UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LADY YASMIN VALERO GUTIERREZ

**FILOGENIA MOLECULAR E METABOLISMO SECUNDÁRIO
DE ESPÉCIES DE *PEPEROMIA***

Versão corrigida

São Paulo

Data de depósito na SPG:

30/06/2015

LADY YASMIN VALERO GUTIERREZ

**FILOGENIA MOLECULAR E METABOLISMO SECUNDÁRIO
DE ESPÉCIES DE *PEPEROMIA***

*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
2015

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

Valero Gutierrez, Lady Yasmin
V165f Filogenia molecular e metabolismo secundário de espécies de
Peperomia / Lady Yasmin Valero Gutierrez. -- São Paulo,
2015.
181p.

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

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

547.7 CDD

*A los que buscan
aunque no encuentren*

*a los que avanzan
aunque se pierdan*

*a los que viven
aunque se mueran*

Mario Benedetti

Dedico este trabalho à minha família,
Myriam, Guillermo, Yaneth, Yenny e Dante
Àqueles que me dão os motivos para continuar.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento ao prof. Dr. Massuo Jorge Kato por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos ensinamentos e orientação.

Ao professor Gabriel Padilla Maldonado e seu grupo de pesquisa pela ajuda, conselhos e apoio na pesquisa.

Ao Dr. Juan Diego Rojas pelos ensinamentos e ajuda inicial que permitiu o aprendizado de novas técnicas e procedimentos bastante úteis para o desenvolvimento do meu trabalho.

À minha família pelo apoio, compreensão e estímulo permanente ainda que na distância, em especial a minha mãe por ser um apoio, exemplo e incentivo na minha vida. Ao Dante por ter chegado a encher de alegria e motivação à minha família.

Aos grandes amigos Anderson, Mauro, Harold, Marcilio, Gerardo, Renan, Celso e Vítor Costa pelo apoio, ânimo, os cafés, as risadas, por me escutar e me dar apoio. À todos os colegas e amigos do laboratório pela força e ensinamentos: Nidia, Érica, Augusto, Edgard, Giovanna, Renata, Lydia, Tara, Eduardo, Fabio Chaves, Daniel Nopper e Karina.

Aos meus amigos colombianos no Brasil que fizeram me sentir mais perto de casa: Catalina, Monica, Sebastian, Roger, Nicolás, Lina, Elizabeth, Felipe, Diego, Carlos, Alba e James. Um agradecimento especial aos meus grandes amigos Camilo e Marcela pela ajuda e conselhos constantes.

Aos meus colegas e grandes amigos de sempre “La gente del arbol” especialmente meus amigos Julio Cesar e Johanna amigos de todas as horas.

À família Muniz de Souza pelo apoio inicial e incentivo constante, sempre morarão no meu coração. Clelinha, obrigada por tudo, sempre!

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo apoio.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Ao Brasil, país que me deu a oportunidade de crescer em muitos aspectos da minha vida e o qual aprendi a amar e tê-la como minha segunda pátria. Sem dúvidas sentirei saudades...

A todos os colegas e funcionários do IQ.

"Si cualquier erudito se inclina, por su temperamento natural, a la arrogancia y a la obstinación, una pequeña dosis de pirronismo [escepticismo radical] puede abatir su orgullo, mostrándole que los pocos avances que pudo haber conseguido sobre sus colegas son insignificantes si se comparan con una universal perplejidad y confusión inherentes a la naturaleza humana. En general, existe un grado de duda, y de precaución, y de modestia, el cual, en todo tipo de escrutinio y decisión, debiera acompañar siempre a un pensador justo".

David Hume

RESUMO

Valero-Gutierrez, L. Y. Filogenia molecular e metabolismo secundário de espécies de *Peperomia*. 2015. 181p. Tese – Programa de Pós- Graduação em Química. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Árvores evolutivas de espécies de *Peperomia* baseadas nas regiões de ITS e *matK* foram confrontadas com perfis metabólicos de extratos brutos obtidos por RMN ^1H , HPLC-DAD e LC-ESI-MS. A análise de clusters (HCA) e a análise discriminante de componentes principais (DAPC) suportaram em parte os agrupamentos observados por ITS e *matK*. As principais classes de metabólicos secundários observadas foram policetídeos, meroterpenos, cromenos, fenilpropanoides e amidas, sendo que foram ainda isolados um policetídeo (malabaricona D) de *P. megapotamica*; o fenilpropanoide elemicina e a lignana tetraidrofurânica diyangambina de *P. rotundifolia*; e as flavonas 5,6,7-trimetoxiflavona e 4',5,6,7-tetrametoxiflavona de *P. sincorana*. As PKS tipo chalcona sintase (CHS) de peperomias, diferiram daquelas de famílias filogeneticamente próximas como Myristicaceae (*Virola*) e Lauraceae (*Aniba*). Como muitos meroterpenos de espécies de *Peperomia* possuem como núcleo básico o ácido orselínico, produto típico de líquens e bactérias, o gene ácido orselínico sintase (OSAS) foi investigado nas plantas e nos 27 fungos endofíticos isolados de espécies de *Peperomia* (identificados pelas sequências de ITS1-5.8S-ITS2). Foram amplificadas pelo menos uma PKS (NR, HR e PR) em cada uma das linhagens e AOS em várias delas (UR1, UC3, UF1, UF2, UF3, UF4, GC3, NR1, NC1, NC2, NF1, AR1, AC1, AC4, OC1 e OF1). A homologia de 60% da OSAS amplificada de UR1 com a sequência de

Streptomyces viridochromogenes é sugestivo de transferência horizontal de bactéria para fungos.

PALAVRAS CHAVE: *Peperomia*, filogenia, metabolômica, PKS, policetídeos, fungos endofíticos.

ABSTRACT

Valero-Gutierrez, L. Y. Molecular phylogeny and secondary metabolism from *Peperomia* species. 2015. 181p. Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Phylogenetic tree of *Peperomia* species based on ITS and *matK* were compared to the metabolic profiling of crude extracts using ^1H NMR, HPLC-DAD and LC-ESI-MS. Cluster analysis (HCA) and discriminant analysis of principal components (DAPC) supported significantly the clustering observed by ITS and *matK*. The major classes of secondary metabolites were polyketides, meroterpenes, chromenes, phenylpropanoids and amides and besides, one polyketide (malabaricone D) of *P. megapotamica*; the phenylpropanoid elemicin and the tetrahydrofuran lignan diyangambin from *P. rotundifolia*; and the flavones 5,6,7-trimethoxyflavone and 4',5,6,7-tetramethoxyflavone were isolated from *P. sincorana*. The PKS chalcone synthase type (CHS) from *Peperomia*, differed from phylogenetically related families Myristicaceae (*Virola*) and Lauraceae (*Aniba*). Since several meroterpenes from *Peperomia* species have the orsellinic acid as an aromatic core, typical of lichens and bacteria, the orsellinic acid (OSAS) was investigated in the plants and 27 endophytes isolated from *Peperomia* (identified based on ITS1-5.8S-ITS2 sequences). At least one PKS (NR, HR and PR) were isolated from each strains and AOS were isolated from several strains (UR1, UC3, UF1, UF2, UF3, UF4, GC3, NR1, NC1, NC2, NF1, AR1, AC1, AC4, OC1 and OF1). The 60% of homology observed for OSAS amplified from UR1 with that of

Streptomyces viridochromogenes is suggestive of a horizontal transferring from bacteria to fungi.

KEYWORDS: *Peperomia*, phylogeny, metabolomics, PKS, polyketides, endophytic fungi.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Proteína transportadora de grupos acila
AT	Aciltransferase
BI	Inferência Bayesiana
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CHS	Chalcona sintase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	Coenzima A
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EM	Espectrometria de massas
EM-ESI	Espectrometria de massas com ionização por electrospray
HCA	Análise de clusters
ITS	Internal transcribed spacer
KR	Cetoreductase
KS	Cetosintase
LC-ESI MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por electrospray
LQPN	Laboratório de Química de Produtos Naturais
m/z	Relação massa/carga
MP	Máxima Parcimônia
OSAS	Sintase do ácido orselínico
PCA	Análise de componente principal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	Batata-dextrose-agar
PKS	Policetídeo sintases
RNA	Ácido ribonucléico
RMN	Ressonância magnética nuclear
Tris	Tris-2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cladograma simplificado de Piperales (SAMAIN et al., 2010).	24
Figura 2. Número de artigos relacionados com <i>Peperomia</i> publicados nos últimos 50 anos (SciFinder® Agosto de 2014).	41
Figura 3. Ilustração da porcentagem do tipo de produto natural isolado do gênero <i>Peperomia</i>	42
Figura 4. PKS tipo I (não iterativa) (modificada de (SHEN, 2003)).....	53
Figura 5. PKS tipo II (iterativa) (SHEN, 2003)	54
Figura 6. PKS tipo III (ACP independente e iterativa) (SHEN, 2003).	54
Figura 7. Tipos de ciclização catalisadas por enzimas PKS de plantas. A Seta cheia ilustra a condensação de Claisen C6/C1, a seta traço e ponto representa a condensação aldólica C2/C7 e a seta pontilhada mostra a lactonização do oxigênio no C-5/C-1. Seta dupla indica mais de uma etapa. Adaptado de FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009.....	57
Figura 8. Biogênese de cromenos isolados de <i>Peperomia villipetiola</i> . IPP: pirofosfato de isopentenila; OMT: O-metiltransferase. Baseado em (SALAZAR et al., 2005). Em vermelho se ressalta o ácido orselínico, intermediário comum.	61
Figura 9. Policetideos prenilados de <i>Rhododendron anthopogonoides</i> (IWATA; KITANAKA, 2011).	62
Figura 10. Derivados de ácidos benzoicos e cromenos isolados de <i>Rhododendron anthopogonoides</i> (IWATA; KITANAKA, 2010).....	63
Figura 11. Derivados de ácidos benzoicos e cromenos isolados de <i>Rhododendron dauricum</i> (IWATA et al., 2004).	63
Figura 12. Glicosídeo de ácido orselínico isolado de <i>Syzygium aromatica</i> (CHARLES; GARG; KUMAR, 1998).....	64

Figura 13. Filogenia de angiospermas (APG III) Imagem tomada de http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/ mostrando a relação filogenética distante entre às ordens Piperales (à qual pertencem as peperomias), Myrtales (à qual pertence a planta <i>Syzygium aromaticum</i>) e Ericales à qual pertencem as plantas da família Rhododendron.	65
Figura 14. Exemplo de compostos isolados de fungos endofíticos com atividade biológica (GUO et al., 2008; STROBEL et al., 2004; KHARWAR et al., 2011; VERMA; KHARWAR; STROBEL, 2009)	69
Figura 15. Alguns exemplos de compostos isolados de fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras.	72
Figura 16. Alguns compostos isolados de fungos endofíticos hospedeiros de espécies de <i>Piper</i>	74
Figura 17. Exemplo de policetideos isolados de fungos.	76
Figura 18. Derivados de ácido orselínico encontrados em diversas espécies de fungos endofíticos.	77
Figura 19. Estratégia de seqüenciamento do gene <i>matK</i> . Cada cor representa um conjunto de iniciadores desenhados em sua forma forward (F) e reverse (R) para conseguir amplificar toda a região do gene.	95
Figura 20. Programa de temperaturas para amplificação da região ITS.	98
Figura 21. Programa de temperatura para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 de fungos endofíticos.	99
Figura 22. Programa de temperaturas para amplificação do gene CHS de <i>Peperomia</i>	100
Figura 23. Programa de temperatura para amplificação do domínio cetosintase de PKS em fungos endofíticos	100
Figura 24. Programa de temperatura PCR <i>touchdown</i> para amplificação do gene do ácido orselínico em plantas e fungos endofíticos.	101

Figura 25. Programa de temperatura alternativo para amplificação do gene do ácido orselínico em plantas e fungos endofíticos	101
Figura 26. Programa de temperaturas para amplificação do gene PKS-ácido orselínico em <i>Peperomia</i> (iniciadores STCSF1 e STCSR1).....	102
Figura 27. a) Cromatograma do padrão ácido orselínico por LC-ESI-MS; b) espectro de massas do ácido orselínico no modo negativo (M-H).....	114
Figura 28. Cromatograma CG-El e espectro de massas por impacto de elétrons da substância 1 isolada de <i>P. megapotamica</i>	115
Figura 29. Estrutura e atribuição de sinais de RMN ^1H da substância 1 isolada de <i>P. megapotamica</i>	116
Figura 30. Cromatograma e espectro de massas CG-El por impacto de elétrons da substância 2 isolada de <i>P. rotundifolia</i>	117
Figura 31. Estrutura e atribuição de sinais de RMN ^1H da substância 2 (diyangambina) isolada de <i>P. rotundifolia</i>	118
Figura 32. Cromatograma e espectro de massas por impacto de elétrons da substância 3 isolada de <i>P. rotundifolia</i>	118
Figura 33. Estrutura e atribuição de sinais de RMN ^1H da substância 3 isolada de <i>P. rotundifolia</i>	119
Figura 34. Estruturas e deslocamentos químicos em RMN ^1H para as substâncias 4 e 5 isoladas de <i>P. sincorana</i>	119
Figura 35. Árvore mais parcimoniosa baseada em sequências do gene <i>matK</i> e ITS. Os valores de bootsptrap se encontram acima dos ramos. <i>Houttunia cordata</i> , <i>Anemopsis californica</i> , <i>Piper aduncum</i> e <i>Piper nigrum</i> foram usadas como grupos externos. Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; 100000 réplicas de bootstrap; comprimento da árvore: 2913 passos; índice de consistência (CI)= 0.6869; índice de homoplasia (HI)= 0.3131; índice de retenção (RI)=0.7471; algoritmo <i>branch-swapping: tree-bisection-reconnection</i> (TBR); número de caracteres informativos= 950; caracteres constantes= 2587.	122

Figura 36. Árvore filogenética (MP) de <i>Peperomia</i> obtida com dados de sequências ITS e <i>matK</i> junto com o mapeamento do tipo de substâncias já isoladas das espécies de <i>Peperomia</i> abordadas neste estudo (ANEXO1), com dados fitoquímicos de algumas espécies de <i>Peperomia</i>	123
Figura 37. Árvore filogenética de <i>Peperomia</i> com dados ITS e <i>matK</i> junto com co-ocorrência de substâncias em mais de uma espécie A21-J11 (ANEXO1).	124
Figura 38. Perfil metabólico por HPLC-DAD (260 nm) de peperomias.	126
Figura 39. Análise de clusters (HCA) dos dados de HPLC (260nm) de peperomias junto com o mapeamento do tipo de substâncias isoladas para estas espécies (A-K, ANEXO1).	127
Figura 40. Análise de clusters (HCA) dos dados de HPLC de peperomias junto com co-ocorrência de substâncias em mais de uma espécie A21-J11 (ANEXO1).	128
Figura 41. Perfil metabólico das espécies de <i>Peperomia</i> por LC-ESI-MS.	129
Figura 42. Análise estatística por HCA dos dados obtidos por LC-ESI-MS de espécies de <i>Peperomia</i>	130
Figura 43. Análise de clusters de peperomias com dados de LC-ESI-MS junto com co-ocorrência de substâncias isoladas de mais de uma espécie (A21-J11, Ver ANEXO1).	131
Figura 44. Perfil metabólico de peperomias por RMN ¹ H.	132
Figura 45. Análise de clusters (HCA) de peperomias com dados de RMN ¹ H e classes ou subclasses de metabólitos secundários.	133
Figura 46. Análise de clusters de peperomias com dados de RMN ¹ H junto com co-ocorrência de substâncias em mais de uma espécie (A21-J11, ANEXO 1).	134
Figura 47. Comparação entre a classificação com dados moleculares e a classificação com dados do perfil químico por HPLC.	137

Figura 48. Comparação entre a classificação com dados moleculares e a classificação com dados do perfil químico por LC-ESI-MS.	138
Figura 49. Comparação entre a classificação com dados moleculares e a classificação com dados do perfil químico por RMN ¹ H.	139
Figura 50. Clusters gerados pela análise discriminante de componentes principais (DAPC) dos dados de RMN ¹ H dos extratos (CHCl ₃) de espécies de <i>Peperomia</i> . .	140
Figura 51. Classificação das espécies de <i>Peperomia</i> enquanto a sua filiação aos diferentes clusters gerados pela análise (DAPC).	140
Figura 52. Árvore filogenética (MP) baseada em sequências do gene CHS de espécies de <i>Peperomia</i> e plantas relacionadas. Valores de bootstrap nos ramos. Análise por máxima parcimônia utilizando o programa PAUP. Busca heurística; repetições de bootstrap: 100000; longitude da árvore: 2624; índice de consistência (CI): 0.6300; índice de homoplasia (HI): 0.3700; índice de retenção (RI): 0.7847; algoritmo <i>Branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR)</i> ; número de caracteres informativos: 665; 224 caracteres são constantes. Grupo externo: <i>Escherichia coli</i> FabH (número de acesso no genBank:M77744), gene da biossíntese de ácidos graxos. Em negrito se encontram as sequências obtidas neste trabalho e em azul as sequências obtidas de <i>Peperomia</i> que também formam parte deste trabalho.....	143
Figura 53. Cultura de fungos endofíticos das diferentes partes das plantas.	146
Figura 54. Fungos endofíticos, observados sob microscópio óptico nos tecidos de diferentes espécies de <i>Peperomia</i>	151
Figura 55. Gel de agarose 2% (contendo brometo de etídeo) mostrando os fragmentos amplificados de aproximadamente 600 pb de alguns dos fungos endofíticos isolados AC4, AR1, AR2 e UF3.	152
Figura 56. Árvore filogenética <i>Neighbor-joining</i> não enraizada feita com sequências ITS1-5.8S-ITS2 dos fungos endofíticos isolados de <i>Peperomia</i>	153

Figura 57. Gel de agarose 1% (contendo brometo de etídeo) mostrando fragmentos amplificados de aproximadamente 700 pb de PKS de fungos endofíticos, utilizando iniciadores LC1-LC2c e KS1-KS2c.....	154
Figura 58. Gel de agarose contendo GelRed com o produto de PCR para ácido orselínico com os iniciadores B da tabela 8. SV (controle positivo, <i>Streptomyces viridochromogenes</i>), as peperomias A (<i>P. arifolia</i>), G (<i>P. glabella</i>), N (<i>P. nitida</i>), O (<i>P. oreophilla</i>), U (<i>P. urocarpa</i>), e os diferentes fungos endofíticos isolados de plantas (UR1-OF2) e por último (-), o controle negativo, água milliQ autoclavada.	156
Figura 59. Eletroforese em gel de agarose mostrando os fragmentos amplificados gerados com iniciadores STCSF1 e STCSR1.....	157
Figura 60. HPLC (260nm) do ácido orselínico e de extratos em AcOEt de fungos endofíticos de <i>Peperomia</i> (OC1 e UR1).....	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedência das espécies de <i>Peperomia</i> estudadas.....	82
Tabela 2. Iniciadores ITS	94
Tabela 3. Iniciadores <i>matK</i> usados neste trabalho.....	95
Tabela 4. Iniciadores usados para a amplificação região ITS1-5.8S-ITS2 de fungos endofíticos.....	95
Tabela 5. Iniciadores utilizados para amplificação do gene CHS.....	96
Tabela 6. Iniciadores usados para avaliar a diversidade de PKS em fungos endofíticos	96
Tabela 7. Iniciadores desenhados para amplificar o gene do ácido orselínico em plantas.....	97
Tabela 8. Gradiente de eluição no HPLC dos extratos em clorofórmio.....	109
Tabela 9. Composição do meio Czapek.....	112
Tabela 10. Composição da solução de metais traço	112
Tabela 11. Gradiente de concentração do solvente para análise por HPLC dos extratos em EtOAc dos fungos endofíticos.....	113
Tabela 12. Dados de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C e dos mapas de contorno HSQC (H-C, 1J) e HMBC (C-H, ⁿ J) (H 500 MHz, C 125 MHz, CDCl ₃).	116
Tabela 13. Fungos isolados de diferentes partes de plantas do gênero <i>Peperomia</i>	147
Tabela 14. Resumo geral dos resultados obtidos no estudo de fungos endofíticos, onde se mostra a planta da qual foi extraído, o gênero ao qual pertence o fungo e a presença (+) ou ausência (-) de diferentes tipos de PKS (NR, PR, HR) e a PKS responsável pela produção do ácido orselínico (OSAS). (Nd: não foi testado com este fungo)	157

Tabela 15. Sequência do possível gene PKS do ácido orselínico no fungo UR1 , 867	
bp.	159

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	QUIMIOSSISTEMÁTICA	26
1.2	METABOLÔMICA	32
1.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ESPÉCIES DE <i>PEPEROMIA</i>	40
1.3.1	Fenilpropanoides (Grupo A).....	42
1.3.2	Lignanas (Grupos B-F)	43
1.3.3	Flavonoides (Grupo G)	46
1.3.4	Policetídeos (Grupo H-I)	46
1.3.5	Cromenos (Grupo J)	47
1.3.6	Amidas (Grupo K)	48
1.3.7	Óleos essenciais.....	49
1.4	POLICETÍDEOS DE <i>PEPEROMIA</i>.....	51
1.4.1	Policetídeo sintases (PKS)	52
1.4.2	Ácido orselínico como intermediário na via biossintética de produtos naturais de <i>Peperomia</i>	60
1.5	FUNGOS ENDOFÍTICOS	66
2	OBJETIVOS	79
2.1	OBJETIVO GERAL	79
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
3.1	EQUIPAMENTOS.....	81
3.2	MATERIAL BIOLÓGICO	82
3.2.1	Coleta de espécies de <i>Peperomia</i>	82
3.2.2	Isolamento de fungos endofíticos das plantas	90
3.2.3	Deteção de fungos endofíticos nos tecidos de <i>Peperomia</i>	91
3.3	MANIPULAÇÃO DO DNA.....	92
3.3.1	Extração do DNA de plantas.....	92
3.3.2	Extração de DNA de fungos endofíticos	92
3.3.3	Avaliação da qualidade do DNA	93
3.3.4	Quantificação do DNA	93
3.4	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	93
3.4.1	Desenho de iniciadores	94

3.4.2	Programação de temperaturas para PCR.....	98
3.5	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	102
3.6	PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR	103
3.7	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	103
3.8	TRATAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	104
3.9	ANÁLISES FILOGENÉTICAS DE <i>PEPEROMIA</i>	104
3.10	OBTENÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	105
3.11	FITOQUÍMICA DE PEPEROMIAS	106
3.11.1	Extração e fracionamento	106
3.12	PERFIL METABÓLICO	108
3.12.1	Perfil metabólico de espécies de <i>Peperomia</i>	108
3.12.2	Perfil metabólico de fungos endofíticos	112
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	115
4.1	FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DE PEPEROMIA	115
4.1.1	<i>Peperomia megapotamica</i>	115
4.1.2	<i>Peperomia rotundifolia</i>	117
4.1.3	<i>Peperomia sincorana</i>	119
4.2	FILOGENIA DE <i>PEPEROMIA</i>.....	120
4.3	PERFIL METABÓLICO DE <i>PEPEROMIA</i>.....	125
4.3.1	HPLC-DAD	125
4.3.2	LC-ESI MS	128
4.3.3	RMN ¹ H.....	131
4.4	FILOGENIA DO GENE CHS	142
4.5	FUNGOS ENDOFÍTICOS	145
4.5.1	Cultura de fungos endofíticos	145
4.5.2	Deteção de fungos endofíticos nos tecidos de <i>Peperomia</i>	151
4.5.3	Amplificação da região ITS1- 5.8S-ITS2 do rDNA para identificação dos fungos enofíticos	151
4.5.4	Diversidade de genes PKS em fungos endofíticos de <i>Peperomia</i>	154
4.6	GENE DO ÁCIDO ORSELÍNICO EM PEPEROMIAS E FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	154

4.6.1	Amplificação do gene PKS da possível ácido orselínico sintase do fungo UR1	158
4.7	PERFIL METABÓLICO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	160
5	CONCLUSÕES	161
5.1	PERFIL METABÓLICO DE <i>PEPEROMIA</i>	161
5.2	FILOGENIA MOLECULAR DE <i>PEPEROMIA</i>	161
5.3	ANÁLISES QUÍMICAS E MOLECULARES CONJUNTAS	162
5.4	ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>PEPEROMIA</i>	162
5.5	ESTUDO DO GENE CHALCONA SINTASE EM <i>PEPEROMIAS</i> E PLANTAS FILOGENÉTICAMENTE RELACIONADAS	162
5.6	FUNGOS ENDOFÍTICOS	163
6	REFERÊNCIAS	164
7	ANEXOS	182

1 INTRODUÇÃO

A evolução das angiospermas é ainda uma das perguntas mais intrigantes desde Darwin. Vários esforços têm sido feitos para obter indicações respeito do processo de especiação acelerado que levou ao grande número de espécies e de sua explosiva irradiação. Acredita-se que estudos de angiospermas basais podem fornecer informações relevantes para resolver esta intrigante e complexa questão (SAMAIN et al., 2009).

As Piperales representam a maior ordem de angiospermas basais com cerca de 4300 espécies, incluindo a família Piperaceae que é representada por cinco gêneros *Verhuellia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Piper* e *Peperomia* (SAMAIN et al., 2009) (Figura 1). Tais espécies podem ser encontradas sob diversas formas como árvores, arbustos, ervas, suculentas, cipós, epífitas, geófitas e também parasitas (WANKE et al., 2007).

Peperomia e *Piper* são os gêneros com maior número de espécies da família Piperaceae com aproximadamente 1500-1700 e 2000 espécies respectivamente (APG 2003) (Figura 1) (SAMAIN et al., 2009; WANKE et al., 2007). Ambos gêneros têm distribuição na região tropical e subtropical (GRIEG, 2004; MIQUEL, 1843 -1844; QUIJANO-ABRIL; CALLEJAS-POSADA; MIRANDA-ESQUIVEL, 2006; WANKE et al., 2007).

O gênero *Peperomia* foi descrito por Ruiz e Pavon em 1794 que estudou 24 espécies de Peru (SAMAIN et al., 2011). Este gênero é distribuído pantropicalmente (SMITH et al., 2008; WANKE et al., 2007), sendo mais diverso nos neotrópicos (com aproximadamente 1500 espécies), seguido por Ásia (100 espécies), África (60

espécies) e Oceania (com menos de 20 espécies) WANKE et al., 2006). A vasta distribuição mundial deste gênero e a extensa dispersão de algumas espécies constitui-se num outro enigma para os evolucionistas.

Figura 1. Cladograma simplificado de Piperales (SAMAIN et al., 2010).

A vicariância foi reconhecida como a causa para a ampla distribuição geográfica e especiação (NELSON, 1981), mas evidências recentes apontam hipóteses alternativas, como à capacidade de dispersão a longas distâncias atribuída às propriedades adesivas dos frutos que podem ser levadas nos pés e penas dos pássaros (RIDLEY, 1930; VALDEBENITO; STUESSY; CRAWFORD, 1990). Outro aspecto importante é o hábito epifítico de algumas peperomias que contribui para seu estabelecimento em diferentes biomas comparado com espécies enraizadas no solo (SMITH et al., 2008).

As peperomias são caracterizadas pela grande diversidade morfológica, fazendo com que a classificação taxonômica infragenérica seja complicada. Isto se reflete no dobro de nomes publicados do que espécies aceitas dentro do gênero (3031 nomes/1700 espécies) (WANKE et al., 2006). A complexidade na classificação

é uma consequência do déficit de sinapomorfias para os grupos infragenéricos devido à extrema redução floral e à evolução paralela de alguns caracteres morfológicos (SAMAIN et al., 2009). A classificação infragenérica mais completa do gênero foi feita por Dahlstedt (1900) (DAHLSTEDT, 1900) baseada principalmente na morfologia do fruto, dividindo a *Peperomia* em nove subgêneros e sete seções (WANKE et al., 2007). Estudos recentes baseados em filogenia molecular deram suporte somente a dois dos nove subgêneros descritos por Dahlstedt (WANKE et al., 2007), demonstrando a limitação da classificação morfológica, provavelmente, pelo fato dos caracteres morfológicos terem evoluído várias vezes de maneira independente (SAMAIN et al., 2009; WANKE et al., 2007).

A compreensão da evolução dos caracteres e uma melhor classificação infragenérica do gênero requer a combinação de dados morfológicos e moleculares (SAMAIN et al., 2009). No entanto, poucos trabalhos foram realizados com este propósito. Os estudos de WANKE et al., 2006, com 48 espécies de *Peperomia* pertencentes a oito dos nove subgêneros descritos por Dahlstedt (1900) foram investigados através de sequências do gene *matK* (que codifica para uma maturase) (WANKE et al., 2006; WANKE et al., 2007). Com o intuito de melhorar a resolução utilizou-se também o intron circundante *trnK* que possui um sinal filogenético semelhante ao do gene *matK*. Somente um subgênero (Micropiper) descrito por Dahlstedt se mostrou como monofilético, tornando evidente que alguns caracteres morfológicos foram superestimados e que os mesmos evoluíram várias vezes de maneira independente. Foi proposta também a incorporação de sequências ITS a fim de aumentar o suporte de certos nodos e melhorar a relação filogenética encontrada.

Mais recentemente, foi publicada uma abordagem com a incorporação de sequências de ITS (DNA nuclear) que, em combinação com sequências de *matK* forneceram maior suporte à filogenia de *Peperomia* (SAMAIN et al., 2009). Além disso, observou-se uma grande incongruência com os resultados de mapeamento de caracteres morfológicos utilizados em estudos de classificação infragenérica.

1.1 QUIMIOSSISTEMÁTICA

A construção de uma árvore filogenética que reconstrua a verdadeira história evolutiva das plantas e que mostre a relação natural que existe entre todos os táxons é o principal objetivo da sistemática vegetal. No entanto, múltiplos sistemas de classificação utilizando diversos caracteres já foram utilizados sem chegar a um consenso (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999). O sistema tradicional de classificação faz uso dos caracteres morfológicos macroscópicos e microscópicos das plantas. Este sistema é, ocasionalmente, complementado com dados de anatomia, palinologia (estudo do pólen), embriologia, bioquímica e química (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999; WINK, 2003).

O sequenciamento de determinadas regiões do DNA tem se mostrado bastante preciso e útil para a reconstrução filogenética e na elucidação da diversidade biológica. A estrutura de macromoléculas, especialmente ácidos nucléicos e proteínas, vem sendo utilizado desde 1960, mas seu interesse aumentou em 1990 com o advento de novas metodologias de amplificação de fragmentos de DNA e programas estatísticos (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999; REYNOLDS, 2007).

A informação molecular também é útil como ferramenta para estudar a evolução de metabólitos secundários. (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999). Sequências gênicas *rbcl* do DNA (que codificam para a grande subunidade de ribulose-1,5- bifosfato carboxilase/oxigenase RuBisCo) tem se mostrado úteis para estudos filogenéticos a níveis altos da hierarquia taxonômica devido ao fato de que esta subunidade parece ter evoluído muito lentamente ao longo da evolução das plantas. Por esta razão, torna-se relevante na análise da utilidade de metabólitos secundários como caracteres quiomiotaxonômicos (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999).

A sistemática química tem como propósito interpretar a implicação filogenética da ocorrência e distribuição de metabólitos secundários (WATERMAN, 2007). Diversas tentativas de utilização da composição química de plantas para auxiliar na sistemática vegetal vêm sendo realizadas, já que alguns metabólitos secundários podem caracterizar espécies em clados monofiléticos. Evidenciando uma possível relação ou descendência a partir de um antecessor comum (WINK, 2003).

As famílias de plantas aquáticas Callitrichaceae e Hippuridaceae, caracterizadas por ter flores reduzidas, eram classificadas em diferente ordem por diversos sistematas. No entanto, o perfil químico delas mostrou uma relação próxima às famílias Scrophulariaceae e Lamiaceae; relação que foi confirmada posteriormente por dados moleculares (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999).

Existem diversos relatos como este, de metabólitos secundários sendo úteis como marcadores taxonômicos na sistemática vegetal. Por exemplo, as betalainas são consideradas como marcadores químicos da ordem Caryophyllales (WATERMAN, 2007) e os terpenos vêm sendo amplamente utilizados em estudos

taxonômicos e em certa maneira na filogenia (REYNOLDS, 2007); Os flavonoides tem ocorrência em todas as plantas vasculares e tem se mostrado úteis em um nível taxonômico baixo, no nível de famílias, gêneros e espécies. Entretanto, existem outros metabolitos secundários que mesmo tendo distribuição limitada tem uma importância taxonômica acima do nível de família (como vários tipos de alcaloides, ácido elágico, betalainas, glucosinolatos, poliacetilenos, antraquinonas, lactonas sesquiterpênicas, iridoides, entre outros) (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999).

Em uma tentativa de mapear a presença de certos metabólitos secundários, observou-se na família Fabaceae que os alcaloides quinolizidínicos podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos por serem especialmente abundantes em membros da “aliança genistoide s.l.” incluindo várias tribos da subfamília Papilionoideae, com uma clara exceção da grande tribo Crotalariae (que produz alcaloides pirrolizidínicos) (WINK, 2003). Além de alcaloides quinolizidínicos, as leguminosas acumulam uma ampla variedade de alcaloides, derivados de diversos precursores. No entanto, para a maioria deles a ocorrência é restrita a poucos táxons comumente não relacionados.

De fato, diversos casos complicam a aplicação da distribuição dos metabólitos secundários na resolução filogenética. O primeiro deles é a presença de metabólitos secundários idênticos ou semelhantes com a mesma origem biossintética em plantas claramente distantes (WATERMAN, 2007). É o caso do alcaloide antitumoral camptotecina que já foi encontrado em diversas famílias de plantas não relacionadas: Ordem Rubiales: *Ophiorrhiza mungos*, *O. pumila*, *O. filistipula* (Rubiaceae); *Ervatamia heyneana* (Apocynaceae) e *Mostuea brunonis* (Loganiaceae); ordem Cornales: *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae); ordem

Celastrales: *Nothapodytes foetida*, *Pirenacantha klaineana* (Icacinaceae) (WINK, 2003).

Ainda que, uma estrutura particular possa indicar uma relação monofilética, sua co-ocorrência pode também ser resultante de convergência evolutiva (genes que codificam para uma determinada via metabólica evoluíram independentemente), ou de expressão gênica diferencial de genes originados precocemente no processo evolutivo e que se encontram desligados, mas com possibilidade de se ligarem em algum momento posterior (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999; WATERMAN, 2007; WINK, 2003). Por este motivo é também importante para a sistemática a incorporação da filogenética em estudos de quimiosistemática (REYNOLDS, 2007) considerando-se a evolução das vias metabólicas.

A importância da precaução na utilização de caracteres químicos pode ser exemplificada pelos alcaloides tropânicos, um dos grupos mais representativos da família Solanaceae, mas também encontrados em outras famílias como Euphorbiaceae, Erythroxylaceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Proteaceae e Rhizophoraceae. Como observado no estudo, os alcaloides tropânicos não se agrupam em um grupo monofilético e aparentemente não estão relacionados (WINK, 2003).

O segundo fator a ser considerado e que complica a utilização de caracteres químicos na filogenia é a grande influência de diversos fatores extrínsecos com forte impacto nos produtos finais das vias metabólicas (WATERMAN, 2007). Existe variabilidade no perfil químico de acordo ao órgão analisado, o estágio de desenvolvimento da planta, mudanças sazonais, estresse, e em geral ao ambiente no qual se desenvolve a planta devido a efeitos como infecção, ataque, herbivoria e

lesão, entre outros. A inconsistência na composição química faz com que o valor destes caracteres na sistemática vegetal torne-se uma questão interpretativa como no caso dos marcadores morfológicos tradicionais (WINK, 2003).

Apesar da grande variabilidade no perfil químico pela sua dependência de fatores ambientais, a árvore filogenética obtida com dados químicos (perfil metabólico de extratos em metil t-butil éter analisados por GC/MS) de espécies do gênero *Zingiber*, crescidas sob as mesmas condições ambientais, foi basicamente a mesma que aquela obtida com dados de DNA (regiões rps16 e trnL-F), de maneira que em alguns casos, o perfil químico pode assumir importância nesta avaliação (JIANG et al., 2006).

Sob o ponto de vista da função ecológica, os metabólitos secundários são de grande importância para a sobrevivência e reprodução das plantas. Podem oferecer à planta defesa frente a microorganismos, vírus, herbívoros ou plantas competidoras. Podem também atuar como sinalizadores, atraindo polinizadores ou dispersores de sementes. Dadas estas características, os metabólitos secundários são caracteres adaptativos originados e modificados como consequência da seleção natural ao longo do processo evolutivo (WINK, 2003).

Um terceiro fator a considerar é que o sistema defensivo de plantas encontra-se sob uma forte pressão evolutiva podendo favorecer a seleção de novas e mais eficientes “armas” de defesa, o que leva à produção de grande diversidade de metabólitos secundários. Assim, os genes envolvidos nas vias metabólicas responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários são um dos elementos genéticos de mais rápida evolução (FISCHBACH; WALSH; CLARDY, 2008). O estudo anterior não desvaloriza estes metabólitos como marcadores taxonômicos,

mas evidencia a dificuldade de interpretação destes marcadores. Assim, pode ser mais útil para a sistemática focar na via metabólica que esteja sendo expressa ao invés de que no produto final desta via (WATERMAN, 2007).

Um quarto aspecto a ser analisado refere-se ao peso dado aos metabólitos produzidos pela planta, pois alguns intermediários de vias metabólicas podem não ser consumidos à mesma velocidade em que são produzidos e isto faz com que no momento da análise sejam detectados alguns compostos que não são expressos diretamente, mas como subprodutos da via metabólica (WATERMAN, 2007). E por último, devido ao fato de que a fitoquímica nos últimos anos, tem sido dirigida à bioatividade e não para fins quimiotaxonômicos, algumas plantas não possuem estudos químicos enquanto outros são incompletos. Existe também a possibilidade de que certas publicações tenham erros enquanto à identificação de compostos ou espécies, de maneira que as inconsistências na quimiosistemática devem ser interpretadas com precaução (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999). Famílias como Asteraceae e Apiaceae são relativamente bem estudadas quimicamente, enquanto outras não apresentam nenhum estudo (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999).

Da mesma maneira recomenda-se ter em conta uma população ampla de espécies do mesmo gênero ou família para conseguir um mapeamento químico mais completo que possa resultar em conclusões mais apropriadas quanto a sua utilidade quimiotaxonômica (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999).

