RESULTADOS E DISCUSSÃO

A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio.

Martin Luther King

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estruturas de metabólitos secundários

4.1.1. Lignanas furofurânicas

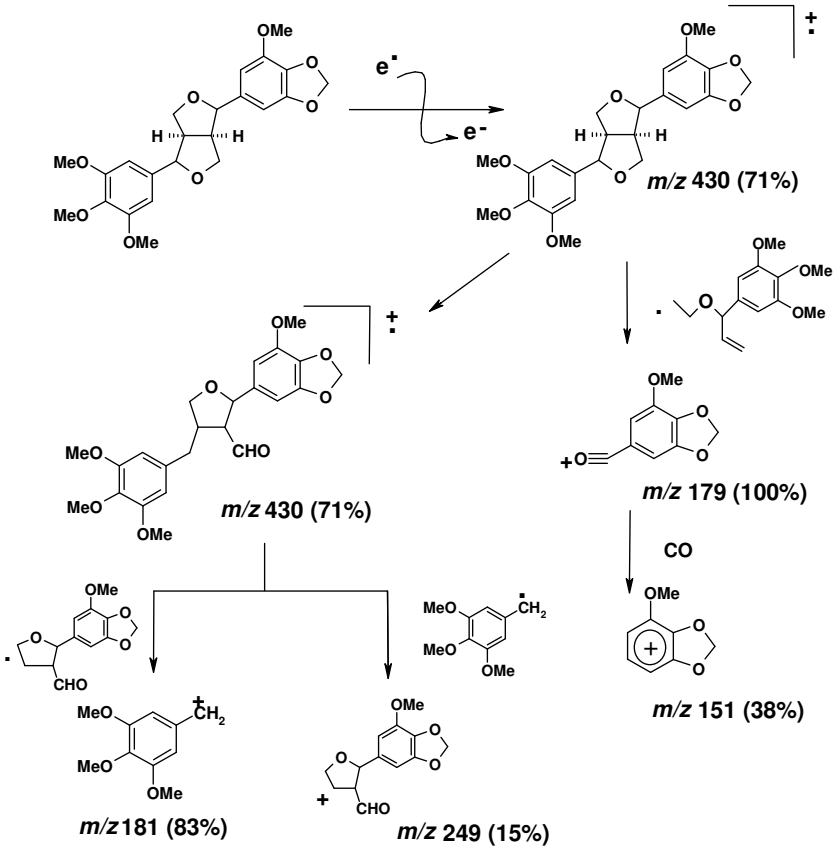
4.1.1.1. Lignanas furofurânicas **1** e **2**

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **1** (Figura 18) apresentou três singletos aromáticos em δ 6,58 (2H), 6,57 (1H) e 6,54 (1H) que, associados a sinais referentes a quatro metóxilas em δ 3,91 (3H, s), 3,87 (6H, s) e 3,84 (3H, s), indicaram a presença de no mínimo dois anéis aromáticos. Como foi observado ainda um singleto referente a um grupo metilenodioxílico em δ 5,96, foi inferida a presença de dois anéis aromáticos trissubstituídos. O reconhecimento da substância **1** ser uma lignana furofurânica contendo o sistema 3,7-dioxabiciclo [3.3.0] octânico, foi baseado nos deslocamentos químicos característicos em δ 4,87 (d, 1H, *J*= 5,4 Hz), 4,89 (d, 1 H, *J*= 5,4 Hz), 3,56 (m, 2H), 3,71 (m, 2H) e um único deslocamento em δ 3,15 (m, 2H) (Tabela 17 página 95). Um dos anéis aromáticos seria trimetóxilado enquanto o outro teria uma metóxila e um anel metilenodioxi (Tabela 17, página 95). O espectro de massas (Figura 17) obtido por CG-EM apresentou o pico do íon molecular $M^{+\bullet}$ em *m/z* 430 Da e um pico base em *m/z* 179 relativo ao íon $[ArCO]^+$ (Esquema 15, página 93). A busca bibliográfica mostrou **1** como sendo a (7*R*, 8*R*, 7'*R*, 8'*R*)-3,4,5-trimetóxi-3',4'-metilenodioxi-5'-metóxi-8.8',7.O.9',7'.O.9-lignana, conhecida como diasesartemina que fora isolada previamente de *Artemisia absinthium* (Greger and Hofer, 1980).

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **2** (Figura 20) apresentou sinais semelhantes ao da lignana **1**, com sinais em δ 4,91 (d, 2H, *J*= 4,5 Hz), 3,20 (m, 2H) e 3,59 (m, 4H). No entanto, apresentou apenas um singleto aromático em δ 6,60

(4H) e dois singletos relativos a seis metoxilas em δ 3,89 (4 CH_3) e 3,86 (2 CH_3), sugerindo a presença de dois anéis aromáticos trimetoxilados, tetrasubstituídos e simétricos (Tabela16, página 94). O espectro de massas (Figura 19) apresentou pico do íon molecular $M^{+\bullet}$ em *m/z* 446 Da. Apresentou ainda o pico base em *m/z* 181 devido à formação do íon $[ArCH_2]^+$ (Esquema 17, página 97) e um pico em *m/z* 224 que confere com um esqueleto constituído por duas unidades cinamílicas idênticas (Ar-CH=CH- CH-$^{+\cdot}$OH). Esses dados permitiram identificar a estrutura da substância **2** como (7*R*, 8*R*, 7'*R*, 8'*R*)-3,4,5-trimetóxi-3',4',5'-trimetóxi-8.8',7.O.9',7'.O.9-lignana, conhecida como diaiangambina e também isolada previamente de *Artemisia absinthium*. As configurações absolutas foram determinadas por comparação dos valores de rotação especificas das duas lignanas isoladas e as reportadas na literatura (Greger and Hofer, 1980).

