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com $m/z = 231,0983$ (calculado $m/z = 231.0997$) e a partir dessa informação foi deduzida a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$ para a substância **1c**.

Figura 57. Curva no UV-visível da substância **1c**.

Figura 58. Espectro de massas de alta resolução no modo positivo da substância **1c**.

A substância **1c** foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico (CG-IE-EM) e o espectro de massas (Figura 59) revelou o pico base e o íon molecular em m/z 208, confirmando o que havia sido observado com as análises de espectrometria de massas de alta resolução.

Figura 59. Espectro de massas (ionização por impacto eletrônico) da substância **1c**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 60) mostrou 3 singletos intensos em δ 3,81; 3,83 e 3,88 atribuídos a grupos metoxílicos aromáticos e também dois singletos em δ 6,69 e 6,53 atribuídos a hidrogênios aromáticos substituídos em relação *para*. Também foram observados multipletos em δ 5,04 e 5,97 referente a hidrogênios olefínicos. Adicionalmente, um dubleto ($J = 6,4$ Hz) um atribuídos a hidrogênios metilênicos adjacentes a carbono olefínico foi detectado em δ 3,32.

Com base nos dados obtidos por RMN de ^1H e por espectrometria de massas foi possível determinar a estrutura da substância **1c** e identificá-la como sendo o fenilpropanoide isoasarona (Santos et al., 1998) (Tabela 7).

Tabela 7. Dados do espectro de RMN de ^1H e estrutura da isoasarona (**1c**).

Posição	δ ^1H , (J em Hz)
1	-	
2	6,69 (1H, s)	
3	-	
4	-	
5	6,53 (1H, s)	
6	-	
1'	3,32 (2H, d, 6,4)	
2'	5,97 (1H, m)	
3'	5,04 (2H, m)	
C3-OMe	3,83 (3H, s)	
C4-OMe	3,88 (3H, s)	
C6-OMe	3,81 (3H, s)

Figura 60. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância **1c**.

5. CONCLUSÕES

O estudo dos metabólitos secundários durante a ontogenia de espécies de *Piper* possibilitou a caracterização de três grupos principais de espécies considerando-se o tipo de metabólito secundário encontrado nas folhas nos dois diferentes estágios de desenvolvimento analisados. O primeiro grupo apresentou espécies de *Piper* (*P. tuberculatum*, *P. amalago* e *P. reticulatum*) que acumulavam exclusivamente amidas tanto nas folhas adultas quanto nas folhas das plântulas. Verificou-se ainda outros dois grupos em que as folhas das plântulas de determinadas espécies de *Piper* apresentaram um perfil de produção de metabólitos secundários bem diferenciado quando comparado com as suas respectivas plantas adultas. As folhas adultas de *P. gaudichaudianum*, *P. caldense* e *P. hemmendorffii* mostraram o acúmulo de ácidos benzoicos prenilados e *P. solmsianum* e *P. regnellii*, o acúmulo de lignanas e neolignanas, respectivamente. Em contrapartida, as folhas das plântulas dessas espécies apresentaram perfil químico bem similar constituído predominantemente de alilfenóis como o apiol, o dilapiol e a isoasarona. Outro grupo de espécies de *Piper* analisadas também apresentaram diferenciação do perfil químico entre as folhas das plântulas e as folhas adultas, mas com padrão diferente do constatado até então. Para as espécies *P. richardiaefolium* e *P. permucronatum* foi observado que acumulam nas folhas adultas principalmente lignanas e flavonoides, respectivamente. Entretanto, no extrato bruto das folhas das plântulas dessas espécies interessantemente detectou-se como constituintes majoritários a presença de amidas (Figura 61).

Para algumas das espécies que apresentaram diferenciação do perfil químico foi possível monitorar o perfil químico por meio de análises periódicas ao longo do desenvolvimento das plântulas e com isso acompanhar as alterações com a produção de metabólitos secundários das espécies de *Piper*. As espécies de *Piper* monitoradas periodicamente foram *P. gaudichaudianum*, *P. regnellii*, *P. solmsianum* e *P. caldense*.

Figura 61. Representação dos metabólitos secundários encontrados nos diferentes estágios de desenvolvimentos das espécies de *Piper* analisadas.