No sentido mais amplo, a quimiotaxonomia, utilizando micro- e macromoléculas tem contribuído com o objetivo de gerar um sistema de classificação (árvore evolutiva) completo e adequado (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999). Após

analisar diversos fatores e exemplos pode-se estabelecer que a distribuição dos metabólitos secundários tem, de fato, um valor taxonômico. No entanto, como sua ocorrência é decorrente da adaptação e estratégias de vida seu valor num determinado âmbito filogenético, deve ser analisada crítica e cuidadosamente (WINK, 2003). Ao mesmo tempo, esta disciplina, pode continuar aportando idéias úteis na reconstrução filogenética de plantas (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999; WATERMAN, 2007).

Uma diferença nos resultados entre a quimiotaxonomia e a filogenia molecular, não significa necessariamente que um deles esteja errado. Uma árvore filogenética baseada em somente um tipo de caracter, seja ele morfológico, químico ou molecular, reflete a evolução desse caracter em particular e não a evolução da planta como tal (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999). Por este motivo, a classificação de plantas não deve se basear somente em um caracter mas em um conjunto de caracteres apropriados a fim de obter um retrato mais fidedigno da história evolutiva desse grupo (GRAYER; CHASE; SIMMONDS, 1999).

Neste trabalho objetivou-se utilizar o perfil metabólico de peperomias para estabelecer correlações entre a química e a evolução das peperomias inferida a partir de dados moleculares.

1.2 METABOLÔMICA

Os metabólitos produzidos pelas plantas são produtos finais das redes metabólicas, a expressão final do genoma a nível metabólico (HUR et al., 2013) (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). É sabido que o estado metabólico das plantas

é controlado dinamicamente pela regulação da transcrição em resposta às condições ambientais e de desenvolvimento (PUTRI et al., 2013). Muitas respostas à alteração da expressão gênica, como por exemplo, das plantas ao estímulo ambiental, resulta em mudanças qualitativas do perfil metabólico, de maneira que a identificação qualitativa dos metabólitos é indispensável (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

A descrição do conjunto de metabólitos secundários nas diversas partes de uma planta, sob diversas condições de crescimento e tratamento é definido como metaboloma (FERNIE, 2003) (FIEHN, 2002). Pode-se entender o metaboloma como uma característica fenotípica de um organismo que é regulada de maneira complexa por diversos componentes celulares em diferentes níveis.

A metabolômica é a análise qualitativa e quantitativa de todos (ou do maior número possível) os metabólitos que participam de reações metabólicas em um organismo, (COX et al., 2014 ;VERPOORTE et al., 2008) (DUNN; ELLIS, 2005). Em relação a uma análise metabólica exaustiva, o perfil metabólico é rápido, não direcionado, de alta capacidade em número de amostras e com um requerimento mínimo de material biológico (IVANISEVIC et al., 2011).

A metabolômica é uma das mais recentes tecnologias “ômicas” que está em rápido desenvolvimento e vem sendo aplicada cada vez mais em diferentes campos de biologia, como genômica funcional, fisiologia, toxicologia, patologia, quimiotaxonomia, ecologia química e na pesquisa de produtos naturais (CHOI; VERPOORTE, 2014) (COX et al., 2014).

A análise metabolômica permite obter um perfil instantâneo do estado genético funcional de um organismo estudando seu perfil bioquímico, permitindo investigar

entre outras coisas, os efeitos epigenéticos das variações ambientais, efeitos das modificações genéticas e em estudos de resposta da planta a estresses ou interação planta-hospedeiro (COX et al., 2014; CHOI; VERPOORTE, 2014 ;DIETERLE et al., 2006; IVANISEVIC et al., 2011; SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Fatores ambientais como radiação UV, temperatura, umidade, fatores bióticos como xenobióticos (por exemplo, toxinas, pesticidas, fármacos), fontes nutricionais (por exemplo, nitrogênio ou carbono em quantidade limitada, estresse salino, inanição), doenças progressivas, etapas de desenvolvimento do organismo ou modificações genéticas conduzem a deslocamentos qualitativos e quantitativos específicos nos padrões de metabólitos (HOLMES et al., 2006).

Presume-se que um organismo contém tantos metabolitos quanto genes que possui, um número aproximado de 30000 metabólitos no caso de plantas. Como a metabolômica trata com todos os metabólitos do organismo, uma falha na extração de todos os metabólitos ou a transformação dos metabólitos durante o processamento do material estudado pode fornecer uma informação equivocada, e uma visão distorcida do metaboloma (CHOI; VERPOORTE, 2014). Assim, os estudos metabolômicos requerem uma análise de metabólitos precisa, global e com a maior velocidade possível (COX et al., 2014).

O procedimento que se segue em um estudo de metabolômica inclui preparação da amostra, análise utilizando instrumentação variada, processamento de dados e análise dos resultados (PUTRI et al., 2013).

A análise qualitativa e quantitativa exaustiva de todos os metabólitos numa célula, tecido ou organismo é um objetivo muito ambicioso que ainda esta longe da realidade para qualquer sistema (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Esta

limitação esta ligada à complexidade química do metaboloma, à mudança biológica própria da maioria de organismos vivos e as limitações da maioria das aproximações experimentais (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

O desenho de um protocolo pré-analítico eficiente é um grande desafio devido ao grande número de metabólitos com ampla faixa de polaridade, diferente estabilidade e diversidade química presentes em um organismo (CHOI; VERPOORTE, 2014). A rigor, não existe uma única técnica com a capacidade de caracterizar todo o metaboloma (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Primeiramente é necessária a cessação das reações biológicas na célula processo que é chamado de *quenching* e que permite obter o perfil metabólico em um momento determinado (PUTRI et al., 2013). No entanto, estresses físicos como alta temperatura ou congelamento/descongelamento é também aplicado (PUTRI et al., 2013). A extração é o processo de obter os metabólitos da célula, para selecionar um método apropriado de extração deve se considerar as propriedades químicas do analito de interesse e a reatividade das enzimas. O método mais comumente usado é extração com solventes orgânicos como clorofórmio e metanol.

Uma única técnica analítica não permite a visualização do metaboloma, de maneira que várias tecnologias devem ser utilizadas a fim de ter uma visão integral do metaboloma (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Diversos métodos analíticos são utilizados em análises metabolômicos, entre os quais estão o infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), HPLC com detecção de ultravioleta (LC/UV/PDA), eletroforese capilar com detetor de ultravioleta (CE/UV), eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser (CE/LIF), eletroforese

capilar acoplada à espectrometria de massas (CE/MS), cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas GC/MS, cromatografia líquida acoplada a detetor de massas (LC/MS), espectrometria de massas em tandem com cromatografia líquida LC/MS/MS, transformada de Fourier- espectrometria de massas (FTMS), HPLC acoplada com detetor de MS e RMN (LC/RMN/MS) e LC/RMN/MS/MS (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). As técnicas hífenadas como LC-MS, LC-MS e LC-RMN tem um interesse crescente (NAKABAYASHI; SAITO, 2013; URICH-MERZENICH et al., 2007) e vêm fornecendo dados de maneira rápida e abrangente, permitindo a quantificação e a reprodutibilidade (COX et al., 2014).

Estas diferentes tecnologias têm diferentes características de velocidade, seletividade e sensibilidade; por exemplo, a RMN é rápida e seletiva, mas tem sensibilidade relativamente baixa (10^{-6} mol). A eletroforese capilar acoplada à fluorescência induzida por laser (CE/LIF) é altamente sensível (10^{-23} mol), mas não é seletiva; técnicas hífenadas de massas com GC/MS e LC/MS oferecem boa sensibilidade (10^{-12} e 10^{-15} mol respectivamente) e seletividade, mas os tempos de análise são relativamente mais longos. A técnica LC/UV, com tempos de análise prolongados, é pouco sensível (10^{-9} mol) (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

GC/MS é uma alternativa de relativamente baixo custo que permite análises reprodutíveis de maneira eficiente e seletiva, podendo resolver misturas complexas e com uma vantagem importante de uma base de dados bastante abrangente para a identificação de estruturas (COX et al., 2014; DUNN; ELLIS, 2005); No entanto, se requer que a amostra seja volátil. Este requerimento é resolvido por derivatização química, mas aumenta o tempo de análise, processamento e variância (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

Em um experimento de espectrometria de massas muitos metabólitos podem ser detectados em um experimento não direcionado. No entanto, a identificação destes compostos é complicada devido ao fato de que muitos produtos naturais têm isômeros que não podem ser diferenciados unicamente baseados em sua relação m/z e também porque para uma faixa de variação de m/z <5 ppm podem ser geradas múltiplas fórmulas empíricas (SUMNER et al., 2015). A quantificação absoluta é difícil de obter por metabolômica baseados em MS, no entanto, a utilização de compostos isotopicamente marcados e células totalmente marcadas tem tornado a quantificação possível (PUTRI et al., 2013).

LC-MS é a tecnologia mais amplamente utilizada em análises metabolômicas devido a sua habilidade de separação e detecção de uma faixa grande de compostos com grande sensibilidade e seletividade (COX et al., 2014). As análises com LC-MS se fazem a temperaturas menores e os analitos não precisam ser voláteis, não sendo necessária a derivatização e simplificando a preparação da amostra (DUNN; ELLIS, 2005) (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). A possibilidade de customizar os parâmetros de separação, detecção ou até mesmo estabelecer um alvo de diversas moléculas a baixas concentrações, faz com que esta técnica seja uma ferramenta ideal para análises metabolômicas (COX et al., 2014).

RMN é um método muito adequado em estudos metabolômicos porque permite a detecção simultânea de diversos grupos de metabólitos secundários. Além disto, os sinais são proporcionais a sua concentração molar, fazendo possível a comparação direta de concentração entre os metabólitos sem a necessidade de fazer curvas de calibração para cada composto, adicionalmente é possível fazer elucidação estrutural dos compostos usando RMN 2D e sem necessidade de

fracionamento do extrato (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010). Uma análise de RMN é um método que precisa pouca preparação de amostra, não destrutivo e de alto rendimento (DUNN; ELLIS, 2005). No entanto, possui baixa sensibilidade, demandando quantidades de amostra maiores a outros métodos analíticos (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010).

A grande quantidade de dados gerados pelos instrumentos analíticos requer a utilização de procedimentos matemáticos e estatísticos para extrair a maior quantidade de informação útil (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). As técnicas quimiométricas vêm contribuindo fundamentalmente para o estudo metabolômico, na medida em que permitem a racionalização de conjuntos amplos de dados, facilitando sua interpretação. As aproximações estatísticas requerem um desenho experimental cuidadoso incluindo amostragem e análise por replicata e a aplicação de testes estatísticos (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). É necessário que as aplicações computacionais permitam diferenciar se as amostras são ou não semelhantes estatisticamente e quais são as diferenças ou semelhanças (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

A análise de componente principal (PCA) é o método predominante para reduzir a dimensionalidade dos dados. No entanto, existem outras metodologias para mineração de dados como os algoritmos de agrupamento (agrupamento hierárquico, árvores de agrupamento, K-means, etc.) (COX et al., 2014; SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

Em um conjunto de dados de metaboloma, algumas variáveis mostram informação redundante; o PCA reduz o número de variáveis dependentes substituindo grupos de variáveis inter-relacionadas com uma única nova variável,

reduzindo assim variáveis complexas em componentes principais manipuláveis sem prejudicar a qualidade dos dados (COX et al., 2014). Com PCA, os componentes principais são estruturados para representar a variação dos dados em um esquema bi- ou tri-dimensional. Esta técnica permite observar padrões de agrupamento das amostras e possíveis *out-liers* (COX et al., 2014). O resultado final é mostrar o efeito da divergência no conjunto de dados sem incluir grandes quantidades de “ruído” irrelevantes (HOLMES et al., 2006).

A análise hierárquica de clusters (HCA) agrupa as amostras de acordo com sua semelhança (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Por sua vez, o agrupamento K-means é outro método de agrupamento que utiliza um número (K) fixo de grupos; o princípio é semelhante ao HCA, no qual se deve definir uma distância métrica que governa o agrupamento, mas a maneira de agrupamento é diferente (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

A metabolômica para o estudo de sistemas biológicos ainda tem um longo período de desenvolvimento por percorrer antes de conseguir a maturidade (PUTRI et al., 2013). No entanto, devido às vantagens técnicas, a metabolômica tem desempenhado um papel fundamental no estudo de plantas, contribuindo para o entendimento dos sistemas celulares e decodificando a função dos genes (PUTRI et al., 2013).

Uma visão holística do metabolismo das plantas que permita entender integralmente as mudanças em uma célula ou organismo frente a estímulos bióticos e abióticos pode ser dada por meio da abordagem de estudos do perfil metabólico em combinação com dados do transcriptoma e do proteoma, abordagem que se denomina biologia de sistemas (URICH-MERZENICH et al., 2007). Estes estudos

permitiriam um entendimento aprofundado das mudanças que acontecem na própria planta e os mecanismos que ela utiliza para fazer frente a estes estímulos.

O estudo proposto com perfil metabólico de peperomias pode fornecer informações cruciais no sentido de determinar o potencial das espécies quanto à presença de metabólitos bioativos, mas pode também contribuir para identificar os padrões metabólicos que juntamente com dados genômicos permitam a compreensão da diversidade molecular.

1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ESPÉCIES DE *PEPEROMIA*

Comparado com *Piper*, poucos estudos fitoquímicos já foram desenvolvidos para *Peperomia*, e somente 34 espécies foram estudadas (ANEXO 1 e 2). Apesar disto, mais de 200 compostos foram isolados de suas espécies, evidenciando sua fitoquímica extremamente rica (ANEXO 1). A grande diversidade química de *Peperomia* é ilustrada pela variedade de produtos naturais isolados; fenilpropanoides, terpenoides, lignoides, cromenos, flavonoides, policetídeos e amidas (WANG et al., 2012).

Diversos compostos bioativos foram isolados da família Piperaceae, mas *Piper* é responsável por 85% do total de relatos, enquanto que publicações de *Peperomia* representam só 15% (LOPEZ et al., 2010), devido ao fato de que existe um maior número de espécies de *Piper* estudadas quando comparado com *Peperomia*.

As espécies de *Peperomia* têm amplas aplicações na medicina popular (ANEXO 2). Por exemplo, preparações fitomedicinais podem ser utilizadas para o tratamento da asma, tosse, inflamação, úlceras gástricas e arritmia cardíaca.

Algumas espécies são utilizadas como diuréticos, analgésicos, antibióticos ou para o controle do nível de colesterol (ARRIGONI-BLANK et al., 2004; BAYMA et al., 2000; FELIPPE et al., 2008; LI, 2008; VELOZO et al., 2009; WANG et al., 2012). De forma complementar, existem várias descrições da atividade biológica de compostos puros isolados de *Peperomia*. Propriedades antiparasitárias (MAHIOU et al., 1996), citotóxica (WU et al., 2005; WU et al., 2006), e antifúngica (SALAZAR et al., 2005) já foram determinadas. Outros compostos são também conhecidos por ter atividade antiprotozoária (MAHIOU et al., 1996), atividade antialimentar contra três fitófagos (*Spodoptera litura*, *Rhaphidopalpa foveicollis* e *Atractomorpha crenulata*) (GOVINDACHARI; KUMARI; PARTHO, 1998), anti-HIV (ZHANG et al., 2007) e anti-inflamatória (LI et al., 2007). Como resultado deste potencial farmacológico, existe um crescente interesse na identificação de novos compostos de *Peperomia* assim como de derivados sintéticos das moléculas isoladas, evidenciado pelo aumento no número de publicações relacionadas com *Peperomia* nos últimos cinquenta anos (Figura 2).

Figura 2. Número de artigos relacionados com *Peperomia* publicados nos últimos 50 anos (SciFinder® Agosto de 2014).

Os produtos naturais isolados de espécies de *Peperomia* podem ser classificados de acordo com sua origem biossintética: Os fenilpropanoides (Figura 3 e ANEXO 1a) representam aproximadamente 12% dos compostos naturais isolados do gênero. As lignanas (Figura 3 e ANEXO 1b-f) 31 %. Um total de 26 flavonoides foram caracterizados no gênero (Figura 3 e ANEXO 1g), representando 11 % do total dos compostos isolados. Os policetídeos (Figura 3, ANEXO 1h-j) podem ser considerados a principal classe de compostos do gênero, com 33 % do total. Diferentes tipos de amidas também foram obtidos de espécies de *Peperomia*, representando 8% dos compostos isolados (Figura 3 e ANEXO 1k)

Figura 3. Ilustração da porcentagem do tipo de produto natural isolado do gênero *Peperomia*.

1.3.1 Fenilpropanoides (Grupo A)

Compostos do tipo foram isolados de folhas de *P. campyloptropa*, *P. dindygulensis*, *P. duclouxii*, *P. nitida*, *P. oreophila*, *P. pellucida*, *P. sui* e *P. tetraphylla* (ANEXO 1a).

Fenilpropanoides como o dillapiol (**A20**) (BAYMA et al., 2000) e apiol (**A21**) (MANALO, 1983) (MALQUICHAGUA SALAZAR, 2009) foram identificados no óleo

essencial das folhas de *P. pellucida* e *P. nitida*. Outro composto representativo do grupo o 2,2,2-trimetoxi-estireno (**A12**) (MANALO, 1983), foi encontrado no extrato metanólico da parte aérea de *P. pellucida*.

Nas folhas de *P. oreophila* podem ser identificados o éster *Z*- e *E*- 3,4,5-trimetoxi-cinâmico e também o análogo de configuração *E* contendo um anel metilenodioxifenila (**A24**, **A25** e **A23**, respectivamente) (SALAZAR et al., 2012).

Nas folhas de *P. tetraphylla* Li e colaboradores identificaram os compostos **A23** (LI et al., 2007) e **A26** (LI et al., 2013), assim como seus derivados acetilados. Em esta planta também já foi reportada a presença de α -asarona (**A19**) (LI et al., 2007) e do 2,4,5-trimetoxi-benzaldeído (**A8**) (LI, 2011).

Os ácidos *Z*- e *E*-*p*-cumárico (**A14** e **A15**) (LI et al., 2007), ácido *E*-ferúlico (**A18**) (LI et al., 2007), ácido vanílico (**A6**) (LI et al., 2007), o ácido siríngico (**A9**) (LI et al., 2007) e o 3-hidroxitirosol (**A10**) (LI et al., 2007) foram encontrados nas folhas de *P. duclouxii*. O 3-hidroxitirosol, eugenol (**A16**) (CHENG et al., 2003) e outros benzenoides como benzaldeído (**A1**) (CHENG; CHEN, 2008), metilparabeno (**A4**) (CHENG et al., 2003), salidrosideo (**A11**) (CHENG et al., 2003) e 2,6-dimetoxi-*p*-quinona (**A5**) (CHENG; CHEN, 2008) foram caracterizados das folhas de *P. sui*.

1.3.2 Lignanas (Grupos B-F)

Existe uma grande diversidade química das lignanas encontradas em espécies de *Peperomia*, com uma variedade estrutural bastante ampla. Vários tipos de lignanas, como as **lignanas tetraidrofurânicas** (ANEXO 1b), isoladas de *P. blanda*, *P. dindygulensis*, *P. heyneana* e *P. pellucida*; **secolignanas** (ANEXO 1c), encontradas em *P. blanda*, *P. dindygulensis*, *P. glabella* var. *nervulosa*, *P. heyneana*,

P. pellucida e *P. sui*; **lignanas Furofurânicas** (ANEXO 1d) obtidas de *P. duclouxii*, *P. obtusifolia*, *P. oreophila*, *P. pellucida*, *P. sui*, *P. tetraphylla* e *P. vulcanica*; **Lignanas** (ANEXO 1e) identificadas em *P. dindygulensis*, *P. duclouxii*, *P. fernandopoioana*, *P. pellucida*, *P. sui* e *P. vulcanica* e **Norlignanas** (ANEXO 1f) isoladas de *P. tetraphylla* e *P. pellucida*.

Em diversos casos, como observado nos exemplos, uma única espécie pode produzir mais de um tipo de lignanas, como no caso da *P. pellucida*, que produz todos os tipos de lignanas descritas.

Em *P. duclouxii* estão reportados um total de 12 lignanas (**E4, E5, E8-E17**) (LI et al., 2007; LI et al., 2003; ZHU; LI; WANG, 2008). Entre elas, cinco contém um anel γ -lactona, um deles é uma lignana glicosídica e quatro outros compostos não apresentam o anel. Provavelmente estes quatro compostos podem ser artefatos produzidos durante a extração. Outras lignanas com anel γ -lactônico, isoladas de espécies do gênero são a (+)-hinokina (**E2**) (CHENG et al., 2003) isolada das folhas de *P. sui*, matairesinol-dimetil-eter (**E6**) (MBAH et al., 2012; MBAH et al., 2002) e Kusunokinol (**E7**) (MBAH et al., 2002) isolados de *P. vulcanica*.

As lignanas tetraidrofurânicas foram encontradas em quatro espécies do gênero, *P. blanda* (**B1 - B5**) (FELIPPE et al., 2008) e *P. dindygulensis* (**B6 - B8, B11** e **B12**) (WU et al., 2005), Cada uma apresenta cinco compostos. *P. pellucida* tem quatro metabolitos reportados (**B6, B9, B12** e **B13**) (XU et al., 2006), e somente duas lignanas foram identificadas em *P. heyneana* (**B9** e **B10**) (ZHANG et al., 2007).

As espécies que produzem as secolignanas são *P. dindygulensis* (**C3 - C5, C7 - C9, C11, C14, C16 - C22**) (LIN et al., 2011) (WANG et al., 2014; WU et al., 2006) (CHEN LI, 2007; GOVINDACHARI; KUMARI; PARTHO, 1998) e *P. heyneana* (**C5,**

C7, C10, C12, C16 - C19 e C21 - C23) (ZHANG et al., 2007) com 15 e 10 substâncias diferentes, respectivamente. Entre as secolignanas isoladas de espécies de *Peperomia*, observou-se a presença de substituintes como hidroxila, metoxila e metilenodioxí. No entanto, não foi identificado nenhum padrão para estas substituições e de qualquer forma, na maioria dos casos a substituição ocorre no carbono α do anel γ -lactônico. Entre as secolignanas encontradas no gênero *Peperomia* se destacam as peperominas A - F e H, pois são muito comuns no gênero. As peperominas D e H, são encontradas em poucas espécies do gênero.

Por sua vez, as lignanas furofurânicas, também encontradas em várias espécies de *Peperomia*. Entre os diferentes metabolitos pode-se destacar, a sesamina (**D1**) (XU et al., 2006) (MBAH et al., 2002) isolada das folhas de *P. pellucida* e *P. vulcânica*; pinoresinol (**D2**) isolado de *P. sui* (CHENG et al., 2003), medioresinol (**D4**) , siringaresinol (**D9**) e zhepiresinol (**D15**), que parece ser um “produto de quebra” do grupo fenila, todos eles encontrados nas folhas de *P. duclouxii* (LI et al., 2007); episalina (**D11**) (MOTA et al., 2009 ;MOTA et al., 2011) e sesartemina (**D12**) (MOTA et al., 2009) extraída de *P. obtusifolia*, diayangambina (**D13**) (MOTA et al., 2011) (SALAZAR et al., 2012) de *P. obtusifolia* e *P. oreophylla* e por último yangambina (**D14**) (MBAH et al., 2002) que pode ser encontrada em folhas de *P. vulcanica*.

Entre as norlignanas a pellucidina A (**F1**) (BAYMA et al., 2000) foi isolada de *P. pellucida* enquanto que as norlignanas **F2, F3 e F4** (LI et al., 2007; LI; TONG; HUANG, 2012) foram isoladas de *P. tetraphylla*.

1.3.3 Flavonoides (Grupo G)

Um total de 26 flavonoides (ANEXO 1g) foram caracterizados de *P. blanda*, *P. dindygulensis*, *P. duclouxii*, *P. obtusifolia*, *P. pellucida*, *P. serpens*, *P. sui*, *P. tetraphylla* e *P. vulcanica*.

Até o momento um total de 10 flavonoides (**G6**, **G8 - G12** e **G23 - G26**) (CHEN LI, 2007; CHENG et al., 2003; FELIPPE et al., 2008; LI CHEN, 2008; LI CHEN, 2007; MOTA et al., 2009; MOTA et al., 2011; WANG et al., 2012; WU et al., 2005) foram isolados de *P. dindygulensis* em sua maioria encontrados na forma heterosídica (**G23 - G26**) (LI CHEN, 2008; LI CHEN, 2007; MOTA et al., 2009; MOTA et al., 2011).

A distribuição dos flavonoides no gênero é bastante heterogênea. Alguns flavonoides como a pellucidatina (**G14**) (AQIL, 1993) são encontrados somente em uma espécie, neste caso na *P. pellucida*. Outros flavonoides como a 5-hidroxi-dimetoxiflavona (**G6**) (CHENG et al., 2003; WU et al., 2005), 5-hidroxi-trimetoxiflavona (**G8**) (CHEN LI, 2007; CHENG et al., 2003; FELIPPE et al., 2008; WANG et al., 2012) e 5-hidroxi-tetrametoxiflavona (**G12**) (CHEN LI, 2007; CHENG et al., 2003; FELIPPE et al., 2008; WANG et al., 2012; WU et al., 2005) são encontradas em várias espécies de *Peperomia*.

1.3.4 Policetídeos (Grupo H-I)

Um total de 52 policetídeos já foram isolados de peperomias (ANEXO 1h). Compostos deste tipo foram encontrados em *P. alata*, *P. dindygulensis*, *P. duclouxii*,

P. glabella var. *nervulosa*, *P. proctorii*, *P. sui*, *P. trineura* e *P. vulcanica*. Entre eles pode-se identificar vários análogos prenilados (ANEXO 1i).

Alguns destes policetídeos apresentam a porção característica 2-acilciclohexano-1,3-diona (**H1 - H23**) (CHENG et al., 2003; FANG, 2011; FERREIRA et al., 2014; LI et al., 2007; SEERAM et al., 2000; WANG et al., 2012; WANG; QU; LIANG, 2013; WU et al., 2005; ZHU, 2011). Esta porção apresenta um sinal característico no RMN, com um singleto raro em $\delta \sim 18$ (1H, s, OH) atribuído à enona quelatada. Estes compostos têm diferenças na cadeia lateral, com diferente número de carbonos, posição das insaturações, anéis aromáticos e em alguns casos se observa a presença de um grupo 3,4-metilenodioxifenila.

P. dindygulensis é uma espécie interessante, com dois policetídeos raros contendo nitrogênio (**H24 - H26**) (WANG; QU; LIANG, 2013).

Policetideos prenilados foram identificados em *P. urocarpa*, *P. arifolia*, *P. obtusifolia*, *P. oreophila* e *P. galioides*, (ANEXO 1i). De um total de seis policetídeos prenilados isolados de espécies de *Peperomia*, cinco deles são encontrados em folhas de *P. galioides*.

1.3.5 Cromenos (Grupo J)

Diversos cromenos (ANEXO 1, Grupo J) foram obtidos de *P. amplexicaulis*, *P. blanda*, *P. clusiifolia*, *P. galioides*, *P. nitida*, *P. obtusifolia*, *P. oreophila*, *P. serpens*, *P. sui* e *P. villipetiola*.

Duas espécies que se destacam são *P. obtusifolia* da qual foram isolados 12 cromenos prenilados diferentes (**J13-J15**, **J17** e **J19-J26**) (BATISTA et al., 2012;

BATISTA et al., 2011; BATISTA et al., 2010; BATISTA et al., 2009; MOTA et al., 2009; TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998). Esta espécie de *Peperomia* representa a principal fonte de cromenos do gênero, mas tal diversidade pode ser simplesmente resultante de um estudo mais intensivo. A outra espécie a ressaltar é a *P. villipetiola*, para a qual foram descritos sete cromenos prenilados (**J1** - **J6** e **J10**) (SALAZAR et al., 2005).

1.3.6 Amidas (Grupo K)

Apesar das amidas serem compostos muito frequentemente isolados de espécies de *Piper*, diferentes tipos de amidas (Grupo K) foram também isolados de *Peperomia* (ANEXO 1k). Estas amidas foram encontradas até o presente em *P. dindygulensis*, *P. duclouxii*, *P. oreophila*, *P. sui*, *P. heyneana* e *P. tetraphylla*.

Uma ampla variedade estrutural foi reportada em espécies de *Peperomia*. Entre outras, foram identificadas aristolactamas, cefaradionas, alcaloides aporfínicos e fenilamidas. Entre estas a *P. duclouxii* se destaca pela presença de um total de dez amidas diferentes isoladas das partes aéreas. Entre as amidas isoladas se encontra a *N*-[2-(3,4-dihidroxifenil)-etil]-3,4-dihidroxi-benzamina (**K12**) (LI et al., 2007), isolada de *P. duclouxii* junto com as feruloiltiraminas (**K13**, **K14** e **K16**) (LI et al., 2007, 2007). Algumas delas são também reportadas para *P. tetraphylla*, *P. sui* e *P. heyneana*.

1.3.7 Óleos essenciais

A composição química e a atividade biológica dos óleos essenciais de espécies de *Peperomia* têm sido amplamente estudadas. É reportado na literatura estudos de óleo essencial de um total de 16 espécies: *P. pellucida*, *P. vulcanica*, *P. blanda*, *P. rupestris*, *P. circinnata*, *P. rotundifolia*, *P. oreophila*, *P. galioides*, *P. emarginella*, *P. serpens*, *P. subespatulata*, *P. macrostachya*, *P. chalhuapuquiana*, *P. obtusifolia*, *P. alata* e *P. circinnata* (ANEXO 2).

A composição química dos óleos essenciais de *Peperomia* caracteriza-se pela grande quantidade de sesquiterpenos, sendo os principais componentes dos óleos essenciais do gênero. Entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno e o germacreno D são os que se encontram mais frequentemente. No entanto, em alguns casos como em *P. pellucida* e *P. subespatulata* os principais componentes são fenilpropanoides (DEDIAZ; DIAZ; CARDOSO, 1988).

Como no caso dos compostos não voláteis, os óleos essenciais de espécies de *Peperomia* também mostram compostos raramente encontrados na natureza como é o caso de 1-metiletilideno propano dinitrila (56%) em *P. pellucida* (OLOYEDE, 2010) e 3-ishwarona (78.2%) em *P. oreophila* (LAGO et al., 2007).

O óleo essencial de *P. pellucida* é o mais estudado do gênero, já que apresenta diversas propriedades medicinais. Entre os compostos identificados no óleo essencial de *P. pellucida* o dillapiol é o componente principal, com uma porcentagem de 37.8 - 55.3% (DA SILVA et al., 2006; DE LIRA et al., 2009; FRANÇOIS et al., 2013; OGUNWANDE et al., 2009). Outros componentes, como carotol (13,41%), *trans*-3-pinanona (32,59%) e 2,4,5-trimetoxi-estireno foram

identificados como constituintes majoritários no óleo essencial da mesma planta (*P. pellucida*) de diferente origem geográfica (MOREIRA et al., 1999; OLOYEDE, 2010) o que mostra a plasticidade expressa pelos componentes voláteis das plantas.

A *P. galioides* é outra espécie bem estudada do gênero e mostrou variação na composição dos óleos essenciais dependendo da origem geográfica. Em um trabalho desenvolvido com espécies coletadas no Brasil e no Perú, as espécies mostraram como principais componentes os sesquiterpenos β -globulol (22,2%), *epi*- α -bisabolol (29,2%) e β -cariofileno (13,1-16,0%). No entanto, em amostras coletadas na Colômbia o principal componente do óleo essencial foi o fenilpropanoide safrol (42,3%) (DE LIRA et al., 2009; DE FEO et al., 2008; ROBAYO-GAMA et al., 2010).

Estas variações intraespecíficas também são observadas em indivíduos coletados em uma mesma região, onde é avaliada a variação na porcentagem dos constituintes do óleo essencial. Zoghbi e colaboradores (2005) estudaram *P. rotundifolia* e *P. circinnata* coletadas em diferentes localidades e o estudo da composição do óleo essencial mostrou variações na porcentagem de seus constituintes. O óleo essencial de *P. rotundifolia* tem como principal constituinte o limoneno (28,7-35,0%), decanal (22,8-44,4%) e no caso de *P. circinnata* o monoterpeno mirceno (12,2-31,2%) e o sesquiterpeno β -felandreno (17,5-25,4%), em ambos os casos as porcentagens dos compostos foi variável (ZOGHBI et al., 2005).

As mudanças no perfil químico de óleos essenciais de espécies de *Peperomia* foram atribuídas ao estado da amostra no momento da análise. Lira e colaboradores realizaram análises do óleo essencial das folhas de *P. galioides*, onde observaram variações na porcentagem dos constituintes voláteis em amostras com material

fresco e seco. Compostos como β -cariofileno (fresco =13,1%, seco = 16,0%), α -humuleno (fresco =13,2%, seco = 17,3%) e *epi*- α -bisabolol (fresco = 15,1%, seco = 21,3%) são encontrados em maior porcentagem em amostras secas (LEO LIRA, 2007).

Em outro estudo, com *P. serpens*, Silva *et al.*, analisaram o óleo essencial de folhas frescas e secas e detectaram uma mudança semelhante na porcentagem relativa dos principais constituintes por meio da extração por hidrodestilação de folhas frescas e secas. Foram identificados o acetato de (*Z*)-nerolidila (fresco = 42,9%, seco = 36,6%) e (*E*)-nerolidol (fresco = 31,3% seco = 29,1%) em diferentes porcentagens dependendo das condições das folhas. Entretanto, a extração da mesma amostra por extração em fase sólida SPME mostrou os sesquiterpenos α -humuleno (49,1%) e β -cariofileno (35,1%) como os principais constituintes da planta (DA SILVA *et al.*, 2006).

A variabilidade encontrada na composição dos óleos essenciais de espécies de *Peperomia* depende basicamente da origem e da manipulação das amostras (ARAUJO *et al.*, 2012).

1.4 POLICETÍDEOS DE *PEPEROMIA*

A maioria dos compostos isolados de espécies de *Peperomia* são oriundos da via biossintética dos policetídeos. Estes compostos pertencem a uma das maiores e mais diversas classes de metabólitos secundários que são formados por um grande número de organismos diferentes incluindo procariotos e eucariotos (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009; STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

Os policetideos são os compostos com maior potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (SHEN, 2003). Alguns exemplos incluem a danorubicina, eritromicina, tetraciclina, rampamicina e lovastatina (SHEN, 2003), que desempenham um papel importante na medicina, devido a suas atividades como antimicrobiana, antiparasitária, antineoplásica, imunossupressiva e controladora do nível de colesterol (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009; WATANABE; PRASEUTH; WANG, 2007).

1.4.1 Policetídeo sintases (PKS)

Os compostos policetídeos são biossintetizados pela ação de enzimas-chave conhecidas como policetídeo sintases (PKS) (VALARMATHI et al., 2009). As policetídeo sintases são um grupo de enzimas que catalisam a condensação de ésteres-CoA iniciadores, como por exemplo, acetil-CoA, com ésteres-CoA extensores, por exemplo, malonil-CoA (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009). As PKSs evoluíram a partir de sintases de ácidos graxos (FASs) do metabolismo primário e são classificadas de acordo com sua configuração arquitetônica como tipo I, II ou III (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

1.4.1.1 PKS tipo I

O tipo I de PKS (Figura 4) descreve um sistema de um ou mais proteínas multifuncionais que contém um sítio ativo diferente para cada reação catalisada pela enzima na montagem e modificação da cadeia policetídica de carbonos. Estas

enzimas estão organizadas em módulos, contendo principalmente aciltransferases (AT), proteína carregadora do grupo acila (ACP) e β -ceto acil sintase (β -KS). As PKS I estão sub-agrupadas como iterativas ou modulares e estão usualmente presentes em bactérias e fungos (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

Figura 4. PKS tipo I (não iterativa) (modificada de (SHEN, 2003)).

1.4.1.2 PKS tipo II

As PKS tipo II (Figura 5) constituem-se num sistema de enzimas individuais que possuem um único conjunto de atividades e agem de maneira iterativa. Uma série mínima consiste de duas unidades de cetosintases (α - e β - KS) e uma ACP que serve como uma âncora para o crescimento da cadeia poliketídica. Subunidades adicionais de PKS como as cetoreduases, ciclases ou aromatases definem o padrão de ciclização do intermediário poliketídico e as modificações adicionais, como oxidações, reduções ou glicosilações do composto poliketídico. O único grupo de organismos conhecidos que utilizam sistemas PKS do tipo II para a biossíntese de poliketídeos são actinomicetos de solo e marinhos. (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

Figura 5. PKS tipo II (iterativa) (SHEN, 2003)

1.4.1.3 PKS tipo III / PKS em plantas

Enzimas PKS tipo III (Figura 6) estão presentes em bactérias, plantas e fungos, e são essencialmente enzimas de condensação sem ACP (proteína carregadora de acila) e atuam diretamente sobre substratos acil-CoA (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009; SHEN, 2003). As chalcona sintases (CHS) e estilbeno sintases (STS) são as enzimas mais estudadas deste tipo, sendo este grupo chamado do tipo CHS/STS (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

Figura 6. PKS tipo III (ACP independente e iterativa) (SHEN, 2003).

PKSs do tipo III produzem uma ampla variedade de compostos como chalconas, pironas, acridonas, floroglucinois, estilbenos e lipídios resorcinólicos.

Além de seus diversos produtos, estas PKS possuem uma ampla distribuição, uma estrutura relativamente pequena e simples e são fáceis de manipular geneticamente (YU et al., 2012).