Esquema 15. Proposta de da fragmentação de **1** no espectrômetro de massas



Esquema 16. Proposta de fragmentação de **2** no espectrômetro de massas

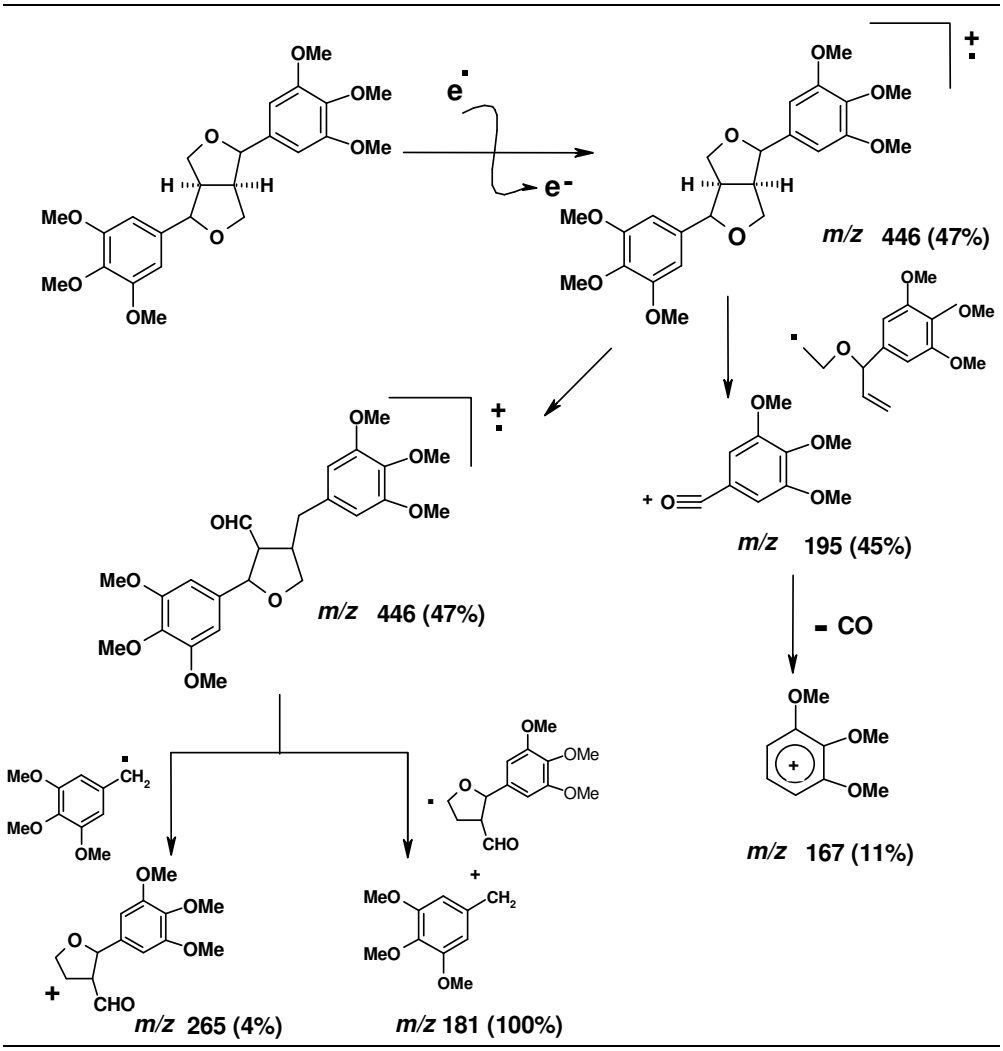
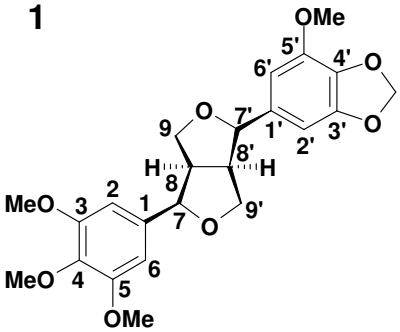
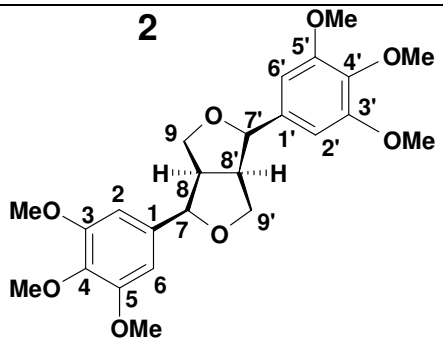


Tabela 17. Dados de RMN de ^{1}H (500 e 200 MHz, $CDCl_3$, TMS) para **1** e **2**

1 		**2** 	
Posição (C)	**δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)**	**Posição (C)**	**δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)**
1’	-	1/1’	-
2’	6,54 (s, 1H)	2/2’/6/6’	6,60 (s, 4H)
3’	-		
4’	-	3/3’/5/5’	-
5’’	-	4/4’	-
6’	6,57 (s, 1H)	7/7’	4,92 (d, 2H, *J* = 4,8 Hz)
7’	4,87 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz)	8/8’	3,20 (m, 2H)
8/8’	3,16 (m, 2H)	9	3,74 (m, 2H)
9’	3,56 (m, 2H)	9’	3,59 (m, 2H)
1	-	3/3’/5/5’-OCH_3	3,89 (s, 12H)
		4/4’-OCH_3	3,86 (s, 6H)
2/6	6,58 (s, 2H)		
3’5	-		
4	-		
7	4,89 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz)		
9	3,70 (m, 2H)		
OCH_2O	5,96 (s, 3H)		
5’-OCH_3	3,92 (s, 3H)		
4-OCH_3	3,84 (s, 3H)		
3/5-OCH_3	3,87 (s, 6H)		

4.1.2. Isobutilamidas aromáticas

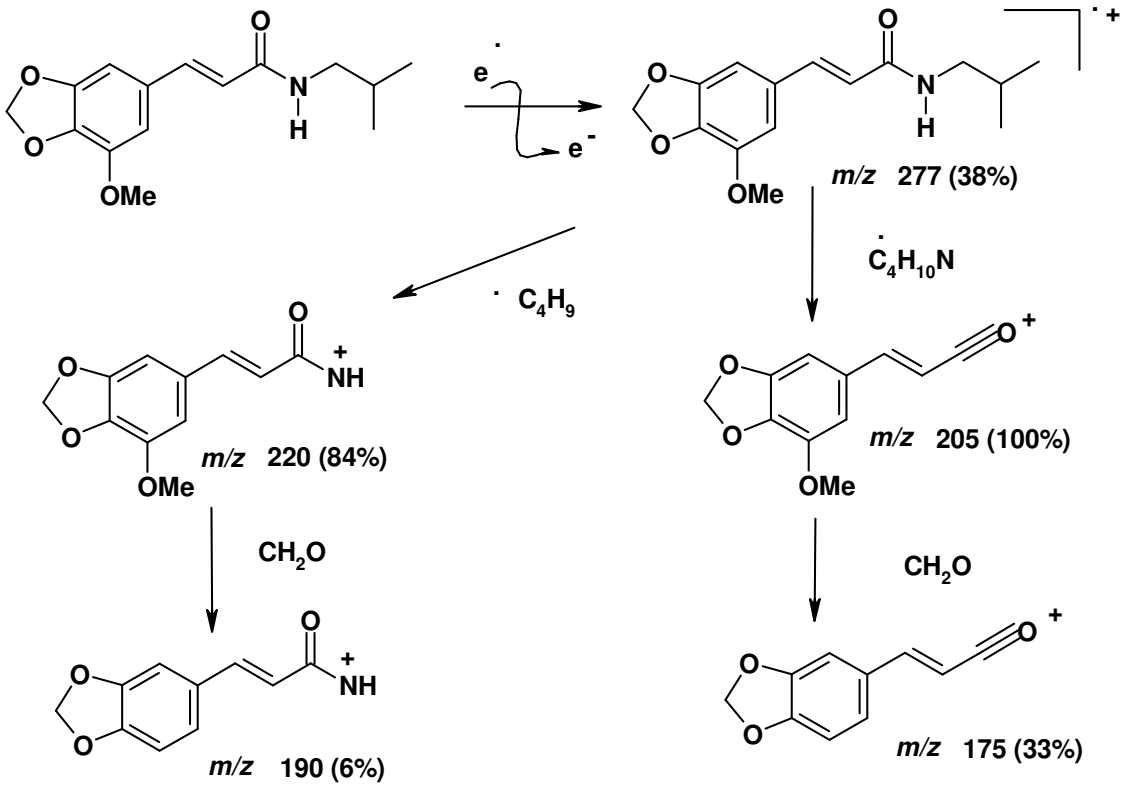
4.1.2.1. Isobutilamida aromática **3** e **4**