Baseado nos resultados obtidos nesse estudo, foi observado que um número considerável de espécies de *Piper* apresentam o perfil metabólico bem diferenciado ao comparar as plântulas com as suas respectivas plantas adultas. Esses dados apresentam indícios da existência de um mecanismo regulatório que ao longo do processo de crescimento da planta promove a gradativa modificação do perfil metabólico, fato este que é bem interessante do ponto de vista biossintético. A função desse mecanismo regulatório para a planta ainda não é clara, mas a partir das propriedades conhecidas dos metabólitos secundários encontrados (alilfenóis e amidas) nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, pode-se cogitar que seja uma provável estratégia defensiva contra fitopatógenos (insetos e microorganismos).

Esses resultados acabam gerando novas questões a respeito das funções dos metabólitos secundários nessas plantas, tanto do ponto de vista biossintético, como ecológico e também evolutivo:

- Por que as plântulas acumulam um determinado tipo de metabólito secundário em suas folhas nos estágios iniciais do seu crescimento e depois a diferenciação no metabolismo?
- Por que para algumas espécies não há modificação significativa do perfil metabólico ao longo do crescimento da planta?
- Durante o crescimento da planta quais fatores são responsáveis pela ativação do processo de modificação do metabolismo secundário?
- Qual a relação evolutiva entre as espécies que mantém o seu perfil metabólico e as que têm o perfil modificado ao longo do crescimento?

Perspectivas

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho e as novas questões originadas é possível propor algumas idéias para a obtenção de dados que possam auxiliar na elucidação de alguns dos questionamentos propostos:

- Realização de experimentos que possam dar indícios a respeito da função biológica dos metabólitos secundários encontrados nas plântulas.
- Realização de experimentos com as plântulas na tentativa de induzir a produção dos metabólitos presentes na planta adulta.
- Realização de estudos filogenéticos para tentar estabelecer uma conexão entre as espécies levando em conta aspectos evolutivos.
- Realização de estudos proteômicos e transcriptômicos para determinar as modificações enzimáticas ocorridas ao longo do crescimento da planta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Cavaleiro, A. J., Bolzani, V. D., Young, M. C. M., Furlan, M., 1999. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* 51, 899-902.
- Bapela, M. J., Lall, N., Isaza-Martinez, J. H., Regnier, T., Meyer, J. J. M., 2007. Variation in the content of naphthoquinones in seeds and seedlings of *Euclea natalensis*. *S. Afr. J. Bot.* 73, 606-610.
- Barrett, D., 2012. Advances in Metabolic Profiling. *Bioanalysis* 4, 643-644.
- Barton, K. E., 2008. Phenotypic plasticity in seedling defense strategies: compensatory growth and chemical induction. *Oikos* 117, 917-925.
- Barton, K. E., Hanley, M. E., 2013. Seedling-herbivore interactions: insights into plant defence and regeneration patterns. *Ann. Bot.* 112, 643-650.
- Benevides, P. J. C., Sartorelli, P., Kato, M. J., 1999. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry* 52, 339-343.
- Bernard, C. B., Krishnamurty, H. G., Chauret, D., Durst, T., Philogene, B. J. R., Sanchezvindas, P., Hasbun, C., Poveda, L., Sanroman, L., Arnason, J. T., 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *J. Chem. Ecol.* 21, 801-814.
- Boege, K., Marquis, R. J., 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends Ecol. Evol.* 20, 441-448.
- Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., Loranger-Merciris, G., 2012. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 10, 325-347.
- Cabral, M. M. O., Alencar, J. A., Guimaraes, A. E., Kato, M. J., 2009. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25, 103-105.
- Cardoso-Taketa, A. T., Pereda-Miranda, R., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Villarreal, M. L., 2008. Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Golpimia*

glauca using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *Planta Med.* 74, 1295-1301.

Castro, P. R. C., Sena, J. O. A., Kluge, R. A. (Eds.), 2002. *Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal*. Eduem, Maringá.

Chang-Yih, D., Yang-Chang, W., Shang-Kwei, W., 1990. Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper aborescens*. *Phytochemistry* 29, 2689-2691.

Chauret, D. C., Bernard, C. B., Arnason, J. T., Durst, T., Krishnamurty, H. G., SanchezVindas, P., Moreno, N., SanRoman, L., Poveda, L., 1996. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *J. Nat. Prod.* 59, 152-155.

Choi, H.-K., Choi, Y. H., Verberne, M., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Verpoorte, R., 2004. Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by ¹H NMR and multivariate analysis technique. *Phytochemistry* 65, 857-864.

Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S. L., Duke, J. A., Briemann, H. L. (Eds.), 2006. *Natural products from plants*. CRC press, New York.

da Silva, R. R., da Camara, C. A. G., Almeida, A. V., Ramos, C. S., 2012. Biotic and abiotic stress-induced phenylpropanoids in leaves of the mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 206-211.

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

Danelutte, A. P., Cavaleiro, A. J., Kato, M. J., 2000. Lignoids in seedlings of *Virola sebifera*. *Phytochem. Anal.* 11, 383-386.

Danelutte, A. P., Costantin, M. B., Delgado, G. E., Braz, R., Kato, M. J., 2005. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 1425-1430.

Danelutte, A. P., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Kato, M. J., 2003. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* 64, 555-559.

Das, A., Lee, S. H., Hyun, T. K., Kim, S. W., Kim, J. Y., 2013. Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnol. Rep.* 7, 9-26.

de Queiroz, A. C., Alves, H. D., Cavalcante-Silva, L. H. A., Dias, T., Santos, M. D., Melo, G. M. D., Campesatto, E. A., Chaves, M. C. D., Alexandre-Moreira, M. S., 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. *Nat. Prod. Res.* 28, 403-406.

Ee, G. C. L., Lim, C. M., Lim, C. K., Rahmani, M., Shaari, K., Bong, C. F. J., 2009. Alkaloids from *Piper sarmentosum* and *Piper nigrum*. *Nat. Prod. Res.* 23, 1416-1423.

Elfahmi, Ruslan, K., Batterman, S., Bos, R., Kayser, O., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J., 2007. Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 397-402.

Ferraz, A. D. F., Balbino, J. M., Zini, C. A., Ribeiro, V. L. S., Bordignon, S. A. L., von Poser, G., 2010. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. *Parasitol. Res.* 107, 243-248.

Flores-Sanchez, I. J., Pec, J., Fei, J., Choi, Y. H., Dusek, J., Verpoorte, R., 2009. Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. *J. Biotechnol.* 143, 157-168.

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.

Frédérich, M., Choi, Y. H., Angenot, L., Harnischfeger, G., Lefeber, A. W. M., Verpoorte, R., 2004. Metabolomic analysis of *Strychnos nux-vomica*, *Strychnos icaia* and *Strychnos ignatii* extracts by ¹H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate analysis techniques. *Phytochemistry* 65, 1993-2001.

Freitas, G. C., Batista, J. M., Franchi, G. C., Nowill, A. E., Yamaguchi, L. F., Vilcachagua, J. D., Favaro, D. C., Furlan, M., Guimaraes, E. F., Jeffrey, C. S., Kato,

- M. J., 2014. Cytotoxic non-aromatic B-ring flavanones from *Piper carniconnectivum* C. DC. *Phytochemistry* 97, 81-87.
- Freitas, G. C., Kitamura, R. O. S., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Guimarães, E. F., Kato, M. J., 2009. Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. *Phytochem. Lett.* 2, 119-122.
- 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.
- Ge, G. B., Zhang, Y. Y., Hao, D. C., Hu, Y., Luan, H. W., Liu, X. B., He, Y. Q., Wang, Z. T., Yang, L., 2008. Chemotaxonomic study of medicinal *Taxus* species with fingerprint and multivariate analysis. *Planta Med.* 74, 773-779.
- Ghosal, S., Deb, A., Mishra, P., Vishwakarma, R., 2012. Leishmanicidal Compounds from the Fruits of *Piper longum*. *Planta Med.* 78, 906-908.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P., 2007. Medicinal plants: Factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quim. Nova* 30, 374-381.
- Goodger, J. Q. D., Heskes, A. M., Woodrow, I. E., 2013. Contrasting ontogenetic trajectories for phenolic and terpenoid defences in *Eucalyptus froggattii*. *Ann. Bot.* 112, 651-659.
- Huang, Y., Ho, S. H., Kini, R. M., 1999. Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 92, 676-683.
- Jansen, J. J., Smit, S., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., 2010. The photographer and the greenhouse: How to analyse plant metabolomics data. *Phytochem. Anal.* 21, 48-60.
- Jiang, R. W., Mak, T. C. W., Fung, K. P., 2003. Molecular structures of two bicyclo-(3.2.1)-octanoid neolignans from *Piper kadsura*. *J. Mol. Struct.* 654, 177-182.

Kim, H. K., Choi, Y. H., Erkelens, C., Lefeber, A. W. M., Verpoorte, R., 2005. Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using H-1-NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 53, 105-109.

Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., 2011. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol.* 29, 267-275.