As PKS tipo III são estruturalmente diferentes das PKS tipo I e II, mesmo contendo o resíduo de cisteína altamente conservado em todas as PKSs. Esta cisteína é responsável pela atividade PKS, atua como nucleófilo e sítio onde se liga o intermediário policetídeo (YU et al., 2012). A sequência de aminoácidos de este motivo de cisteína em PKS III aparenta não ter semelhança a aqueles de cetosintase (KS) das PKS tipo I e II (SHEN, 2003). As PKS tipo III de plantas tem um tamanho aproximado de 400 aminoácidos (41-44 kDa) e compartilham um 45-95% de identidade entre elas (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

Pequenas modificações no sítio ativo das PKS de plantas oferecem uma grande diversidade funcional, pois estas mudanças influenciam na seleção do substrato, no tamanho da cadeia policetídeo e no mecanismo da reação de ciclização. O tamanho do sítio ativo influencia a seletividade da molécula iniciadora e limita o tamanho da cadeia policetídeo sintetizada (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

Diferentes iniciadores de cadeia são utilizados por PKS III variando de substratos de tipo alifático-CoA a aromático-CoA, de substratos pequenos (acetil-CoA) a volumosos (*p*-cumaroil-CoA) ou substratos polares (malonil-CoA) a não polares (isovaleroil-CoA). Adicionalmente, as PKS podem ter diferente número de reações de condensação, levando a diversos tamanhos de cadeia policetídeo. O padrão de ciclização das PKS de plantas pode ser realizado de diferentes maneiras, conferindo uma diversificação funcional e estrutural de policetídeos extraordinária às

plantas (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009; WATANABE; PRASEUTH; WANG, 2007).

Várias PKS do tipo III foram descritas em plantas e todas elas participam da biossíntese de metabólitos secundários: chalcona sintases (CHS), 2-pirona sintases (2-PS), estilbenosintases (STS), bisbenzilsintases (BBS), homoeriodictiol/eriodictiolsintases (HEDS ou HvCHS), acridonasintases (ACS), benzofenona sintases (BPS), floroisovalerofenona sintases (VPS), isobutirofenonasintases (BUS), ácido triacéticocumaroilsintases (CTAS), benzalacetonasintases (BAS), C-metilchalconasintases (PstrCHS2), estilbenocarboxilatosintases (STCS), e do tipo *anter*-específica chalcona sintases (ASCL) (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

Dependendo do padrão de ciclização dos substratos intermediários as enzimas PKS III podem ser classificadas como chalcona sintase (CHS), estilbeno carboxilato sintase (STCS), estilbeno sintase (STS) ou ácido triacético cumaroil sintases (CTAS) (Figura7) (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

As PKS tipo chalcona sintase (CHS) se caracterizam por permitir uma condensação de Claisen que leva à ciclização intramolecular entre o carbono C6 e C1 (Figura 7). A ciclização nas PKS tipo estilbenosintase (STS) acontece entre os carbonos C2 e C7 por meio de uma condensação aldólica e com uma descarboxilação do C1 como CO₂ (Figura 7). Na PKS tipo CTAS é formada uma lactona entre o oxigênio do carbono C5 e o carbono C1 (Figura 7). Por sua vez, as estilbenocarboxilato sintases (STCS) apresentam também uma condensação aldólica com a consequente ciclização entre os carbonos C2 e C7 sem a descarboxilação que apresentam as STS (Figura 7).

Figura 7. Tipos de ciclização catalisadas por enzimas PKS de plantas. A Seta cheia ilustra a condensação de Claisen C6/C1, a seta traço e ponto representa a condensação aldólica C2/C7 e a seta pontilhada mostra a lactonização do oxigênio no C-5/C-1. Seta dupla indica mais de uma etapa. Adaptado de FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009.

As enzimas envolvidas na síntese de acridonas, estilbenos e chalconas estão intimamente relacionadas (SCHRODER, 1997). Acredita-se que esta família de proteínas é mais antiga do que se pensa devido ao fato de que sequências relacionadas são encontradas em bactérias (25-30% de identidade com CHS de plantas e presença de cisteína no sitio ativo) (SCHRODER, 1997).

1.4.1.3.1 Chalcona sintase (CHS)

As chalcona sintase (CHS) intervém na biossíntese de flavonoides (WATANABE; PRASEUTH; WANG, 2007); catalisam a síntese de grande número de

substâncias de interesse biológico. Por exemplo, substâncias que brindam proteção à planta da luz ultravioleta, substâncias responsáveis pela coloração das flores, pela defesa contra patógenos, interação com microorganismos e fertilidade (SCHRODER, 1997). Estas enzimas são proteínas relativamente pequenas (40-45 kDa) e utilizam ésteres CoA de fenilpropanoides como substratos, catalisam três reações de condensação com malonil-CoA na síntese de um tetracetídeo que resulta em um novo sistema aromático (SCHRODER, 1997).

1.4.1.3.2 Estilbeno sintase (STS)

Os estilbenos são pouco comuns em plantas vasculares e tem ocorrência em famílias de plantas pouco relacionadas. Estas substâncias atuam como fitoalexinas, indicadores de estresse e contribuem para a resistência de tecidos lenhosos. Este tipo de substâncias é sintetizado pela ação de uma estilbeno sintase, uma enzima que está intimamente relacionada com as CHS (com 70% de identidade de aminoácidos conservados) (SCHRODER, 1997).

As reações de CHS e STS são idênticas até a formação do tetracetídeo, e o sítio catalítico (cisteína, Cys169) se encontra na mesma posição em ambas as proteínas. A diferença radica na reação de anelamento (condensação aldólica versus condensação de Claisen) (ECKERMANN et al., 2003) (Figura 7). Todas as STS analisadas *in vitro* resultam em produtos descarboxilados. No entanto, estilbenoides que conservam o grupo carboxílico também são encontrados em plantas (SCHRODER, 1997).

A partir de uma árvore filogenética construída com 34 sequências de CHS e 4 sequências de STS revelou-se que as STS não formam um cluster separado das CHS. Isto sugere que as STS evoluíram de CHS várias vezes independentemente no curso da evolução. De fato, as STS conservam uma identidade entre 60 e 70% com as CHS (ECKERMANN et al., 2003) e experimentos demonstraram que a mudança de 4 aminoácidos em uma sequência de CHS de 107 aminoácidos resultou na atividade de STS (TROPF et al., 1994).

Curiosamente, as CHS se agrupam em subfamílias que em grande medida correspondem com as famílias sistemáticas (TROPF et al., 1994); já as STS se agruparam com as CHS da mesma planta ou de espécies relacionadas (TROPF et al., 1994).

É praticamente impossível distinguir entre as enzimas CHS, STS e CTAS pela comparação geral das proteínas. Isto complica a pesquisa devido ao fato de que a maioria de sequências identificadas como CHS foram identificadas por comparação com sequências existentes em bases de dados, de maneira que é difícil saber se funcionalmente elas são CHS, STS ou CTAS (SCHRODER, 1997). A classificação de uma proteína clonada como CHS, STS ou CTAS ou outra enzima relacionada requer evidencia genética ou expressão funcional em outro organismo (expressão heteróloga) para se confirmar sua funcionalidade (SCHRODER, 1997).

Grande progresso já foi feito para entender o mecanismo de reação de PKS de plantas, várias estruturas cristalinas já foram identificadas e o mecanismo de reação de CHS e STS já foi decifrado. No entanto, o mecanismo de reação de enzimas como STCS ainda é incerto (FLORES-SANCHEZ; VERPOORTE, 2009).

1.4.1.3.3 Estilbeno carboxilato sintases (STCS)

As enzimas STCS possuem uma atividade semelhante às STS, porém, sem a descarboxilação final (Figura 7) (ECKERMANN et al., 2003).

A atividade *in vitro* de STCS foi demonstrada até 2003, mesmo com baixa porcentagem de formação do produto esperado (ECKERMANN et al., 2003). Esta proteína STCS contém resíduos pouco comuns em posições que em outras proteínas relacionadas com CHS são altamente conservadas, sendo que estudos de metagênese demonstram que estes resíduos são importantes para a atividade estrutural e catalítica (ECKERMANN et al., 2003).

1.4.2 Ácido orselínico como intermediário na via biossintética de produtos naturais de *Peperomia*

Existem diversos produtos naturais de espécies de *Peperomia* que podem ser originados pela ação de uma STS tendo como intermediário o ácido orselínico. É o caso dos compostos **I4** (*P. galioides*, *P. urocarpa*), **I5** (*P. oreophila*, *P. arifolia*), **I6** (*P. obtusifolia*, *P. galioides*) ou pela ação de uma STCS (mantendo o grupo carboxílico) como no caso dos compostos **I7** (*P. galioides* e *P. urocarpa*), **J1** (*P. serpens*, *P. villipetiola*), **J2** (*P. nitida*, *P. villipetiola*), **J3** e **J4** (*P. villipetiola*), **J5** (*P. nitida*, *P. villipetiola*), **J9** (*P. serpens*), **J10** (*P. villipetiola*), **J18** (*P. ampleuxicaulis*), **J19- J26** (*P. obtusifolia*) (ANEXO 1). A rota biossintética para estes compostos de *P. villipetiola* (Figura 8) foi sugerida por Salazar em 2005 (SALAZAR et al., 2005).

Figura 10. Derivados de ácidos benzoicos e cromenos isolados de *Rhododendron anthopogonoides* (IWATA; KITANAKA, 2010)

Figura 11. Derivados de ácidos benzoicos e cromenos isolados de *Rhododendron dauricum* (IWATA et al., 2004).

O ácido orselínico é encontrado comumente em líquens (associações simbióticas entre fungo e alga) como monômero de depsídeos e depsídonas (BIRCH, 1967) (CHOOI et al., 2008); também é encontrado em fungos como *Penicillium madriti* (GAUCHER; SHEPHERD, 1968), *Penicillium fennelliae* (EIJK, 1969), *Chaetomium globosum* (XU et al., 2014) e *Aspergillus nidulans* (SANCHEZ et al., 2010). Em plantas foi encontrado o glicosídeo do ácido orselínico 2-O-β-D glucopiranosídeo orselínico (Figura 12) no extrato metanólico da planta *Syzygium aromática*, pertencente à família Myrtaceae (CHARLES; GARG; KUMAR, 1998).

Figura 12. Glicosídeo de ácido orselínico isolado de *Syzygium aromática* (CHARLES; GARG; KUMAR, 1998).

Como observado (Figura 13), a presença deste tipo de substâncias não é uma característica sinapomórfica, mas podendo resultar da convergência evolutiva, no qual estes caracteres evoluíram de maneira independente várias vezes.

Figura 13. Filogenia de angiospermas (APG III) Imagem tomada de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> mostrando a relação filogenética distante entre às ordens Piperales (à qual pertencem as peperomias), Myrtales (à qual pertence a planta *Syzygium aromaticum*) e Ericales à qual pertencem as plantas da família Rhododendron.

1.4.2.1 Ácido orselínico sintase

A atividade do ácido orselínico sintase (OSAS) foi demonstrada pela primeira vez em um extrato bruto de células do fungo *Penicillium marditi* em 1968 (GAUCHER; SHEPHERD, 1968). Em 1997 foi identificado o gene *AviM* em *Streptomyces viridochromogenes*, que expresso em *Streptomyces lividans* e *S. coelicolor* levou à formação de ácido orselínico, a sequência deduzida de aminoácidos para este gene exibiu grande semelhança com PKS tipo I (GAISSER et al., 1997).

Em 2002, foi identificado o gene CalO5 de *Micromonospora echinospora* que codifica para uma PKS tipo I, com uma semelhança notável com *AviM* (65% de identidade, 93% de semelhança) (AHLERT et al., 2002). Em 2001 foi publicado numa patente (WO 0151639-A2 44 19-JUL-2001) para o gene *evrJ* de *Micromonospora carbonaceae*, que codifica para um ácido orselínico sintase, PKS tipo I.

1.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS

A grande quantidade de exemplos de fungos endofíticos produtores de compostos isolados da planta hospedeira e a dificuldade de amplificação do gene responsável pela produção do ácido orselínico nas peperomias estudadas apontou para o estudo de seus fungos endofíticos. A hipótese seria a participação de microorganismos endofíticos na produção do ácido orselínico (intermediário biossintético dos policetídeos derivados do ácido orselínico isolados da planta).

Bactérias e fungos são os endófitos mais comumente encontrados em plantas. No entanto, outros microorganismos poderiam fazer parte da comunidade microbiológica hospedeira das plantas como Archeae (STROBEL et al., 2004).

Os fungos endofíticos são aqueles que habitam tecidos de uma planta viva e aparentemente saudável sem gerar nenhuma manifestação negativa imediata (ALY et al., 2010; KHARWAR et al., 2011; STONE, 2011). Todos os tipos de interações envolvendo fungos e plantas são possíveis: comensalismo, mutualismo e parasitismo (STONE, 2011). Existem vários relatos que mostram a participação de comensalismo dos fungos endofíticos em diferentes circunstâncias de estresse à planta hospedeira, como tolerância à altas temperaturas, seca, salinidade do solo, presença de metais, herbivoria, doenças em geral e estímulo ao crescimento da planta e obtenção de nutrientes (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008) (GUNATILAKA, 2006). Por sua vez, os endofíticos geralmente permanecem em estado de latência por longos períodos. Sob determinadas condições ambientais os fungos podem tornar-se patogênicos. Alguns fungos podem ser patogênicos para algumas plantas e ter relações de comensalismo ou mutualismo com outras (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008).

Os fungos endofíticos por estarem sujeitos a permanentes interações metabólicas e ambientais apresentam grande potencial biossintético para a produção de metabólitos bioativos (Figura 14) (CHITHRA et al., 2014; STROBEL et al., 2004). Entre os compostos produzidos por microorganismos endofíticos se encontram aqueles com aplicações na agricultura, na indústria e na medicina, como antibióticos, antifúngicos, imunossupressores e compostos anticancerígenos (STROBEL et al., 2004), sendo a grande maioria compostos policetídicos.

Considerando-se a existência de mais de 300.000 espécies de plantas superiores, cada uma hospedando uma comunidade complexa de fungos endofíticos, pode-se supor que muito pouco é conhecido com relação à biologia de endofíticos (KHARWAR et al., 2011; STONE, 2011; STROBEL et al., 2004). Trata-se de um campo de estudo quase inexplorado e bastante promissor, fato evidenciado pelo aumento do número de publicações relacionadas ao tema nos últimos anos (ALY et al., 2010).

A classificação filogenética dos endofíticos isolados pode ser determinada pelo sequenciamento de certas regiões dos ácidos nucleicos (sendo a região espaçadora ITS do rDNA a mais comumente utilizada para tais fins) através da comparação com sequências de nucleotídeos de fungos já conhecidos, pode-se identificar a categoria taxonômica do isolado (ordem, família ou até incluso o gênero) (STONE, 2011).

Os compostos isolados de fungos endofíticos são de grande variedade estrutural, incluindo benzopiranos, alcaloides, aminas, amidas, esteroides, fenois, derivados de isocumarinas, flavonoides, fenilpropanoides, cromonas, depsidonas, depsipeptídeos, policetídeos, lignanas, peptídeos, quinonas, espirobisnaftalenos, terpenos, xantonas, citochalasinias, enniatinas, compostos clorados, entre outros (Figura 14) (GUO et al., 2008; KHARWAR et al., 2011; TAN; ZOU, 2001; VERMA; GANGWAR; NATH, 2014; VERMA; KHARWAR; STROBEL, 2009).

Figura 14. Exemplo de compostos isolados de fungos endofíticos com atividade biológica (GUO et al., 2008; STROBEL et al., 2004; KHARWAR et al., 2011; VERMA; KHARWAR; STROBEL, 2009)

O perfil metabólico dos fungos é fortemente influenciado pelo ambiente químico onde o endofítico se desenvolve. Existe grande incerteza sobre o que o endofítico produz em cultura com relação ao que produz no ambiente natural. É provável que

os fatores que afetam a planta hospedeira como sazonalidade, idade, localização e ambiente podem afetar a biologia do endofítico (qualitativa ou quantitativamente) (STROBEL et al., 2004). Também é evidente que dependendo da composição do meio de cultura, a temperatura de crescimento, o tempo de desenvolvimento do fungo, o grau de aeração, e até a planta de onde foi isolado, muda o perfil de metabólitos produzidos pelo fungo endofítico (qualitativa ou quantitativamente) (STROBEL et al., 2004). Assim, não há consenso sobre quais são as condições ótimas para a produção de metabólitos secundários (MATHAN, 2013), mesmo porque depende dos metabolitos de interesse e do fungo sob análise.

Alguns fungos endofíticos podem produzir os mesmos compostos ou análogos a aqueles produzidos pela planta hospedeira. Tais semelhanças biossintéticas podem ser resultado da grande e prolongada interação simbiótica entre fungo e a planta hospedeira (CHITHRA et al., 2014), o que levou a Tan e Zou a pensar na “recombinação genética” entre o fungo e a planta hospedeira ao longo do processo evolutivo (transferência horizontal de genes) permitindo a incorporação de genes de rotas biossintéticas da planta hospedeira ao endofítico (TAN; ZOU, 2001). Entretanto, não existem ainda estudos que comprovem esta hipótese (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

Uma mesma substância pode ser gerada através de diferentes vias metabólicas (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008), como no caso da emodina (Figura 15), uma antraquinona produzida por fungos bem diferentes, *Cortinarius sanguineus* (basidiomiceto) e *Penicillium islandicum* (ascomiceto). Este composto é também encontrado na planta *Rheum rhaponticum* (ruibarbo) sendo que a

biossíntese na planta não guarda nenhuma semelhança com a do fungo (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

Um dos casos mais amplamente conhecidos de produção de compostos tanto pelo fungo endofítico como pela planta hospedeira, é o caso do agente anti-tumoral Taxol (Figura 15). Encontrado em espécies do gênero *Taxus* e isolado primeiramente da planta *Taxus brevifolia*, o Taxol foi posteriormente encontrado no fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, hospedeiro da mesma planta (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Outro caso conhecido é o alcaloide citotóxico camptotecina (Figura 15), utilizado como precursor de medicamentos anticancerígenos. A camptotecina está presente em baixas concentrações nas raízes de espécies de *Nothapodytes* e foi isolado posteriormente do fungo endofítico da família Phycomycetes, proveniente da planta *Nothapodytes foetida* (PURI et al., 2005). A *Azadirachta indica*, o neen, uma planta produtora do inseticida natural azadiractina (Figura 15) é hospedeira do fungo *Eupenicillium parvum* que também produz essa substância (KUSARI et al., 2012). O agente anticancerígeno cajanol (Figura 15) encontrado na planta *Cajanus cajan* foi também isolado do fungo endofítico *Hipocrea lixii* (ZHAO et al., 2013). Finalmente, os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Mycosphaerella* sp. PF13 isolados de *Piper nigrum* são produtores de piperina (Figura 15) um dos principais compostos isolados da sua planta hospedeira e com diversas atividades biológicas (CHITHRA et al., 2014; CHITHRA et al., 2014).

No caso particular da família Piperaceae, existem alguns relatos de fungos endofíticos isolados de espécies de *Piper*, como aqueles já descritos anteriormente dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Mycosphaerella* sp. PF13 isolados de *Piper nigrum* (CHITHRA et al., 2014; CHITHRA et al., 2014). De *Piper nigrum* L.

coletada no nordeste da Índia, foi isolado também fungo *Muscodor albus* MOW12 produtor de uma mistura antimicrobiana volátil, de acordo com análises de cromatografia a gás, etanol foi o componente majoritário seguido por hexanal e o acetato de etila (BANERJEE et al., 2014). Além dos fungos descritos, também foram isolados os fungos *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium sporotrichioides*, *Gliocladium roseum*, *Phialophora verrucosa*, *Stachylidium bicolor*, *Trichoderma viride*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium frequentans* (SHANKAR, 2010).

Figura 15. Alguns exemplos de compostos isolados de fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras.

De *Piper longum* por sua vez foi isolado o fungo *Chaetomium* sp. (VERMA; GANGWAR; NATH, 2014) assim como também o fungo *Periconia* sp., produtor de piperina (VERMA et al., 2011). Das folhas da planta *Piper hispidum* foram isolados 21 fungos endofíticos agrupados em 11 gêneros (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*,

Glomerella, *Guignardia*, *Schizophyllum*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Phlebia*, *Marasmius* e *Lasiodiplodia*) (ORLANDELLI et al., 2012). De *Piper guineense* foi isolado um fungo *Fusarium* sp, do qual foram isolados entre outros compostos o novo cromeno (S)-bancromeno (Figura 16), além de sete compostos conhecidos (TATONG et al., 2014). De *Piper aduncum* foi obtido o fungo *Xylaria* sp, do qual foi isolada uma nova citocalasina (Figura 16) junto com outros cinco compostos conhecidos (SILVA et al., 2010). Outro trabalho da mesma planta, foi isolado *Xylaria* sp. produtor de uma nova dihidro-isocoumarina o ácido (3*R*,4*R*)-3,4-dihidro-4,6-dihidroxi-3-metil-1-oxo-1*H*-isocromeno-5 carboxílico (Figura 16) que apresentou atividade anti-fúngica e atividade inibitória de acetilcolinesterase. (OLIVEIRA et al., 2011). Em um outro estudo, foram isolados dois novos sesquiterpenos: ácido 9,15-diidroxi-presilfiperfolan-4-oico e o ácido 15-acetoxi-9-hidroxi-presilfiperfolan-4-oico (Figura 16) de *Xylaria* sp. isolado das folhas de *Piper aduncum* (SILVA et al., 2010). Outro estudo de fungos endofíticos de folhas e caule da mesma planta levou ao isolamento de 315 fungos, de 85 morfologias diferentes, entre os quais foram identificados fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (LIMA et al., 2011). Este último estudo assim como todos os descritos mostram a grande oportunidade de estudo de fungos endofíticos de espécies da família Piperaceae para a descoberta de novas substâncias.

No caso específico de *Peperomia*, até o momento não existe nenhum estudo publicado, desta maneira este trabalho é uma das primeiras contribuições ao conhecimento de sua diversidade microbiológica.

Os compostos policetídicos de fungos são produzidos por enzimas PKS iterativas de multidomínio. Estes compostos podem ser grupados em não reduzidos

(NR), parcialmente reduzidos (PR) e altamente reduzidos (HR) (BINGLE; SIMPSON; LAZARUS, 1999; NICHOLSON et al., 2001; COX, 2007). Os fungos são conhecidos por produzir compostos policetídicos estruturalmente diversos (NICHOLSON et al., 2001; ANKE et al., 2009) e por serem a maior fonte de policetídeos (em particular os Deuteromicetos) (BINGLE; SIMPSON; LAZARUS, 1999). Muitos destes compostos são conhecidos por causar danos severos na agricultura, na indústria alimentaria e na saúde humana (ANKE et al., 2009; COX, 2007). No entanto, também mostram diversas atividades biológicas como antibióticas, antiinflamatórias, antitumoral e antiviral (ANKE et al., 2009); sendo a lovastatina (figura 17) um dos compostos mais conhecidos na medicina por sua capacidade de redução dos níveis de colesterol no sangue.

Figura 16. Alguns compostos isolados de fungos endofíticos hospedeiros de espécies de *Piper*.

Outros policetideos isolados de fungos são a aflatoxina B1, fumonisina, citrinina, assim como o policetideo altamente complexo T-toxina (Figura 17) (ANKE et al., 2009).

O ácido orselínico (Figura 17) é o tetracetídeo não reduzido mais simples isolado de fungos e é biossintetizado através da condensação do grupo acetato como iniciador e de três unidades extensoras de malonil (SANCHEZ et al., 2010). Foi um dos primeiros policetideos isolados de fungos, obtido inicialmente do fungo *Penicillium madriti* em 1968 (ANKE et al., 2009). Entretanto, também é encontrado em outros fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (COX, 2007), como o *Apergillus nidulans* (SANCHEZ et al., 2010).

O ácido orselínico sintase (OSAS) (gene AN7909.4) foi estudado no fungo *Aspergillus nidulans*, sendo uma PKS multidominio tipo I, com 2104 aminoácidos e semelhante com outras PKS não reduzidas identificadas em seqüências gênicas de fungos (SANCHEZ et al., 2010). A organização dos domínios da OSAS de fungo diverge daquela OSAS descrita em bactérias (SANCHEZ et al., 2010), que é também uma PKS tipo I e forma parte do cluster gênico dos policetideos derivados de ácido orselínico, calicheamicina (gene CalO5) e avilamicina A (gene AviM), estudados nas bactérias *Micromonospora echinospora* e *Streptomyces viridochromogenes* respectivamente (AHLERT et al., 2002; GAISSER et al., 1997). A OSAS de bactéria é mais semelhante com as PKS parcialmente reduzidas de fungo do que com as PKS não reduzidas (SANCHEZ et al., 2010). Todos estes genes descritos para OSAS, junto com outras seqüências de PKS de plantas, foram utilizados neste trabalho para o desenho de iniciadores que permitissem a amplificação da ácido orselínico sintase em peperomias.

Figura 17. Exemplo de policetideos isolados de fungos.

Derivados do ácido orselínico são também encontrados em fungos de diferentes espécies como *Chaetomium globosporum*, *Chaetomium globosum*, *Eurotium cristatum*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium rubrum*, *Penicillium commune*, *Armillaria melea* e várias outras espécies do gênero *Armillaria* em culturas duplas (Figura 18). Vários desses derivados apresentaram atividade contra o vírus da influenza, anti-cancerígenos e antibacterianos (BASHYAL et al., 2005; DU et al., 2014; GAO et al., 2011; MISIEK et al., 2009; SCHLORKE; ZEECK, 2006; SONNENBICHLER et al., 1997; STIERLE; STIERLE; GIRTSMAN, 2012; WANG et

al., 2011; XU et al., 2014).

Figura 18. Derivados de ácido orselínico encontrados em diversas espécies de fungos endofíticos.

Apesar da relevante relação simbiótica dos fungos endofíticos com suas plantas hospedeiras, existem poucos estudos realizados com o objetivo de determinar o grau de envolvimento de cada organismo no metabolismo do outro (MEJIA et al., 2014). No caso específico de plantas do gênero *Peperomia* ainda não há relatos publicados de isolamento, identificação e caracterização química de

fungos endofíticos isolados das mesmas. Portanto, esse projeto objetiva contribuir para descrever a estrutura evolutiva de espécies de *Peperomia* incluindo o envolvimento de fungos endofíticos no seu metabolismo secundário.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo de espécies de *Peperomia* (Piperaceae) objetivando compreender a estrutura evolutiva e avaliar sua correlação com o metabolismo secundário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Realizar o estudo filogenético de plantas pertencentes ao gênero *Peperomia* usando os marcadores ITS e *matK*;
- * Obter dados de perfil metabólico (RMN ¹H, LC-ESI-MS e HPLC) de algumas espécies de *Peperomia* e analisa-los através de análises estatísticas (HCA, DAPC);
- * Realizar estudo fitoquímico de algumas peperomias incluídas no estudo;
- * Seqüenciar o gene responsável pela biossíntese de derivados de ácido orselínico em espécies de *Peperomia*;
- * Seqüenciar genes PKS-CHS de espécies do gênero *Peperomia* e de famílias filogeneticamente relacionadas;
- * Isolar e identificar fungos endofíticos de diferentes partes de espécies de gênero *Peperomia*;
- * Estudar a diversidade de genes PKS e de OSAS nos fungos endofíticos isolados de *Peperomia*;

- * Examinar a presença de ácido orselínico em extratos de *Peperomia* e de seus fungos endofíticos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência: Sistema analítico Shimadzu com sistema binário de bombas, modelo LC-20AD, detector UV-visível com arranjo de diodos modelo SPD-20AD e injetor automático Shimadzu SIL-20A. Operando em um intervalo de 200-800 nm.
- Coluna analítica de fase reversa Phenomenex Luna Su C18 (2) 100A° (250 mm x 4,6 mm).
- Espectrômetro de massas: Bruker micrOToF - QII acoplado a um CLAE Shimadzu.
- Cromatógrafo a gás modelo Shimadzu CGMS-QP2010 Ultra.
- RMN: Gemini Varian 200 MHz. (IQ-USP; Prof. Alcindo A. Santos); Inova 300 (Varian); Bruker DRX500 (Central Analítica IQ-USP)
- Concentrador: Centrивap concentrator, Labconco (SpeedVac)
- Centrífuga: Hitachi (High-speed refrigerated centrifuge), Himac CR226II
- Rotaevaporador: Büchi Rotavapor R-124
- Termociclador Biorad MyCycler™
- NanoDrop (ThermoScientific)
- isolera One (Biotage®)

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1 Coleta de espécies de *Peperomia*

As espécies de *Peperomia* foram coletadas em diferentes regiões do Brasil e vem sendo cultivadas nas estufas do LQPN no IQ-USP (Tabela 1). A identificação botânica foi realizada pela Dra. Elsie F. Guimarães (Instituto de pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro) e os vouchers foram depositados no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ. Algumas das espécies estão ainda em processo de identificação.

Tabela 1. Procedência das espécies de *Peperomia* estudadas.

Espécie	Código LQPN	Lugar de coleta	Foto
<i>P. alata</i> Ruiz & Pav	K-1175	Congonhal (MG)
<i>P. arifolia</i> Miq.	K-395	Brotas (SP)

<i>P. blanda</i> (Jacq.) Kunth.	K-1497	Urubici (SC)
<i>P. corcovadensis</i> Gardner	K-1188	Gonçalves (MG)
<i>P. galioides</i> Kunth	K-1487	Lauro Muller (SC)

<i>P. glabella</i> (Sw.) A. Dietr.	K-416	Ibicoara (BA)
<i>P. glabella</i> var. <i>nervulosa</i> (C. DC.) Yunk.	K-816	Intervales (SP)
<i>P. hilariana</i> Miq	K-1489	Urubici (SC)

<i>P. hispidula</i> (Sw.) A. Dietr.	K-1496	Urubici (SC)
<i>P. incana</i> (Haw) A. Dietr.		São Paulo (SP)
<i>P. megapotamica</i> Dahlst	K-1486	Lauro Muller (SC)
<i>P. nitida</i> Dahlst	K-482	Ubatuba (SP)

<p><i>P. obtusifolia</i> (L.) A. Dietr.</p>		<p>São Paulo (SP)</p>
<p><i>P. oreophila</i> Hensch</p>	<p>K-418</p>	<p>Caeté (MG)</p>
<p><i>P. pellucida</i> (L.) Kunth</p>	<p>K-492</p>	<p>Manaus (AM)</p>

<i>P. pseudoestrellensis</i> C. DC.	K-1201	São Paulo (SP)
<i>P. rhombea</i> Ruiz & Pav.	K-1174	Congonhal (MG)
<i>P. rotundifolia</i> (L) Kunth	K-120	Parque estadual Intervales (SP)
<i>P. sandersii</i> C. DC.	K-887	São Paulo (SP)

<i>P. serpens</i> (Sw.) Loudon	K-556	Ubatuba (SP)
<i>P. sincorana</i> C. DC.	K-1499	Morro do chapéu (BA)
<i>P. sp.</i>	K-1064	Morretes (PR)

<p><i>P. subrubripica</i> C. DC.</p>	<p>K-1525</p>	<p>Piatá (BA)</p>
<p><i>P. tetraphylla</i> (G.Forst.) Hook. & Arn.</p>	<p>K-1094</p>	<p>Juqueí (SP)</p>
<p><i>P. transparens</i> Miq</p>	<p>K-1485</p>	<p>Lauro Muller (SC)</p>

<i>P. trineura</i> Miq.	K-831	Encantado (RS)
<i>P. urocarpa</i> fisch & mey	K-1481	São Pedro do Iguaçu (PR)

3.2.2 Isolamento de fungos endofíticos das plantas

As folhas, caule e raízes foram coletadas de plantas saudáveis (*P. arifolia*, *P. glabella*, *P. nitida*, *P. oreophila* e *P. urocarpa*) e o isolamento de fungos foi realizado no mesmo dia da coleta.

O material coletado foi lavado com água e posteriormente esterilizado por sucessivas imersões em etanol 70% (1 min.) e hipoclorito de sódio 2% (3 min.), seguido por lavagem com água destilada (2 min.).

Foram cortados pequenos fragmentos de cada parte da planta com uma lâmina esterilizada em chama, tais fragmentos foram dispostos em placas de Petri contendo PDA (ágar de batata-dextrose: 400g de batata cozida em 1 litro de água, depois

filtrada e adicionados 20g de dextrose e 20g de ágar, completado a 1 litro com água destilada e autoclavado) suplementada com cloranfenicol a uma concentração de 100 µg/ml. Foi feita uma cultura da água de lavagem final para cada planta a fim de descartar possível contaminação por fungos de superfície (epifíticos).

A incubação foi feita a 28 °C e observou-se o crescimento de fungos 3 dias após a cultura ser inoculada. Os fungos assim obtidos foram separados e duplicados em novas placas de Petri contendo PDA ou MDA (extrato malte-ágar) permitindo o crescimento e a cultura foi repicada a cada semana, durante 3 semanas.

Para manter os fungos por um longo período, placas de Petri contendo os fungos endofíticos em meio PDA, foram guardadas em freezer a -20°C. Também foram cortados pequenos fragmentos de 5mm² de fungos crescidos em placas de Petri contendo PDA e foram conservados tubos de plástico esterilizados (2 ml) a -20°C, de duas maneiras, uma contendo somente água e outra contendo glicerol 15% em água.

3.2.3 Detecção de fungos endofíticos nos tecidos de *Peperomia*

A detecção dos fungos dentro dos tecidos foi feita pelo método descrito por (C. SAHA, 1988). Para tal, foram feitos cortes transversais de folhas e caules das espécies de *Peperomia*, os quais foram submergidos durante 15 segundos em solução de rosa bengala (0.5% rosa bengala dissolvida em etanol 5%), seguida de lavagem com água destilada. Os cortes foram dispostos em lamínulas de vidro e observados no microscópio óptico ZEISS com uma aproximação de 50 e 100X.

3.3 MANIPULAÇÃO DO DNA

3.3.1 Extração do DNA de plantas

Entre 30 e 50 mg de tecido vegetal foram utilizados para extrair DNA com 2 x CTAB (brometo de hexadecil trimetil amônio catiônico 2%, 20 mM EDTA, polivinilpirrolidona 1%, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH8, 2-mercaptoetanol 2%) (MÁRCIO ELIAS FERREIRA, 1996). Em alguns casos foi necessária uma posterior purificação do DNA utilizando o kit comercial (NucleoSpin® Plant II – Macherey-Nagel).

3.3.2 Extração de DNA de fungos endofíticos

Com o objetivo de identificar os fungos endofíticos através de dados moleculares, manteve-se a cultura em meio líquido de batata-dextrose durante 3 dias sob agitação.

5 Fragmentos de 0,5 X 0,5 cm do ágar com micélio na superfície foram inoculados em erlenmeyers de 250 ml contendo 100 mL de meio PDB (200 g de batata cozida e coada e 20 g de dextrose em um litro de água esterilizada) à temperatura ambiente durante 3 dias após os quais foi possível a extração do DNA para posterior identificação dos fungos usando iniciadores específicos para regiões ITS1 e ITS4 (VAZ et al., 2009).

A extração do DNA de fungos foi realizada da mesma maneira que para as plantas utilizando-se aproximadamente 50 mg de massa micelial dos fungos.

3.3.3 Avaliação da qualidade do DNA

A qualidade do DNA obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo GelRed (Amershan), usando-se tampão TAE 1X (composição: 40 mM Tris-acetato, 20 mM de ácido acético, 1mM EDTA) como eletrólito.

3.3.4 Quantificação do DNA

A quantificação de DNA foi feita por espectrofotometria UV utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) através da medida da absorbância em 260 e 280 nm do DNA extraído. A pureza foi obtida por meio da razão entre os comprimentos de onda A_{260}/A_{280} (uma razão de 1.8 é aceita para DNA “puro”, se a razão é significativamente menor pode indicar a presença de proteína, fenol ou outros contaminantes que absorvem perto de 280 nm) como indicado no manual do usuário do equipamento.

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase foi feita em um termociclador Biorad MyCycler™. Os estudos de amplificação por PCR foram avaliados para um volume de 20 μ L para verificar a eficiência do procedimento com várias amostras. As amostras que amplificaram, foram submetidas a PCRs de 50 μ L a fim de obter quantidade suficiente para o sequenciamento.

A mistura de reação de PCR (20 µl) continha 100 ng de DNA genômico, 16 pmol de cada primer, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 2mM de MgCl₂ e 200µM de cada dNTP, 2 µl de tampão Taq Buffer e água desionizada e autoclavada em quantidade suficiente para completar o volume a 20 µl.

A mistura de reação de PCR (50 µl) continha 300 ng de DNA genômico, 40 pmol de cada primer, 5 unidades de Taq DNA polimerase, 5 mM de MgCl₂ e 500µM de cada dNTP, 5 µl de tampão Taq Buffer e água desionizada e autoclavada em quantidade suficiente para completar o volume a 50 µl.

3.4.1 Desenho de iniciadores

3.4.1.1 Filogenia molecular de *Peperomia*

Foram desenhados iniciadores para ITS (Tabela 2) e *matK* (Tabela 3) a partir do alinhamento de sequências de ITS e *matK* de peperomias encontradas na base de dados do *GenBank*, a maioria dos quais provenientes de estudos para ITS (SAMAIN et al., 2009) e para *matK* (WANKE et al., 2007).

Tabela 2. Iniciadores ITS

	Iniciadores ITS	Tamanho esperado (pb)
F	AGA GGA AGG AGA AGT CGT AAC	912
R	CCA TTC CAT GGG ACT TGT GCC	

Devido ao tamanho do gene *matK* ser de aproximadamente 1600 pb na maioria das angiospermas (HILU et al., 2003), e pelo fato de que o tamanho recomendado do fragmento a ser sequenciado no sequenciador ABI 3100 de 16 capilares ser menor do que 1000 bp, foi necessário fazer o seqüenciamento de três fragmentos que posteriormente se juntaram para completar o gene (Figura 19).

Figura 19. Estratégia de sequenciamento do gene *matK*. Cada cor representa um conjunto de iniciadores desenhados em sua forma forward (F) e reverse (R) para conseguir amplificar toda a região do gene.

Tabela 3. Iniciadores *matK* usados neste trabalho

	Iniciadores <i>matK</i>	Tamanho esperado pb
mKF1	AGC TCY AAT TMT RGG GAA ACC	981
mKR1	GGA RRG AGA ATG GAA TTT CCA	
mKF2	CKA GTT CMC TAA TTG TGA	965
mKR2	ACA CTT GAA RSA TAG CCC	
mKF3	GAT TTC AAA GGG AAC TSA TC	1043
mKR3	ATT GCA CAC GGC TTT MCC	

3.4.1.2 Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA para a identificação dos fungos endofíticos

A identificação dos fungos foi feita por meio do sequenciamento da região do DNA ribossômico, ITS1-5.8S-ITS2, usando e iniciadores universais empregados para este fim (WHITE T J, 1990; VAZ et al., 2009) (Tabela 4).