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **3** (Figura 22) apresentou dois grupos de sinais (Tabela 17, página 95). No primeiro, dois singletos aromáticos em δ 6,73 (s, 1H) e 6,68 (s, 1H), dois dubletos em δ 6,24 (d, 1H, *J*= 15,3 Hz) e 7,51 (d, 1H, *J*= 15,3 Hz); um singleto em δ 6,01 (s, 2H) referente a um grupamento metilenodióxi e outro singleto em δ 3,92 (s, 3H) referente a um grupamento metoxílico que sugeriram a presença de uma unidade cinamílica**.** O segundo grupo de sinais foi observado em δ 3,22 (t, 2H, *J*=6,2 e 6,2 Hz), 1,91-1,78 (m, 1H), 0,96 (d, 6H, *J*= 6,6 Hz) e 5,61 (sl, 1H) que possibilitou determinar a presença de uma isobutilamida em sua estrutura (Tabela 17, página 95). O espectro de massas (IE-EM) (Figura 21) apresentou o íon molecular $M^{+\bullet}$ em *m/z* 277 Da ($C_{15}H_{19}O_4N$), um pico base em *m/z* 205 devido à eliminação do radical $[C_4H_{10}N]^\bullet$ e outro em *m/z* 220 devido à eliminação do radical $[C_4H_9]^\bullet$ (Esquema 17, página 75), foram compatíveis com a estrutura de (2'*E*)-*N*-isobutil-3'-(5-metóxi-7,8-benzodioxol-1-il)acrilamida. Essa substância foi isolada de *Piper amalago* (Achenbach et al., 1986), para a qual havia descrito somente os dados de RMN de ^{1}H. Nesse trabalho, foram obtidos os dados de RMN de C^{13}/HMQC e HMBC (Figuras 23-26).

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **4** (Figura 28) apresentou sinais semelhantes aos apresentados por **3** (Tabela 17, página 97)**.** Um singleto aromático em δ 6,73 (s, 2H), sinais relativos ao sistema AB em δ 6,32 (d, 1H, *J*= 15,3 Hz) e 7,55 (d, 1H, *J*= 15,3 Hz) e dois singletos adicionais em δ 3,87 (3H) e 3,89 (6H) sugeriram uma sub-estrutura 3,4,5-trimetóxi-*trans*-cinamato. Sinais adicionais em δ

3,23 (t, 2H, *J*=6,6 e 6,2 Hz), 1,92-1,74 (m, 1H), 0,96 (d, 6H, *J*= 6,6 Hz) e 5,69 (sl, 1H) semelhantes aos apresentados por **3**, permitiram definir a estrutura como (2'*E*)-*N*-isobutil-3'-(3,4,5-trimetóxifenil) acrilamida. A substância apresentou no espectro de massas (IE-EM) (Figura 27) o pico relativo ao íon molecular [$M^{+\bullet}$] em *m/z* 293 Da, compatível com a fórmula $C_{16}H_{23}O_4N$, que associado aos íons fragmentários *m/z* 236, 221, 206, 193 e 163 (Esquema 17), permitiram identificá-la com uma amida previamente isolada de *P. amalago* (Achenbach et al., 1986).

Esquema 17. Proposta de fragmentação de **3** no espectrômetro de massas



Esquema 18. Proposta de fragmentação de **4** no espectrômetro de massas

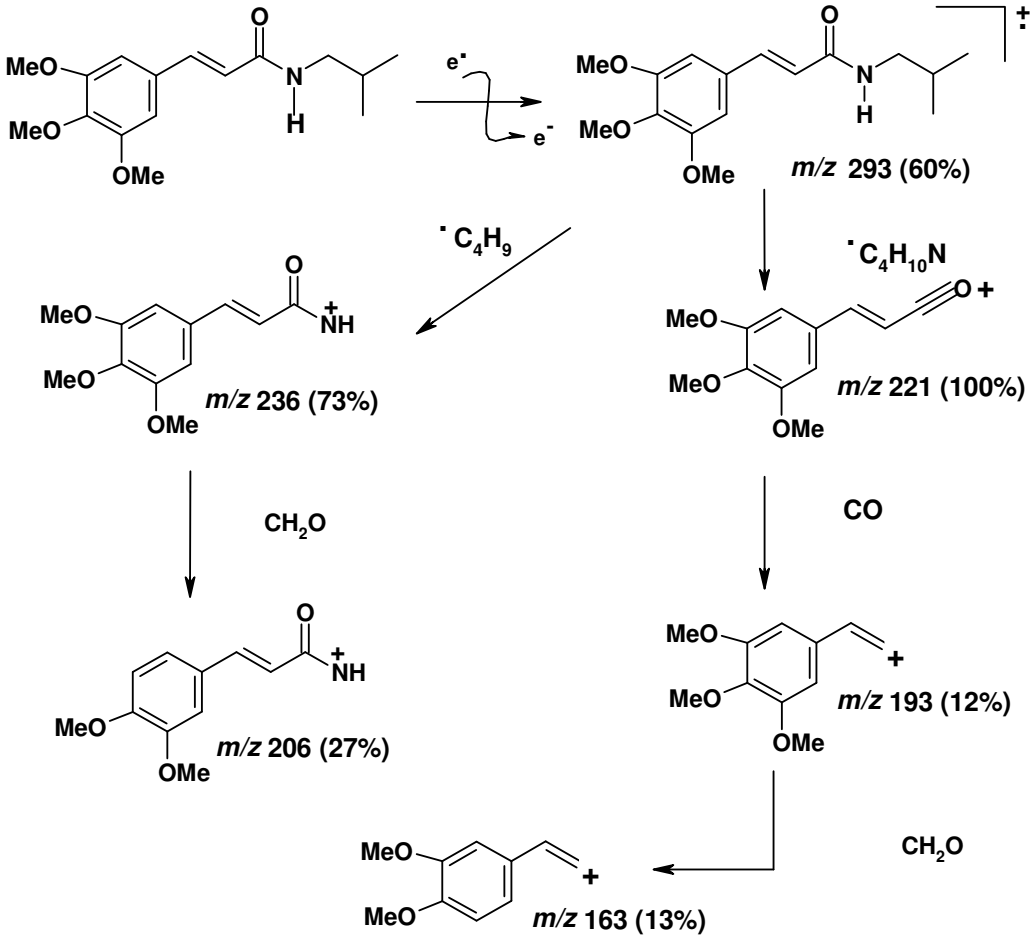
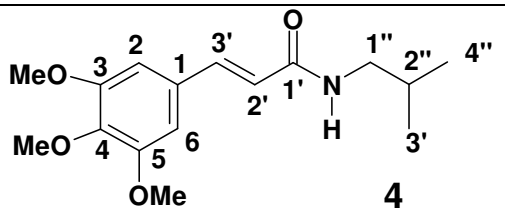
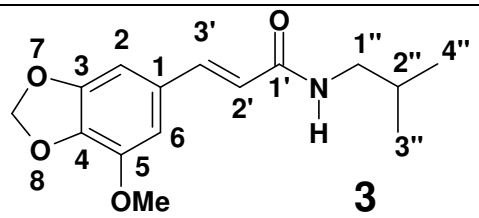