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

Kim, S. H., Kim, D. H., Park, J.-H., Choi, E. J., Park, S., Lee, K. Y., Jeon, M.-J., Kim, Y. C., Sung, S. H., 2010b. Discrimination of *Scrophularia* spp. according to geographic origin with HPLC-DAD combined with multivariate analysis. *Microchem J.* 94, 118-124.

Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D. R., Vassao, D. G., Jackson, B. L., Kish, C. M., Orlova, I., Spassova, S. M., Lewis, N. G., Noel, J. P., Baiga, T. J., Dudareva, N., Pichersky, E., 2006. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10128-10133.

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

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

Lee, D. K., Yoon, M. H., Kang, Y. P., Yu, J., Park, J. H., Lee, J., Kwon, S. W., 2013. Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of *Schisandra chinensis* by GC/MS and LC/MS. *Food Chem.* 141, 3931-3937.

- Leitão da-Cunha, E. V., de Oliveira Chaves, M. C., 2001. Two amides from *Piper tuberculatum* fruits. *Fitoterapia* 72, 197-199.
- Liu, H. P., Chao, Z. M., Tan, Z. G., Wu, X. Y., Wang, C., Sun, W., 2013. Isolation, crystal structure, and anti-inflammatory activity of sakuranetin from *Populus tomentosa*. *Chin. J. Struct. Chem.* 32, 173-178.
- Liu, N. Q., Cao, M., Frederich, M., Choi, Y. H., Verpoorte, R., van der Kooy, F., 2010. Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of *Artemisia afra* with NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *J. Ethnopharmacol.* 128, 230-235.
- Liu, Z. L., Chu, S. S., Jiang, G. H., 2011. Insecticidal activity and composition of essential oil of *Ostericum sieboldii* (Apiaceae) against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*. *Rec. Nat. Prod.* 5, 74-81.
- Lopes, A. A., Baldoqui, D. C., Lopez, S. N., Kato, M. J., Bolzani, V. D., Furlan, M., 2007. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). *Phytochemistry* 68, 2053-2058.
- Madala, N. E., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., Dubery, I. A., 2013. Metabolomic analysis of isonitrosoacetophenone-induced perturbations in phenolic metabolism of *Nicotiana tabacum* cells. *Phytochemistry* 94, 82-90.
- Marques, J. V., Kitamura, R. O. S., Lago, J. H. G., Young, M. C. M., Guimaraes, E. F., Kato, M. J., 2007. Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. *J. Nat. Prod.* 70, 2036-2039.
- Martins, R. C. C., Lago, J. H. G., Albuquerque, S., Kato, M. J., 2003. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 64, 667-670.
- Martins, R. C. C., Latorre, L. R., Sartorelli, P., Kato, M. J., 2000. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 55, 843-846.
- Messiano, G. B., Vieira, L., Machado, M. B., Lopes, L. M. X., De Bortoli, S. A., Zukerman-Schpector, J., 2008. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and

lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. J. Agric. Food Chem. 56, 2655-2659.

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

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

Newman, D. J., Cragg, G. M., 2012. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. J. Nat. Prod. 75, 311-335.

Okada, T., Afendi, F. M., Altaf-UI-Amin, M., Takahashi, H., Nakamura, K., Kanaya, S., 2010. Metabolomics of Medicinal Plants: The importance of multivariate analysis of analytical chemistry data. Curr. Comput.-Aided Drug Des. 6, 179-196.

Okunishi, T., Umezawa, T., Shimada, M., 2000. Enantiomeric compositions and biosynthesis of *Wikstroemia sikokiana* lignans. J. Wood Sci. 46, 234-242.

Palomino-Schätzlein, M., Escrig, P. V., Boira, H., Primo, J., Pineda-Lucena, A., Cabedo, N., 2011. Evaluation of nonpolar metabolites in plant extracts by ¹³C NMR spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 59, 11407-11416.

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

Perry, N. B., Foster, L. M., 1994. Antiviral and antifungal flavonoids, plus a triterpene, from *Hebe cupressoides*. Planta Med. 60, 491-492.

Pessini, G. L., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., Ferreira, A. G., Cortez, D. A. G., 2005. Neolignans and the analysis of the essential oil of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck leaves. Braz. J. Pharmacogn. 15, 199-204.

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

Puhl, M., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., Dias, B. P., 2011. Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and Its synergism with different antibiotics. *Molecules* 16, 9925-9938.