Tabela 4. Iniciadores usados para a amplificação região ITS1-5.8S-ITS2 de fungos endofíticos.

Nome do iniciador	Sequência 5' → 3'
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

3.4.1.3 Estudo do gene chalcona sintase (CHS) em plantas

Os iniciadores usados para amplificar de regiões de DNA do gene que codifica para a enzima chalcona sintase foram desenhados a partir de regiões conservadas de sequências disponíveis no GenBank (NCBI, 2011) (RADHAKRISHNAN; VARGHESE; VASUDEVAN, 2010) (Tabela 5).

Tabela 5. Iniciadores utilizados para amplificação do gene CHS

Nome do iniciador	Sequência	Tamanho esperado (pb)
GPKSF	CCTCGCCAAGGACCTCGCCGAGAACAA	600
GPKSR	CGGACCGAACCCGAAGAGAACGCCCA	

3.4.1.4 Diversidade de genes PKS em fungos endofíticos presentes em *Peperomia*

A diversidade de genes PKS foi testada para todos os fungos isolados, utilizando iniciadores específicos para o domínio cetosintase LC1-LC2c (*non reduced ketosynthase domain*), LC3-LC5c (*partially reduced ketosynthase domain*) e KS3-KS4c (*high reduced ketosynthase domain*). (BINGLE; SIMPSON; LAZARUS, 1999; LIN et al. 2010; NICHOLSON et al., 2001) (Tabela 6).

Tabela 6. Iniciadores usados para avaliar a diversidade de PKS em fungos endofíticos

Nome do iniciador	Sequência 5' → 3'
LC1	5' GAY CCI MGI TTY TTY AAY ATG
LC2c	GTI CCI GT I CCR TGC ATY TC
LC3	5' GCI GAR CAR ATG GAY CCI CA
LC5c	5' GTI GAI GTI GCR TGI GCY TC
KS3	TTY GAY GCI GCI TTY TTY AA
KS4c	RTG RTT IGG CAT IGT IAT ICC

3.4.1.5 ESTUDO DO GENE PKS DO ÁCIDO ORSELÍNICO EM PLANTAS E FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram desenhados conjuntos diferentes de pares de iniciadores alinhando as sequências obtidas do GenBank (Tabela 7), este alinhamento foi feito utilizando o programa *MEGA version 5* (TAMURA K, 2011).

Tabela 7. Iniciadores desenhados para amplificar o gene do ácido orselínico em plantas

<p>A. Baseados em sequências proteicas de KS de <i>AviM</i> (Número de acesso no GenBank: AAK83194), alinhados com proteínas de plantas mais semelhantes com <i>AviM</i> segundo a ferramenta do BLAST do NCBI (MALQUICHAGUA SALAZAR, 2009)</p> <p>R 5' GGN CCR AAN CCR AAN ARN AC</p> <p>F 5' GCN ACN ATH YTN GCN ATH GG</p> <p>Tamanho esperado: 750 bp</p>
<p>B. Desenhado baseado nas sequências (<i>AviM</i>) de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (AAK83194), CaLO5 de <i>Micromonospora echinospora</i> (AAM70355), (CHLB1) de <i>Streptomyces antibioticus</i> (AAZ77673), (POKM1) de <i>S. diastatochromogenes</i> (ACN64831), (PKS1 iterat) <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (YP_001107472):</p> <p>F 5' GAT GGA CCC RCA GCA KCG SMT G</p> <p>R 5' AYG GTG CCG CCG WAR CCG AA</p> <p>Tamanho esperado: 1000 bp</p>
<p>C. Desenhados com base em sequências de plantas vasculares semelhantes com a proteína <i>AviM</i> segundo a ferramenta BLAST do GenBank:</p> <p>F1 5' GTD GAN GTD GCA TGN GCA TBA TRT A</p> <p>F2 5' CCH AAY YAY KCN RYH KYH ACW GC</p> <p>R' 5' GGD GTB YYN RTD GGN DSN GS</p> <p>Tamanho esperado: 1) 684 bp / 2) 484 bp</p>
<p>D. Baseados na proteína do ácido orselínico de <i>A. nidulans</i> (XP_681178), <i>AviM</i> (AAK83194), CaLO5 (AAM70355), <i>Helianthus annuus</i> (ABI 18155), <i>Hordeum vulgare</i> (BAJ86549):</p> <p>F 5' GAC GGS TAC KGC CGY GGY GAG GG</p> <p>R 5' CCS GCR GCS SCC WVM MKR TGY CC</p> <p>Tamanho esperado: 374 bp</p>
<p>E. Baseados no gene ácido alquilresorcinoico sintase de <i>Oryza sativa</i> (AAN04188), olivetol sintase de <i>Cannabis sativa</i> (BAG 14339) e genes semelhantes de acordo com o BLAST: <i>Hordeum vulgare</i> (BAJ99402), <i>Zea mays</i> (NP 001140848), sintase do tipo curcuminóide (XP 003563005):</p>

<p>OSF 5' GCN ATH GGN ACN GCN AAY CCN</p> <p>OSR 5' TCN ARD ATN GCN YKN CCN CCN GG</p> <p>Tamanho esperado: 855 bp</p>
<p>F. Foram desenhados dois pares de iniciadores baseados em sequências de plantas: De <i>Cannabis sativa</i> olivetol sintase (AB164375) (TAURA et al., 2009), PKSG1 (EU551163), PKSG2 (EU551164), PKSF3 (EU551162), PKSG4 (EU551165), PKSG5 (EU551166) (FLORES-SANCHEZ; LINTHORST; VERPOORTE, 2010); de <i>Hydrangea macrophylla</i> STCS (AF456446) (ECKERMANN et al., 2003), sintase do ácido triacetico coumaroila (AB011468) (AKIYAMA et al., 1999) e de <i>Humulus lupulus</i> CHS (FJ554587).</p> <p>STCSF1 TAY TTY CGY GTY ACY AAR WSY</p> <p>STCSR1 TTC CTC CAH VGA YCT CTT CCT</p> <p>Tamanho esperado: 954 pb</p> <p>STCSF2 RTY CTS GCS ATY GGM ACS GCH</p> <p>STCSR2 RAA SCC RAA AAG AAC ACC CCA YTC</p> <p>Tamanho esperado: 1065 pb</p>

3.4.2 Programação de temperaturas para PCR

3.4.2.1 Amplificação da região ITS e matK de *Peperomia*

A otimização das reações de PCR para a região ITS, foi feita avaliando-se gradientes de temperatura para o par de iniciadores, onde foram testadas cinco temperaturas de anelamento (54°C, 51,9°C, 50°C, 47,6°C e 45,9°C). Com isso, foi definida 49°C como temperatura de anelamento, com a qual se obteve o melhor rendimento (Figura 20).

Figura 20. Programa de temperaturas para amplificação da região ITS.

Para determinar a temperatura ótima de anelamento de todos os conjuntos de iniciadores, para o gene *matK*, foram testadas diferentes temperaturas (40°C; 41,3°C; 43,8°C; 47,3°C; 52,1°C; 55,9°C; 58,4 °C e 60°C), estabelecendo-se como temperaturas ótimas de anelamento 49°C para o conjunto de iniciadores *mKF1/mKF2*; 52°C para os iniciadores *mKF2/mKR2* e *mKF3/mKR3*.

O programa de temperaturas para amplificação do gene *matK* foi o mesmo apresentado (Figura 20), alterando-se a temperatura de anelamento de acordo com o caso.

3.4.2.2 Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA para identificação de fungos endofíticos

O programa de temperaturas para amplificar a região ITS de fungos endofíticos foi modificado da literatura (VAZ et al., 2009) obtendo-se bons resultados (Figura 21).

Figura 21. Programa de temperatura para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 de fungos endofíticos.

3.4.2.3 Chalcona sintase em *Peperomia* e plantas relacionadas

O programa de temperaturas para amplificação do gene CHS em peperomias baseou-se em um estudo prévio (RADHAKRISHNAN; VARGHESE; VASUDEVAN, 2010) (Figura 22).

Figura 22. Programa de temperaturas para amplificação do gene CHS de *Peperomia*.

3.4.2.4 Diversidade de genes PKS em fungos endofíticos presentes em *Peperomia*

O programa de temperaturas para amplificação de PKSs em fungos endofíticos (Figura 23) foi modificado de descrição prévia (BINGLE; SIMPSON; LAZARUS, 1999; NICHOLSON et al., 2001).

Figura 23. Programa de temperatura para amplificação do domínio cetosintase de PKS em fungos endofíticos

3.4.2.5 Estudo do gene PKS do ácido orselínico em plantas e fungos endofíticos

A reação de PCR (20 μ L) foi feita como descrita, no qual foram testadas diferentes concentrações de reagentes, temperaturas de anelamento (50-60°C) e diferentes programas de temperaturas para cada conjunto de iniciadores utilizado. Alguns dos programas de temperatura utilizados com os iniciadores A-E são mostrados na Figura 24 e Figura 25.

Figura 24. Programa de temperatura **PCR** *touchdown* para amplificação do gene do ácido orselínico em plantas e fungos endofíticos.

Figura 25. Programa de temperatura alternativo para amplificação do gene do ácido orselínico em plantas e fungos endofíticos

Para os iniciadores F (Tabela 7) a temperatura de anelamento adequada foi determinada a partir do teste de diferentes temperaturas: 51°C; 52°C, 53,9°C;

56,5°C; 60,1°C; 63,0 °C; 64,8 °C e 66°C. Escolheu-se 52°C como temperatura de anelamento adequada (Figura 26).

Figura 26. Programa de temperaturas para amplificação do gene PKS-ácido orselínico em *Peperomia* (iniciadores STCSF1 e STCSR1).

Como controle positivo foi utilizado DNA de *Streptomyces viridochromogenes* em todos os casos, considerando o fato de que o gene *AviM* presente em este microorganismo em experimentos de expressão heteróloga em *Streptomyces lividans* levaram à formação do ácido orselínico (HILL, 2006).

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A qualidade da amplificação foi feita por eletroforese em géis de agarose em concentração de 1%. Uma alíquota das amostras de DNA ou produto de PCR foi misturada com tampão “Loading Dye” 10X (100 mM EDTA, 43% glicerol e 0,5% azul de bromo-fenol) e “GelRed™”, como revelador no UV do DNA. As corridas foram feitas em cubas horizontais a uma voltagem de 75V contendo tampão TAE (composição: Tris 0,04 M, ácido acético glacial 0,12% e Na₂-EDTA 1 mM pH 8) como eletrólito; e observadas em transiluminador de UV. Os marcadores de massa molecular empregados foram 1kb e Low Mass DNA (Life Technologies).

3.6 PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR do tamanho esperado foram purificados diretamente ou cortados do gel de agarose quando se apresentavam mais bandas. Posteriormente foram purificados com o kit comercial GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) ou o kit comercial QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), seguindo instruções dos fabricantes.

3.7 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento no Centro de estudos do Genoma Humano da USP ou para o Serviço de Sequenciamento de DNA - SSDNA IQUSP. As amostras enviadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da USP foram preparadas de acordo com as indicações.

Para sequenciamento no Serviço de Sequenciamento de DNA - SSDNA IQUSP, foi realizada uma reação de PCR com os produtos obtidos, desta vez com nucleotídeos marcados, utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). Para este fim, empregou-se entre 100-200 ng de produto de PCR; 3 µL de um dos iniciadores (senso ou antisenso), a uma concentração de 3,2 pmol/µL; 3 µL de tampão de sequenciamento, 2 µL de BigDye v3.1 e água necessária para um volume final de 15 µL.

Posteriormente, o produto desta reação de PCR foi submetido a precipitação seguindo as seguintes etapas: Aos 15 µL da reação de sequenciamento se adicionaram 25 µL do “Cocktail de precipitação”, (que para 96 amostras, contém

2750 µL de etanol gelado ao 100%; 110 µL de 3M de NaOAc pH 5,2 e 110 µL de glicogênio 1 mg/µL); em seguida os tubos foram agitados em Vortex e mantidos em gelo durante 15 minutos; posteriormente, centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos à temperatura ambiente; o sobrenadante foi descartado, dando a seguir um pulso de 1000 rpm com a placa invertida. Adicionou-se então 50 µL de etanol gelado ao 70 % e se centrifugou durante 10 minutos a 4000 rpm, e os tubos novamente foram drenados e centrifugados com a placa invertida como já descrito. Os tubos foram secos durante uma hora em um lugar protegido da luz ou 1 minuto a 95°C no termociclador aberto. Este produto seco foi enviado para sequenciamento.

3.8 TRATAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

As seqüências obtidas, tanto com o iniciador *forward* quanto com o iniciador *reverse*, foram editadas no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011), ou no programa BioEdit (HALL, 1999), obtendo-se assim uma sequência de consenso. As seqüências foram analisadas com a ferramenta Blast do banco de dados Genbank. No programa MEGA5, matrizes de ITS, *matK* e CHS foram organizadas, quando especificado, foram adicionadas na matriz as seqüências obtidas no GenBank e alinhadas (ClustalW). Finalmente estas matrizes foram exportadas no formato apropriado para cada programa utilizado para a reconstrução filogenética.

3.9 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DE *PEPEROMIA*

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o método de máxima

parcimônia (MP) e inferência Bayesiana (BI).

As análises de MP foram realizadas no programa PAUP (SWOFFORD, 2003). As buscas heurísticas utilizaram 1000 réplicas de adições randômicas de táxons e TBR Branch swapping. Todos os caracteres tiveram o mesmo peso e os *gaps* foram tratados como “*missing data*”. O suporte dos dados dos clados foi estimado por bootstrap (BP), com 100000 replicatas.

Para obter a árvore filogenética de inferência Bayesiana (BI), foi necessário determinar o modelo evolutivo mais adequado, através do programa MrModeltest 2.3. (NYLANDER, 2004). Uma vez determinado o modelo evolutivo mais adequado, no programa MrBayes 3.2 (RONQUIST et al.), obtendo-se a árvore de inferência Bayesiana, que foi editada no programa TreeGraph 2.0.

A árvore filogenética obtida pelo método de *maximum likelihood* foi feita no programa PAUP, utilizando a matriz conjunta dos dados matK e ITS e definindo como modelo evolutivo o método GTR + I+ G gerado com o programa MrModeltest (NYLANDER, 2004).

3.10 OBTENÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

As sequências processadas no programa MEGA5, foram agrupadas em uma única matriz, junto com sequências com maior porcentagem de identidade para cada fungo obtidas do GenBank através da ferramenta BLAST.

A análise filogenética foi feita no programa MEGA5 pelo método *neighbor-joining* (NJ), fazendo o teste de filogenia pelo método de bootstrap com 10000 replicatas, e as distancias evolutivas foram obtidas pelo modelo Kimura 2p. Por meio desta metodologia foi possível identificar os fungos endofíticos no nível de gênero.

3.11 FITOQUÍMICA DE PEPEROMIAS

3.11.1 Extração e fracionamento

3.11.1.1 *Peperomia megapotamica*

Partindo-se de 12 g de material vegetal seco e moído foi feita a extração com clorofórmio-metanol-água 2:1:1. A fração em clorofórmio foi seca obtendo-se 0,362 g. Posteriormente, este material (276 mg) foi submetido a uma coluna Sep-Pak (C18) previamente acondicionada, utilizando-se o sistema de solventes: metanol, metanol/clorofórmio 1:1, clorofórmio e, por último, hexano. A coluna foi seca após a passagem de solvente e, ao final, foram obtidas 4 frações de 556 mg, 300 mg, 215 mg e 35 mg, respectivamente.

A fração em metanol-clorofórmio (300 mg) apresentou menor quantidade de compostos de acordo com a cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se como eluente o sistema hexano:EtOAc (3:2). Utilizando-se os R_fs dos componentes majoritários, foi feita uma separação no equipamento Isolera One (Biotage®) utilizando-se o mesmo sistema de solventes. A fração 3 resultante (35 mg) apresentou 3 compostos majoritários observados por CCD, de maneira que foi feita uma cromatografia em placa preparativa (hexano/EtOAc 3:2) que resultou no isolamento da substância **1** (7,1 mg).

3.11.1.2 *Peperomia rotundifolia*

Partindo-se de 12 g de material vegetal fresco foi feita a extração com clorofórmio-metanol-água 2:1:1. A fração em clorofórmio foi seca obtendo-se 0,423 g. Posteriormente este material foi passado através de uma coluna Sep-Pak (C18)

seguindo o mesmo procedimento utilizado com a planta *P. megapotamica*, e se obtiveram 4 frações de 100,56 mg (hexano), 87,21 mg (clorofórmio), 92,16 mg (clorofórmio-metanol 1:1) e 139,91 mg (metanol).

Com as frações em metanol e clorofórmio/metanol e baseados nos R_fs das placas em CCD utilizando o sistema hexano:EtOAc (1:1) foi feita uma eluição no cromatógrafo preparativo Isolera de cada fração em separado. Depois de reunir as frações obtidas deste fracionamento, na fração 3 (31,07 mg) da fração em clorofórmio/metanol se observaram dois compostos majoritários por CCD, assim que foi feita uma placa preparativa com um sistema hexano:EtOAc 7:3 e foi obtida a substância **3** (2,4 mg).

Da fração 11, proveniente da separação por meio da isolera da fração em metanol, foi recristalizado com MeOH a substância **2** (5,2 mg). Da fração 3 foi isolada também a substância **3**, também presente na fração em clorofórmio/metanol.

3.11.1.3 *Peperomia sincorana*

Aproximadamente 50g de folhas, previamente secas em estufa a 50°C, foram extraídos com 1L de metanol sob agitação por 12 horas, resultando em 8g de extrato.

Após avaliação da composição química por CCD, a fração do extrato solúvel em clorofórmio foi fracionada em coluna de sílica, eluída com gradiente de EtOAc em hexano iniciado com 60% e finalizado a 90%, obtendo 25 frações.

As frações 12-15 foram novamente fracionadas, para a purificação dos compostos presentes, devido à formação de cristais. Foi utilizada cromatografia flash

com eluição isocrática (60% de EtOAc em hexano). Destas frações foi possível isolar frações com cristais insolúveis em metanol frio, o qual permitiu a recristalização para o aumento de pureza. Estes cristais foram analisados por CCD mostrando ser uma mistura de três compostos majoritários com Rfs bastante próximos. Utilizou-se de cromatografia em placa preparativa para a purificação dos compostos (50% de EtOAc em hexano), obtendo os compostos **4** e **5**, os quais foram caracterizados por RMN ^1H .

3.12 PERFIL METABÓLICO

3.12.1 Perfil metabólico de espécies de *Peperomia*

3.12.1.1 Obtenção de extratos de espécies de *Peperomia*

As espécies de peperomias mantidas nas estufas do LQPN, sob as mesmas condições de crescimento, foram coletadas às 10:00 horas da manhã. As plantas foram submersas em nitrogênio líquido e posteriormente com ajuda de um almofariz foram moídas até obter um pó fino. 200 mg de material vegetal moído foram transferidos a tubos de 2 mL para a extração. A extração foi feita com um sistema de 3 solventes, clorofórmio:metanol:água na proporção 2:1:1, 500 μL de clorofórmio, 250 μL de metanol e 250 μL de água. A seguir foram agitados em vortex durante 5 minutos e centrifugados a 8000 rpm a 0°C, durante 10 minutos. Após a centrifugação, foram separadas as fases. O procedimento de extração foi repetido, juntando as fases para uma posterior secagem dos extratos. Todo o procedimento foi feito mantendo-se as amostras em gelo.

A fração clorofórmica foi seca utilizando-se um fluxo de nitrogênio gasoso, enquanto o extrato aquoso foi seco em SpeedVac. Os extratos secos foram pesados e preparados para as análises posteriores.

3.12.1.2 Perfil metabólico de peperomias e tratamento estatístico

3.12.1.2.1 HPLC

Os extratos foram dissolvidos em metanol (grau HPLC), levando-os a uma concentração de 1mg/mL e filtrados em filtro (Acrodisc CR. PTFE) para remoção de partículas insolúveis. O volume de injeção foi 20 µL. A eluição em HPLC foi feita utilizando-se gradiente de concentração de solventes (Tabela 8), que permitiu uma melhor resolução dos componentes dos extratos.

Tabela 8. Gradiente de eluição no HPLC dos extratos em clorofórmio.

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

3.12.1.2.2 RMN de ^1H

Em torno de 7 mg de extrato foi dissolvido em clorofórmio deuterado, CDCl_3 , filtrados e analisados por RMN ^1H de 500 MHz (Central Analítica do IQ-USP).

Os dados obtidos foram tratados no programa MestreNova, ajustando-se o

sinal do TMS em 0,00 ppm, o ajuste de fase foi manual e a correção de linha base foi automática. Foram considerados os dados de deslocamento químico entre 2,4 e 19 ppm, desconsiderando-se o sinal residual de clorofórmio entre 7,20 e 7,28 ppm. Posteriormente foi feito um “*binning*” para um intervalo de 0,01 ppm e os dados foram normalizados pela área total. Os dados foram salvos como arquivo de texto ASCII, para serem tratados no programa STATISTICA 6.0.

No programa STATISTICA 6.0, os dados foram normalizados e analisados por meio do Análise de clusters (HCA), a fim de classificar as amostras de acordo com a sua semelhança no perfil químico e encontrar relações entre as diferentes espécies. O Método de cluster utilizado foi o *Joining (tree clustering)*. A medida da semelhança das amostras foi feita utilizando distância Euclidiana e o agrupamento aglomerativo foi aplicado utilizando o algoritmo *Ward's method*.

A análise discriminante dos componentes principais dos dados foi feita no programa R, usando o pacote adgenet (JOMBART, 2008) (<http://adeget.net.r-forge.r-project.org/>), definindo para 4 clusters. Este é um método multivariado desenhado para identificar clusters de indivíduos geneticamente relacionados (JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010).

Os dados de RMN ^1H foram também processados com o programa The Unscrambler X (versão 10.1, CAMO Software AS) para obter as análises de PCA.

3.12.1.2.3 LC-ESI-MS

Os extratos em clorofórmio foram dissolvidos em metanol grau HPLC e levados a uma concentração de 1 mg/ml. Para a análise cromatográfica se

empregou a mesma coluna e sistema cromatográfico utilizado no equipamento de HPLC.

Os dados obtidos foram salvos em formato cdf e depois tratados no programa MZmine (PLUSKAL et al.). A faixa de tempo considerada foi: 1,5 – 42,0 min, utilizando a função Crop filter. Para a correção de linha base, se utilizaram os seguintes parâmetros: *MS level* 1, *smoothing factor*: 10^5 , *Assymetry*= 0,01. Para a detecção dos picos, a detecção das massas foi feita pelo *Centroid mass detector*, com *noise level*= $1,5 \times 10^2$. Para a construção do cromatograma os parâmetros empregados foram: *minimum time span*= 0,1; *minimum height*= $3,0 \times 10^3$; *m/z tolerance*= 0,0050 ou 5,0 ppm. A deconvolução dos picos utilizou o algoritmo noise amplitude e os seguintes parâmetros: *minimum peak height* = $3,0 \times 10^3$; *Peak duration range*= 0,0-0,6 min; *Amplitude of noise*= $1,8 \times 10^3$. Utilizou-se também a ferramenta *Peak extender* com os seguintes parâmetros: *m/z tolerance*= 0,001 m/z ou 5,0 ppm; *minimum height* = $3,0 \times 10^3$. O alinhamento de picos foi feito pelo método *RANSAC method*, com *m/z tolerance*= 0,01 m/z ou 5,0 ppm; *Retention time tolerance*= 1 minuto; *Retention time tolerance after correction*= 0,8 minutos e *RANSAC iterations*= 4000. A normalização foi feita pelo método *linear normalizer*, do tipo *average intensity*; *Peak measurement type*= Peak area.

Os dados de m/z, tempo de retenção e altura de pico foram então exportados como arquivo de texto e posteriormente utilizados para a análise de cluster no programa STATISTICA.

3.12.2 Perfil metabólico de fungos endofíticos

3.12.2.1 Obtenção dos extratos de fungos endofíticos

Os fungos AC4, AR1, OC1, OF1, UC3 e UR1 foram crescidos por triplicata em meio Czapek para se obter o perfil metabólico e realizar a busca do ácido orselínico.

Os fungos foram crescidos em placas de Petri contendo meio PDA (batata-dextrose-ágar) durante cinco dias, após deste tempo, foram cortados 5 pedaços de Ágar de aproximadamente 5 mm² e foram colocados para crescer em 300 mL de meio estacionário Czapek (Tabela 4), meio otimizado para obter a maior produção de ácido orselínico no fungo *Aspergillus nidulans* (SANCHEZ et al., 2010).

Tabela 9. Composição do meio Czapek

Substância	Quantidade por litro de meio
NaNO ₃	3g
KCl	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
K ₂ HPO ₄	1g
Sacarose	30g
Solução de metais traço (Tabela 9)	1 mL

Tabela 10. Composição da solução de metais traço

Substância	Quantidade para 100 mL de água
ZnSO ₄ .H ₂ O	2,2 g
H ₃ BO ₃	1,1 g
MnCl ₂ .H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .H ₂ O	0,5 g
CoCl ₂	94,5 mg
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,16 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,11 g
Na ₄ EDTA	5 g

As culturas foram mantidas em escuro durante 16 dias, após os quais foi feita a filtração para separar o micélio da fase líquida. A fase líquida foi levada até pH 2 e foi feita a extração líquido-líquido duas vezes com EtOAc. O extrato obtido foi concentrado em Rotaevaporador e analisado por HPLC-DAD e LC-ESI MS.

3.12.2.2 Análises do perfil metabólico dos fungos endofíticos por HPLC

Para as análises de HPLC o extrato foi dissolvido em metanol a uma concentração de 2 mg/mL e filtrado em filtro (Acrodisc CR. PTFE) para remoção de partículas insolúveis e volume de injeção foi 25 µL.

A eluição foi feita utilizando o gradiente de concentração de solventes apresentado na (Tabela 11), que permitiu uma melhor resolução.

Tabela 11. Gradiente de concentração do solvente para análise por HPLC dos extratos em EtOAc dos fungos endofíticos.

Solventes	Tempo (min)	%B
	0-5	20
A. Água + 0,01% ácido fórmico	30	70
B. Acetonitrila + 0,01% ácido fórmico	32	70
	35	20
	40	20

3.12.2.3 Análise do perfil metabólico de fungos endofíticos por LC-ESI-MS

Foi feita uma busca do ácido orselínico nos extratos dos fungos por LC-ESI-MS, utilizando-se as mesmas condições de eluição como no HPLC e tendo como referencia o ácido orselínico padrão (Alfa Aesar) (Figura 27).

Figura 27. a) Cromatograma do padrão ácido orselínico por LC-ESI-MS; b) espectro de massas do ácido orselínico no modo negativo (M-H).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DE PEPEROMIA

4.1.1 *Peperomia megapotamica*

A substância isolada de *P. megapotamica* (**1**) foi identificada como sendo um policetídeo por meio da análise do espectro de massas e de RMN ^1H , RMN ^{13}C e COSY (Figura 29) (ANEXO3) (Tabela 12). De acordo com buscas na literatura, trata-se da malabaricona D, uma substância já isolada de *Myristica malabarica* (família Myristicaceae) (PURUSHOTHAMAN; SARADA; CONNOLLY, 1977; KUMAR; HERATH; KARUNARATNE, 1988), em *Peperomia* ainda não foram isoladas substâncias semelhantes.

Figura 28. Cromatograma CG-El e espectro de massas por impacto de elétrons da substância **1** isolada de *P. megapotamica*.

Figura 29. Estrutura e atribuição de sinais de RMN 1H da substância **1** isolada de *P. megapotamica*.

Tabela 12. Dados de deslocamento químico de RMN 1H e ^{13}C e dos mapas de contorno HSQC (H-C, 1J) e HMBC (C-H, nJ) (H 500 MHz, C 125 MHz, $CDCl_3$).

Posição	δH	δC	H-C 1J	H-C, nJ
1		110,06		
2	-OH (9,54)	161,16		
3	6,38	108,41	108,41	
4	7,21	135,60	135,60	161,16 (C2), 108,41 (C3 e 5), 110,06 (C1)
5	6,38	108,41	108,41	108,41 (C3), 110,06 (C1), 161,16 (C6), 207,86 (C15')
6	-OH (9,54)	161,16		
1'		136,82		
2'	6,67	108,87	108,87	35,64 (C7'), 108,04 (C5'), 121,06 (C6'), 145,34 (C4'), 147,38 (C3')
3'		147,38		
4'		145,34		
5'	6,72	108,04	108,04	108,87 (C2'), 121,06 (C6'), 136,82 (C1'), 145,34 (C4'), 147,38 (C3')
6'	6,62	121,06	121,06	35,64 (C7'), 108,87 (C2'), 145,34 (C4'), 147,38 (C3')
7'	2,51	35,64	35,64	29,04 (C9'), 31,67 (C8'), 108,87 (C2'), 121,06 (C6'), 136,82 (C1')
8'	1,56	31,67	31,67	136,82 (C1'), 35,64 (C7'), 29,37 (C10')
9'	1,27-1,40	29,04	29,04	
10'	1,27-1,40	29,37	29,37	29,04 (C9'), 29,30 (C12'), 31,67 (C8'), 35,64 (C7')
11'	1,69	24,36	24,36	29,04 (C9'), 44,75 (C14'),
12'	1,27-1,40	29,30	29,30	24,36 (C11'), 29,04 (C9'), 44,75 (C14')
13'	1,27-1,40	29,30	29,30	
14'	3,11	44,75	44,75	24,36 (C11'), 29,30 (12'), 207,86 (C15')
15'		207,86		
16'	5,91	100,66	100,66	145,34 (C4'), 147,38 (C3')

4.1.2 *Peperomia rotundifolia*

Por meio da análise do espectro de massas por impacto de elétrons e pela comparação com os dados de RMN ^1H descritos se identificou a substância **2** como sendo diyangambina (GREGER; HOFER, 1980), uma lignana furofurânica isolada já de outras espécies de Piperaceae como *P. oreophila* (SALAZAR et al., 2012), *P. obtusifolia* (MOTA et al., 2011) e também de *Piper arborescens* (TSAI et al., 2005) (Figura 31).

Figura 30. Cromatograma e espectro de massas CG-El por impacto de elétrons da substância **2** isolada de *P. rotundifolia*.

Figura 31. Estrutura e atribuição de sinais de RMN ^1H da substância **2** (diyangambina) isolada de *P. rotundifolia*.

Elemicina (3)

Por meio de análise de RMN ^1H e pela comparação do espectro de massas por impacto de elétrons com os dados reportados na literatura se identificou a substância **3** como elemicina (4-*alil*-1,2,6-trimetoxibenzeno) (Figura 33), um fenil propanoide já isolado do óleo essencial da *Piper divaricatum* (DA SILVA et al., 2014) e também em plantas de outras famílias.

Figura 32. Cromatograma e espectro de massas por impacto de elétrons da substância **3** isolada de *P. rotundifolia*.

C₁₂H₁₆O₃
Exact Mass: 208.1099

elemicina

Figura 33. Estrutura e atribuição de sinais de RMN ¹H da substância **3** isolada de *P. rotundifolia*.

4.1.3 *Peperomia sincorana*

As substâncias **4** e **5** foram analisados por RMN de ¹H (Figura 15) e apresentam similaridade em alguns pontos e divergências em outros. O resumo dos dados espectroscópicos está contido na Figura 34.

Figura 34. Estruturas e deslocamentos químicos em RMN ¹H para as substâncias **4** e **5** isoladas de *P. sincorana*.

As substâncias isoladas (Figura 34) são 5,6,7-trimetoxiflavona (substância **4**), conhecida como trimetoxibaicaleina, e 4',5,6,7-tetrametoxiflavona

(substância **5**), conhecida como tetrametilscutelareina. Esses compostos já foram isolados de outras espécies vegetais, inclusive da casca de cítricos (GREEN et al., 2009), e foram destacadas em vários trabalhos por apresentarem ampla atividade biológica, dentre as quais, antiviral (HAYASHI et al., 1997), antimicrobianas (BASTOS et al., 2009), anti-helmínticas (AYERS et al., 2008) e anticancerígenas (ZHANG et al., 2005).

4.2 FILOGENIA DE *PEPEROMIA*

Uma primeira análise dos dados indica que a classificação com dados moleculares (Figura 35 e ANEXO 4) concorda com dados morfológicos, várias plantas com semelhança morfológica aparecem juntas ou bastante próximas nos dendrogramas.

A topologia da árvore com dados ITS MP e BI varia um pouco (ANEXO 4), além disto, alguns valores de consistência (*bootstrap*) na análise MP estão abaixo de 70, o que indica menor consistência a estes ramos e ainda apresenta muita politomia.

No caso da reconstrução filogenética com dados *matK*, os valores de consistência estão acima de 70. Portanto esta árvore é mais consistente do que com dados ITS, provavelmente pelo fato que estas seqüências são mais informativas, ao ter maior quantidade de nucleotídeos. Adicionalmente é conservada a topologia da árvore MP e BI com dados *matK* (ANEXO 4).

De acordo com o observado com os dois marcadores moleculares, o gene *matK* se mostra como o mais adequado para a classificação filogenética destas

plantas. No entanto, os grupos mais representativos são conservados em todas as análises, tanto com dados *matK* quanto com dados ITS.

Uma análise conjunta dos dados (ITS e *matK*) permitiu a obtenção de uma árvore de consenso semelhante a aquela obtida com dados do gene *matK*, com um resultado congruente com estudos prévios para as espécies já estudadas (SAMAIN et al., 2009; WANKE et al., 2006). No entanto, mesmo sendo mais robusta em alguns ramos, em outros não houve resolução adequada, levando à politomia (Figura 35). Como sugestão para futuros trabalhos, outra região do DNA diferente de ITS poderia melhorar a resolução da árvore obtida com dados *matK*.

Considerando-se que a maioria de plantas incluídas neste análise não foram caracterizadas quimicamente e que das estudadas os estudos não foram aprofundados, ao analisar a distribuição dos tipos de substâncias químicas já isoladas de *Peperomia* por meio do mapeamento na árvore filogenética (Figura 36), é possível observar que substâncias como fenilpropanoides (A), lignanas furofuranicas (D), flavonoides (G), policetídeos (H), policetídeos prenilados (I) e cromenos (J) estão amplamente distribuídos em todos os clados. Já as lignanas tetraidrofurânicas (B), secolignanas (C), lignanas (E), norlignanas (F) e as amidas (K) são mais restritas. Contudo, dada a carência de dados químicos e a evidente inespecificidade na produção de substâncias determinadas em cada clado resulta difícil inferir conclusões mais efetivas.

Figura 35. Árvore mais parcimoniosa baseada em sequências do gene *matK* e ITS. Os valores de bootstrap se encontram acima dos ramos. *Houttuynia cordata*, *Anemopsis californica*, *Piper aduncum* e *Piper nigrum* foram usadas como grupos externos. Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; 100000 réplicas de bootstrap; comprimento da árvore: 2913 passos; índice de consistência (CI)= 0.6869; índice de homoplasia (HI)= 0.3131; índice de retenção (RI)=0.7471; algoritmo *branch-swapping*; *tree-bisection-reconnection* (TBR); número de caracteres informativos= 950; caracteres constantes= 2587.

Figura 36. Árvore filogenética (MP) de *Peperomia* obtida com dados de sequências ITS e *matK* junto com o mapeamento do tipo de substâncias já isoladas das espécies de *Peperomia* abordadas neste estudo (ANEXO1), com dados fitoquímicos de algumas espécies de *Peperomia*.

Como algumas substâncias já foram isoladas de várias espécies estudadas, esperar-se-ia que plantas produtoras dessas substâncias fossem bastante próximas sob o ponto de vista evolutivo. No entanto, ao mapear na árvore filogenética se

observa que estas não se encontram tão próximas. A princípio, a árvore poderia ser dividida em dois clados principais: A e B (Figura 37). Assim, o clado A, produziria preferencialmente lignanas tetraidrofurânicas (B), secolignanas (C) e lignanas (E); já o clado B produziria preferencialmente norlignanas (F) e amidas (K), tal como a classificação feita no ANEXO 1.

Figura 37. Árvore filogenética de *Peperomia* com dados ITS e matK junto com co-ocorrência de substâncias em mais de uma espécie A21-J11 (ANEXO1).

A simples vista, os caracteres químicos não mostram estar relacionados à história evolutiva mostrada por dados moleculares dos genes ITS e *matK*, o que pode ser útil no momento de se diferenciar quimicamente espécies bastante próximas.

É provável que os caracteres químicos possam diferenciar espécies em níveis intergenéricos, por exemplo, ao comparar os gêneros *Piper* e *Peperomia*.

4.3 PERFIL METABÓLICO DE *PEPEROMIA*

Para correlacionar a filogenia molecular das peperomias obtida utilizando sequências de ITS e *matK* com o perfil químico dos extratos se coletaram as plantas sob as mesmas condições e os extratos foram realizados exatamente da mesma maneira para todas as amostras. Portanto, espera-se que a variabilidade química seja devida somente às características inerentes de cada planta analisada. Os extratos de cada planta foram feitos por triplicata assim como as análises; em todos os casos a variabilidade interespecífica foi maior do que a variabilidade intraespecífica.

4.3.1 HPLC-DAD

Os resultados obtidos por HPLC-DAD mostram a riqueza química das peperomias, evidenciada pela grande quantidade de picos por amostra (Figura 38). Não obstante, para grande parte das amostras poucos picos são majoritários naquele comprimento de onda (260 nm).

Após testar vários gradientes de eluição, se chegou ao método de separação utilizado, que apresentou uma boa separação para a maior parte dos extratos. O mesmo método foi utilizado para a obtenção dos dados de LC-ESI-MS.

Como uma análise dos resultados (Figura 38) não permite estabelecer

semelhanças entre as amostras, a análise estatística dos dados é fundamental nestes casos. Utilizou-se assim a análise hierárquica de clusters (HCA) com os dados normalizados provenientes da análise de HPLC (Figura 39).

Figura 38. Perfil metabólico por HPLC-DAD (260 nm) de peperomias.

A especificidade dos clusters quanto à produção de tipos de metabólitos não é muito evidente, pelo menos com a informação que se tem até o momento.