Tabela 18. Dados de RMN de ^{1}H de **4** (200 MHz), de ^{13}C (50 MHz) e de HMBC (500 e 125 MHz, $CDCl_3$, TMS) de **3**





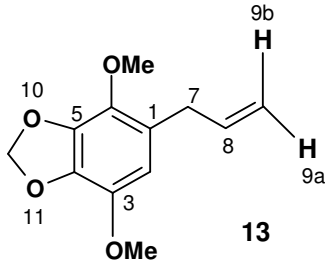
Posição (C)	δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)	Posição (C)	δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)	δ ^{13}C	HMBC (H→C)
1	-	1	-	129,55 (C)	-
2/6	6,73 (s, 2H)	2	6,73 (s, 1H)	100,70 (CH)*	C3, C4, C6, C3'
1'	-	3	-	149,12 (C)	-
2'	6,32 (d, 2H, *J*=15,3)	4	-	136,59 (C)	-
3'	7,55 (d, 2H, *J*=15,3)	5	-	143,49 (C)	-
1''	3,23 (t, 2H, *J*=6,6 e 6,2)	6	6,68 (s, 1H)	108,80 (CH) *	C2, C4, C5, C3'
2''	1,92-1,74 (m, 1H)	1'	-	165,85 (C)	-
3''/4''	0,96 (d, 6H, *J*=6,6)	2'	6,24 (d, 1H, *J*=15,3)	119,16 (CH) *	C1, C1'
N-H	5,72 (sl, 1H)	3'	7,51 (d, 1H, *J*=15,3)	140,72 (CH) *	C1'
3/5-OCH_3	3,89 (s, 6H)	1''	3,22 (t, 2H, *J*=6,2)	46,97 (CH_2) *	-
4-OCH_3	3,87 (s, 3H)	2''	1,91-1,78 (m, 1H)	28,50 (CH) *	-
		3''/4''	0,96 (d, 6H, *J*=6,6)	20,01 ($2CH_3$) *	C2''
		N-H	5,61 (sl, 1H)	-	-
		5-OCH_3	3,92 (s, 3H)	56,51 (CH_3) *	C5
		OCH_2O	6,01 (s, 2H)	101,72 (CH_2)*	C3, C4

*Multiplicidade obtida por RMN de ^{13}C/Dept 135° e HMQC (75 MHz, $CDCl_3$)

4.1.3. Fenilpropanóide 13

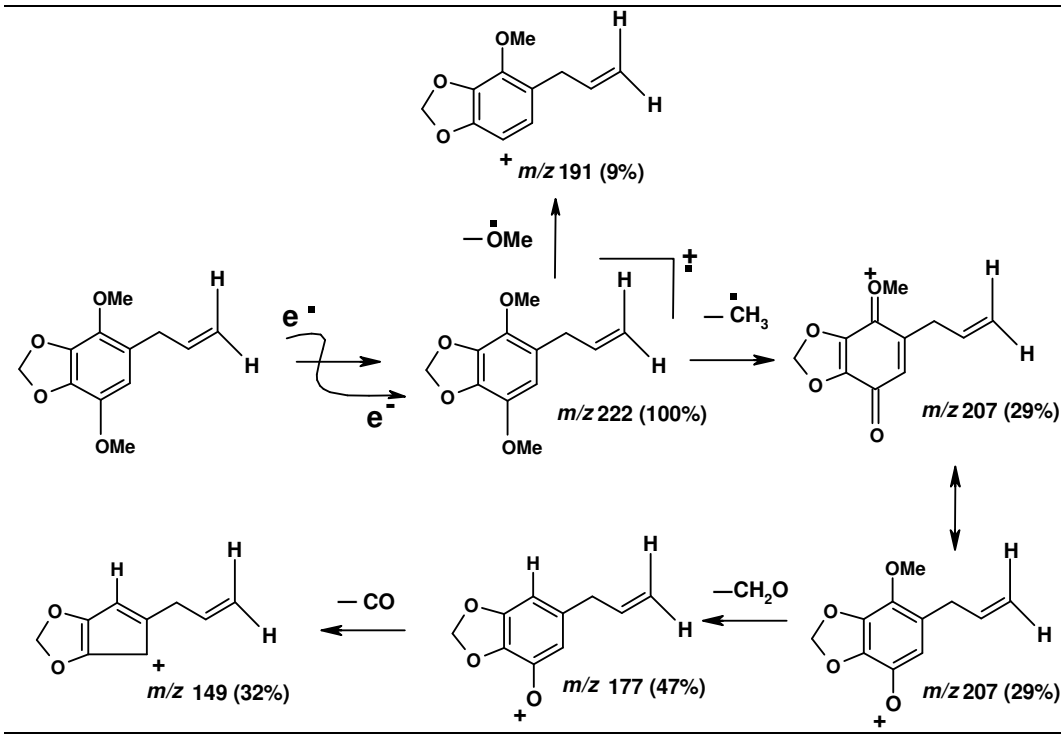
O espectro de RMN de ^{1}H da substância **13** (Figura 30) apresentou entre os sinais mais intensos, três singletos característicos de dois grupamentos metoxílicos em δ 3,76 (3H, s), 4,02 (3H, s); além de um metilenodioxifenílico em δ 5,89 (2H, s) (Tabela 19). Observou-se também um único singleto de hidrogênio aromático em δ 6,35, que associado aos sinais de hidrogênios alílicos e olefínicos em δ 5,89 (1H, m), 5,01 (1H, m) e 5,07 (1H, m) permitiram identificar a substância como sendo o fenilpropanóide apiol (1-alil-3,6-dimetóxi-10,11-benzodioxol) (Benevides et al., 1999). O pico relativo ao íon molecular [$M^{+\cdot}$] em *m/z* 222 Da (CG-EM) (Figura 29) e aos íons fragmentários m/z 177, m/z 165, 161, 91 e 77, corroboraram a identificação do apiol.