Rafael, M. S., Hereira-Rojas, W. J., Roper, J. J., Nunomura, S. M., Tadei, W. P., 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genet. Mol. Res.* 7, 772-781.

Ramos, C. S., Kato, M. J., 2009. Hydrolysis of methyl benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* beetle. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 560-563.

Ramos, C. S., Kato, M. J., 2012. Secondary metabolites from the phloem of *Piper solmsianum* (Piperaceae) in the honeydew of *Edessa meditabunda*. *Phytochem. Anal.* 23, 604-606.

Ramos, C. S., Kato, M. J., 2013. Metabolism of neolignans from *P. regnellii* (Piperaceae) in the beetle *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae). *Chemoecology* 23, 143-148.

Ramos, C. S., Soares, M. G., da Silva, A. M., Batista-Pereira, L. G., Correa, A. C., Kato, M. J., 2012a. Electrophysiological responses of the *Naupactus bipes* beetle to essential oils from Piperaceae species. *Nat. Prod. Commun.* 7, 1103-1106.

Ramos, C. S., Souza, L. D., Kato, M. J., Batista, R., 2012b. Biotransformation of 4-nerolidylcatechol by *Heraclides brasiliensis* (Lepidoptera: Papilionidae) reduces the toxicity of *Piper umbellata* (Piperaceae). *Chemoecology* 22, 39-45.

Ramos, C. S., Vanin, S. A., Kato, M. J., 2008. Metabolism of (-)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. *Phytochemistry* 69, 2157-2161.

- Ramos, C. S., Vanin, S. A., Kato, M. J., 2009. Sequestration of prenylated benzoic acid and chromenes by *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae) feeding on *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). *Chemoecology* 19, 73-80.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Yoshinari, T., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M. B., Nagasawa, H., Sakudat, S., 2007. Dillapiol and apiol as specific inhibitors of the biosynthesis of aflatoxin G(1) in *Aspergillus parasiticus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2329-2332.
- Santos, B. V. D., da-Cunha, E. V. L., Chaves, M. C. D., Gray, A. I., 1998. Phenylalkanooids from *Piper marginatum*. *Phytochemistry* 49, 1381-1384.
- Sartorelli, P., Benevides, P. J. C., Ellensohn, R. M., Rocha, M., Moreno, P. R. H., Kato, M. J., 2001. Enantioselective conversion of p-hydroxypropenylbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. *Plant Sci.* 161, 1083-1088.
- Schripsema, J., 2010. Application of NMR in plant metabolomics: Techniques, problems and prospects. *Phytochem. Anal.* 21, 14-21.
- Schripsema, J., Lemos, M. A., Vianna, M. D. D., Vianna, D. S., Dagnino, D. S., 2012. Robust standard procedures for plant metabolomics with NMR-improvements in the extraction and processing procedures. *Planta Med.* 78, 1251-1251.
- Scott, I. M., Jensen, H. R., Philogène, B. J. R., Arnason, J. T., 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem. Rev.* 7, 65-75.
- Silva, A. L., Chaves, F. C. M., Lameira, R. C., Bizzo, H. R., 2013. Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15, 670-674.
- Simoh, S., Quintana, N., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., 2009. Metabolic changes in *Agrobacterium tumefaciens*-infected *Brassica rapa*. *J. Plant Physiol.* 166, 1005-1014.

- Srivastava, S., Gupta, M. M., Prajapati, V., Tripathi, A. K., Kumar, S., 2001. Insecticidal activity of myristicin from *Piper mullesua*. Pharm. Biol. 39, 226-229.
- Ternes, W., Krause, E. L., 2002. Characterization and determination of piperine and piperine isomers in eggs. Anal. Bioanal. Chem. 374, 155-160.
- Vanin, S. A., Ramos, C. S., Gulmaraes, E. F., Kato, M. J., 2008. Insect feeding preferences on Piperaceae species observed in Sao Paulo city, Brazil. Rev. Bras. Entomol. 52, 72-77.
- Vassão, D. G., Gang, D. R., Koeduka, T., Jackson, B., Pichersky, E., Davin, L. B., Lewis, N. G., 2006. Chavicol formation in sweet basil (*Ocimum basilicum*): cleavage of an esterified C9 hydroxyl group with NAD(P)H-dependent reduction. Org. Biomol. Chem. 4, 2733-2744.
- Vinciguerra, V., Luna, M., Bistoni, A., Zollo, F., 2003. Variation in the composition of the heartwood flavonoids of *Prunus avium* by on-column capillary gas chromatography. Phytochem. Anal. 14, 371-377.
- Vogelmann, A. F., Turner, J. C., Mahlberg, P. G., 1988. Cannabinoid composition in seedlings compared to adult plants of *Cannabis sativa*. J. Nat. Prod. 51, 1075-1079.
- Wallace, S. K., Eigenbrode, S. D., 2002. Changes in the glucosinolate-myrosinase defense system in *Brassica juncea* cotyledons during seedling development. J. Chem. Ecol. 28, 243-256.
- Widarto, H. T., Van der Meijden, E., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., 2006. Metabolomic differentiation of *Brassica rapa* following herbivory by different insect instars using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Chem. Ecol. 32, 2417-2428.
- Wolfender, J. L., Glauser, G., Boccard, J., Rudaz, S., 2009. MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. Nat. Prod. Commun. 4, 1417-1430.
- Wolfender, J. L., Rudaz, S., Choi, Y. H., Kim, H. K., 2013. Plant metabolomics: From holistic data to relevant biomarkers. Curr. Med. Chem. 20, 1056-1090.