Analizando as espécies produtoras de substâncias iguais (Figura 40), observa-se que a *P. tetraphylla* e a *P. oreophila*, pertencentes ao mesmo clado por dados moleculares, também aparecem próximas na análise de clusters por HPLC e ambas são produtoras do fenilpropanóide **A23** (ANEXO 1). No caso de *P. serpens* e *P. oreophila*, que nas análises com dados moleculares estão distantes, se encontram no mesmo cluster por HCA com dados de HPLC e são produtoras da substância

J11 (ANEXO 1).

Figura 39. Análise de clusters (HCA) dos dados de HPLC (260nm) de peperomias junto com o mapeamento do tipo de substâncias isoladas para estas espécies (A-K, ANEXO1).

Mesmo sem a fitoquímica amplamente descrita para as espécies *P. corcovadensis* e *P. pseudoestrellensis* é evidente sua proximidade já que aparecem agrupadas nas análises moleculares e também na análise de clusters por dados de HPLC; o mesmo acontece com as espécies *P. megapotamica* e *P. rhombea*; *P. alata* e *P. galioides*, *P. arifolia* e *P. transparens*; *P. glabella nervulosa* e *P.*

rotundifolia; *P. blanda* e *P. hilariana* e *P. nitida* e *P. incana*.

Figura 40. Análise de clusters (HCA) dos dados de HPLC de peperomias junto com co-ocorrência de substâncias em mais de uma espécie A21-J11 (ANEXO1).

4.3.2 LC-ESI MS

Como observado (**Figura 41**), a análise por LC-ESI-MS dos extratos de peperomias permite observar maior quantidade de sinais comparado com HPLC-DAD dada a maior sensibilidade do método e por não ser limitado a um comprimento de onda específico de detecção.

Figura 41. Perfil metabólico das espécies de *Peperomia* por LC-ESI-MS.

Os clusters formados pela análise de HCA (Figura 42) não apresentam nenhuma especificidade aparente com relação ao tipo de substâncias já isoladas de estas espécies. No entanto, espécies como *P. rhombea* e *P. megapotamica*, *P. corcovadensis* e *P. pseudoestrellensis*, *P. serpens* e *P. urocarpa* que se encontram próximas nas análises moleculares também aparecem próximas na análise de clusters com dados de LC-ESI-MS evidenciando a grande proximidade destas espécies sob o ponto de vista evolutivo. A *P. tetraphylla* e *P. oreophylla*, intimas nas análises moleculares e produtoras de cinamatos (**A23**) também se encontram próximas nesta análise de clusters (Figura 43). *P. urocarpa* e *P. galioides*, que tem em comum as substâncias **I4** e **I7** também aparecem agrupadas no mesmo cluster. Para contrastar, *P. glabella* var. *nervulosa* e *P. pellucida* com as duas secolignanas

C4 e **C5** em comum, não aparecem muito próximas, mas ainda estão no mesmo clado maior (Figura 43).

Figura 42. Análise estatística por HCA dos dados obtidos por LC-ESI-MS de espécies de *Peperomia*.

Figura 43. Análise de clusters de peperomias com dados de LC-ESI-MS junto com co-ocorrência de substâncias isoladas de mais de uma espécie (A21-J11, Ver ANEXO1).

4.3.3 RMN ^1H

Os espectros de RMN dos extratos brutos se apresentaram bastante complexos em todos os casos (Figura 44) (ANEXO 5), com nitida presença de compostos alifáticos com sinais sobrepostos na região entre 0 e 2,4 ppm. Esses foram atribuídos a sinais de ácidos graxos e não foram considerados nas análises.

Figura 44. Perfil metabólico de peperomias por RMN ^1H .

Por outro lado, se observa a presença de sinais de grupos metoxilicos e de hidrogênios de anéis aromáticos ou olefínicos. Digno de nota foram os picos característicos em 18 ppm, em espécies de *P. trineura*, *P. rhombea*, *P. megapotamica*, *P. hilariana*, *P. blanda*, *P. sp*, *P. arifolia*, *P. rotundifolia*, *P. glabella var. nervulosa*, *P. sincorana* e *P. tetraphylla*, tais sinais foram atribuídos às ciclohexilidonas que foram isoladas de *P. alata* e *P. trineura* (FERREIRA et al., 2014). Um caso especial foi o sinal em 14 ppm para o extrato da *P. glabella*, que não foi possível atribuir a nenhuma substância já isolada da planta.

A análise de clusters dos dados de RMN ^1H (Figura 45) não revela igualmente uma estruturação bem definida pelo quimismo das espécies trabalhadas, com uma

dispersão de ocorrência das classes de metabólitos secundários em todos os clusters.

Figura 45. Análise de clusters (HCA) de peperomias com dados de RMN ^1H e classes ou subclasses de metabólitos secundários.

Das espécies produtoras de substâncias em comum somente a *P. tetraphylla* e *P. oreophila* (substância **A23**) se encontram no mesmo cluster (Figura 46). Tendo como comparação as análises com dados moleculares, espécies como *P. alata* e *P.*

glabella; *P. nitida* e *P. serpens*; *P. incana* e *P. urocarpa*; *P. oreophila*, *P. tetraphylla* e *P. subrubripica*; *P. rhombea* e *P. megapotamica* também aparecem juntas nas análises de clusters com dados de RMN ^1H .

Figura 46. Análise de clusters de peperomias com dados de RMN ^1H junto com co-ocorrência de substâncias em mais de uma espécie (A21-J11, ANEXO 1)

Todas as análises com dados químicos e moleculares resultaram no agrupamento das espécies *P. rhombea* e *P. megapotamica*; e *P. tetraphylla* e *P. oreophila* se encontram bastante próximas, evidenciando a semelhança entre estas espécies.

Observa-se maior consistência dos dados de RMN com dados moleculares do que os dados de LC-ESI-MS ou HPLC (Figura 47-Figura 49). Possivelmente, o

aspecto qualitativo sugestivo à estrutura química das substâncias seria a principal vantagem sobre os dados de espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos são próximos para substâncias com esqueleto semelhante e, além disso, tempos de retenção no LC-ESI-MS ou HPLC, que com pequenas variações nas estruturas, por exemplo, por metilação de ácidos benzoicos ou fenólicos resultaria numa diferenciação significativa no tratamento de dados. De uma forma geral, uma análise direta entre o perfil metabólico com a filogenia com dados moleculares, não indica uma correlação nitida como seria desejável. As evidências que emergiram foram que a diversidade metabólica nas peperomias leva à produção de um amplo arsenal de substâncias.

O fato dos genes de vias metabólicas serem um dos elementos genéticos de mais rápida evolução (FISCHBACH; WALSH; CLARDY, 2008) e que a expressão genética destes ser bastante dependente de fatores extrínsecos à planta torna complexo e desafiador testar o uso combinado desses dois conjuntos de caracteres.

Essa evolução rápida de genes do metabolismo secundário e a alta plasticidade das plantas ao estímulo externo fazem com que o estudo do fenótipo químico seja mais adequado para estudos ecofisiológicos ou até mesmo o estudo da expressão de genes do metabolismo secundário ao longo de ontogenia ou diferentes tratamentos.

Fenômenos como a convergência evolutiva ou o silenciamento de genes também tornam este tipo de estudos um desafio. Também é importante ressaltar que nem todos os metabólitos tem uma utilidade na quimiotaxonomia e cada tipo pode ser útil como marcador quimiotaxonômico em diferentes níveis taxonômicos, não necessariamente para classificar entre espécies de um mesmo gênero. Assim,

seria recomendável um estudo mais aprofundado sobre a composição química de estas espécies, assim como a inclusão de mais espécies para encontrar mais padrões. Uma revisão sobre metabolismo secundário de *Peperomia* (ANEXO 1), torna evidente a carência de estudos para a maioria das espécies analisadas. Há espécies relativamente bem estudadas, como é o caso de *P. tetraphylla* e *P. obtusifolia* enquanto que outras não foram ainda estudadas.

No geral, mesmo com algumas coincidências, cada metodologia de análise dos extratos de *Peperomia* apresenta resultados diferentes, assim todas as técnicas não são excludentes, mas complementares. Portanto, nenhuma técnica descreve completamente o perfil químico da planta; de maneira que fazer uma análise do perfil metabólico é um trabalho que deve ser realizado com precaução para não resultar em conclusões equivocadas.

Figura 47. Comparação entre a classificação com dados moleculares e a classificação com dados do perfil químico por HPLC.

Figura 48. Comparação entre a classificação com dados moleculares e a classificação com dados do perfil químico por LC-ESI-MS.

Figura 49. Comparação entre a classificação com dados moleculares e a classificação com dados do perfil químico por RMN ^1H .

Para buscar um detalhamento da relação complexa dentro de cada cluster, foi utilizada a análise discriminante de componentes principais (DAPC), uma metodologia estatística que permite descrever a diversidade entre grupos pré-definidos. O tratamento com dados de RMN ^1H foi definido para um conjunto de 4 clusters (Figura 50).

Figura 50. Clusters gerados pela análise discriminante de componentes principais (DAPC) dos dados de RMN ^1H dos extratos (CHCl_3) de espécies de *Peperomia*.

Figura 51. Classificação das espécies de *Peperomia* enquanto a sua filiação aos diferentes clusters gerados pela análise (DAPC).

Pode-se observar que dos quatro clusters gerados (Figura 50), o cluster 1 e 3 são bastante próximos e, de fato, várias espécies como a *P. nitida*, *P. sp* e *P. tetraphylla* que pertencem principalmente ao cluster 1 também tem algumas características do cluster 3.

O cluster 2 e 4 coincidem com os clusters gerados também pela análise de HCA de dados de RMN. Já os clusters 1 e 3 não coincidem muito.

Fazendo-se a comparação de esta classificação com a classificação filogenética com dados de ITS e *matK*, é possível identificar também algumas correlações interessantes. O cluster 1, em termos gerais engloba plantas que se encontram no grupo A, tal como mostrado na Figura 37 e algumas espécies do clado B. O cluster 3 inclui especialmente as espécies no clado B (Figura 37), excluindo *P. corcovadensis*, *P. tetraphylla* e *P. sp*. No entanto, estas duas últimas tem uma probabilidade de pertencer a este grupo (Figura 51). No cluster 2 se encontram as espécies *P. alata* e *P. glabella* que, de acordo com as análises filogenéticas, se encontram também em um mesmo clado. À este cluster também pertence a espécie *P. sincorana*, que agrupado ao mesmo clado por filogenia molecular, mesmo um pouco mais distante, outra espécie classificada no cluster 2 é a *P. corcovadensis*, que esperar-se-ia que estivesse classificada no cluster 3 ou 1.

Pela sua vez, no cluster 4 se encontram as espécies *P. incana*, *P. serpens*, *P. urocarpa* e *P. obtusifolia*, que na árvore filogenética (Figura 36) também são espécies muito próximas.

Este método estatístico se mostrou bastante útil para estudos de análise do perfil químico e bastante congruente com a classificação com dados moleculares de estas espécies. Pode ser uma ferramenta útil para a classificação de plantas que

sejam relativamente próximas, pois além de classificar as espécies em diferentes clusters pode ajudar a entender a relação que existe entre estes clusters.

De acordo com todos os diferentes métodos utilizados para analisar os extratos e as análises estatísticas com dados químicos, cabe ressaltar o grupo de espécies *P. incana*, *P. nitida*, *P. serpens*, *P. urocarpa* por serem bastante próximas filogeneticamente e com seu perfil químico. Outro grupo interessante é o grupo de espécies conformado por *P. corcovadensis*, *P. pseudoestrellensis*, *P. oreophila*, *P. subrubripica*, *P. tetraphylla*, *P. megapotamica*, *P. rhombea*, *P. sp* e *P. trineura* (Clado B, figura 10), já que também aparentam ter uma química particular e comum a todas elas, que faz com que nas análises estatísticas com dados químicos fiquem bastante próximas. Um estudo com este conjunto de espécies pode dar idéias sobre a evolução do metabolismo secundário.

4.4 FILOGENIA DO GENE CHS

Analizando-se as seqüências obtidas da região do gene CHS amplificado e fazendo-se uma comparação com seqüências de CHS presentes na base de dados do GenBank, não se encontram seqüências muito próximas às obtidas de *Peperomia*. Assim, com a informação disponível até o momento não foi possível estabelecer a função específica destes genes CHS (Figura 52). Isto pode levar a pensar numa possível utilização de este caráter como marcador molecular para algumas espécies de *Peperomia*.

Com exceção de *P. nitida*, as seqüências CHS das demais peperomias analisadas fazem parte de um único clado, possivelmente, plantas próximas nesta classificação produzem substâncias policetídicas com esqueletos semelhantes, o

qual pode se comprovar com futuros estudos fitoquímicos.

Figura 52. Árvore filogenética (MP) baseada em sequências do gene CHS de espécies de *Peperomia* e plantas relacionadas. Valores de bootstrap nos ramos. Análise por máxima parcimônia utilizando o programa PAUP. Busca heurística; repetições de bootstrap: 100000; longitude da árvore: 2624; índice de consistência (CI): 0.6300; índice de homoplasia (HI): 0.3700; índice de retenção (RI): 0.7847; algoritmo *Branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR)*; número de caracteres informativos: 665; 224 caracteres são constantes. Grupo externo: *Escherichia coli* FabH (número de acesso no genBank:M77744), gene da biossíntese de ácidos graxos. Em negrito se encontram as sequências obtidas neste trabalho e em azul as sequências obtidas de *Peperomia* que também formam parte deste trabalho.

O gene CHS amplificado não é específico a algum tipo de composto pelo fato de que os iniciadores foram desenhados a partir do alinhamento de diversas sequências atribuídas a CHS na base de dados do GenBank. Como evidenciado (TROPF et al., 1994) e (SCHRODER, 1997), a grande semelhança entre genes CHS, STS e STCS faz com que seja difícil diferenciar entre eles pela simples comparação das sequências e devido ao fato de que muitas sequências designadas como sendo do tipo CHS não tem nenhum estudo de funcionalidade, estes genes sequenciados podem ser responsáveis pela produção de flavonoides, cromenos, fenóis prenilados, entre outros policetídeos.

Mesmo que nem todas as peperomias abordadas neste estudo tenham amplificado para o gene CHS, aquelas que amplificaram e que permitiram obter uma árvore filogenética com uma topologia bastante compatível com aquela obtida com dados de ITS e *matK*, levando a supor que a velocidade de evolução destes genes CHS é comparável com aquela dos genes *matK* ou ITS. Esta particularidade leva a hipótese de que o estudo da evolução do metabolismo secundário possa ser melhor entendido através do estudo dos genes do metabolismo secundário presentes nas espécies e não através do estudo do produto final da expressão gênica das mesmas (os metabólitos secundários propriamente ditos). Isto devido a que a característica fenotípica de presença/ausência de determinado metabólito secundário é bastante sensível e dependente das condições ambientais e mostra as condições da planta em um momento determinado, podendo ela produzir outro tipo de substâncias se esta se encontra sob estresse ou em outro momento do dia/ou ano (ciclo circadiano/ ciclos sazonais).

Esta sensibilidade das plantas às condições externas faz com que o estudo do

perfil químico seja bastante útil para comparar entre plantas bastante próximas (variedades de uma mesma espécie) ou a mesma planta submetida a diferentes condições, o que permite também identificar genes associados a determinadas funções metabólicas.

4.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Diversos metabólitos secundários de espécies de *Peperomia* possuem esqueleto policetídeo como derivados de ácido orselínico (SALAZAR et al., 2005). Estudos realizados anteriormente no LQPN objetivando o estudo de policetideo sintases e o seu possível envolvimento na biossíntese de compostos estruturalmente relacionados ao ácido orselínico envolveram tentativas de amplificação de PKS. No entanto, tais esforços foram infrutíferos. Assim, objetivou-se como alternativa o estudo dos fungos endofíticos e seu envolvimento no metabolismo secundário de espécies de *Peperomis* (*Peperomia arifolia*, *P. glabella*, *P. nitida*, *P. oreophilla*, *P. urocarpa*). Foi realizado o isolamento e a identificação de um total de 27 fungos endofíticos, tendo como base a análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos mesmos.

4.5.1 Cultura de fungos endofíticos

Em geral observou-se um bom desenvolvimento dos fungos endofíticos no meio de cultura de batata dextrose-água (PDA). Cada uma das partes das plantas resultou no desenvolvimento de pelo menos um fungo endofítico. A água de

lavagem final das plantas, antes de serem cortadas e dispostas nas placas de Petri, também foi utilizada como controle negativo, em todos os casos não houve crescimento de organismo algum (Figura 53). Portanto, pôde-se afirmar que os fungos obtidos são, de fato, endofíticos e que não houve contaminação por fungos de superfície ou outro tipo de contaminantes.

Figura 53. Cultura de fungos endofíticos das diferentes partes das plantas.

Para o isolamento de cada fungo crescido no meio PDA se fez a repicagem das colônias em novas placas de Petri, por duplicata, assim foram mantidos por uma semana, após a qual, novos repiques foram feitos. Poucos fungos repicados

apresentaram contaminação por leveduras, de maneira que a repicagem em duplicata permitiu a obtenção e preservação das colônias purificadas (Tabela 13).

Tabela 13. Fungos isolados de diferentes partes de plantas do gênero *Peperomia*.

PLANTA	PARTE	NÚMERO DE ISOLADOS	FUNGO	
<i>P. urocarpa</i>	raíz	1	UR1
	Caule	3	UC1
			UC2
			UC3
	folhas	4	UF1

			UF2
			UF3
			UF4
<i>P. glabella</i>	raíz	2	GR1
			GR2
	caule	2	GC2
			GC3

	folhas	1	GF1
<i>P. nitida</i>	raiz	1	NR1
	caule	2	NC1
			NC2
	folhas	1	NF1
<i>P. arifolia</i>	raiz	2	AR1
			AR2

	caule	2	AC1
			AC4
	folhas	1	AF1
<i>P. oreophila</i>	raíz	1	OR2
	caule	2	OC1
			OC2
	folhas	2	OF1

			OF2
--	--	--	-----	---

4.5.2 Detecção de fungos endofíticos nos tecidos de *Peperomia*

O corante rosa bengala (SAHA, 1988) foi utilizado para observar os fungos endofíticos nos tecidos das peperomias (Figura 54).

Figura 54. Fungos endofíticos, observados sob microscópio óptico nos tecidos de diferentes espécies de *Peperomia*.

4.5.3 Amplificação da região ITS1- 5.8S-ITS2 do rDNA para identificação dos fungos endofíticos

Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 600 pb (Figura 55) com os iniciadores ITS1 e ITS4. As seqüências obtidas foram processadas no programa MEGA5, e juntadas em uma única matriz, junto com seqüências com maior porcentagem de identidade obtidas com a ferramenta BLAST do GenBank. Com estas foi possível fazer uma reconstrução filogenética, no mesmo programa, pelo método de distância Neighbor-joining (NJ), conseguindo identificar os fungos endofíticos no nível de gênero (Figura 56) (Tabela 14).

Esta análise mostrou a grande variedade de fungos endofíticos em espécies de *Peperomia*, os quais estão agrupados em seis famílias diferentes e tiveram seus gêneros identificados; seria imprescindível uma análise morfológica para identificação da espécie à qual pertencem.

Figura 55. Gel de agarose 2% (contendo brometo de etídeo) mostrando os fragmentos amplificados de aproximadamente 600 pb de alguns dos fungos endofíticos isolados AC4, AR1, AR2 e UF3.

Observou-se que várias sequências ITS de fungos foram idênticas (AR1 e AR2), (GC3 e NR1), (UF3 e NF1), (AC4 e AC1), (UF1 e UF4), (UC1 e UF2) e (entre OC2 e GR1 só houve apenas a alteração de um nucleotídeo na região sequenciada). No entanto, não seria conveniente afirmar que se trata da mesma espécie, pois em alguns casos foram observadas diferenças morfológicas, como entre AR1 e AR2, UC1 e UF2, e UF3 e NF1. Outro fator a se ter em conta é que entre fungos com sequência igual no intervalo sequenciado de ITS, um dos fungos amplifica para a sintase do ácido orselínico e o outro não. Esse foi o caso do AR1 que amplifica com os iniciadores B (Tabela 7) enquanto que AR2 não, AC4 amplifica e AC1 não, OC2 amplifica enquanto que GR1 não. Desta maneira, pode se inferir que a região ITS no caso dos fungos endofíticos analisados não é suficiente para estabelecer se duas espécies bastante próximas constituem-se na mesma espécie ou se seriam espécies diferentes. Seria conveniente utilizar mais de uma região do DNA para se estabelecer a identidade das espécies.

Figura 56. Árvore filogenética *Neighbor-joining* não enraizada feita com sequências ITS1-5.8S-ITS2 dos fungos endofíticos isolados de *Peperomia*.

4.5.4 Diversidade de genes PKS em fungos endofíticos de *Peperomia*

Os policetídeos em fungos são produzidos por PKSs de multidomínio. As PKSs de fungos podem ser agrupadas entre não reduzidas (NR, que amplificam com os iniciadores LC1-LC2c), parcialmente reduzida (PR, que amplificam com os iniciadores LC3-LC5c) e altamente reduzidas (HR, que amplificam com os iniciadores KS3-KS4c) examinando-se os domínios codificados no gene (SANCHEZ et al., 2010). Foi possível a obtenção de produtos de PCR com aproximadamente 700-800 pb, para alguns fungos endofíticos (Figura 57).

Figura 57. Gel de agarose 1% (contendo brometo de etídeo) mostrando fragmentos amplificados de aproximadamente 700 pb de PKS de fungos endofíticos, utilizando iniciadores LC1-LC2c e KS1-KS2c.

Na Tabela 14 se apresentam resumidamente os resultados de amplificação obtidos com cada iniciador, como se pode observar todos os fungos, com exceção do OC1, amplificaram pelo menos para um tipo de *PKS*, evidenciando-se o potencial de estes fungos para produzir compostos de tipo policetídeo.

4.6 GENE DO ÁCIDO ORSELÍNICO EM PEPEROMIAS E FUNGOS ENDOFÍTICOS

Tendo como hipótese que o ácido orselínico é um intermediário na produção de certos compostos policetídeos em *Peperomia* (SALAZAR et al., 2005), foram

desenhados iniciadores específicos para o gene de ácido orselínico (Tabela 7). Este conjunto de iniciadores foram testados com DNA de peperomias (*P. arifolia*, *P. glabella*, *P. nitida*, *P. oreophilla* e *P. urocarpa*, produtoras de compostos derivados do ácido orselínico) e seus fungos endofíticos, sob diferentes condições de reação, utilizando-se como controle positivo DNA de *Streptomyces viridochromogenes*.

Os iniciadores B (Tabela 7), desenhados com base na sequência gênica da proteína AviM presente na bactéria *Streptomyces viridochromogenes* (número de acesso no genBank: AAK83194), considerando que experimentos de expressão heteróloga de AviM em *Streptomyces lividans* resultaram na formação do ácido orselínico (HILL, 2006), permitiriam amplificar uma região de 1000 bp, para o controle positivo, como esperado (Figura 58). Estes iniciadores permitiram a amplificação de um fragmento do tamanho esperado em vários fungos endofíticos. No entanto, não foi observada nenhuma banda nas plantas analisadas, o que leva a pensar que as plantas geram ácido orselínico através de uma PKS diferente de aquela comum a os fungos e bactérias, ou que possivelmente o grau de envolvimento dos fungos endofíticos no metabolismo de *Peperomia* é maior do que o esperado, o qual terá de ser desvendado em experimentos apropriados.

Como se observou, pelo menos um fungo em cada planta analisada é um potencial produtor de ácido orselínico (Tabela 14), podendo produzir ácido orselínico ou algum derivado deste sob condições específicas de crescimento.

Figura 58. Gel de agarose contendo GelRed com o produto de PCR para ácido orselínico com os iniciadores B da tabela 8. SV (controle positivo, *Streptomyces viridochromogenes*), as peperomias A (*P. arifolia*), G (*P. glabella*), N (*P. nitida*), O (*P. oreophilla*), U (*P. urocarpa*), e os diferentes fungos endofíticos isolados de plantas (UR1-OF2) e por último (-), o controle negativo, água milliQ autoclavada.

Com os outros iniciadores desenhados (Tabela 7) não foi possível a obtenção de fragmentos do tamanho esperado com as plantas. Com os iniciadores F (STCSF1 e STCSR1). Porém, se observaram fragmentos com um tamanho menor ao esperado (954bp) (Figura 59) e a amplificação em grande escala não resultou em quantidade suficiente para seqüenciamento. Seria recomendável otimizar esta reação de PCR e sequenciar estes fragmentos que poderiam corresponder a uma PKS não necessariamente a aquela relacionada à biossíntese do ácido orselínico pois estes iniciadores foram desenhados a partir de sequências de genes que codificam para PKSs com outras funções em plantas.

Estes resultados podem indicar que a ácido orselínico sintase de peperomias poderia ser diferente daquela já descrita para outros organismos. Portanto, poderia se tratar de um caso de convergência evolutiva, no qual os genes não possuem um ancestral comum mesmo que levam à produção do mesmo esqueleto de carbonos.

Figura 59. Eletroforese em gel de agarose mostrando os fragmentos amplificados gerados com iniciadores STCSF1 e STCSR1

Tabela 14. Resumo geral dos resultados obtidos no estudo de fungos endofíticos, onde se mostra a planta da qual foi extraído, o gênero ao qual pertence o fungo e a presença (+) ou ausência (-) de diferentes tipos de PKS (NR, PR, HR) e a PKS responsável pela produção do ácido orselínico (OSAS). (Nd: não foi testado com este fungo)

PLANTA	PARTE	NOME DO FUNGO	GÊNERO	PKS LC1/LC2c (NR)	PKS KS3/KS4c (HR)	PKS LC3-LC5c (PR)	PKS OSAS
<i>P. urocarpa</i>	Raízes	UR1	<i>Chaetomium</i>	+	-	+	+
	Caule	UC1	<i>Diaporthe</i>	-	+	-	-
		UC2	<i>Diaporthe</i>	+	+	+	-
		UC3	<i>Xylaria</i>	+	+	+	+
	Folhas	UF1	<i>Xylaria</i>	+	+	+	+
		UF2	<i>Diaporthe</i>	-	+	-	+
		UF3	<i>Colletotrichum</i>	+	-	-	+
		UF4	<i>Xylaria</i>	+	+	+	+
<i>P. glabella</i>	Raízes	GR1	<i>Fusarium</i>	+	-	+	-
		GR2	<i>Fusarium</i>	-	+	-	-
	Caule	GC2	<i>Colletotrichum</i>	-	+	-	-
		GC3	<i>Thielavia</i>	+	+	+	+
	Folhas	GF1	<i>Arthrimum</i>	+	-	+	-
<i>P. nitida</i>	Raízes	NR1	<i>Thielavia</i>	+	-	-	+
	Caule	NC1	<i>Diaporthe</i>	+	+	+	+
		NC2	<i>Colletotrichum</i>	+	-	+	+
	Folhas	NF1	<i>Colletotrichum</i>	+	+	+	+
<i>P. arifolia</i>	Rraízes	AR1	<i>Chaetomium</i>	+	+	+	+

		AR2	<i>Chaetomium</i>	Nd	Nd	Nd	Nd
	Caule	AC1	<i>Arthrimum</i>	+	+	+	+
		AC4	<i>Arthrimum</i>	+	-	+	+
	Folhas	AF1	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>P. oreophila</i>	raízes	OR2	<i>Fusarium</i>	-	+	+	-
	Caule	OC1	<i>Diaporthe</i>	-	-	-	+
		OC2	<i>Fusarium</i>	+	+	+	-
	Folhas	OF1	<i>Diaporthe</i>	+	-	-	+
		OF2	<i>Arthrimum</i>	+	-	+	-

4.6.1 Amplificação do gene PKS da possível ácido orselínico sintase do fungo UR1

Foi sequenciado o produto de amplificação dos iniciadores B (para ácido orselínico sintase) do fungo UR1 (Tabela 15), fungo do gênero *Chaetomium*, obtendo uma sequência de boa qualidade de 867 bp. Dando como maior porcentagem de semelhança 82%, com uma PKS do fungo *Myceliophthora thermophila*, com número de acesso no GenBank XM_003664816, sem função descrita.

A sequência obtida foi submetida a um BLAST para ver o tipo de gene e o grau de semelhança com o gene de ácido orselínico em diferentes organismos: *Streptomyces viridochromogenes* (AviM, número de acesso no GenBank AAK83194, *Michromonospora echinospora* (CaLO5, número de acesso no GenBank AAM70355), e *Aspergillus nidulans* (AN7909.2, número de acesso no GenBank XP_681178).

Foi observado um 60% de semelhança com a sequência genômica da proteína AviM de *Streptomyces viridochromogenes*, 47% de semelhança com a sequência

gênica da proteína CaLO5, de *Michromonospora echinospora*, por último, uma porcentagem de semelhança de 50% com o gene do ácido orselínico em *Aspergillus nidulans*. É importante ressaltar que dada a maior semelhança desta sequência do fungo UR1 com a sequência de bactéria *Streptomyces viridochromoogenes* do que com a sequência do fungo *Aspergillus nidulans*, pode ser um indicativo de uma possível transferência horizontal deste gene.

Tais porcentagens não são baixas comparando-se porcentagens de semelhança resultantes ao fazer um BLAST entre estas proteínas que tem a mesma função em diferentes organismos: 32% entre *AviM* e o gene de ácido orselínico em *Aspergillus nidulans* (AN7909.2); 59% entre *AviM* e *CaLO5* e 32% entre o gene de ácido orselínico em *Aspergillus nidulans* (AN7909.2) e *CaLO5*. No entanto, para se estabelecer se de fato este gene corresponde a uma ácido orselínico sintase no fungo UR1 seria necessário o sequenciamento do gene inteiro e a expressão em um organismo heterólogo.

Tabela 15. Sequência do possível gene PKS do ácido orselínico no fungo UR1 , 867 bp.

```
>UR1 OSASB
CGCTGTCTTTGCCGGTCTCATGACTGGCGACTACGACACTCTGTCCCAGCGCGACGAGCTT
GACWCCAGCCAGTACTACGCCGCTGGCAATGCGCGCTCAATTCTGTCAAATCRCATCTCGT
ACTTCTTCAACTTCAATGGCCCCTCAATGACCATCGACACCGCAYGCTCGTCCAGCCTTGTC
GCTCTTCACCAGGCTGTCCTGAGCCTGCGGTGCGGAGAGTGCAAGATGGCCTGTGTGCGG
GGCGCCAACATGATCCTCACCCCGGAGCAGTTCATCGTCGAGTCGAGCCTGCACATGCTCA
GCCCCACTGGCCACTGCCGCATGTGGGATGCTGGCGCCGATGGCTACGCCCCGCGGAGAAG
GCGTCGCTGCCTTGTTTCATCAAGCCCTTGAGCCAGGCTCTTGCCGACGGTGACCACATCGA
GGCCATCATTCGTGACACCGGCGTCAATTCGGACGGTCGCTCCCGCGGAATTACGATGCCC
AATTGGGAAGCCCAGTCACGCCTTATCCAGGACACCTACCAGCGAGCCGGCCTGGACTCTA
AGTCCCCCGAAGATCGATGCCAATACTTCGAGGCTCACGGCACGGGCACCAGCGCCGGAG
ATCCCAACGAGGCGCGCGCCATTGAGAATGCCTTTTTTCGATCGTAACAAGGACTCTGCTTCG
GGTGCCAAATTGCTTGTCGGCTCCGTCAAGACCGTGATCGGCCACACCGAAGGCGCTGCC
GGCTTGGCTGGTCTTCTCAAGGTGATTGAGAGCATGCGCCACGGCTCAGTGCCTCCCAACC
TCCATCTTGACAAGCTCAATCCCGACGTTGAGCAGTACTACAACAACCTTGCTCGTCCCAACT
TCTGCTATCGCATG
```

4.7 PERFIL METABÓLICO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Devido ao fato que diferentes fungos endofíticos amplificaram para o gene de ácido orselínico, decidiu-se fazer o estudo do perfil metabólico deste em busca do ácido orselínico em alguns destes fungos (AC4, AR1, OC1, OF1, UC3, UR1).

Pelas análises por HPLC e LC-ESI-MS dos extratos em AcOEt dos fungos endofíticos crescidos em meio Czpazek não foi possível identificar o ácido orselínico. Mesmo que o meio foi adaptado do protocolo mais adequado para aumentar a produção de ácido orselínico no fungo *Aspergillus nidulans* (SANCHEZ et al.). Este resultado pode significar que os fungos não produzem ácido orselínico nas condições de cultura utilizadas ou que provavelmente o ácido orselínico não seja o produto final da biossíntese e, portanto, esteja sendo rapidamente consumido no processo biossintético para levar à produção de outras substâncias.

Figura 60. HPLC (260nm) do ácido orselínico e de extratos em AcOEt de fungos endofíticos de *Peperomia* (OC1 e UR1)

5 CONCLUSÕES

5.1 PERFIL METABÓLICO DE *PEPEROMIA*

- ✓ Obteve-se o perfil metabólico de 27 espécies de peperomias utilizando-se técnicas como HPLC-DAD, RMN de ^1H e LC-ESI-MS, evidenciando a grande riqueza em metabólitos secundários de este gênero. As triplicatas das análises se mostraram consistentes entre elas. Cada metodologia analítica dos extratos revelou resultados diferentes nas análises estatísticas, sendo que cada metodologia aporta para o conhecimento do perfil químico global da planta.
- ✓ A análise dos dados químicos com a ferramenta estatística HCA permitiu a classificação das espécies por semelhança na produção de metabólitos secundários e a análise estatística DAPC se mostrou como uma ferramenta útil para encontrar a relação entre os clusters formados pelas espécies trabalhadas.
- ✓ Não foi possível a identificação do ácido orselínico nas peperomias estudadas por meio de LC-ESI-MS.

5.2 FILOGENIA MOLECULAR DE *PEPEROMIA*

- ✓ A classificação obtida com máxima parcimônia de 27 espécies de peperomias com dados de ITS e *matK* permitiu o grupamento das plantas de maneira consistente com características morfológicas, como observamos em campo, plantas com características morfológicas semelhantes ficaram próximas na classificação com dados moleculares. O gene *matK* mostra-se como um marcador mais adequado para obter a filogenia de *Peperomia* dado que o

suporte estatístico dos ramos das árvores obtidas foi mais significativo quando comparado com as árvores obtidas com dados ITS.

5.3 ANÁLISES QUÍMICAS E MOLECULARES CONJUNTAS

- ✓ As classificações obtidas com dados moleculares foram analisadas diante dos dados de perfil químico conseguindo algumas correlações interessantes, no entanto, não se observa uma correlação direta entre os clados formados e as classes de metabólitos encontrados nestas espécies.

5.4 ESTUDO FITOQUÍMICO DE *PEPEROMIA*

- ✓ Foi isolado o policetídeo malabaricona D de *P. megapotamica*,
- ✓ O fenilpropanoide elemicina e a lignana furofurânica diyangambina foram isolados de *P. rotundifolia*.
- ✓ As flavonas 5,6,7-trimetoxiflavona e a 4',5,6,7-tetrametoxiflavona foram isoladas de *P. sincorana*.

5.5 ESTUDO DO GENE CHALCONA SINTASE EM *PEPEROMIAS* E PLANTAS FILOGENÉTICAMENTE RELACIONADAS

- ✓ De acordo com a árvore filogenética se observa que as CHS de *Peperomia* formam um clado separado do resto de sequências conhecidas de CHS. Serão necessários estudos mais aprofundados para estabelecer se a diferenciação das CHS se encontra no gene, na estrutura ou na função da proteína.

5.6 FUNGOS ENDOFÍTICOS

- ✓ Os 27 fungos endofíticos foram isolados de raiz, caule e folhas de 5 espécies de *Peperomia* (*P. glabella*, *P. nitida*, *P. urocarpa*, *P. oreophila*, *P. arifolia*). A identificação destes fungos endofíticos utilizando a região ITS1- 5.8S-ITS2 do rDNA foi útil para estabelecer o gênero dos fungos isolados, no entanto, uma identificação morfológica será necessária para fazer a identificação das espécies, assim como para estabelecer se fungos com sequência ITS bastante semelhante ou igual pertencem à mesma espécie.
- ✓ A amplificação de diferentes tipos de policetídeo sintase pelos fungos permite entrever o potencial dos mesmos na produção de compostos de tipo policetideo. Adicionalmente, acredita-se que pelo menos um fungo isolado de cada *Peperomia* trabalhada tem a faculdade de produção de ácido orselínico devido à amplificação de um fragmento de DNA com iniciadores específicos para ácido orselínico sintase. Porém, o estudo do perfil metabólico de vários fungos endofíticos de *Peperomia* com potencial para produção de ácido orselínico, não permitiu identificar o ácido orselinico no extrato em acetato de etila.
- ✓ Foi possível sequenciar o gene atribuído ao ácido orselinico sintase do fungo UR1, o qual apresenta uma porcentagem de semelhança de 60 % com a sequência gênica da proteína *Avim* da bactéria *Streptomyces viridochromogenes*, indicando uma possível transferência horizontal deste gene.

6 REFERÊNCIAS¹

AHLERT, J.; SHEPARD, E.; LOMOVSKAYA, N.; ZAZOPOULOS, E.; STAFFA, A.; BACHMANN, B. O.; HUANG, K. X.; FONSTEIN, L.; CZISNY, A.; WHITWAM, R. E.; FARNET, C. M.; THORSON, J. S. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. **Science**, vol. 297, 1173-1176, 2002.

AKIYAMA, T.; SHIBUYA, M.; LIU, H. M.; EBIZUKA, Y. *p*-Coumaroyltriacytic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from *Hydrangea macrophylla* var. thunbergii. **European Journal of Biochemistry**, vol. 263, 834-839, 1999.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, vol. 41, 1-16, 2010.

ANKE, T.; WEBER, D.; SCHUEMANN, J.; HERTWECK, C. In: **Physiology and Genetics**. Springer Berlin Heidelberg; 2009. vol. 15, p. 331-351.

AQIL, M. K., I. Z.; AHMAD, M. B. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. **Scientist of Physical Sciences**, vol. 5, 213-215, 1993.

ARAUJO, M. J. C.; CAMARA, C. A. G.; BORN, F. S.; MORAES, M. M.; BADJI, C. A. Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, vol. 57, 139-155, 2012.

ARRIGONI-BLANK, M. D.; DMITRIEVA, E. G.; FRANZOTTI, E. M.; ANTONIOLLI, A. R.; ANDRADE, M. R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 91, 215-218, 2004.