Tabela 19. Dados de RMN de ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS) de **13**



Posição (C)	δ^1H (multiplicidade, *J*/Hz)
2	6,35 (s, 1H)
7	3,31 (d, 2H, *J*=6,6 Hz)
8	5,89 (m, 1H)
9a	5,01 (m, 1H)
9b	5,07 (m, 1H)
3-OMe	3,76 (s, 3H)
6-OMe	4,02 (s, 3H)
OCH_2O	5,89 (s, 2H)

Esquema 19. Proposta de fragmentação de **13** no espectrômetro de massas



4.1.4. Derivados do ácido cinâmico

4.1.4.1. Derivados do ácido cinâmico **5** e **6**

O espectro de RMN de ^{1}H da mistura das substâncias **5** e **6** (Tabela 20, página 103), apresentou o mesmo padrão de sinais nos dois casos (Figura 33). Observaram-se singletos correspondentes a hidrogênios aromáticos de **5** e **6** em δ 6,75 (2H)/7,06 (2H) e sinais relativos ao sistema AB em δ 6,35 (d, 1H, *J*= 16,2 Hz) e 7,62 (d, 1H, *J*= 16,2 Hz) e o segundo sistema AB em δ 5,91 (d, 1H, *J*= 12,9 Hz)/6,82 (d, 1H, *J*= 12,9 Hz). Também foram observados singletos adicionais relativos a oito metoxilas entre δ 3,74 e 3,89 que permitiram determinar as substâncias como o (2*E*)-3'-(3,4,5-trimetóxifenil) acrilato de metila (**5**) e (2*Z*)-3-(3,4,5-trimetóxifenil) acrilato

de metila (**6**). Os espectros de massas (CG-EM) (Figura 31-32) das substâncias apresentaram o pico relativo ao íon molecular [$M^{+\bullet}$] em *m/z* 252 Da que associado aos íons fragmentários *m/z* 237, 221, 177 e 77, foram compatíveis com as estruturas sugeridas (Esquema 20, página 102).

Os dois isômeros foram isolados anteriormente de *Aragoa lucidula Blake* (Corothie and Ilija, 1975) e também obtidos por síntese (Settimj et al., 1976).

Esquema 20. Proposta de fragmentação dos derivados de ácido cinâmico **5** e **6** no espectrômetro de massas

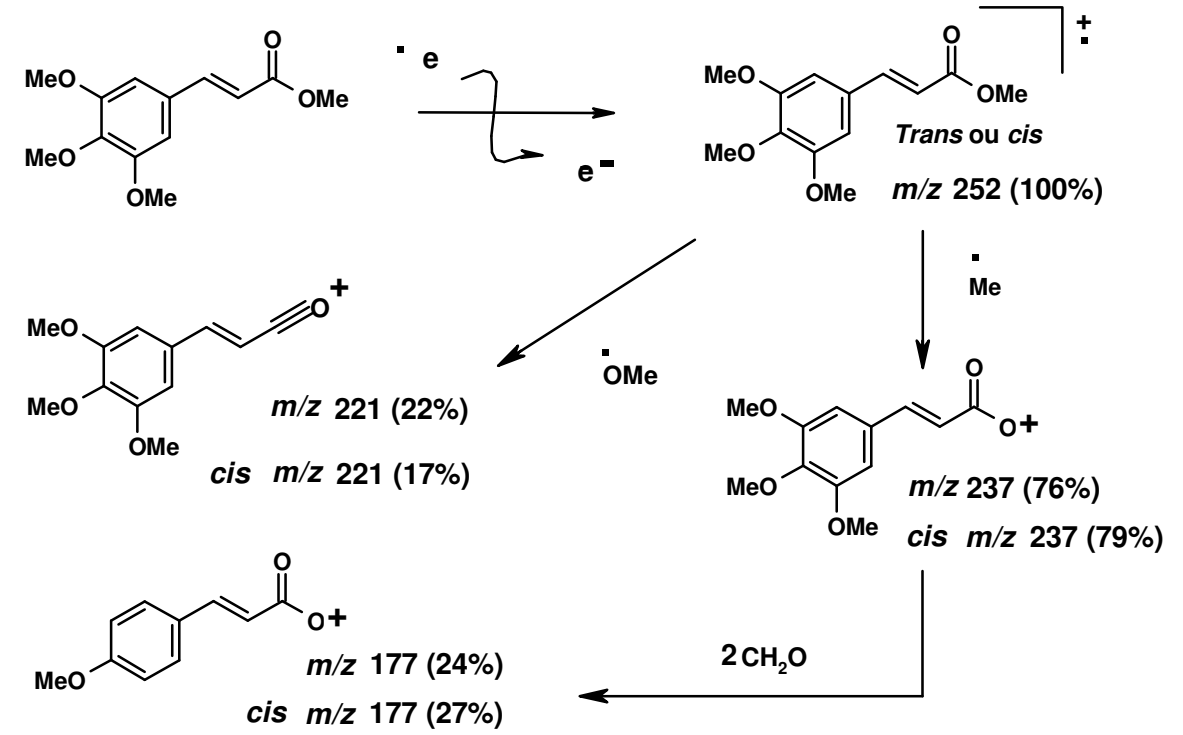
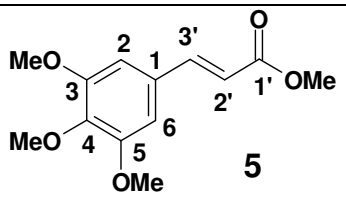
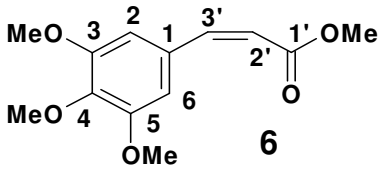


Tabela 20. Dados de RMN de ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS) para **5** e **6**

Posição (H)	 **5**	 **6**
	δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)	**δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)**
2/6	6,76 (s, 2H)	7,06 (s, 2H)
3/4/5-OCH_3	3,88 (s, 9H)	3,89 (s, 9H)
1'-OCH_3	3,81(s, 3H)	3,74 (s, 3H)
2'	6,35 (d, 1H, *J*=16,2)	5,91 (d, 1H, *J*=12,9)
3'	7,62 (d, 1H, *J*=16,2)	6,82 (d, 1H, *J*=12,9)

4.1.4.2. Derivado do ácido cinâmico **7**

O espectro de massas (IE-EM) (Figura 34) de **7** apresentou além do pico base em $M^{+\bullet}$ 236 Da, o pico em *m/z* 205 devido à eliminação do radical metoxílico e um pico em *m/z* 175 devido à saída consecutiva de uma molécula de CH_2O, correspondente à fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_5$ (Esquema 21, página 104).

O espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** (Figura 35) apresentou sinais em δ 6,68 (d, 1H, *J*= 1,2 Hz) e 6,63 (d, 1H, *J*= 1,2 Hz) sugerindo um acoplamento *meta* e sinais em δ 6,21 (d, 1H, *J*= 15,8 Hz) e 7,50 (d, 1H, *J*= 15,8 Hz) relativos ao sistema AB. Observaram-se também três singletos em δ 5,95 (2H), 3,86 (3H) e 3,73 (3H) (Tabela 20, página 103) que, devido à semelhança com àqueles apresentados pela substância **3**, sugeriram a presença de uma unidade cinamílica em **7**. Esses dados junto os obtidos no espectro de massas sugeriram a substância **7** como sendo (2'*E*)-3'-(5-metóxi-7,8-benzodioxol-1-il)acrilato de metila, substância tambem isolada de *P. tetraphylla* (Li et al., 2007)

Esquema 21. Proposta da fragmentação de **7** no espectrômetro de massas

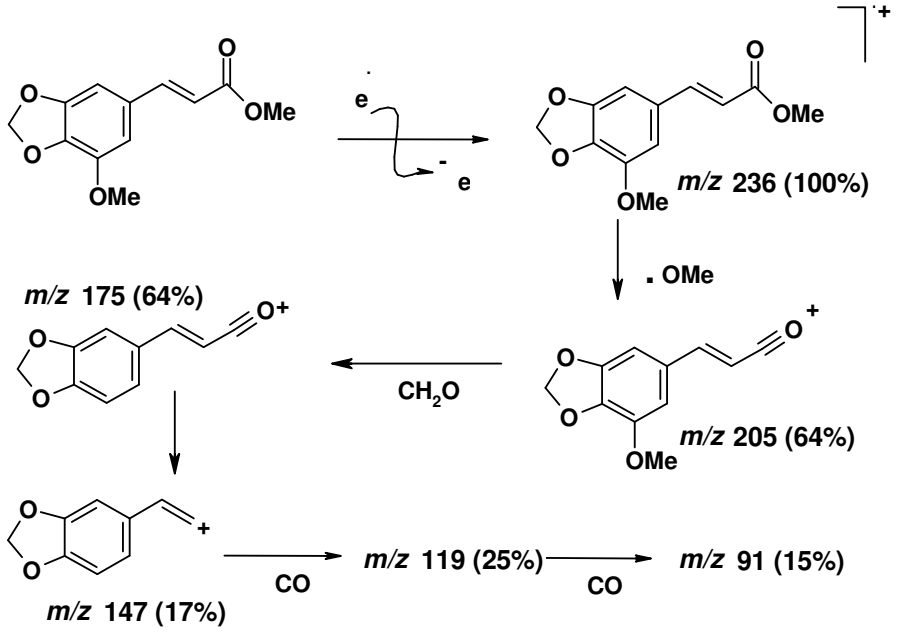
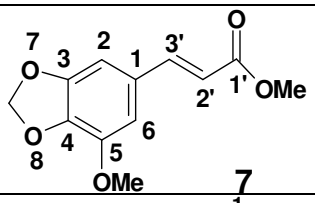


Tabela 21. Dados de RMN de ^{1}H de ^{13}C (200 e 50MHz, $CDCl_3$, TMS) de **7**



7

Posição (H)	**δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)**
2	6,68 (d, 1H, *J*= 1,2)
6	6,63 (d, 1H, *J*= 1,2)
5-OCH_3	3,86 (s, 3H)
2’	6,21 (d, 1H, *J*= 15,8)
3’	7,50 (d, 1H, *J*= 15,8)
1’-OCH_3	3,73 (s, 3H)
OCH_2O	5,95 (s, 2H)

4.1.5. Fenóis prenilados

4.1.5.1. Fenóis prenilados **11** e **12**

Os espectros de RMN de ^{1}H das substâncias **11** e **12** (Figura 37-38) apresentaram singletos correspondentes aos hidrogênios aromáticos em δ 6,23 (2H) e 6,26 (1H), respectivamente, indicando a presença de um anel aromático tetrasubstituido na estrutura de **11** e pentasubstituído na estrutura de **12** (Tabela 21, página 104). Os espectros apresentaram sinais semelhantes em δ 3,4 (d, 2H), 5,3 (t, 1H), 5,04-5,08 (m, 2H), 1,99 – 2,10 (m, 8H), e singletos de metílas em δ 1,59 (6CH_3), 1,67 (CH_3) e 1,81 (CH_3), sugerindo a presença de um substituinte farnesila (C_{15}) nas estruturas de **11** e **12**. Foram observados singletos adicionais correspondentes à grupos metílicos ligados a anel aromático em δ 2,20 e 2,52, respectivamente. As principais diferenças em seus espectros de RMN de ^{1}H referem-se à presença de uma hidroxila quelatada em δ 11,86 para **12**, portanto, em posição *orto* ao grupo carboxílico, enquanto que o espectro de **11** observa-se um hidrogênio aromático adicional à estrutura de **12**. Esses dados sugeriram as estruturas de **11** como sendo o 5-metil-2-[(2'*E*,6'*E*)-3',7',11'-trimetildodeca-2',6',10'-trien-1-il] benzeno-1,3-diol e, para **12**, o ácido 2,4-dihidróxi-6-metil-3-[(2'*E*,6*E*)-3',7',11'-trimetildodeca-2',6',10'-trien-1'-il] benzóico, isolados também de *Peperomia galioides* (Mahiou et al., 1995). O espectro de massas (IE-EM) de **11** (Figura 36) apresentou o pico molecular em M^+ *m/z* 328 Da compatível com a estrutura proposta. No caso do espectro de massas (IE-EM) (Figura 38) de **12**, ainda que não tenha sido possível observar o pico correspondente ao íon molecular em *m/z* 372, o espectro apresentou o íon fragmentário em *m/z* 328 ($[M-COO]^+$, que constitui-se em suporte para a proposta da

estrutura **12**. Ambos os espectros apresentaram picos comuns em *m/z* 191 [M-$C_{10}H_{17}$]$^{\bullet}$ e o pico base em *m/z* 137 [M-$C_{14}H_{23}$]$^{\bullet}$ (Esquema 22).

Esquema 22. Propostas de fragmentação de **11** e **12** no espectrômetro de massas