Xie, G. X., Ni, Y., Su, M. M., Zhang, Y. Y., Zhao, A. H., Gao, X. F., Liu, Z., Xiao, P. G., Jia, W., 2008. Application of ultra-performance LC-TOF MS metabolite profiling techniques to the analysis of medicinal *Panax* herbs. *Metabolomics* 4, 248-260.

Yamaguchi, L. F., Freitas, G. C., Yoshida, N. C., Silva, R. A., Gaia, A. M., Silva, A. M., Scotti, M. T., Emerenciano, V. D., 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. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 2371-2382.

Yamaguchi, L. F., Lago, J. H. G., Tanizaki, T. M., Di Mascio, P., Kato, M. J., 2006. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* 67, 1838-1843.

Yao, Y. J., Cai, W. L., Yang, C. J., Xue, D., Huang, Y. Z., 2008. Isolation and characterization of insecticidal activity of (Z)-asarone from *Acorus calamus* L. *Insect Sci.* 15, 229-236.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Anderson Melo Gaia

Local de nascimento: São Paulo - SP

Data de nascimento: 20 de outubro de 1980.

EDUCAÇÃO

Ensino Médio: E.E. Escultor Galileo Emendabili – São Paulo - SP
1995-1997

Graduação: Faculdade de Tecnologia de São Paulo – São Paulo - SP
Tecnologia Mecânica (Modalidade: Projetos)
2001-2003

Graduação: Universidade de São Paulo – São Paulo - SP
Licenciatura em Química
2004-2008

Pós-graduação: Universidade de São Paulo – São Paulo – SP
Instituto de Química
Doutorado em Química
2009-2014

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto - FAPESP

05/2011-11/2013

Bolsista de Mestrado - FAPESP

03/2009-03/2011

Monitor pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da USP:

1º sem/2010: Química Orgânica I – curso de graduação em Farmácia

1º sem/2011: Química Orgânica I – curso de graduação em Química

2º sem/2012: Química Orgânica II – curso de graduação em Farmácia

PUBLICAÇÕES

Artigos Completos

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

2. Yamaguchi, L. F. ; Freitas, G. C. ; Yoshida, N. C. ; Silva, R. A. ; Gaia, A. M. ; Silva, A. M. ; Scotti, M. T. ; Emerenciano, V. P. ; Guimarães, E. F. ; Floh, E. I. S. ; Colombo, C. A. ; Siqueira, W. J. ; Kato, M. J. Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from *Piper* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 2371-2382, 2011.

Resumos em Congressos

1. Gaia, A. M., Kato, M. J. Análise do metaboloma de *Piper gaudichaudianum* em diferentes estágios de desenvolvimento. II Congresso Institucional do Instituto de Química da USP. Guarujá-SP, 2012.
2. Gaia, A. M., Kato, M. J. Metabolome analysis at different developmental stages of Piper species. 3rd BCNP - Brazilian Conference on Natural Products. Ouro Preto – MG, 2011.
3. Gaia, A. M., Silva, R. A., Floh, E. I. S., Colombo, C. A., Siqueira, W. J., Kato, M. J. Metabolic differentiation during seedling development of *Piper* species. Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy and the Phytochemical Society of North America. Florida-EUA, 2010.
4. Gaia, A. M., Kato, M. J. Phenylpropanoids and seedling development of *Piper gaudichaudianum*. 2º Brazilian Conference on Natural Products. São Pedro-SP, 2009.