AYERS, S.; ZINK, D. L.; MOHN, K.; POWELL, J. S.; BROWN, C. M.; MURPHY, T.; BRAND, R.; PRETORIUS, S.; STEVENSON, D.; THOMPSON, D.; SINGH, S. B. Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity in vitro. **Phytochemistry**, vol. 69, 541-545, 2008.

BANERJEE, D.; PANDEY, A.; JANA, M.; STROBEL, G. Muscodor albus MOW12 an Endophyte of *Piper nigrum* L. (Piperaceae) Collected from North East India Produces Volatile Antimicrobials. **Indian Journal of Microbiology**, vol. 54, 27-32, 2014.

BASHYAL, B. P.; WIJERATNE, E. M. K.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. L. Globosumones A-C, Cytotoxic orsellinic acid esters from the Sonoran Desert

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Endophytic Fungus *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, vol. 68, 724-728, 2005.

BASTOS, M.; LIMA, M.; CONSERVA, L.; ANDRADE, V.; ROCHA, E.; LEMOS, R. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, vol. 8, 16, 2009.

BATISTA, J. M., JR.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LOPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, vol. 53, 6051-6054, 2012.

BATISTA, J. M., JR.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LOPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure Elucidation and Absolute Stereochemistry of Isomeric Monoterpene Chromane Esters. **Journal of Organic Chemistry**, vol. 76, 2603-2612, 2011.

BATISTA, J. M., JR.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; CASS, Q. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; LOPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Absolute configuration reassignment of two chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) using VCD and DFT calculations. **Tetrahedron-Asymmetry**, vol. 21, 2402-2407, 2010.

BATISTA, J. M.; LOPEZ, S. N.; MOTA, J. D.; VANZOLINI, K. L.; CASS, Q. B.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; BOLZANI, V. D.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution and Absolute Configuration Assignment of a Natural Racemic Chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Chirality**, vol. 21, 799-801, 2009.

BAYMA, J. D.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; CANTO, W. C. A dimeric ArC2 compound from *Peperomia pellucida*. **Phytochemistry**, vol. 55, 779-782, 2000.

BINGLE, L. E. H.; SIMPSON, T. J.; LAZARUS, C. M. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. **Fungal Genetics and Biology**, vol. 26, 209-223, 1999.

BIRCH, A. J. Biosynthesis of Polyketides and Related Compounds. **Science**, vol. 156, 202-206, 1967.

CHARLES, R.; GARG, S. N.; KUMAR, S. An orsellinic acid glucoside from *Syzygium aromaticum*. **Phytochemistry**, vol. 49, 1375-1376, 1998.

CHEN LI, Z. Y., DONG JUN-XING. Chemical constituents of *Peperomia dindygulensis*. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, vol. 38, 2007.

CHENG, M.-J.; CHEN, I.-S. Secondary metabolites from *Peperomia sui*. **Journal of**

the **Chilean Chemical Society**, vol. 53, 1539-1542, 2008.

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

CHITHRA, S.; JASIM, B.; ANISHA, C.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. LC-MS/MS Based Identification of Piperine Production by Endophytic *Mycosphaerella* sp PF13 from *Piper nigrum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 173, 30-35, 2014.

CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, vol. 21, 534-540, 2014.

CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics: What You See is What You Extract. **Phytochemical Analysis**, vol. 25, 289-290, 2014.

CHOOI, Y.-H.; STALKER, D. M.; DAVIS, M. A.; FUJII, I.; ELIX, J. A.; LOUWHOFF, S. H. J. J.; LAWRIE, A. C. Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen *Xanthoparmelia semiviridis*. **Mycological Research**, vol. 112, 147-161, 2008.

COX, D. G.; OH, J.; KEASLING, A.; COLSON, K. L.; HAMANN, M. T. The utility of metabolomics in natural product and biomarker characterization. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, vol. 1840, 3460-3474, 2014.

COX, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. **Organic & Biomolecular Chemistry**, vol. 5, 2010-2026, 2007.

DA SILVA, A. C. M.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; GUIMARAES, E. F.; MAIA, J. G. S. Essential oil composition of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 18, 269-271, 2006.

DA SILVA, J.; SILVA, J.; NASCIMENTO, S.; DA LUZ, S.; MEIRELES, E. I.; ALVES, C. U.; RAMOS, A.; MAIA, J. Antifungal Activity and Computational Study of Constituents from *Piper divaricatum* Essential Oil against Fusarium Infection in Black Pepper. **Molecules**, vol. 19, 17926-17942, 2014.

DAHLSTEDT, H. In: HANDLINGAR., S. V.-A.editor. Kongl. Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar.; 1900. vol. Band. 33.

DE FEO, V.; BELAUNDE, A. J.; SANDOVAL, J. G.; SENATORE, F.; FORMISANO, C. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Peperomia galioides* HBK (Piperaceae) from Peru. **Natural Product Communications**, vol. 3, 933-936, 2008.

DE LIRA, P. N.; DA SILVA, J. K.; ANDRADE, E. H.; SOUSA, P. J.; SILVA, N. N.; MAIA, J. G. Essential oil composition of three *Peperomia* species from the Amazon, Brazil. **Nat Prod Commun**, vol. 4, 427-30, 2009.

DEDIAZ, A. M. P.; DIAZ, P. P.; CARDOSO, H. Volatile constituents of *Peperomia-subespatulata*. **Planta Medica**, vol., 92-93, 1988.

DIETERLE, F.; ROSS, A.; SCHLOTTERBECK, G.; SENN, H. Metabolite projection analysis for fast identification of metabolites in metabonomics. Application in an amiodarone study. **Analytical Chemistry**, vol. 78, 3551-3561, 2006.

DU, F.-Y.; LI, X.-M.; SONG, J.-Y.; LI, C.-S.; WANG, B.-G. Anthraquinone Derivatives and an Orsellinic Acid Ester from the Marine Alga-Derived Endophytic Fungus *Eurotium cristatum* EN-220. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 97, 973-978, 2014.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, vol. 24, 285-294, 2005.

ECKERMAN, C.; SCHRODER, G.; ECKERMAN, S.; STRACK, D.; SCHMIDT, E.; SCHNEIDER, B.; SCHRODER, J. Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. **Phytochemistry**, vol. 62, 271-286, 2003.

EIJK, G. W. V. Isolation and identification of orsellinic acid and penicillic acid produced by *Penicillium fennelliae* Stolk **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 35, 497-504, 1969.

FANG, C. Y., GUOHONG; CHEN, HONGZHUAN; WANG, QIWEI; YU, DEHONG; YANG, YIFANG; LU, QIN; LIN, MENGGAN; BAI, FAN; LI, GUIXIU (2011). Application of polyketone compounds extracted from *Peperomia dindygulensis* as angiogenesis inhibitor.

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

FERNIE, A. R. Metabolome characterisation in plant system analysis. **Functional Plant Biology**, vol. 30, 111-120, 2003.

FERREIRA, E. A.; REIGADA, J. B.; CORREIA, M. V.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; FRANCHI, G. C.; NOWILL, A. E.; LAGO, J. O. H. G.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J. Antifungal and Cytotoxic 2-Acylcyclohexane-1,3-diones from *Peperomia alata* and *P. trineura*. **Journal of Natural Products**, vol. 77, 1377-1382, 2014.

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

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T.; CLARDY, J. The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 105, 4601-4608, 2008.

FLORES-SANCHEZ, I. J.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. In silico expression analysis of PKS genes isolated from *Cannabis sativa* L. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 33, 703-U155, 2010.

FLORES-SANCHEZ, I. J.; VERPOORTE, R. Plant Polyketide Synthases: A fascinating group of enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 47, 167-174, 2009.

FRANÇOIS, T.; MICHEL, J. D. P.; VYRY, W. N. A.; FABRICE, F. B.; LAMBERT, S. M.; HENRI, A. Z. P.; CHANTAL, M. Composition and Antifungal Properties of Essential Oils from Five Plants Growing in the Mountainous Area of the West Cameroon. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, vol. 16, 679-688, 2013.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, vol. 112, 231-240, 2008.

GAISSER, S.; TREFZER, A.; STOCKERT, S.; KIRSCHNING, A.; BECHTHOLD, A. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tu57. **Journal of Bacteriology**, vol. 179, 6271-6278, 1997.

GAO, S.-S.; LI, X.-M.; ZHANG, Y.; LI, C.-S.; CUI, C.-M.; WANG, B.-G. Comazaphilones A-F, Azaphilone Derivatives from the Marine Sediment-Derived Fungus *Penicillium commune* QSD-17. **Journal of Natural Products**, vol. 74, 256-261, 2011.

GAUCHER, G. M.; SHEPHERD, M. G. Isolation of orsellinic acid synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 32, 664-671, 1968.

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

GRAYER, R. E. J.; CHASE, M. W.; SIMMONDS, M. S. J. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's Chemotaxonomie der Pflanzen. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 27, 369-393, 1999.

GREEN, C. O.; WHEATLEY, A. O.; OSAGIE, A. U.; DILWORTH, L. L.; MORRISON, E. Y. S. A.; ASEMOTA, H. N. Characterization of Health-Promoting Polymethoxylated Flavones from Jamaican and Mexican Citrus Peels. **II International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables: Favhealth 2007**, vol. 841, 511-514, 2009.

GREGER, H.; HOFER, O. New unsymmetrically substituted tetrahydrofurofuran lignans from *Artemisia-absinthium* - assignment of the relative stereochemistry by lanthanide induced chemical-shifts. **Tetrahedron**, vol. 36, 3551-3558, 1980.

GRIEG, N. In: KLUWER.editor. New York: 2004. p. 1-4.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, vol. 69, 509-526, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol. 44, 136-142, 2008.

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

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; OTSUKA, H.; TAKEDA, Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 39, 821-824, 1997.

HELLWIG, V.; NOPPER, R.; MAULER, F.; FREITAG, J.; LIU, J. K.; DING, Z. H.; STADLER, M. Activities of prenylphenol derivatives from fruitbodies of *Albatrellus* spp. on the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1) and characterisation of the novel natural product confluentin. **Archiv Der Pharmazie**, vol. 336, 119-126, 2003.

HILL, A. M. The biosynthesis, molecular genetics and enzymology of the polyketide-derived metabolites. **Natural Product Reports**, vol. 23, 256-320, 2006.

HILU, K. W.; BORSCH, T.; MULLER, K.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; SAVOLAINEN, V.; CHASE, M. W.; POWELL, M. P.; ALICE, L. A.; EVANS, R.; SAUQUET, H.; NEINHUIS, C.; SLOTTA, T. A. B.; ROHWER, J. G.; CAMPBELL, C. S.; CHATROU, L. W. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. **American Journal of Botany**, vol. 90, 1758-1776, 2003.

HOLMES, E.; TANG, H. R.; WANG, Y. L.; SEGER, C. The assessment of plant metabolite profiles by NMR-based methodologies. **Planta Medica**, vol. 72, 771-785, 2006.

HUR, M.; CAMPBELL, A. A.; ALMEIDA-DE-MACEDO, M.; LI, L.; RANSOM, N.; JOSE, A.; CRISPIN, M.; NIKOLAUH, B. J.; WURTELE, E. S. A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery. **Natural Product Reports**, vol. 30, 565-583, 2013.

ISHII, N.; TAKAHASHI, A.; KUSANO, G.; NOZOE, S. Studies on the constituents of *Polyporus-dispansus* and *Polyporus-confluens*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 36, 2918-2924, 1988.

IVANISEVIC, J.; THOMAS, O. P.; LEJEUSNE, C.; CHEVALDONNE, P.; PEREZ, T. Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges. **Metabolomics**, vol. 7, 289-304, 2011.

IWATA, N.; KITANAKA, S. New Cannabinoid-Like Chromane and Chromene Derivatives from *Rhododendron anthopogonoides*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 59, 1409-1412, 2011.

IWATA, N.; KITANAKA, S. Tetracyclic Chromane Derivatives from *Rhododendron anthopogonoides*. **Journal of Natural Products**, vol. 73, 1203-1206, 2010.

IWATA, N.; WANG, N. L.; YAO, X. S.; KITANAKA, S. Structures and histamine release inhibitory effects of prenylated orcinol derivatives from *Rhododendron dauricum*. **Journal of Natural Products**, vol. 67, 1106-1109, 2004.

JIANG, H.; XIE, Z.; KOO, H. J.; MCLAUGHLIN, S. P.; TIMMERMANN, B. N.; GANG, D. R. Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber species*: Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Phytochemistry**, vol. 67, 1673-1685, 2006.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, vol. 24, 1403-1405, 2008.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **Bmc Genetics**, vol. 11, 2010.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, vol. 28, 1208-1228, 2011.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, vol. 5, 536-549, 2010.

KUMAR, N. S.; HERATH, H. M. T. B.; KARUNARATNE, V. Arylalkanones from *Myristica dactyloides*. **Phytochemistry**, vol. 27, 465-468, 1988.

KUSARI, S.; VERMA, V. C.; LAMSHOEFT, M.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, vol. 28, 1287-1294, 2012.

LAGO, J. H. G.; DE OLIVEIRA, A.; GUIMARAES, E. F.; KATO, M. J. 3-ishwarone and 3-ishwarol, rare sesquiterpenes in essential oil from leaves of *Peperomia oreophila* hensch. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 18, 638-642, 2007.

LEO LIRA, P. F., Y; VAN BAREN, C; BANDONI, A; COUSSIO, J AND DE ABRAM A. Composition of the essential oil of two *Peperomia* from Peru: *P. galioides* and *P. Chalhuapuquiana*. **Revista Latinoamericana de Química**, vol. 1-2, 7-12, 2007.

LI CHEN, Y. Z., YI-LONG ZHOU, JUN-XING DONG. A new C-glycosylflavone from *Peperomia dindygulensis*. **China journal of Chinese materia medica** vol. 33, 772-774, 2008.

LI CHEN, Z. Y., DONG JX. Three new flavonoid glycosides from *Peperomia dindygulensis*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, vol. 42, 183-186, 2007.

LI, N.; WU, J.-L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.-I.; BAI, L.-M.; WANG, L.-Y.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, vol. 70, 544-548, 2007.

LI, N.; WU, J.-L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.-I.; BAI, L.-M.; WANG, L.-Y.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, vol. 70, 998-1001, 2007.

LI, N.; WU, J. L.; SAKAI, J.; ANDO, M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, vol. 66, 1421-1426, 2003.

LI, N. W., J.-L.; XU, S.; ZHANG, G.-L.; ANDO, M.; WANG, M.-W. In: GOVIL, J. N. S., V. K.; MISHRA, S. K. editor. **Phytopharmacology and therapeutic values II 2008 pp. 419-431**. 2008. vol. 20.

LI, Y.-Z.; HUANG, J.; GONG, Z.; TIAN, X.-Q. A novel norlignan and a novel phenylpropanoid from *Peperomia tetraphylla*. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 90, 2222-2226, 2007.

LI, Y.-Z.; PENG, D.-Y.; DAI, M.; XIAO, C.-M.; JIANG, H.-B.; HUANG, J. A new phenylpropanoid from *Peperomia tetraphylla*. **Natural Product Research**, vol. 27, 837-840, 2013.

LI, Y.-Z.; TONG, A.-P.; HUANG, J. Two New Norlignans and a New Lignanamide from *Peperomia tetraphylla*. **Chemistry & Biodiversity**, vol. 9, 769-776, 2012.

LI, Y. H., JING. In: **Zhongcaoyao: Chinese Traditional and Herbal Drugs**. 2011 vol. 42 Issue9, p. 1699-1701.

LIMA, A. M. D.; SALEM, J. L. I.; SOUZA, J. O. V. B. D.; CORTEZ, A. C. A.; CARVALHO, C. M.; CHAVES, F. C. L. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. N. D. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 14, 8-8,

2011.

LIN, M.-G.; YU, D.-H.; WANG, Q.-W.; LU, Q.; ZHU, W.-J.; BAI, F.; LI, G.-X.; WANG, X.-W.; YANG, Y.-F.; QIN, X.-M.; FANG, C.; CHEN, H.-Z.; YANG, G.-H. Secolignans with Antiangiogenic Activities from *Peperomia dindygulensis*. **Chemistry & Biodiversity**, vol. 8, 862-871, 2011.

LIN, X.; HUANG, Y. J.; ZHENG, Z. H.; SU, W. J.; QIAN, X. M.; SHEN, Y. M. Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity, identification and diversity of its polyketide synthase gene. **Fungal Diversity**, vol. 41, 41-51, 2010.

LOPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA, J. M., JR.; FLAUSINO, O., JR.; BOLZANI, V. D. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, vol. 101, 4251-4260, 2010.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; BARRIOS, A. A.; FOURNET, A.; DUCROT, P. H. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **Journal of Natural Products-Lloydia**, vol. 58, 324-328, 1995.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; DEARIAS, A. R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. **Journal of Natural Products**, vol. 59, 694-697, 1996.

MALQUICHAGUA SALAZAR, K. J. Estudo químico e biossintético de peperomias. 2009. 179 f. **Doutorado (Doctorate) - Instituto de Química Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.

MANALO, J. B. H., BYUNG HOON; HAN, YONG NAM; PARK, MYUNG HWAN; ANZALDO, FELICIDAD E. Studies on ether-soluble neutral compounds of *Peperomia pellucida*. **Archives of Pharmacal Research**, vol. 6, 133-136, 1983.

MÁRCIO ELIAS FERREIRA, D. G. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: **Embrapa**; 1996. p.

MATHAN, S., SUBRAMANIAN, V. AND NAGAMONY, S. Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. **European Journal of Experimental Biology**, vol. 3, 138-144, 2013.

MBAH, J. A.; NGEMENYA, M. N.; ABAWAH, A. L.; BABIAKA, S. B.; NUBED, L. N.; NYONGBELA, K. D.; LEMUH, N. D.; EFANGE, S. M. N. Bioassay-guided discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoioana* and *Scleria striatinux*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, vol. 11, 2012.

MBAH, J. A.; TCHUENDEM, M. H. K.; TANE, P.; STERNER, O. Two chromones

from *Peperomia vulcanica*. **Phytochemistry**, vol. 60, 799-801, 2002.

MEJIA, L. C.; HERRE, E. A.; SPARKS, J. P.; WINTER, K.; GARCIA, M. N.; VAN BAEL, S. A.; STITT, J.; SHI, Z.; ZHANG, Y.; GUILTINAN, M. J.; MAXIMOVA, S. N. Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. **Frontiers in Microbiology**, vol. 5, 2014.

MIQUEL, F. A. G. *Systema Piperacearum*. Rotterdam: 1843 -1844. p.

MISIEK, M.; WILLIAMS, J.; SCHMICH, K.; HUETTEL, W.; MERFORT, I.; SALOMON, C. E.; ALDRICH, C. C.; HOFFMEISTER, D. Structure and Cytotoxicity of Arnarnial and Related Fungal Sesquiterpene Aryl Esters. **Journal of Natural Products**, vol. 72, 1888-1891, 2009.

MOREIRA, D. L.; DE SOUZA, P. O.; KAPLAN, M. A. C.; GUIMARAES, E. F. In: CAFFINI, N.; BERNATH, J.; CRAKER, L.; JATISATIENR, A.; GILBERTI, G. editor. **Proceedings of the 2nd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants**. 1999. p. 65-69.

MOTA, J. D. S.; LEITE, A. C.; BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPEZ, S. N.; AMBROSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; BARRETTO CICARELLI, R. M.; FURLAN, M. In vitro Trypanocidal Activity of Phenolic Derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, vol. 75, 620-623, 2009.

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

NAKABAYASHI, R.; SAITO, K. Metabolomics for unknown plant metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 405, 5005-5011, 2013.

NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. 2011.

NELSON, G. P., NI. Systematics and biogeography: cladistics and vicariance. New York: Columbia University Press; 1981. p.

NICHOLSON, T. P.; RUDD, B. A. M.; DAWSON, M.; LAZARUS, C. M.; SIMPSON, T. J.; COX, R. J. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. **Chemistry & Biology**, vol. 8, 157-178, 2001.

NYLANDER, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author., Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

OGUNWANDE, I. A.; OGUNBINU, A. O.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; OKENIYI, S. O. Essential Oil Profiles of Some Nigerian Medicinal Plants. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, vol. 12, 225-235, 2009.

OLIVEIRA, C. M.; REGASINI, L. O.; SILVA, G. H.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; BERLINCK, R. G. S.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry Letters**, vol. 4, 93-96, 2011.

OLOYEDE, G. K. Chemical composition, toxicity, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Peperomia pellucida* (Piperaceae) from Nigeria. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, vol. 4, 143-148, 2010.

ORLANDELLI, R. C.; ALBERTO, R. N.; RUBIN FILHO, C. J.; PAMPHILE, J. A. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. **Genetics and Molecular Research**, vol. 11, 1575-1585, 2012.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; ORESIC, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **Bmc Bioinformatics**, vol. 11.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, vol. 68, 1717-1719, 2005.

PURUSHOTHAMAN, K. K.; SARADA, A.; CONNOLLY, J. D. Malabaricones A-D, novel diarylnonanooids from *Myristica-malabarica* Lam (Myristicaceae). **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, vol., 587-588, 1977.

PUTRI, S. P.; NAKAYAMA, Y.; MATSUDA, F.; UCHIKATA, T.; KOBAYASHI, S.; MATSUBARA, A.; FUKUSAKI, E. Current metabolomics: Practical applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 115, 579-589, 2013.

QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, vol. 33, 1266-1278, 2006.

RADHAKRISHNAN, E. K.; VARGHESE, R. T.; VASUDEVAN, S. E. Unusual intron in the second exon of a Type III polyketide synthase gene of *Alpinia calcarata* Rosc. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 33, 141-145, 2010.

REYNOLDS, T. The evolution of chemosystematics. **Phytochemistry**, vol. 68, 2887-2895, 2007.

RIDLEY, H. **The Dispersal of Plants Throughout the World**. Ashford, Kent: L. Reeve & Company; 1930. p.

ROBAYO-GAMA, P. A.; QUIJANO, C. E.; MORALES, G.; PINO, J. A. Composition of the Essential Oil From Leaves of *Peperomia galioides* HBK Grown in Colombia. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 22, 307-309, 2010.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, vol. 59, 1109-1114, 2008.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, vol. 61, 539-542, 2011.

SAHA, M. A. J., AND J. M. JOHNSON-CICALESE. A Rapid Staining Method for Detection of Endophytic Fungi in Turf and Forage Grasses. **Phytopathology**, vol. 78, 237-9, 1988.

SALAZAR, K. J. M.; LAGO, J. H. G.; GUIMARAES, E. F.; KATO, M. J. Meroterpenes from *Peperomia oreophila* Hensch and *Peperomia arifolia* Miq. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 23, 782-785, 2012.

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

SAMAIN, M.-S.; MATHIEU, G.; PINO, G.; SYMMANK, L.; CIEZA, N.; NEINHUIS, C.; GOETGHEBEUR, P.; WANKE, S. The geophytic *Peperomia* subgenus *Tildenia* (Piperaceae) in the Andes with the description of new species in a phylogenetic framework. **Plant Ecology and Evolution**, vol. 144, 148-176, 2011.

SAMAIN, M.-S.; VANDERSCHAEVE, L.; CHAERLE, P.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. Is morphology telling the truth about the evolution of the species rich genus *Peperomia* (Piperaceae)? **Plant Systematics and Evolution**, vol. 278, 1-21, 2009.

SAMAIN, M.-S.; VANDERSCHAEVE, L.; CHAERLE, P.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. Is morphology telling the truth about the evolution of the species rich genus *Peperomia* (Piperaceae)? (vol 278, pg 1, 2009). **Plant Systematics and Evolution**, vol. 280, 251-254, 2009.

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

SANCHEZ, J. F.; CHIANG, Y.-M.; SZEWCZYK, E.; DAVIDSON, A. D.; AHUJA, M.; OAKLEY, C. E.; BOK, J. W.; KELLER, N.; OAKLEY, B. R.; WANG, C. C. C. Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **Molecular Biosystems**, vol. 6, 587-593.

SANCHEZ, J. F.; CHIANG, Y.-M.; SZEWCZYK, E.; DAVIDSON, A. D.; AHUJA, M.;

OAKLEY, C. E.; BOK, J. W.; KELLER, N.; OAKLEY, B. R.; WANG, C. C. C. Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **Molecular Biosystems**, vol. 6, 587-593, 2010.

SCHLORKE, O.; ZEECK, A. Orsellides A-E: An example for 6-deoxyhexose derivatives produced by fungi. **European Journal of Organic Chemistry**, vol., 1043-1049, 2006.

SCHRODER, J. A family of plant-specific polyketide synthases: Facts and predictions. **Trends in Plant Science**, vol. 2, 373-378, 1997.

SEERAM, N. P.; LEWIS, A. W.; JACOBS, H.; NAIR, M. G.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Proctoriones A-C: 2-acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii*. **Journal of Natural Products**, vol. 63, 399-402, 2000.

SHANKAR, N. A. S., J. Diversity and structure of fungal endophytes in some climbers and grass species of Malnad Region, Western Ghats, Southern India. **Mycosphere**, vol. 1, 265-274, 2010.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 7, 285-295, 2003.

SILVA, G. H.; DE OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; COSTA-NETO, C. M.; PFENNING, L. H.; BERLINCK, R. G. S.; ARAUJO, A. R. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, vol. 3, 164-167, 2010.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M. D.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. D. S.; ARAUJO, A. R.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; COSTA-NETO, C. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (piperaceae). **Química Nova**, vol. 33, 2038-2041, 2010.

SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J.; DAVIDSON, C. Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, vol. 275, 9-30, 2008.

SONNENBICHLER, J.; GUILLAUMIN, J. J.; PEIPP, H.; SCHWARZ, D. Secondary metabolites from dual cultures of genetically different *Armillaria* isolates. **European Journal of Forest Pathology**, vol. 27, 241-249, 1997.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, vol. 18, 380-416, 2001.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces-andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, vol. 260, 214-

216, 1993.

STIERLE, A. A.; STIERLE, D. B.; GIRTSMAN, T. Caspase-1 Inhibitors from an Extremophilic Fungus That Target Specific Leukemia Cell Lines. **Journal of Natural Products**, vol. 75, 344-350, 2012.

STONE, J. K. P. J. D., AND WHITE, JR. JAMES F. In: PRESS, A. editor. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. **Gerald F. Bills**. 2011.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, vol. 67, 257-268, 2004.

SUMNER, L. W.; LEI, Z.; NIKOLAU, B. J.; SAITO, K. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. **Natural Product Reports**, vol. 32, 212-229, 2015.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, vol. 62, 817-836, 2003.

SWOFFORD, D. L. (2003). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland, Massachusetts., Sinauer Associates.

TAMURA K, P. D., PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods., **Molecular Biology and Evolution**.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, vol. 28, 2731-2739, 2011.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, vol. 18, 448-459, 2001.

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

TATONG, M. D. K.; TALONTSI, F. M.; RAHIM, H.; ISLAM, M. T.; OSWALD, R. B.; LAATSCH, H. Banchromene and other secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium sp* obtained from *Piper guineense* inhibit the motility of phytopathogenic *Plasmopara viticola* zoospores. **Tetrahedron Letters**, vol. 55, 4057-4061, 2014.

TAURA, F.; TANAKA, S.; TAGUCHI, C.; FUKAMIZU, T.; TANAKA, H.; SHOYAMA, Y.; MORIMOTO, S. Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. **Febs Letters**, vol. 583, 2061-2066, 2009.

TROPF, S.; LANZ, T.; RENSING, S. A.; SCHRODER, J.; SCHRODER, G. Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, vol. 38, 610-618, 1994.

TSAI, I.-L.; LEE, F.-P.; WU, C.-C.; DUH, C.-Y.; ISHIKAWA, T.; CHEN, J.-J.; CHEN, Y.-C.; SEKI, H.; CHEN, I.-S. New Cytotoxic Cyclobutanoid Amides, a New Furanoid Lignan and Anti-Platelet Aggregation Constituents from *Piper arborescens*. **Planta Med**, vol. 71, 535-542, 2005.

URICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H.; WAGNER, H. Application of the "-omic-" technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**, vol. 14, 70-82, 2007.

VALARMATHI, R.; HARIHARAN, G. N.; VENKATARAMAN, G.; PARIDA, A. Characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from lichen *Dirinaria applanata*. **Phytochemistry**, vol. 70, 721-729, 2009.

VALDEBENITO, H. A.; STUESSY, T. F.; CRAWFORD, D. J. A new biogeographic connection between islands in the atlantic and pacific oceans. **Nature**, vol. 347, 549-550, 1990.

VAZ, A. B. M.; MOTA, R. C.; BOMFIM, M. R. Q.; VIEIRA, M. L. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 55, 1381-1391, 2009.

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

VERMA, V. C.; GANGWAR, M.; NATH, G. Osmoregulatory and tegumental ultrastructural damages to protoscoleces of hydatid cysts *Echinococcus granulosus* induced by fungal endophytes. **Journal of Parasitic Diseases**, vol. 38, 432-439, 2014.

VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. A. Chemical and Functional Diversity of Natural Products from Plant Associated Endophytic Fungi. **Natural Product Communications**, vol. 4, 1511-1532, 2009.

VERMA, V. C.; LOBKOVSKY, E.; GANGE, A. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. Piperine production by endophytic fungus *Periconia sp.* Isolated from *Piper longum* L. **J Antibiot**, vol. 64, 427-431, 2011.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.; MUSTAFA, N.; KIM, H. Metabolomics: back to basics. **Phytochemistry Reviews**, vol. 7, 525-537, 2008.

WANG, H.; WANG, Y.; WANG, W.; FU, P.; LIU, P.; ZHU, W. Anti-influenza Virus polyketides from the Acid-Tolerant Fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21. **Journal of Natural Products**, vol. 74, 2014-2018, 2011.

WANG, Q.-W.; YU, D.-H.; LIN, M.-G.; ZHAO, M.; ZHU, W.-J.; LU, Q.; LI, G.-X.; WANG, C.; YANG, Y.-F.; QIN, X.-M.; FANG, C.; CHEN, H.-Z.; YANG, G.-H. Antiangiogenic polyketides from *Peperomia dindygulensis* Miq. **Molecules**, vol. 17, 4474-4483, 2012.

WANG, X.-Z.; LIANG, J.-Y.; WEN, H.-M.; SHAN, C.-X.; LIU, R. Simultaneous determination of five bioactive secolignans in rat plasma by LC-MS/MS for pharmacokinetic studies following oral administration of *Peperomia dindygulensis* Miq. extract. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, vol. 944, 82-89, 2014.

WANG, X.-Z.; QU, W.; LIANG, J.-Y. Two N-containing polyketide derivatives from *Peperomia dindygulensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 48, 1027-1030, 2013.

WANG, X.; QU, W.; LIANG, J. New long-chain aliphatic compounds from *Peperomia dindygulensis*. **Natural Product Research**, vol. 27, 796-803, 2013.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M.-S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales - *matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, vol. 42, 477-497, 2007.

WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the *trnK/matK* region (cpDNA). **Plant Biology**, vol. 8, 93-102, 2006.

WATANABE, K.; PRASEUTH, A. P.; WANG, C. C. C. A comprehensive and engaging overview of the type III family of polyketide synthases. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 11, 279-286, 2007.

WATERMAN, P. G. The current status of chemical systematics. **Phytochemistry**, vol. 68, 2896-2903, 2007.

WHITE T J, B. T., LEE S, TAYLOR J W. . In: INNIS M A, G. D. H., SNINSKY J J, WHITE T J, editor. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, N.Y: **Academic Press**, Inc.; 1990. p. 315–322.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular

phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, vol. 64, 3-19, 2003.

WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; KAKUTA, S.; TANG, W. X.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, vol. 68, 1656-1660, 2005.

WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; MITSUI, T.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; OKA, S.; KIUCHI, M.; TOMIDA, A.; TURUO, T.; LI, M. J.; TANG, W. X.; ANDO, M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, vol. 69, 790-794, 2006.

XU, G.-B.; WANG, N.-N.; BAO, J.-K.; YANG, T.; LI, G.-Y. New orsellinic acid esters from fungus *Chaetomium globosporum*. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 97, 151-159, 2014.

XU, S.; LI, N.; NING, M. M.; ZHOU, C. H.; YANG, Q. R.; WANG, M. W. Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. **Journal of Natural Products**, vol. 69, 247-250, 2006.

YU, D.; XU, F.; ZENG, J.; ZHAN, J. Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. **lubmb Life**, vol. 64, 285-295, 2012.

ZHANG, G.-L.; LI, N.; WANG, Y.-H.; ZHENG, Y.-T.; ZHANG, Z.; WANG, M.-W. Bioactive lignans from *Peperomia heyneana*. **Journal of Natural Products**, vol. 70, 662-664, 2007.

ZHANG, S. Z.; YANG, X. N.; COBURN, R. A.; MORRIS, M. E. Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. **Biochemical Pharmacology**, vol. 70, 627-639, 2005.

ZHAO, J.; LI, C.; WANG, W.; ZHAO, C.; LUO, M.; MU, F.; FU, Y.; ZU, Y.; YAO, M. *Hypocrea lixii*, novel endophytic fungi producing anticancer agent cajanol, isolated from pigeon pea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp.). **Journal of Applied Microbiology**, vol. 115, 102-113, 2013.

ZHU, W. L., MENGGAN; YANG, GUOHONG; WANG, QIWEI; YANG, YIFANG. Structure identification of two polyketide isomers in ethanol extract from *Peperomia dindygulensis* Miq. **Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi**, vol. 42, 504 - 507, 2011.

ZHU, W. L., MENGGAN; YANG, GUOHONG; WANG, QIWEI; YANG, YIFANG. Two novel polyketides from *Peperomia dindygulensis*. **Zhongcaoyao**, vol. 42, 420 - 423, 2011.

ZHU, Y. H.; LI, N.; WANG, M.-W. A new lignan glycoside from *Peperomia duclouxii*. **Natural Product Research**, vol. 22, 1483-1486, 2008.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; LOBATO, R. C. L.; TAVARES, A. C. C.; SOUZA, A. P. S.; CONCEICAO, C. C. C.; GUIMARAES, E. F. *Peperomia circinnata* Link and *Peperomia rotundifolia* (L.) Kunth growing on different host-trees in Amazon: volatiles and relationship with bryophytes. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 33, 269-274, 2005.

7 ANEXOS

CONTEÚDO DOS ANEXOS

ANEXO 1 Metabólitos secundários de espécies de *Peperomia*: a) fenilpropanoides; b) lignanas tetraidrofurânicas; c) secolignanas; d) lignanas furofurânicas; e) neolignanas; f) lignanas; g) flavonoides; h) policetídeos; i) policetídeos prenilados; j) cromenos; k) amidas; l) outros.....185

1.1 GRUPO A. Fenilpropanoides	185
1.2 GRUPO B. Lignanas tetraidrofurânicas	187
1.3 GRUPO C. Secolignanas	188
1.4 GRUPO D. Lignanas furofurânicas	190
1.5 GRUPO E. Lignanas	191
1.6 GRUPO F. Norlignanas	192
1.7 GRUPO G. Flavonoides.....	193
1.8 GRUPO H. Policetídeos	195
1.9 GRUPO I. Policetídeos prenilados.....	198
1.10 GRUPO J. Cromenos.....	199
1.11 GRUPO K. Amidas.....	201
1.12 GRUPO L. outros.....	203

ANEXO 2. Propriedades biológicas, óleos essenciais e compostos isolados de espécies de *Peperomia*.....204

ANEXO 3: Espectros de RMN ^1H das substâncias isoladas.....221

3.1. RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) substância 1 isolada de <i>P. megapotamica</i>	221
3.2. RMN de ^{13}C (CDCl_3) da substância 1 isolada de <i>P. megapotamica</i>	222
3.3 COSY (CDCl_3) substância 1 isolada de <i>P. megapotamica</i>	223
3.4 HSQC (CDCl_3) substância 1 isolada de <i>P. megapotamica</i>	224
3.5 HMBC (CDCl_3) substância 1 isolada de <i>P. megapotamica</i>	225
3.6 RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) substância 2 isolada de <i>P. rotundifolia</i>	226
3.7 RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) substância 3 isolada de <i>P. rotundifolia</i>	227
3.8 RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) substância 4 isolada de <i>P. sincorana</i>	228
3.9 RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) substância 5 isolada de <i>P. sincorana</i>	228

ANEXO 4: Árvores filogenéticas.....229

4.1 Árvore mais parcimoniosa de espécies de <i>Peperomia</i> com dados ITS.	229
4.2 Inferência Bayesiana obtida com dados da região ITS para espécies de <i>Peperomia</i>	230
4.3 Árvore mais parcimoniosa obtida com dados do gene matK de espécies de <i>Peperomia</i> .231	
4.4 Árvore de inferência Bayesiana obtida com dados do gene matK de espécies de <i>Peperomia</i>	232
4.5 Árvore Máxima verossimilhança (ML) com dados de ITS e matK de espécies de <i>Peperomia</i>	233
4.6 Árvore de Inferência Bayesiana do gene CHS em <i>Peperomia</i>	234

ANEXO 5. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos de *Peperomia*.....235

5.1 <i>P. alata</i>	235
5.2 <i>P. arifolia</i>	236
5.3 <i>P. blanda</i>	237
5.4 <i>P. corcovadensis</i>	238
5.5 <i>P. galioides</i>	239
5.6 <i>P. glabella</i>	240
5.7 <i>P. glabella</i> var. <i>nervulosa</i>	241
5.8 <i>P. hilariana</i>	242
5.9 <i>P. hispidula</i>	243
5.10 <i>P. incana</i>	244
5.11 <i>P. megapotamica</i>	245
5.12 <i>P. nitida</i>	246
5.13 <i>P. obtusifolia</i>	247
5.14 <i>P. oreophila</i>	248
5.15 <i>P. pellucida</i>	249
5.16 <i>P. pseudoestrellensis</i>	250
5.17 <i>P. rhombea</i>	251
5.18 <i>P. rotundifolia</i>	252
5.19 <i>P. sandersii</i>	253
5.20 <i>P. serpens</i>	254
5.21 <i>P. sincorana</i>	255
5.22 <i>P. sp.</i> (K-1064)	256
5.23 <i>P. subrubripica</i>	257
5.24 <i>P. tetraphylla</i>	258
5.25 <i>P. transperens</i>	259
5.26 <i>P. trineura</i>	260
5.27 <i>P. urocarpa</i>	261
REFERÊNCIAS DE ANEXOS.....	262

ANEXO 1 Metabólitos secundários de espécies de *Peperomia*: a) fenilpropanoides; b) lignanas tetraidrofurânicas; c) secolignanas; d) lignanas furofurânicas; e) neolignanas; f) lignanas; g) flavonoides; h) policetídeos; i) policetídeos prenilados; j) cromenos; k) amidas; l) outros.