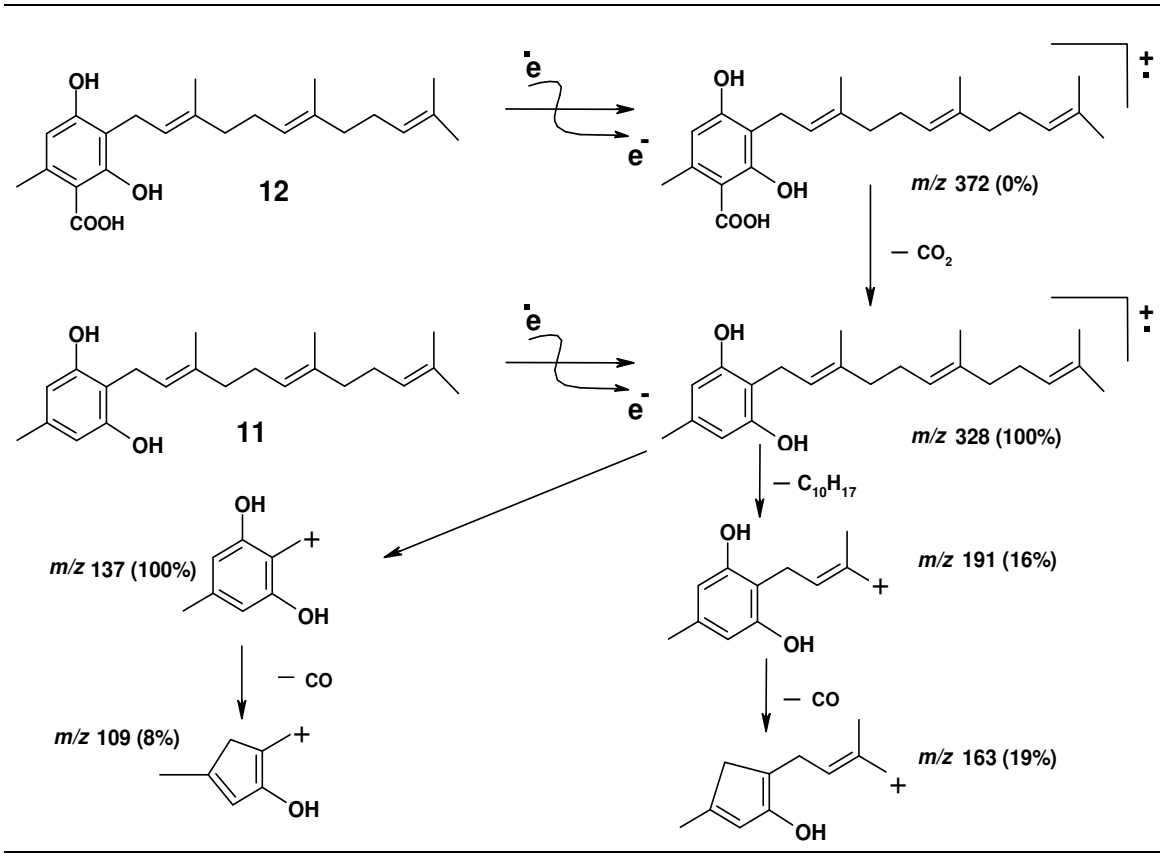
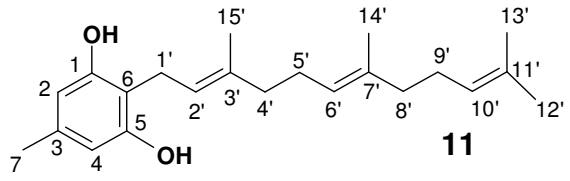
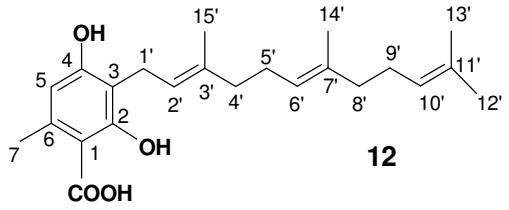


Tabela 22. Dados de RMN de ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS) de **11** e **12**

Posição	**δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)**	
1	-	-
2	6,23 (s, 2H)	-
4		-
3	-	
5	-	6,26 (s, 1H)
6	-	-
7	2,20 (s, 3H)	2,52 (s, 3H)
1’	3,38 (d, 2H, *J*=7,0)	3,42 (d, 2H, *J*= 7,0)
2’	5,26 (t, 1H, *J*=6,6 e 6,2)	5,27 (t, 1H, *J*=6,6 e 7,0)
3’	-	-
4’	1,99-2,07 (m, 8H)	1,99-2,08 (m, 8H)
5’		
8’		
9’		
7’	-	-
6’	5,08 (m, 2H)	5,04 (m, 2H)
10’		
11’	-	-
12’	1,67 (s, 3H)	1,67 (s, 3H)
13’	1,59 (s, 3H)	1,59 (s, 3H)
14’	1,59 (s, 3H)	1,59 (s, 3H)
15’	1,81 (s, 3H)	1,81 (s, 3H)
COOH	-	11,86 (s, 1H)

.

4.1.5.2. Fenóis prenilados **8** e **10**

O espectro de massas alta resolução (ESI-EM) de **8** apresentou o pico molecular $[M+ H]^+$ em *m/z* 329.2485 Da correspondente à fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_2$. O espectro de massas (IE-EM) (Figura 40) apresentou o pico molecular em $M^{+\bullet}$ 328 Da e picos adicionais em *m/z* 272 devido à saída sucessiva de $CH_2{=}CH_2$ e uma molécula de CO e em *m/z* 203, devido à saída sucessiva do radical $[C_5H_9]^\bullet$ (Esquema 23, página 109).

O espectro na região do IV da substância **8** (Figura 41) apresentou banda de absorção em 3.449 cm^{-1} atribuído a vibrações de deformação axial de O-H das hidroxilas livres, em 1.595-1.622 cm^{-1}/1.500-1.400 cm^{-1} características de deformação axial C-C do anel e bandas em 900 cm^{-1} relativo a deformação angular fora do plano das ligações C-H do anel aromático. Uma banda larga e intensa foi observada em 3.000-2.800 cm^{-1} atribuída à deformação axial C-H dos grupos CH, CH_2 e CH_3.

O espectro no UV de **8** (Figura 42) apresentou dois máximos de absorção em 208 (57.335) e em 283 nm (ε 3.384) (banda larga), indicativas de sistemas conjugados.

O espectro de RMN de ^1H da substância **8** (Figura 43) apresentou um singleto aromático em δ 6,26 (1H), um singleto aromático em δ 2,20 (3H) e um singleto largo em δ 5,38 (1H) atribuído a hidrogênio hidroxílico (Tabela 22, página 107). Sinais adicionais entre δ 1,58 - 5,25 e especialmente aqueles observados em 3,28 (d, 2H, *J*= 6,6) e 3,39 (d, 2H, *J*= 7,0) são indicativos característicos de unidades prenílicas de C_5 e C_{10} semelhantes àquelas apresentadas por [(2'*E*)-3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1'-il]-5-metil-2-(3''-metilbut-2'-en-1'-il) benzeno-1,3-diol. Essa substância, conhecida como piperogalina, foi anteriormente isolada de *Peperomia galioides* (Mahiou et al.,

1995). Todos os dados sugeriram que a substância **8** seria a piperogalina ou seu isômero. Nos espectros de RMN de ^{13}C e HMQC foram observados sinais correspondentes a 22 carbonos, sendo oito quaternários, quatro metínicos, quatro metilênicos e seis metílicos, concordantes com a natureza dos substituintes do anel aromático proposto (Figura 44-45). Não obstante, foram utilizadas correlações HMBC (Figura 46) para determinar o posicionamento dos mesmos em torno do anel aromático de **8** (Tabela 22, página 107). A análise desse espectro mostrou correlações do hidrogênio de um grupo hidroxílico (δ 5,38, sl, 1H) com C1, C2 e C3 permitindo definir esse grupo hidroxílico em C2. Correlações adicionais entre H1' com C1, C2, C6, C2', C3' e de H1'' com C2, C3, C2'', C3'', permitiram posicionar a prenila C_5 em C3 e a prenila C_{10} no C1. NOESY (Figura 47) mostrou esse posicionamento mostrando sinais entre o H1' e H7, H2', H8' e entre H7 e H5, H1'. Assim, a estrutura de **8** foi proposta como [(2'*E*)-3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1'-il]-6-metil-3-(3''-metilbut-2''-en-1''-il) benzeno-2,4-diol substância inédita, isômero da piperogalina.