1.1 GRUPO A. Fenilpropanoides

A17

miristicina

 $C_{11}H_{12}O_3$
 Exact Mass: 192,0786
P. villipetiola, P. camplyotropa **A18**ácido *E*-ferúlico
 $C_{10}H_{10}O_4$
 Exact Mass: 194,0579
P. duclouxii **A19**

alfa-asarona

 $C_{12}H_{16}O_3$
 Exact Mass: 208,1099
P. tetraphylla **A20**

dillapiol

 $C_{12}H_{14}O_4$
 Exact Mass: 222,0892
P. pellucida **A21**

apiol

 $C_{12}H_{14}O_4$
 Exact Mass: 222,0892
P. nitida, P. pellucida **A22**

isofraxadina

 $C_{11}H_{10}O_5$
 Exact Mass: 222,0528
P. sui **A23**
 $C_{12}H_{12}O_5$
 Exact Mass: 236,0685
P. tetraphylla, P. oreophila **A24**
 $C_{13}H_{16}O_5$
 Exact Mass: 252,0998
P. oreophila **A25**
 $C_{13}H_{16}O_5$
 Exact Mass: 252,0998
P. oreophila **A26**
 $C_{14}H_{16}O_7$
 Exact Mass: 296,0896
P. tetraphylla
atividade anticancerígena **A27**

dindygulensina

 $C_{17}H_{14}O_7$
 Exact Mass: 330,074
P. dindygulensis **A28**
 $C_{19}H_{18}O_{11}$
 Exact Mass: 422,0849
P. pellucida
atividade bactericida

$C_{22}H_{24}O_7$
Exact Mass: 400,1522

B1

P. blanda
atividade tripanocida

$C_{22}H_{26}O_7$
Exact Mass: 402,1679

B2

P. blanda
atividade tripanocida

$C_{23}H_{28}O_7$
Exact Mass: 416,1835

B3

P. blanda
atividade tripanocida

$C_{23}H_{30}O_7$
Exact Mass: 418,1992

B4

P. blanda
atividade tripanocida

$C_{23}H_{28}O_8$
Exact Mass: 432,1784

B5

P. blanda
atividade tripanocida

$C_{24}H_{26}O_{10}$
Exact Mass: 474,1526

B6

P. pellucida, P. dindygulensis
atividade estrogênica

$C_{24}H_{26}O_{10}$
Exact Mass: 474,1526

B7

P. dindygulensis

$C_{24}H_{26}O_{10}$
Exact Mass: 474,1526

B8

P. dindygulensis
atividade anti-cancerígena

$C_{24}H_{28}O_{10}$
Exact Mass: 476,1682

B9

P. pellucida, P. heyneana
baixa atividade anti HIV-1

$C_{24}H_{28}O_{10}$
Exact Mass: 476,1682

B10

P. heyneana

$C_{25}H_{30}O_{10}$
Exact Mass: 490,1839

B11

P. dindygulensis

$C_{26}H_{30}O_{11}$
Exact Mass: 518,1788

B12

P. pellucida, P. dindygulensis
atividade anti-cancerígena

$C_{26}H_{32}O_{11}$
Exact Mass: 520,1945

B13

P. pellucida

1.2 GRUPO B. Lignan tetraidrofurânicas

$C_{20}H_{16}O_6$
Exact Mass: 352,0947

P. glabella var. *nervulosa*
forte atividade fungicida

peperomina D
 $C_{20}H_{16}O_6$
Exact Mass: 354,1103
P. glabella var. *nervulosa*
forte atividade fungicida

peperomina H
 $C_{21}H_{20}O_8$
Exact Mass: 400,1158
P. dindygulensis

peperomina E
 $C_{22}H_{20}O_8$
Exact Mass: 412,1158
P. dindygulensis, *P. sui*
P. glabella var. *nerv. pellucida*
atividade fungicida

peperomina A
 $C_{22}H_{22}O_8$
Exact Mass: 414,1315
P. dindygulensis, *P. sui*
P. heyneana, *P. japonica*
P. glabella var. *nerv. P. pellucida*

**atividade fungicida / atividade MDR
anti-cancerígeno / anti-inflamatório
atividade anti HIV-1 moderada**

$C_{22}H_{22}O_8$
Exact Mass: 414,1315
P. blanda

$C_{22}H_{22}O_8$
Exact Mass: 414,1315
P. dindygulensis
P. heyneana
**anti-cancerígeno / atividade
inibitória na indução de ICAM-1**

$C_{22}H_{24}O_8$
Exact Mass: 416,1471
P. dindygulensis

4"-hidroxipeperomina B
 $C_{22}H_{24}O_8$
Exact Mass: 416,1471
P. dindygulensis

$C_{22}H_{24}O_8$
Exact Mass: 416,1471
P. heyneana

$C_{22}H_{24}O_8$
Exact Mass: 416,1471
P. pellucida, *P. dindygulensis*
atividade anti-cancerígena fraca

$C_{22}H_{26}O_8$
Exact Mass: 418,1628
P. heyneana

1.3 GRUPO C. Secolignan

C13

$C_{23}H_{24}O_8$
Exact Mass: 428,1471

P. pellucida

atividade anti-cancerígena

C14

$C_{22}H_{22}O_9$
Exact Mass: 430,1264

P. dindygulensis

C15

$C_{23}H_{26}O_8$
Exact Mass: 430,1628

P. blanda

C16

peperomina B
 $C_{23}H_{26}O_8$
Exact Mass: 430,1628
P. dindygulensis, heyneana, P. sui, P. japonica P. pellucida, P. blanda

**atividade anti-cancerígena
atividade antiogénica
atividade anti HIV-1 moderada**

C17

4"-hidroxipeperomina C

$C_{23}H_{28}O_8$
Exact Mass: 432,1784

P. heyneana, P. dindygulensis

**atividade inibitória na
indução de ICAM-1**

C18

$C_{23}H_{28}O_8$
Exact Mass: 432,1784

*P. dindygulensis
P. heyneana*

**atividade anti HIV-1 baixa
atividade inibitória na
indução de ICAM-1**

C19

peperomina C

$C_{24}H_{30}O_8$
Exact Mass: 446,1941

P. dindygulensis, P. sui, P. heyneana, P. japonica P. pellucida

**atividade anti HIV-1 baixa
atividade MDR**

C20

$C_{23}H_{26}O_9$
Exact Mass: 446,1577

P. dindygulensis

atividade MDR

C21

$C_{24}H_{26}O_{10}$
Exact Mass: 474,1526

*P. heyneana
P. dindygulensis*

atividade anti-cancerígena

C22

peperomina F

$C_{24}H_{26}O_{10}$
Exact Mass: 474,1526

P. dindygulensis e heyneana

C23

$C_{25}H_{30}O_{10}$
Exact Mass: 490,1839

P. heyneana

C24

peperomina G

$C_{22}H_{20}O_8$
Exact Mass: 412,1158

P. dindygulensis

Continuação GRUPO C. Secolignanas

1.4 GRUPO D. Lignanas furofurânicas

$C_{22}H_{26}O_7$
Exact Mass: 402,1679
P. pellucida

(+)-hinokinina
 $C_{20}H_{18}O_6$
Exact Mass: 354,1103
P. sui

burseherina
 $C_{21}H_{22}O_6$
Exact Mass: 370,1416
P. fernandopoiana

$C_{21}H_{22}O_7$
Exact Mass: 386,1366
P. duclouxii

$C_{21}H_{22}O_7$
Exact Mass: 386,1366
P. duclouxii

matairesinol di-metil eter
 $C_{22}H_{26}O_6$
Exact Mass: 386,1729
P. vulcanica

kusunokinol
 $C_{22}H_{28}O_6$
Exact Mass: 388,1886
P. vulcanica

$C_{22}H_{22}O_8$
Exact Mass: 414,1315
P. duclouxii

$C_{22}H_{24}O_8$
Exact Mass: 416,1471
P. duclouxii

$C_{23}H_{26}O_8$
Exact Mass: 430,1628
P. duclouxii

$C_{28}H_{34}O_{13}$
Exact Mass: 578,1999
P. duclouxii

$C_{22}H_{24}O_8$
Exact Mass: 416,1471
P. duclouxii

$C_{21}H_{24}O_7$
Exact Mass: 388,1522
P. duclouxii

$C_{24}H_{28}O_9$
Exact Mass: 460,1733
P. duclouxii

$C_{26}H_{32}O_{10}$
Exact Mass: 504,1995
P. duclouxii

$C_{27}H_{34}O_{10}$
Exact Mass: 518,2152
P. duclouxii

$C_{26}H_{30}O_{10}$
Exact Mass: 502,1839
P. duclouxii
atividade anti-inflamatória

1.5 GRUPO E. Lignan

pellucidina A

F1

$C_{22}H_{28}O_6$
Exact Mass: 388,1886

P. pellucida

peperotetrafinina

F2

$C_{22}H_{22}O_8$
Exact Mass: 414,1315

P. tetraphylla **F3**

$C_{23}H_{26}O_8$
Exact Mass: 430,1628

P. tetraphylla **F4**

$C_{23}H_{26}O_8$
Exact Mass: 430,1628

P. tetraphylla

1.6 GRUPO F. Norlignanas

G1

$C_{15}H_{14}O_2$
Exact Mass: 226,0994

P. obtusifolia

G2

$C_{16}H_{14}O_5$
Exact Mass: 286,0841

P. serpens

G3

apigenina
 $C_{15}H_{10}O_5$
Exact Mass: 270,0528

P. pellucida

G4

acetina
 $C_{16}H_{12}O_5$
Exact Mass: 284,0685

P. pellucida

G5

$C_{16}H_{12}O_5$
Exact Mass: 284,0685

P. tetraphylla

G6

5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona
 $C_{17}H_{14}O_5$
Exact Mass: 298,0841
P. dindygulensis, *P. sui*
anti-cancer activity

G7

$C_{17}H_{14}O_6$
Exact Mass: 314,079

P. tetraphylla

G8

5-hidroxi-4',7,8-trimetoxiflavona
 $C_{18}H_{16}O_6$
Exact Mass: 328,0947

P. dindygulensis
P. sui, *P. blanda*

G9

$C_{18}H_{16}O_6$
Exact Mass: 328,0947

P. dindygulensis

G10

5,3-diidroxi-4',7,8-trimetoxiflavona
 $C_{18}H_{16}O_7$
Exact Mass: 344,0896

P. dindygulensis

G11

$C_{18}H_{16}O_7$
Exact Mass: 344,0896

P. dindygulensis

G12

5-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona

$C_{19}H_{18}O_7$
Exact Mass: 358,1053

P. dindygulensis, *P. blanda*, *P. sui*

G13

5-desmetiltangeritina

$C_{19}H_{18}O_7$
Exact Mass: 358,1053

P. vulcanica

G14

pellucidatina
 $C_{19}H_{18}O_8$
Exact Mass: 374,1002

P. pellucida

G15

isovitexina
 $C_{21}H_{20}O_{10}$
Exact Mass: 432,1056

P. pellucida

1.7 GRUPO G. Flavonoides.

$C_{22}H_{22}O_{10}$
Exact Mass: 446,1213

P. pellucida

citisoida
 $C_{22}H_{22}O_{10}$
Exact Mass: 446,1213

P. duclouxii

$C_{23}H_{24}O_{12}$
Exact Mass: 492,1268

P. dindygulensis

$C_{27}H_{30}O_{14}$
Exact Mass: 578,1636

P. blanda

atividade antioxidante moderada

$C_{28}H_{32}O_{14}$
Exact Mass: 592,1792

P. obtusifolia

$C_{28}H_{32}O_{14}$
Exact Mass: 592,1792

P. duclouxii

$C_{27}H_{30}O_{15}$
Exact Mass: 594,1585

P. blanda

atividade antioxidante moderada

$C_{27}H_{30}O_{15}$
Exact Mass: 594,1585

P. dindygulensis

$C_{29}H_{34}O_{14}$
Exact Mass: 606,1949

P. obtusifolia

$C_{28}H_{32}O_{15}$
Exact Mass: 608,1741

P. dindygulensis

$C_{28}H_{32}O_{15}$
Exact Mass: 608,1741

P. dindygulensis

Continuação GROUP G. Flavonoides

1.8 GRUPO H. Policetídeos

$C_{16}H_{16}O_5$
Exact Mass: 288,0998

P. alata

atividade anti-fungica forte

$C_{22}H_{28}O_6$
Exact Mass: 388,1886

P. duclouxii

$C_{24}H_{32}O_6$
Exact Mass: 416,2199

P. dindygulensis,
P. duclouxii

atividade antiangiogênica

$C_{26}H_{36}O_6$
Exact Mass: 444,2512

P. dindygulensis
P. duclouxii

atividade antiangiogênica
atividade anti-inflamatória fraca

$C_{28}H_{40}O_5$
Exact Mass: 456,2876

P. trineura

atividade anti-fungica baixa

surinona A
 $C_{28}H_{40}O_6$
Exact Mass: 472,2825

P. sui, *P. duclouxii*

atividade anti-cancerigena
atividade anti-inflamatória fraca

$C_{30}H_{44}O_5$
Exact Mass: 484,3189

P. trineura

atividade anti-fungica baixa

$C_{24}H_{41}NO_2$
Exact Mass: 375,3137

P. dindygulensis

$C_{24}H_{41}NO_3$
Exact Mass: 391,3086

P. dindygulensis

$C_{32}H_{49}NO_5$
Exact Mass: 527,3611

P. dindygulensis

$C_{10}H_{12}O_4$
Exact Mass: 196,0736

P. glabella

$C_{18}H_{28}O_3$
Exact Mass: 292,2038

P. glabella var. *nervulosa*
atividade anti-fungica

$C_{20}H_{32}O_3$
Exact Mass: 320,2351

P. glabella var. *nervulosa*
atividade anti-fungica

$C_{22}H_{36}O_3$
Exact Mass: 348,2664

P. glabella var. *nervulosa*
atividade anti-fungica

Continuação GRUPO H. Policetídeos

Continuação GRUPO H. Policetídeos

ácido 1,3-benzodioxol-5-pentanoico

$C_{12}H_{14}O_4$
Exact Mass: 222,0892

I1

P. duclouxii

ácido 1,3-benzodioxol-5-nonanoico

$C_{16}H_{22}O_4$
Exact Mass: 278,1518

I2

P. duclouxii

ácido 1,3-benzodioxol-5-tridecanoico

$C_{20}H_{30}O_4$
Exact Mass: 334,2144

I3

P. duclouxii

$C_{22}H_{32}O_2$
Exact Mass: 328,2402

I4

P. galioides, *P. urocarpa*

atividade tripanocida

$C_{22}H_{32}O_2$
Exact Mass: 328,2402

I5

P. oreophila, *P. arifolia*

piperogalina
 $C_{22}H_{32}O_2$
Exact Mass: 328,2402

I6

P. obtusifolia, *P. galioides*

atividade leishmanicida

$C_{23}H_{32}O_4$
Exact Mass: 372,2301

I7

P. galioides, *P. urocarpa*

$C_{22}H_{30}O_3$
Exact Mass: 342,2195

I8

P. galioides

$C_{22}H_{32}O_3$
Exact Mass: 344,2351

I9

P. galioides

atividade leishmanicida

1.9 GRUPO I. Policetídeos prenilados

J1

$C_{14}H_{16}O_4$
Exact Mass: 248,1049

P. serpens
P. villipetiola

J2

$C_{14}H_{16}O_4$
Exact Mass: 248,1049

P. nitida,
P. villipetiola

J3

$C_{13}H_{14}O_5$
Exact Mass: 250,0841

P. villipetiola

J4

$C_{15}H_{18}O_4$
Exact Mass: 262,1205

P. villipetiola

J5

$C_{15}H_{18}O_4$
Exact Mass: 262,1205

P. villipetiola
P. nitida

J6

$C_{14}H_{16}O_5$
Exact Mass: 264,0998

P. villipetiola

atividade anti-fungica

J7

$C_{18}H_{22}O_3$
Exact Mass: 286,1569

P. blanda

J8

$C_{18}H_{22}O_3$
Exact Mass: 286,1569

P. blanda

J9

$C_{18}H_{22}O_4$
Exact Mass: 302,1518

P. serpens

J10

$C_{16}H_{18}O_6$
Exact Mass: 306,1103

P. villipetiola

atividade anti-fungica moderada

J11

$C_{22}H_{30}O_2$
Exact Mass: 326,2246

P. serpens, *P. oreophila*

J12

$C_{22}H_{28}O_3$
Exact Mass: 340,2038

P. galioides

J13

$C_{22}H_{30}O_2$
Exact Mass: 326,2246

P. obtusifolia

atividade tripanocida

J14

$C_{22}H_{30}O_2$
Exact Mass: 326,2246

P. obtusifolia

atividade tripanocida

1.10 GRUPO J. Cromenos

Continuação GRUPO J. Cromenos

K1

$C_{12}H_{13}NO_3$
Exact Mass: 219,0895

P. tetraphylla

K2

$C_{17}H_{13}NO_3$
Exact Mass: 279,0895

P. dindygulensis

K3

cefaradiona B
 $C_{19}H_{15}NO_4$
Exact Mass: 321,1001

P. sui

K4

$C_{20}H_{17}NO_5$
Exact Mass: 351,1107

P. sui

K5

$C_{15}H_{19}NO_4$
Exact Mass: 277,1314

P. oreophila

K6

$C_{16}H_{23}NO_4$
Exact Mass: 293,1627

P. oreophila

K7

pipercallosidina
 $C_{18}H_{25}NO_3$
Exact Mass: 303,1834

P. duclouxii

K8

pipercallosina
 $C_{20}H_{27}NO_3$
Exact Mass: 329,1991

P. duclouxii

K9

$C_{15}H_{15}NO_4$
Exact Mass: 273,1001

P. tetraphylla

atividade anti-cancerígena

K10

trans-N-p-cumaroil tiramina
 $C_{17}H_{17}NO_3$
Exact Mass: 283,1208

P. duclouxii

1.11 GRUPO K. Amidas

K11

cis-N-p-cumaroil tiramina
 $C_{17}H_{17}NO_3$
 Exact Mass: 283,1208
P. duclouxii

K12

N-[2-(3,4-diidroxiifenil)etil]-3,4-diidroxi-benzamida
 $C_{15}H_{15}NO_5$
 Exact Mass: 289,095
P. duclouxii, *P. tetraphylla*

K13

cis-N-feruloiltiramina
 $C_{18}H_{19}NO_4$
 Exact Mass: 313,1314
P. duclouxii, *P. sui*

K14

trans-N-feruloiltiramina
 $C_{18}H_{19}NO_4$
 Exact Mass: 313,1314
P. duclouxii,
P. heyneana, *P. sui*

K15

 $C_{18}H_{19}NO_4$
 Exact Mass: 313,1314
P. tetraphylla

K16

trans-N-feruloildopamina
 $C_{18}H_{19}NO_5$
 Exact Mass: 329,1263
P. duclouxii, *P. tetraphylla*

K17

trans-N-sinapoiltiramina
 $C_{19}H_{21}NO_5$
 Exact Mass: 343,142
P. duclouxii

K18

trans-N-feruloil-3-O-metildopamina
 $C_{19}H_{21}NO_5$
 Exact Mass: 343,142
P. duclouxii

K19

 $C_{36}H_{36}N_2O_8$
 Exact Mass: 624,2472
P. tetraphylla

L1

5-acetoximetil furfural

 $C_8H_8O_4$
 Exact Mass: 168,0423
P. sui

L2

(+) -isololiolida

 $C_{11}H_{16}O_3$
 Exact Mass: 196,1099
P. duclouxii

L3

3-oxo-α-ionol

 $C_{13}H_{20}O_2$
 Exact Mass: 208,1463

P. duclouxii,
P. heyneana

L4

(+) -epi-α-bisabolol

 $C_{15}H_{26}O$
 Exact Mass: 222,1984
P. galioides
atividade cicatrizante

L5

β-bisabolol

 $C_{15}H_{26}O$
 Exact Mass: 222,1984
*P. sui***atividade anti-cancerígena**

L6

(-) -blumenol A

 $C_{13}H_{20}O_3$
 Exact Mass: 224,1412
P. duclouxii

L7

sinugibberodiol

 $C_{15}H_{24}O_2$
 Exact Mass: 236,1776
*P. duclouxii***atividade MDR**

L8

 $C_9H_{12}O_2$
 Exact Mass: 152.0837
P. macrostachya

L9

 $C_9H_{10}O_3$
 Exact Mass: 166.063
P. macrostachya

L10

 $C_{10}H_{12}O_3$
 Exact Mass: 180.0786
P. macrostachya

L11

 $C_{10}H_{12}O_4$
 Exact Mass: 196.0736
P. macrostachya

L12

 $C_{20}H_{34}O$
 Exact Mass: 290.261
P. macrostachya

1.12 GRUPO L. outros

ANEXO 2. Propriedades biológicas, óleos essenciais e compostos isolados de espécies de *Peperomia*.

Espécies	Parte	Uso medicinal / atividade biológica do extrato	Atividade biológica	Substâncias (ANEXO 1)	Referências
<i>Peperomia alata</i> Ruiz & Pav.	Folhas	---	Forte atividade fungicida contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> (0,1 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (0,25 µg).	H12	REIGADA, 2009
	Folhas	---	Forte atividade fungicida contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> (0,5 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (0,5 µg).	H17	
	Parte aérea	---		Óleo essencial, Componente principal: kongol 22,88%.	MOREIRA et al., 1999
<i>P. amplexicaulis</i> (Sw.) A. Dietr.	Folhas (MeOH)	---	---	J18	BURKE et al., 2003
<i>P. arifolia</i> Miq.	planta inteira (hexano)	---	---	I5	SALAZAR et al., 2012
<i>P. blanda</i> (Jacq.) Kunth	Parte aérea (EtOAc)	---	Atividade tripanocida IC ₅₀ : 9,6 µg/mL	B1	FELIPPE et al., 2008
			Atividade tripanocida IC ₅₀ : 18,6 µg/mL	B2	
			Atividade tripanocida IC ₅₀ : 12,6 µg/mL	B3	
			Atividade tripanocida IC ₅₀ : 23,7 µg/mL	B4	
			Atividade tripanocida IC ₅₀ : 25,4 µg/mL	B5	
	Parte aérea (EtOAc)	---	---	C6	FELIPPE et al., 2011
	Parte aérea (EtOAc)	---	---	C15	FELIPPE et al., 2012
			---	C16	
	Parte aérea (EtOAc)	---	---	G8	FELIPPE et al., 2008
			---	G12	
	Parte aérea (MeOH)	---	Atividade antioxidante modesta (Teste DPPH): IC ₅₀ : 357,2 µM	G19	VELOZO et al., 2009
			Atividade antioxidante modesta (Teste DPPH): IC ₅₀ : 90,5 µM	G22	
	Parte aérea (MeOH)	---	---	J7	VELOZO et al., 2006
			---	J8	
	Folhas			Óleo essencial. Composto majoritário: Guaieno (6,8%)	DOS SANTOS et al., 2001
<i>P. campyloptropa</i> A. W. Hill	---	---	---	A13	GARCIA G., 1990
			---	A17	
<i>P. chaluapquiana</i> Trel.	---	---		Óleo essencial. Componentes principais:	LEO LIRA, 2007

				sabineno (20,5-31,0%), criptona (8,5-8,7%) e óxido de cariofileno (8,8-10,2%).	
<i>P. clusiifolia</i> (Jacq.) Hook.	planta inteira (hexano)	---	---	J16	BURKE et al., 2003; SEERAM et al., 1998
<i>P. circinnata</i> Link	planta inteira	---		Óleo essencial. Componentes principais: mirceno (12,2 – 31,2%) e β -felandreno (17,5 - 25,4 %).	ZOGHBI et al., 2005
<i>P. dindygulensis</i> Miq. (sinônimo de <i>Peperomia blanda</i> (Jacq.) Kunth.)	---		---	A27	CHEN LI, 2007
	Planta inteira (MeOH)	Na medicina popular chinesa é utilizada para o tratamento de asma, tosse, tuberculose, e câncer de estomago, pulmão, esôfago, mama e fígado.	---	B6	WANG et al., 2012; WU et al., 2005
			---	B7	
			Atividade mínima de inibição do crescimento de VA-13 IC ₅₀ : 36,2 µg/mL.	B8	
			Atividade para a acumulação de calceína em células tumorais MDR maior do que verapamil a 2,5 µg/mL. Atividade anti-inflamatória: De moderada a fraca atividade inibitória da indução de ICAM- 1, IC ₅₀ : 189 µM. Não toxico para células A549 no teste MTT.	B11	
			Atividade mínima de inibição do crescimento de VA-13 IC ₅₀ : 47,4 µg/mL. Atividade anti-inflamatória: De moderada a fraca atividade inibitória da indução de ICAM- 1. IC ₅₀ : 84,4 µM. Não toxico para células A549 no teste MTT.	B12	
	Planta inteira (EtOH)	O extrato em CHCl ₃ apresentou atividade significativa na supressão da proliferação de células de veia umbilical humanas (HUVEC).	---	C3	LIN et al., 2011
	Planta inteira (MeOH)/ Parte aérea (EtOH)		Atividade inibitória contra células tumorais de pulmão (VA-13) IC ₅₀ : 1,93 µM. Inibição do crescimento células normais de fibroblasto de pulmão (WI-38) ao mesmo nível. Atividade inibitória contra células tumorais de fígado (HepG2) IC ₅₀ : 12,1 µM Aumento da acumulação de calceína em células MDR 2780 a 25 µg/mL.	C4	WU et al., 2006; LIN et al., 2011; GOVINDACHARI; KUMARI; PARTHO, 1998

			<p>Atividade anti-inflamatória: Atividade inibitória da indução da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1).</p> <p>Atividade antiangiogênica: Citotoxicidade contra células endoteliais de veia umbilical (HUVEC): IC₅₀: 1,64 µM.</p> <p>Atividade de inibição da formação do tubo HUVEC: IC₅₀: 3,13 µM, não causada por citotoxicidade.</p>		
	Planta inteira (MeOH)/		Aumento da acumulação de calceína em células MDR 2780 a 25 µg/mL.	C5	WU et al., 2006; WANG et al., 2014; LIN et al., 2011; GOVINDACHARI; KUMARI; PARTHO, 1998
	Parte aérea (EtOH)				
	planta inteira (MeOH)		<p>Atividade inibitória contra células tumorais de pulmão (VA-13), IC₅₀: 13,5 µM.</p> <p>Inibição do crescimento de células normais de fibroblasto de pulmão (WI-38) ao mesmo nível.</p> <p>Atividade inibitória contra células tumorais de fígado (HepG2) IC₅₀: 22,3 µM</p> <p>Aumento da acumulação de calceína em células MDR 2780 a 25 µg/mL.</p> <p>Atividade inibitória da indução da molécula de adesão intercelular-1(ICAM-1).</p>	C7	WU et al., 2006
	---		---		
	Planta inteira (MeOH)		---	C9	WU et al., 2006; WANG et al., 2014
	Planta inteira (EtOH)		---	C11	LIN et al., 2011
	Planta inteira (MeOH)		---	C14	WU et al., 2006; LIN et al., 2011
	Planta inteira (MeOH)/ Parte aérea (EtOH)		<p>Atividade inibitória contra células tumorais de pulmão (VA-13) IC₅₀: 13,9 µM.</p> <p>Inibição do crescimento células normais de fibroblasto de pulmão (WI-38) ao mesmo nível.</p> <p>Aumento da acumulação de calceína em células MDR 2780 a 25 µg/mL</p> <p>Atividade antiangiogênica: Citotoxicidade contra células endoteliais de veia umbilical (HUVEC): IC₅₀: 8,44 µM.</p>	C16	WU et al., 2006; WANG et al., 2014; LIN et al., 2011; GOVINDACHARI; KUMARI; PARTHO, 1998; CHEN LI, 2007

			Atividade de inibição da formação do tubo HUVEC: IC ₅₀ : 6,24 µM, não causada por citotoxicidade.		
	Planta inteira (MeOH)		Atividade inibitória da indução da molécula de adesão intercelular-1(ICAM-1).	C17	WU et al., 2006; WANG et al., 2014
	Planta inteira (MeOH)		Atividade inibitória da indução da molécula de adesão intercelular-1(ICAM-1).	C18	WU et al., 2006
	Planta inteira (MeOH)		Aumento da acumulação de calceína em células MDR 2780 a 25 µg/mL.	C19	WU et al., 2006; WANG et al., 2014; CHEN LI, 2007
	Planta inteira (MeOH)		Aumento da acumulação de calceína em células MDR 2780 a 25 µg/mL.	C20	WU et al., 2006
	Planta inteira (MeOH)		Atividade inibitória contra células tumorais de pulmão (VA-13) IC ₅₀ : 15,2 µM. Inibição do crescimento células normais de fibroblasto de pulmão (WI-38) ao mesmo nível.	C21	
	Planta inteira (MeOH) / Parte aérea (EtOH)		---	C22	WU et al., 2006; GOVINDACHARI; KUMARI; PARTHO, 1998
	Planta inteira (EtOH)		---	C24	LIN et al., 2011
	Planta inteira (MeOH)		Atividade mínima de inibição do crescimento de VA-13 IC ₅₀ : 38,9 µg/mL.	G6	WU et al., 2005
	Planta inteira (EtOH)		---	G8	WANG et al., 2012; CHEN LI, 2007
	Planta inteira (EtOH)	Extratos clorofórmicos apresentaram atividade de supressão significativa contra a proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).	---	G9	WANG et al., 2012
	---		---	G10	CHEN LI, 2007
	Planta inteira (EtOH)		---	G11	WANG et al., 2012
	Planta inteira (EtOH)/ (MeOH)		---	G12	WANG et al., 2012; WU et al., 2005; CHEN LI, 2007
	---		---	G18	LI CHEN, 2007
	---		---	G23	
	---		---	G25	
	---		---	G26	LI CHEN, 2008
	Planta inteira (EtOH)		---	H3	WANG et al., 2012

	---		---	H5	ZHU, 2011
	---		---	H6	
	---		---	H7	FANG, 2011
	Planta inteira (EtOH)		Atividade antiangiogênica: Inibição da proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Supressão acentuada da formação do tubo HUVEC.	H8	WANG et al., 2012; WANG; QU; LIANG, 2013; FANG, 2011
	Planta inteira (EtOH)		---	H9	ZHU, 2011
			---	H10	
	Planta inteira (MeOH)		Atividade mínima de inibição do crescimento de VA-13 IC ₅₀ : 40,5 µg/mL.	H11	WU et al., 2005
	Planta inteira (EtOH)		---	H14	WANG et al., 2012
	Planta inteira (EtOH)		---	H15	WANG; QU; LIANG, 2013
	Planta inteira (EtOH)		---	H16	WANG et al., 2012; WANG; QU; LIANG, 2013
	Planta inteira (EtOH)		Atividade antiangiogênica: Inibição da proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Supressão acentuada da formação do tubo HUVEC.	H19	FANG, 2011; WANG et al., 2012
	Planta inteira (EtOH)		Atividade antiangiogênica: Inibição da proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).	H20	WANG et al., 2012
	Planta inteira (EtOH)		---	H32	WANG; QU; LIANG, 2013
	---		---	H34	FANG, 2011
	Planta inteira (EtOH)		Atividade antiangiogênica: Inibição da proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).	H35	WANG et al., 2012
	Planta inteira (EtOH)		---	H36	WANG et al., 2012; FANG, 2011
	Planta inteira (EtOH)		---	H37	WANG; QU; LIANG, 2013
			---	H24	
			---	H25	
			---	H26	
	Planta inteira (EtOH)		---	K2	WANG et al., 2012

<i>P. duclouxii</i> C. DC. (sinônimo de <i>Peperomia heyneana</i> Miq.)	Planta inteira (MeOH)		---	A3	LI et al., 2007
	Planta inteira (MeOH)		---	A6	LI et al., 2007
	Planta inteira (MeOH)		---	A9	LI et al., 2007
	Planta inteira (MeOH)		---	A10	LI et al., 2007
			---	A14	
			---	A15	
			---	A18	
			---	D3	
			---	D4	
		Atividade inibitória do crescimento celular contra células malignas de pulmão (VA-13) e células de hepatoma (HepG2), IC ₅₀ : 5,3 e 13,2 µg/mL respectivamente. Efeito mais potente no acúmulo de calceína em células MDR 2780 AD do que o verapamil (controle positivo) a 25 µg/mL.		D6	
			---	D7	
			---	D8	
			---	D9	
			---	D15	
	Planta inteira (MeOH)	Utilizada tradicionalmente no tratamento de vários tipos de câncer.	---	E4	LI et al., 2003
			---	E5	
			---	E8	
			---	E9	
			---	E10	
	Planta inteira (MeOH)	Utilizada tradicionalmente para o tratamento de vários tipos de câncer	---	G17	ZHU; LI; WANG, 2008
			---	G21	
			---	E11	
	Planta inteira (MeOH)		---	E12	LI et al., 2007
	Planta inteira (MeOH)		---	E13	LI et al., 2003
			---	E14	
			---	E15	
			---	E16	
	Planta inteira (MeOH)		Atividade anti-inflamatória utilizando o teste ICAM-1 (indução da molécula de adesão	E17	LI et al., 2007a

			intercelular-1), estimulada por IL-1 α e TNF- α IC ₅₀ : 107 e 13,4 μ M, respectivamente, e sem citotoxicidade para células A549 (IC ₅₀ > 316 μ M). Atividade anti-inflamatória de moderada a fraca: Efeitos inibitórios na indução de ICAM-1 em presença de IL-1 α (IC ₅₀ : 36,8 μ g/mL) ou TNF- α (IC ₅₀ : 22,9 μ g/mL), pouca toxicidade ou nula frente a células humanas A549 (carcinoma humano de pulmão) no teste MTT.		
	Planta inteira (MeOH)		Atividade citotóxica contra células normais de fibroblasto de pulmão (WI-38), células malignas de pulmão (VA-13), e células tumorais de fígado (HepG2) IC ₅₀ : 9,6; 5,8 e 9,2 μ g/mL, respectivamente. Atividade inibitória de moderada a fraca na indução de ICAM-1 com IC ₅₀ : 36,8 μ g/mL (quando a indução de ICAM-1 foi estimulada com IL- α) e 22,9 μ g/mL (usando TNF- α).	H16	LI et al., 2007b
			---	H18	
			---	H19	
			Atividade anti-inflamatória de moderada a fraca: Efeitos inibitórios na indução de ICAM-1 em presença de IL-1 α (IC ₅₀ : 43,3 μ g/mL) ou TNF- α (IC ₅₀ : 27,2 μ g/mL), pouca toxicidade ou nula frente a células humanas A549 (carcinoma humano de pulmão) no teste MTT.	H20	
			Atividade citotóxica contra células normais de fibroblasto de pulmão (WI-38), células malignas de pulmão (VA-13), e células tumorais de fígado (HepG2) IC ₅₀ : 8,6; 4,4 e 7,4 μ g/mL, respectivamente. Atividade anti-inflamatória de moderada a fraca: Efeitos inibitórios na indução de ICAM-1 em presença de IL-1 α (IC ₅₀ : 51,4 μ g/mL) ou TNF- α (IC ₅₀ : 33,5 μ g/mL), pouca toxicidade ou nula frente a células humanas A549 (carcinoma humano de pulmão) no teste MTT.	H22	
			Atividade anti-inflamatória de moderada a fraca: Efeitos inibitórios na indução de ICAM-1 em presença de IL-1 α (IC ₅₀ : 65,2 μ g/mL) ou	H38	

			TNF- α (IC ₅₀ : 48,8 μ g/mL), pouca toxicidade ou nula frente a células humanas A549 (carcinoma humano de pulmão) no teste MTT.		
			---	I1	
			---	I2	
			---	I3	
			---	K7	
			---	K8	
	Planta inteira (MeOH)		---	K10	LI et al., 2007a
			---	K11	
	Planta inteira (MeOH)		---	K12	LI et al., 2007b
	Planta inteira (MeOH)		---	K13	LI et al., 2007a
			---	K14	
	Planta inteira (MeOH)		---	K16	LI et al., 2007b
			---	K17	
			---	K18	
	Planta inteira (MeOH)		---	L2	LI et al., 2007a
	Planta inteira (MeOH)		---	L3	LI et al., 2007b
	Planta inteira (MeOH)		---	L6	LI et al., 2007a
	Planta inteira (MeOH)		Efeito mais potente no acúmulo de calceína em células MDR 2780AD do que verapamil (controle positivo) a 2,5 e 25 μ g/mL	L7	LI et al., 2007b
<i>P. emarginella</i> (Sw. Ex Wikstr.) C. DC.	Folhas			Óleo essencial. Compostos majoritários: limoneno (29,0%) e decanal (33,0%).	DE ABREU et al., 2005
<i>P. fernandopoioana</i> C. DC.	Planta inteira (hexano extract)	Usado na medicina popular de Camarões para o tratamento de infecções bacterianas. O extrato bruto em Metanol e diclorometano possui atividade antibacteriana.	---	E5	FANKAM; KUIATE; KUETE, 2014; MBAH et al., 2012; MBAH et al., 2012
<i>P. galioides</i> Kunth	Planta inteira	O extrato em éter de petróleo possui atividade significativa in vitro contra três espécies de <i>Leishmania</i> (responsáveis pela leishmaniasis) –mostrando lise total de <i>Leishmania chagasi</i> a 10 μ g/mL, e em três cepas of <i>Trypanosoma cruzi</i> (causante da	Mostra atividade significativa (% Lysis > 60%) contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .	I4	MAHIOU et al., 1995; MAHIOU et al., 1996
			Ativo contra três espécies de <i>Leishmania</i> (<i>L. braziliensis</i> , <i>donovani</i> e <i>amazonensis</i>), com lise total das parasitas a 25 μ g/mL.	I6	
			---	I7	

		doença de Chagas).			
	Planta inteira		---	I8	MAHIOU et al., 1996
			Atividade promissora contra formas promatigotas de três espécies de <i>Leishmania</i> (<i>L. braziliensis</i> , <i>donovani</i> e <i>amazonensis</i>) a 25 µg/mL, com lise total das parasitas a 100 µg/mL.	I9	
			---	J12	
	Planta inteira (EtOH)	O extrato etanólico possui atividade cicatrizante <i>in-vivo</i> . Usado na medicina tradicional como compressa –feita da planta triturada sem as raízes- e se aplica nas feridas ou cortes para acelerar a cicatrização.	Atividade cicatrizante <i>in vivo</i> ED ₅₀ 155 µg/mL	L4	VILLEGAS et al., 2001
		---	Atividade antibacteriana moderada.	Óleo essencial. Principais constituintes: β-cariofileno (13,1-16,0%), α-humuleno (13,2- 17,3%) e epi-α-bisabolol (15,1-21,3%)	DE FEO et al., 2008; ROBAYO-GAMA et al., 2010; LEO LIRA, 2007
<i>P. glabella</i> (Sw.) A.Dietr.	Folhas (MeOH)	Utilizada como antiasmático na medicina tradicional Venezuelana.	---	H27	SOARES et al., 2006
<i>P. glabella</i> var. <i>nervulosa</i> (C. DC.) Yunk.	Folhas (CHCl ₂ :MeOH 2:1)		Forte atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (1,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (1,0 µg).	C1	REIGADA, 2009
	Planta inteira (MeOH)	Na medicina popular venezuelana é usada como antiasmático	Forte atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (1,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (1,0 µg).	C2	DELLEMONACHE; COMPAGNONE, 1996; REIGADA, 2009
	Folhas (CHCl ₂ :MeOH 2:1)		Atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (5,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (5,0 µg).	C4	REIGADA, 2009
			Atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (5,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (5,0 µg).	C5	
			Atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (25,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (50,0 µg).	H28	
			Atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (25,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (50,0 µg).	H29	
			Atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium</i>	H30	

			<i>cladosporoides</i> (25,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (50,0 µg).		
			Atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (25,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (50,0 µg).	H31	
<i>P. heyneana</i> Miq. (Synonym <i>Peperomia duclouxii</i> C. DC.)	Planta inteira (EtOH)	Utilizada tradicionalmente na China para dissipar a estagnação do sangue e parar a hemorragia.	Baixa atividade anti HIV-1 EC ₅₀ : 49,8 µM.	B9	ZHANG et al., 2007
			---	B10	
			Moderada atividade anti HIV-1 EC ₅₀ : 5,3 µM.	C5	
			---	C7	
			---	C10	
			---	C12	
			Moderada atividade anti HIV-1 EC ₅₀ : 5,4 µM.	C16	
			---	C17	
			Baixa atividade anti HIV-1 EC ₅₀ : 27,3 µM.	C18	
			Baixa atividade anti HIV-1 EC ₅₀ : 42,6 µM.	C19	
			---	C21	
			---	C22	
			---	C23	
			---	K14	
<i>P. japonica</i> Makino (sinônimo de <i>Peperomia blanda</i> (Jacq.) Kunth.)	Planta inteira	Usada no tratamento de tumores malignos.	---	C5	CHEN et al., 1989
				C16	
				C19	
<i>P. macrostachya</i> (Vahl) A. Dietr.	Parte aérea	---	O óleo essencial e o extrato metanólico mostraram uma alta atividade larvicida frente a <i>Artemia salina</i> LC ₅₀ : 9,0 ±0,4 µg/mL.	Óleo essencial	DE LIRA et al., 2009
	Sementes (hexano)	--		L8	YOUNGSTEADT et al., 2008
				L9	
				L10	
				L11	
				L12	
<i>P. nitida</i> Dahlst.	Planta inteira (DCM: MeOH 2:1)	---	---	A21	MALQUICHAGUA SALAZAR, 2009
				J2	
				J5	
<i>P. obtusifolia</i> (L.) A.Dietr.	Parte aérea (EtOH)		---	D11	MOTA et al., 2011; MOTA et al., 2009
	Parte aérea (EtOH)	O extrato bruto de folhas apresentou atividade tripanocida significativa (IC ₅₀ de 4,3 µg/mL) ao ser comparado com o controle	---	D12	MOTA et al., 2009

		positivo, benznidazol (IC ₅₀ : 2,7 µg/mL).			
	Parte aérea (EtOH)		---	D13	MOTA et al., 2011
	Parte aérea (MeOH)		---	G1	TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998
	Parte aérea (EtOH)		---	G20	MOTA et al., 2011; MOTA et al., 2009
			---	G24	
	Parte aérea (MeOH)		---	I6	TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998; MOTA et al., 2009
		Atividade tripanocida <i>in vitro</i> IC ₅₀ : 47,5 ± 4,0 µM.		J13	
	Parte aérea (EtOH) / (MeOH)	Atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra a forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> . (mistura racêmica) IC ₅₀ : 3,1 ± 0,2 µM. Citotoxicidade inespecífica em células de mamíferos (Índice de seletividade): 402,1 ± 3,0 (130,4) - Não tóxica ao nível de sua atividade tripanocida, mas maior que a do benznidazol (controle positivo)- Boa seletividade para epimastigotos de <i>T. cruzi</i> quando comparado com benznidazol.		J14	MOTA et al., 2009; TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998
				J15	
	Parte aérea (MeOH)		---	J17	TANAKA; ASAI; IINUMA, 1998
	Folhas (Hexano)	Atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra a forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> , (mistura racêmica) IC ₅₀ : 27,0 ± 0,8 µM. Citotoxicidade inespecífica em células de mamíferos (Índice de seletividade): 405,0 ± 5,0 (14,9) - Não tóxica ao nível de sua atividade tripanocida-, mas maior que a do benznidazol (controle positivo).		J19	BATISTA et al., 2010; BATISTA et al., 2009; MOTA et al., 2009
				J20	
	Parte aérea (EtOH)		---	J21	BATISTA et al., 2011
			---	J22	
			---	J23	
			---	J24	
	Parte aérea (EtOH)	Utilizada por comunidades de Centro América no tratamento de picaduras de insetos e serpentes e para limpeza da pele.	---	J25	BATISTA et al., 2012; BATISTA et al., 2011
			---	J26	
	Parte aérea	---		Óleo essencial: Componente majoritário α-eudesmol 27,11%.	MOREIRA et al., 1999

<i>P. oreophila</i> Henschen	Folhas (MeOH)	---	---	A23	SALAZAR et al., 2012
			---	A24	
			---	A25	
			---	D10	
			---	D13	
			---	I5	
			---	J11	
			---	K5	
			---	K6	
	Folhas	---		Óleo essencial: Componente majoritário, 3-ishwarona 78,2%.	LAGO et al., 2007
<i>P. pellucida</i> (L.) Kunth	Planta inteira (MeOH)		---	A12	MANALO, 1983
	Parte aérea (MeOH)	Usada como emoliente, diurético e no controle de tosse e arritmia cardíaca na região Amazônica.	Atividade citotóxica no desenvolvimento embrionário de blastocistos de rato	A20	BAYMA et al., 2000 ;CHAN, 2014
	Planta inteira (MeOH)	Em Filipinas, a planta inteira é usada como cataplasma quente para furúnculos e abscessos. Na África ocidental tropical é utilizado como ingrediente em infusões medicinais para o tratamento de convulsões.	---	A21	MANALO, 1983
	Planta inteira (EtOH)	Usada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de abscessos, furúnculos, feridas na pele, trauma e sangramento.	Promove a proliferação de células de câncer de mama MCF-7 com EC ₅₀ de 142 nM. Atividade estrogênica: EC ₅₀ : 3,1 µM em células CV-1 transfectadas com receptor de estrogênio humano (ERα).	B6	OLOYEDE, 2010; XU et al., 2006
			---	B9	
			---	B12	
		Tradicionalmente utilizada para tratar dor abdominal, acne, cólica, fadiga, gota, dor de cabeça, distúrbios renais, dores reumáticas e para tratar câncer de mama, impotência, sarampo, transtornos mentais e varíola. Tem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e analgésicas.	---	B13	
			Efeito inibidor do crescimento em três tipos de células cancerígenas, HL-60 (IC ₅₀ : 1,8 ± 0,8 µM), MCF-7 (IC ₅₀ : 3,9 ± 0,2 µM) e HeLa (IC ₅₀ : 11,1 ± 0,4 µM).	C4	
			---	C5	
			Efeito fraco na inibição do crescimento em células cancerígenas HL-60 (IC ₅₀ : 10,8 ± 1,1 µM), um resultado semelhante ao controle positivo, etoposide.	C11	
			Efeito inibidor do crescimento em três	C13	

			linhagens de células cancerígenas, HL-60 (IC ₅₀ : 1,4 ± 0,2 µM), MCF-7 (IC ₅₀ : 3,8 ± 1,1 µM) e HeLa (IC ₅₀ : 9,1 ± 0,3 µM).		
			---	C16	
			---	C19	
			---	D1	
			---	E1	
	Parte aérea (MeOH)		---	F1	BAYMA et al., 2000
			---	G3	AQIL, 1993
			---	G4	
			---	G14	
			---	G15	
	Planta inteira (EtOH)		---	G16	XU et al., 2006
	Folhas (EtOH)		Atividade anti-bacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: 8-64 µg/mL Atividade citotóxica contra larvas de <i>Artemia salina</i> : LC ₅₀ : 18,24 µg/mL. Atividade antifúngica fraca contra <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Candida albicans</i> .	A28	KHAN, 2010
	Parte aérea	Atividade antifúngica significativa contra <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> .	O óleo e o extrato metanólico apresentaram alta atividade larvicida contra <i>Artemia salina</i> LC ₅₀ : 2,4 ± 0,5 µg/mL.	Óleo essencial. Componentes majoritários (MOREIRA et al., 1999): 5-hidroxi-3,4-metilenodioxialibenzeno 10,58%; dillapiol 36,96%. Componentes majoritários (DE LIRA et al., 2009): Dillapiol (55,3%), (<i>E</i>)-cariofileno (14,3%) e carotol (8,1%) Componentes principais (FRANÇOIS et al., 2013): dillapiol (37,8%) e miristicina (11,3%)	DE LIRA et al., 2009; FRANÇOIS et al., 2013; MOREIRA et al., 1999
<i>P. proctori</i> Yunck.	Planta inteira (hexano)	---	---	H3	SEERAM et al., 2000
			---	H4	
			---	H39	

<i>P. rotundifolia</i> (L.) Kunth		---	O óleo e o extrato metanólico mostraram atividade larvica alta contra <i>Artemia</i> LC ₅₀ : 1,9 ± 0,1 µg/mL.	Óleo essencial: Componentes majoritários (DE LIRA et al., 2009): decanal (43,3%); dihidro-P3-santalol (9,0%), (<i>E</i>)-nerolidol (7,9%) e limoneno (7,7%). Componentes majoritários (ZOGHBI et al., 2005): limoneno (28,7 - 35,0%) e decanal (22,8-44,4%)	ZOGHBI et al., 2005; DE LIRA et al., 2009
<i>P. rupestris</i> Kunth (sinônimo de <i>Peperomia macrostachya</i> (Vahl) A. Dietr.)	Planta inteira			Óleo essencial: Composto majoritário germacreno D: 14,95%.	DOS SANTOS et al., 2001
<i>P. scandens</i> Ruiz & Pav.	Parte aérea	---		Óleo essencial: Dillapiol 8,43%, apiole 7,13%.	MOREIRA et al., 1999
<i>P. serpens</i> (Sw.) Loudon	Folhas (CH ₂ Cl ₂)	---	---	G2	KITAMURA et al., 2006
			---	J1	
			---	J9	
			---	J11	
	Planta inteira	Na medicina popular brasileira é usada para tratar inflamação, dor e asma. O extrato CH ₂ Cl ₂ das folhas apresentou potencial fungicida significativo contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>C. shpaerospermum</i> (5,0 µg). pelo teste de bioautografia.	Efeito significativo antinociceptivo e antiinflamatório.	Óleo essencial. Componentes majoritários: (<i>E</i>)-Nerolidol (38,0%), ledol (27,1%), α-humuleno (11,5%), (<i>E</i>)-cariofileno (4,0%) e α-eudesmol (2,7%).	PINHEIRO et al., 2011
<i>P. subspathulata</i> Yunck.	Folhas	Usado na medicina popular Colombiana para tratar desordens estomacais.		Óleo essencial: Componente majoritário: safrol (49 %)	DEDIAZ; DIAZ; CARDOSO, 1988
<i>P. sui</i> T.T. Lin & S. Y. Lu (sinônimo de <i>Peperomia blanda</i> (Jacq.) Kunth	Planta inteira (MeOH)		---	A1	CHENG; CHEN, 2008
			---	A11	CHENG et al., 2003
			---	A4	
			---	A5	CHENG; CHEN, 2008
			---	A6	CHENG et al., 2003
			---	A16	CHENG et al., 2003;
			---	A22	(CHENG; CHEN, 2008
			Atividade citotóxica significativa contra células	C4	CHENG et al., 2003

			cancerígenas humanas HONE-1 e NUGC-3. (5,1% de crescimento celular a uma concentração de 50 µM)		
			---	C5	CHENG; CHEN, 2008; CHENG et al., 2003
			---	C16	
			---	C19	CHENG; CHEN, 2008
			---	D1	CHENG et al., 2003
			---	D2	CHENG; CHEN, 2008
		Citotoxicidade significativa do extrato metanólico da planta inteira contra células cancerígenas HONE-1 e NUGC-3 <i>in vitro</i> . O extrato etanólico da planta inteira mostrou forte atividade anti viral contra o vírus da influenza H6N1 <i>in vitro</i>		E2	CHENG et al., 2003; CHENG; CHEN, 2008; YANG et al., 2014
				G6	
				G8	
				G12	
			Atividade citotóxica significativa contra células cancerígenas humanas HONE-1 e NUGC-3. (0,0% de crescimento celular a uma concentração de 50 µM). IC ₅₀ : 8,08 µg/mL	H3	
			Atividade citotóxica significativa contra células cancerígenas humanas HONE-1 e NUGC-3. (39,27% de crescimento celular a uma concentração de 50 µM)	H8	
			---	H15	
			---	H16	
			Atividade citotóxica significativa contra células cancerígenas humanas HONE-1 e NUGC-3. (31,38% de crescimento celular a uma concentração de 50 µM)	H22	
			---	H33	
				H40	
			---	H42	
			---	J27	
			---	K3	
			---	K4	CHENG; CHEN, 2008; CHENG et al., 2003
			---	K13	
			---	K14	
			---	L1	CHENG; CHEN, 2008
			Atividade citotóxica significativa contra células cancerígenas humanas HONE-1 e NUGC-3. (0,0% de crescimento celular a uma concentração de 50 µM). IC ₅₀ : 10,3 µg/mL	L5	CHENG et al., 2003

<i>P. tetraphylla</i> (G. Forst.) Hook. & Arn.			---	A2	LI, 2011
	Planta inteira (EtOH)		---	A6	LI et al., 2007
			---	A7	
			---	A8	
	Planta inteira (EtOH)		---	A19	LI et al., 2007
			---	A23	
			---	A26	
	Planta inteira (EtOH)		Atividade inibitória moderada contra a célula A549.	A26	LI et al., 2013
	---		---	D5	LI, 2011
	Planta inteira (EtOH)		---	F2	LI et al., 2007
	Planta inteira (EtOH)		---	F3	LI; TONG; HUANG, 2012
			---	F4	
			---	G5	
	---		---	G7	LI, 2011
<i>P. trineura</i> Miq.	Planta inteira (EtOH)		---	K1	LI; TONG; HUANG, 2012; LI, 2011
	Planta inteira (EtOH)	Usada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de tosse, asma, beribéri, disenteria, diarreia e insônia. Além de ser usado como antitumoral em algumas regiões.	Citotoxicidade: Significativa atividade inibitória contra células HepG2 IC ₅₀ : 9,4 ±1,0 µM.	K9	LI; TONG; HUANG, 2012
				K12	
				K15	
				K16	
				K19	
	Planta inteira (CHCl ₃)	---	Moderada atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (10,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (25,0 µg).	H1	FERREIRA, 2009
			Atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (1,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (10,0 µg).	H2	
			Moderada atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (5,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (25,0 µg).	H13	
			Baixa atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (100,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (100,0 µg).	H21	
			Baixa atividade anti-fúngica contra <i>Cladosporium cladosporoides</i> (100,0 µg) e <i>C. sphaerospermum</i> (100,0 µg).	H23	
<i>P. urocarpa</i> Fisch. & C.A.Mey.	Folhas (DCM:MeOH)	---	---	I4	MALQUICHAGUA SALAZAR, 2009
			---	I7	

	2:1)				
<i>P. villipetiola</i> C. DC.	Parte aérea (DCM: MeOH 2:1)			A17	SALAZAR et al., 2005
				J1	
				J2	
				J3	
				J4	
				J5	
			Atividade antifúngica medida por bioautografia: Moderadamente ativo contra <i>C. sphaerospermum</i> at 25 µg e fortemente activo contra <i>C. cladosporoides</i> a 100 µg.	J6	
<i>P. vulcanica</i> Baker & C.H. Wright	Planta inteira (hexano)	Usada na medicina popular de Camarões para tratar infecções bacterianas, e contra a esterilidade.		D1	MBAH et al., 2002
				D14	
		Usada na medicina popular de Camarões para tratar infecções bacterianas. atividade antibacteriana de extratos bruto em metanol e diclorometano.		E6	MBAH et al., 2002; MBAH et al., 2012
				E7	MBAH et al., 2002
				G13	MBAH et al., 2012
				H41	MBAH et al., 2002
				H43	
	Folhas			Óleo essencial: Compostos majoritários: α-terpineno (18,3%) e β-pineno (14,0%)	FRANÇOIS et al., 2013

ANEXO 3: Espectros de RMN ^1H das substâncias isoladas

3.1. RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) substância **1** isolada de *P. megapotamica*.

3.2. RMN de ¹³C (CDCl₃) da substância **1** isolada de *P. megapotamica*.

3.3 COSY (CDCl_3) da substância **1** isolada de *P. megapotamica*.

3.4 HSQC (CDCl₃) da substância **1** isolada de *P. megapotamica*.

3.5 HMBC (CDCl₃) substância **1** isolada de *P. megapotamica*.

3.6 RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da substância **2** isolada de *P. rotundifolia*.

3.7 RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da substância **3** isolada de *P. rotundifolia*.

3.8 RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância **4** isolada de *P. sincorana*.

3.9 RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da substância **5** isolada de *P. sincorana*.

ANEXO 4: Árvores filogenéticas.

4.1 Árvore mais parcimoniosa de espécies de *Peperomia* com dados ITS.

Valores de bootstrap nos ramos. Análise por máxima parcimônia utilizando o programa PAUP. Busca heurística; repetições de bootstrap: 100000; longitude da árvore: 1282; índice de consistência (CI): 0.5181; índice de homoplasia (HI): 0.4819; índice de retenção (RI): 0.6823; algoritmo Branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 304; 601 caracteres são constantes. Grupo externo: *Houttuynia cordata*, *Anemopsis californica* e *Piper malacophyllum*.

4.2 Inferência Bayesiana obtida com dados da região ITS para espécies de *Peperomia*.

Árvore consenso obtida após 40000 gerações no programa MrBayes. Modelo evolutivo: (GTR+I+G) selecionado por MrModeltest 2.3 baseado em hLRT (hierarchical likelihood ratio test).

4.3 Árvore mais parcimoniosa obtida com dados do gene *matK* de espécies de *Peperomia*.

Valores de *bootstrap* nos ramos. Análise por máxima parcimônia utilizando o programa PAUP. Busca heurística; repetições de *bootstrap*: 100000; longitude da árvore: 1468; índice de consistência (CI): 0.88147; índice de homoplasia (HI): 0.1853; índice de retenção (RI): 0.8420; algoritmo Branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 614; 2029 caracteres são constantes. Grupo externo: *Houttuynia cordata*, *Anemopsis californica* e *Piper nigrum* e *Piper aduncum*.

4.4 Árvore de inferência Bayesiana obtida com dados do gene matK de espécies de *Peperomia*.

Árvore consenso obtida após 40000 gerações. Modelo evolutivo: (GTR+I+G) selecionado por MrModeltest 2.3 baseado em hLRT (hierarchical likelihood ratio test).

4.5 Árvore Máxima verossimilhança (ML) com dados de ITS e matK de espécies de *Peperomia*.

Modelo evolutivo:(GTR+I+G) selecionado pelo programa MrModeltest 2.3 baseado em hLRT (hierarchical likelihood ratio test). Réplicas de bootstrap:100, busca heurística. Os valores de bootstrapse encontram acima dos ramos.

4.6 Árvore de Inferência Bayesiana do gene CHS em *Peperomia*.

Árvore consenso obtida após 200000 gerações obtida com o programa MrBayes, modelo evolutivo GTR+G selecionado pelo programa MrModeltest 2.3 baseado em hLRT (hierarchical likelihood ratio test).

ANEXO 5. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos de *Peperomia*

5.1 *P. alata*

5.2 *P. arifolia*

5.3 *P. blanda*

5.4 *P. corcovadensis*

5.5 *P. galioides*

5.6 *P. glabella*

5.7 *P. glabella* var. *nervulosa*

5.8 *P. hilariana*

5.9 *P. hispidula*

5.10 *P. incana*

5.11 *P. megapotamica*

5.12 *P. nitida*

5.13 *P. obtusifolia*

5.14 *P. oreophila*

5.15 *P. pellucida*

5.16 *P. pseudoestrellensis*

5.17 *P. rhombea*

5.18 *P. rotundifolia*

5.19 *P. sandersii*

5.20 *P. serpens*

5.21 *P. sincorana*

5.22 *P. sp.* (K-1064)

5.23 *P. subrubripica*

5.24 *P. tetraphylla*

5.25 *P. transperens*

5.26 *P. trineura*

5.27 *P. urocarpa*

REFERÊNCIAS DE ANEXOS

- AQIL, M. K., I. Z.; AHMAD, M. B. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. **Scientist of Physical Sciences**, vol. 5, 213-215, 1993.
- BATISTA, J. M., JR.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LOPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, vol. 53, 6051-6054, 2012.
- BATISTA, J. M., JR.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LOPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure Elucidation and Absolute Stereochemistry of Isomeric Monoterpene Chromane Esters. **Journal of Organic Chemistry**, vol. 76, 2603-2612, 2011.
- BATISTA, J. M., JR.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; CASS, Q. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; LOPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Absolute configuration reassignment of two chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) using VCD and DFT calculations. **Tetrahedron-Asymmetry**, vol. 21, 2402-2407, 2010.
- BATISTA, J. M.; LOPEZ, S. N.; MOTA, J. D.; VANZOLINI, K. L.; CASS, Q. B.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; BOLZANI, V. D.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution and Absolute Configuration Assignment of a Natural Racemic Chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Chirality**, vol. 21, 799-801, 2009.
- BAYMA, J. D.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; CANTO, W. C. A dimeric ArC2 compound from *Peperomia pellucida*. **Phytochemistry**, vol. 55, 779-782, 2000.
- BURKE, S. J.; JACOBS, H.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Structural and spectral assignment by 2D NMR of a new prenylated benzopyrancarboxylic acid and structural reassignment of a related compound. **Magnetic Resonance in Chemistry**, vol. 41, 145-146, 2003.
- CHAN, W.-H. Cytotoxic Effects of Dillapiole on Embryonic Development of Mouse Blastocysts in Vitro and in Vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 15, 10751-10765, 2014.
- CHEN, C. M.; JAN, F. Y.; CHEN, M. T.; LEE, T. J. PEPEROMINS-A, PEPEROMINS-B AND PEPEROMINS-C, NOVEL SECOLIGNANS FROM *PEPEROMIA-JAPONICA*. **Heterocycles**, vol. 29, 411-414, 1989.
- CHEN LI, Z. Y., DONG JUN-XING. Chemical constituents of *Peperomia dindygulensis*; **Chinese traditional and herbal drugs**, vol. 38, 2007.
- CHENG, M.-J.; CHEN, I.-S. Secondary metabolites from *Peperomia sui*. **Journal of the Chilean Chemical Society**, vol. 53, 1539-1542, 2008.
- CHENG, M. J.; LEE, S. J.; CHANG, Y. Y.; WU, S. H.; TSAI, I. L.; JAYAPRAKASAM, B.; CHEN, I. S. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**, vol. 63, 603-608, 2003.
- DE ABREU, A. M.; BRIGHENTE, I. M. C.; DE AGUIAR, E. M.; REBELO, R. A. Volatile constituents of Piperaceae from Santa Catarina, Brazil - Essential oil composition of *Piper cernuum* Vell. and *Peperomia emarginella* (Sw.) c. DC. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 17, 286-288, 2005.
- DE FEO, V.; BELAUNDE, A. J.; SANDOVAL, J. G.; SENATORE, F.; FORMISANO, C. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Peperomia galioides* HBK (Piperaceae) from Peru. **Natural Product Communications**, vol. 3, 933-936, 2008.

- DE LIRA, P. N.; DA SILVA, J. K.; ANDRADE, E. H.; SOUSA, P. J.; SILVA, N. N.; MAIA, J. G. Essential oil composition of three *Peperomia* species from the Amazon, Brazil. **Nat Prod Commun**, vol. 4, 427-30, 2009.
- DEDIAZ, A. M. P.; DIAZ, P. P.; CARDOSO, H. VOLATILE CONSTITUENTS OF *PEPEROMIA-SUBESPATULATA*. **Planta Medica**, vol., 92-93, 1988.
- DELLEMONACHE, F.; COMPAGNONE, R. S. A secolignan from *Peperomia glabella*. **Phytochemistry**, vol. 43, 1097-1098, 1996.
- DOS SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. D.; GUIMARAES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, vol. 58, 547-551, 2001.
- FANG, C. Y., GUOHONG; CHEN, HONGZHUAN; WANG, QIWEI; YU, DEHONG; YANG, YIFANG; LU, QIN; LIN, MENGGAN; BAI, FAN; LI, GUIXIU (2011). Application of polyketone compounds extracted from *Peperomia dindygulensis* as angiogenesis inhibitor.
- FANKAM, A. G.; KUIATE, J. R.; KUETE, V. Antibacterial activities of *Beilschmiedia obscura* and six other Cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, vol. 14, 9, 2014.
- FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; GUIMARAES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, vol. 69, 445-450, 2008.
- FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M., JR.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Structure and absolute configuration of a secolignan from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry Letters**, vol. 4, 245-249, 2011.
- FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M., JR.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; HE, Y.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. VCD to determine absolute configuration of natural product molecules: secolignans from *Peperomia blanda*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, vol. 10, 4208-4214, 2012.
- FERREIRA, E. A. 2-Acil-cicloexano-1,3-dionas de *Peperomia trineura* (Miq). 2009. 140 f. **Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.
- FRANÇOIS, T.; MICHEL, J. D. P.; VYRY, W. N. A.; FABRICE, F. B.; LAMBERT, S. M.; HENRI, A. Z. P.; CHANTAL, M. Composition and Antifungal Properties of Essential Oils from Five Plants Growing in the Mountainous Area of the West Cameroon. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, vol. 16, 679-688, 2013.
- GARCIA G., E. M., V.; GUZMAN, A.; GUTIERREZ, R. Constituents of *Peperomia campylotropa*. **Fitoterapia**, vol. 61, 90, 1990.
- GOVINDACHARI, T. R.; KUMARI, G. N. K.; PARTHO, P. D. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. **Phytochemistry**, vol. 49, 2129-2131, 1998.
- KHAN, A. R., MOIZUR; ISLAM, SHARIFUL. Isolation and Bioactivity of a Xanthone Glycoside from *Peperomia pellucida*. **Life Sciences & Medicine Research**, vol. 2010, 2010.
- KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). **Phytochemistry**, vol. 67, 2398-2402, 2006.
- LAGO, J. H. G.; DE OLIVEIRA, A.; GUIMARAES, E. F.; KATO, M. J. 3-ishwarone and 3-ishwarol, rare sesquiterpenes in essential oil from leaves of *Peperomia oreophila* hensch. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 18, 638-642, 2007.

- LEO LIRA, P. F., Y; VAN BAREN, C; BANDONI, A; COUSSIO, J AND DE ABRAM A. Composition of the essential oil of two *Peperomia* from Peru: *P. galioides* and *P. chahuapuyana*. **Revista Latinoamericana de Química**, vol. 1-2, 7-12, 2007.
- LI CHEN, Y. Z., YI-LONG ZHOU, JUN-XING DONG. A new C-glycosylflavone from *Peperomia dindygulensis*. **China Journal of Chinese Materia Medica** vol. 33, 772-774, 2008.
- LI CHEN, Z. Y., DONG JX. Three new flavonoid glycosides from *Peperomia dindygulensis*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, vol. 42, 183-186, 2007.
- LI, N.; WU, J.-L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.-I.; BAI, L.-M.; WANG, L.-Y.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, vol. 70, 544-548, 2007a.
- LI, N.; WU, J.-L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.-I.; BAI, L.-M.; WANG, L.-Y.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, vol. 70, 998-1001, 2007b.
- LI, N.; WU, J. L.; SAKAI, J.; ANDO, M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**, vol. 66, 1421-1426, 2003.
- LI, Y.-Z.; HUANG, J.; GONG, Z.; TIAN, X.-Q. A novel norlignan and a novel phenylpropanoid from *Peperomia tetraphylla*. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 90, 2222-2226, 2007.
- LI, Y.-Z.; PENG, D.-Y.; DAI, M.; XIAO, C.-M.; JIANG, H.-B.; HUANG, J. A new phenylpropanoid from *Peperomia tetraphylla*. **Natural Product Research**, vol. 27, 837-840, 2013.
- LI, Y.-Z.; TONG, A.-P.; HUANG, J. Two New Norlignans and a New Lignanamide from *Peperomia tetraphylla*. **Chemistry & Biodiversity**, vol. 9, 769-776, 2012.
- LI, Y. H., JING. In: **Zhongcaoyao: Chinese Traditional and Herbal Drugs**. 2011 vol. 42 Issue9, p. 1699-1701.
- LIN, M.-G.; YU, D.-H.; WANG, Q.-W.; LU, Q.; ZHU, W.-J.; BAI, F.; LI, G.-X.; WANG, X.-W.; YANG, Y.-F.; QIN, X.-M.; FANG, C.; CHEN, H.-Z.; YANG, G.-H. Secolignans with Antiangiogenic Activities from *Peperomia dindygulensis*. **Chemistry & Biodiversity**, vol. 8, 862-871, 2011.
- MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; BARRIOS, A. A.; FOURNET, A.; DUCROT, P. H. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **Journal of Natural Products-Lloydia**, vol. 58, 324-328, 1995.
- MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; DEARIAS, A. R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. **Journal of Natural Products**, vol. 59, 694-697, 1996.
- MALQUICHAGUA SALAZAR, K. J. Estudo químico e biossintético de *Peperomias*. 2009. 179 f. **Tese de Doutorado - Instituto de Química Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.
- MANALO, J. B. H., BYUNG HOON; HAN, YONG NAM; PARK, MYUNG HWAN; ANZALDO, FELICIDAD E. Studies on ether-soluble neutral compounds of *Peperomia pellucida*. **Archives of Pharmacal Research**, vol. 6, 133-136, 1983.
- MBAH, J. A.; NGEMENYA, M. N.; ABAWAH, A. L.; BABIAKA, S. B.; NUBED, L. N.; NYONGBELA, K. D.; LEMUH, N. D.; EFANGE, S. M. N. Bioassay-guided

- discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoiana* and *Scleria striatinux*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, vol. 11, 2012.
- MBAH, J. A.; TCHUENDEM, M. H. K.; TANE, P.; STERNER, O. Two chromones from *Peperomia vulcanica*. **Phytochemistry**, vol. 60, 799-801, 2002.
- MOREIRA, D. L.; DE SOUZA, P. O.; KAPLAN, M. A. C.; GUIMARAES, E. F. In: CAFFINI, N.; BERNATH, J.; CRAKER, L.; JATISATIENR, A.; GILBERTI, G. editor. **Proceedings of the 2nd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants**. 1999. p. 65-69.
- MOTA, J. D. S.; LEITE, A. C.; BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPEZ, S. N.; AMBROSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; BARRETTO CICARELLI, R. M.; FURLAN, M. In vitro Trypanocidal Activity of Phenolic Derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, vol. 75, 620-623, 2009.
- MOTA, J. D. S.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M. Isoswertisin flavones and other constituents from *Peperomia obtusifolia*. **Natural Product Research**, vol. 25, 1-7, 2011.
- OLOYEDE, G. K. Chemical composition, toxicity, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Peperomia pellucida* (Piperaceae) from Nigeria. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, vol. 4, 143-148, 2010.
- PINHEIRO, B. G.; SILVA, A. S. B.; SOUZA, G. E. P.; FIGUEIREDO, J. G.; CUNHA, F. Q.; LAHLOU, S.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 138, 479-486, 2011.
- REIGADA, J. B. Bioprospecção em espécies de Piperaceae. 2009. 133 f. **Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.
- ROBAYO-GAMA, P. A.; QUIJANO, C. E.; MORALES, G.; PINO, J. A. Composition of the essential oil from leaves of *Peperomia galioides* HBK Grown in Colombia. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 22, 307-309, 2010.
- SALAZAR, K. J. M.; LAGO, J. H. G.; GUIMARAES, E. F.; KATO, M. J. Meroterpenes from *Peperomia oreophila* Hensch and *Peperomia arifolia* Miq. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 23, 782-785, 2012.
- SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. **Phytochemistry**, vol. 66, 573-579, 2005.
- SEERAM, N. P.; JACOBS, H.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. A prenylated benzopyran derivative from *Peperomia clusiifolia*. **Phytochemistry**, vol. 49, 1389-1391, 1998.
- SEERAM, N. P.; LEWIS, A. W.; JACOBS, H.; NAIR, M. G.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Proctoriones A-C: 2-acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii*. **Journal of Natural Products**, vol. 63, 399-402, 2000.
- SOARES, M. G.; DE FELIPPE, A. P. V.; GUIMARAES, E. F.; KATO, M. J.; ELLENA, J.; DORIGUETTO, A. C. 2-Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone from leaves of *Peperomia glabella*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 17, 1205-1210, 2006.
- TANAKA, T.; ASAI, F.; IINUMA, M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. **Phytochemistry**, vol. 49, 229-232, 1998.

- VELOZO, L. S. M.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, vol. 67, 492-496, 2006.
- VELOZO, L. S. M.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; GUIMARAES, E. F.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. **Fitoterapia**, vol. 80, 119-122, 2009.
- VILLEGAS, L. F.; MARCALO, A.; MARTIN, J.; FERNANDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. (+)-Epi- α -bisbolol is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: Investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. **Journal of Natural Products**, vol. 64, 1357-1359, 2001.
- WANG, Q.-W.; YU, D.-H.; LIN, M.-G.; ZHAO, M.; ZHU, W.-J.; LU, Q.; LI, G.-X.; WANG, C.; YANG, Y.-F.; QIN, X.-M.; FANG, C.; CHEN, H.-Z.; YANG, G.-H. Antiangiogenic polyketides from *Peperomia dindygulensis* Miq. **Molecules**, vol. 17, 4474-4483, 2012.
- WANG, X.-Z.; LIANG, J.-Y.; WEN, H.-M.; SHAN, C.-X.; LIU, R. Simultaneous determination of five bioactive secolignans in rat plasma by LC-MS/MS for pharmacokinetic studies following oral administration of *Peperomia dindygulensis* Miq. extract. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, vol. 944, 82-89, 2014.
- WANG, X.-Z.; QU, W.; LIANG, J.-Y. Two N-containing polyketide derivatives from *Peperomia dindygulensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 48, 1027-1030, 2013.
- WANG, X.; QU, W.; LIANG, J. New long-chain aliphatic compounds from *Peperomia dindygulensis*. **Natural Product Research**, vol. 27, 796-803, 2013.
- WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; KAKUTA, S.; TANG, W. X.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, vol. 68, 1656-1660, 2005.
- WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; MITSUI, T.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; OKA, S.; KIUCHI, M.; TOMIDA, A.; TURUO, T.; LI, M. J.; TANG, W. X.; ANDO, M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, vol. 69, 790-794, 2006.
- XU, S.; LI, N.; NING, M. M.; ZHOU, C. H.; YANG, Q. R.; WANG, M. W. Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. **Journal of Natural Products**, vol. 69, 247-250, 2006.
- YANG, C.-H.; TAN, D.-H.; HSU, W.-L.; JONG, T.-T.; WEN, C.-L.; HSU, S.-L.; CHANG, P.-C. Anti-influenza virus activity of the ethanolic extract from *Peperomia sui*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 155, 320-325, 2014.
- YOUNGSTEADT, E.; NOJIMA, S.; HAEBERLEIN, C.; SCHULZ, S.; SCHAL, C. Seed odor mediates an obligate ant-plant mutualism in Amazonian rainforests. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 105, 4571-4575, 2008.
- ZHANG, G.-L.; LI, N.; WANG, Y.-H.; ZHENG, Y.-T.; ZHANG, Z.; WANG, M.-W. Bioactive lignans from *Peperomia heyneana*. **Journal of Natural Products**, vol. 70, 662-664, 2007.
- ZHU, W. L., MENGGAN; YANG, GUOHONG; WANG, QIWEI; YANG, YIFANG. Structure identification of two polyketide isomers in ethanol extract from *Peperomia dindygulensis* Miq. **Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi**, vol. 42, 504 - 507, 2011.

- ZHU, W. L., MENGGAN; YANG, GUOHONG; WANG, QIWEI; YANG, YIFANG. Two novel polyketides from *Peperomia dindygulensis*. **Zhongcaoyao**, vol. 42, 420 - 423, 2011.
- ZHU, Y. H.; LI, N.; WANG, M.-W. A new lignan glycoside from *Peperomia duclouxii*. **Natural Product Research**, vol. 22, 1483-1486, 2008.
- ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; LOBATO, R. C. L.; TAVARES, A. C. C.; SOUZA, A. P. S.; CONCEICAO, C. C. C.; GUIMARAES, E. F. *Peperomia circinnata* Link and *Peperomia rotundifolia* (L.) Kunth growing on different host-trees in Amazon: volatiles and relationship with bryophytes. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 33, 269-274, 2005.