Esquema 23. Proposta de fragmentação de **8** no espectrômetro de massas

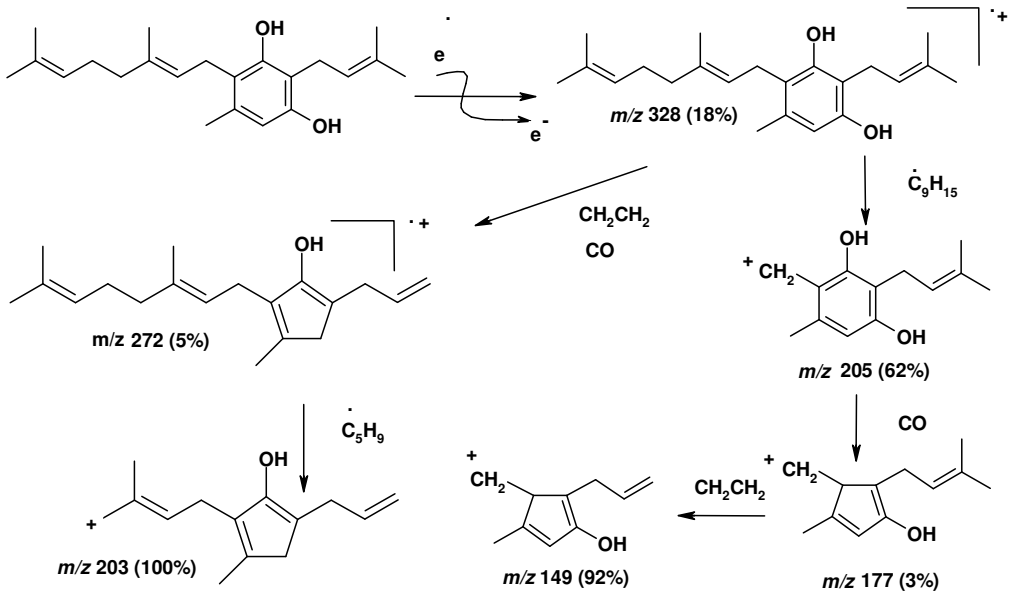
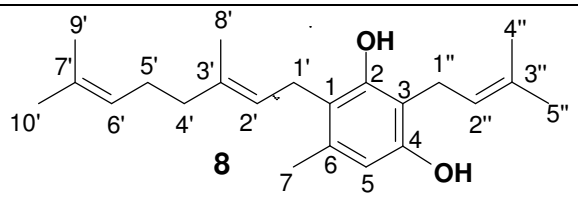


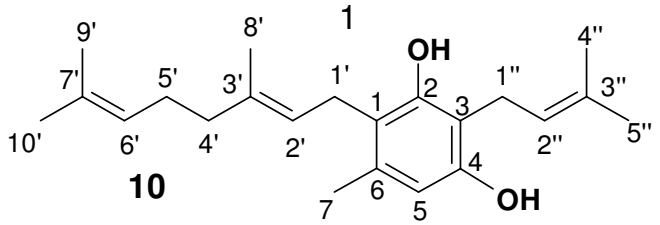
Tabela 23. Dados de RMN de ^{1}H, ^{13}C, HMBC e NOESY (500 e 125 MHz, $CDCl_3$, TMS) de **8**

Posição (C)				
	δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)	**δ ^{13}C**	**HMBC (H → C)**	**NOESY (H → H)**
1	-	118,01 (C)	-	-
2	-	153,47 (C)	-	-
3	-	111,57 (C)	-	-
4	-	152,64 (C)	-	-
5	6,26 (s, 1H)	109,74 (CH)*	C1, C3, C4,	H7
6	-	135,19 (C)	-	-
7	2,20 (s, 3H)	19,79 (CH_3)*	C1, C5, C6,C2	H5, H1’
1’	3,28 (d, 2H, *J*= 6,6)	25,62(CH_2)*	C1, C2, C6,	H7, H2’,H8’
2’	5,13 (tt, 1H, *J*= 7,0 e 6,6)	122,51 (CH)*	C1’,C4’, C8’	H1’,H4’
3’	-	137,49 (C)	-	-
4’	2,05 (m, 2H)	39,64 (CH_2)*	C2’, C3’, C5’,	H2’,H6’
5’	2,09 (m, 2H)	26,43 (CH_2)*	C3’, C4’, C6’,	-
6’	5,05 (m, 1H)	123,93 (CH)*	C9’,C10’	H4’,H10’
7’	-	131,78 (C)	-	-
8’	1,80 (d, 3H, *J*= 0,94)	16,12 (CH_3)*	C2’, C3’, C4’	H1’
9’	1,58 (s, 3H)	17,81 (CH_3)*	C6’, C7’, C10’	-
10’	1,67 (s, 3H)	25,69(CH3)*	C6’, C7’, C9’	H6’
1’’	3,39 (d, 2H, *J*= 7,0)	22,66 (CH_2)*	C3, C2, C2’’,	H2’’
2’’	5,25 (tt, 3H, *J*= 7,0 e 7,0)	122,18 (CH)*	C1’’	H1’’,H5’’
3’’	-	134,54 (C)	-	-
4’’	1,81 (s, 3H)	17,64(CH_3)*	C2’’, C3’’, C5’’	-
5’’	1,73 (s, 3H)	25,73 (CH3)*	C3’’	H2’’
C2-OH	5,38 (sl, 3H)	-	C1, C2, C3	-

*Correlação obtida por HMQC (300 e 75 MHz, $CDCl_3$)

O espectro de massas alta resolução (ESI-EM) de **10** apresentou o pico molecular [M^++ H] em *m/z* 329.2472 Da (Figura 48) correspondente à formula molecular $C_{22}H_{32}O_2$. O espectro de massas (IE-EM) apresentou além do pico molecular em M^+ 328 Da, picos em *m/z* 272 devido à saída sucessiva de CH_2CH_2 e uma molécula de CO e em *m/z* 203 devido a saída sucessiva do radical $[C_5H_9]^{\bullet}$ (Esquema 23, página 109). O espectro de RMN de ^{1}H da substância **10** (Figura 49) apresentou um singleto de hidrogênio aromático em 6,26 δ (1H), um singleto de metila aromática em δ 2,20 (3H) (Tabela 23, página 110). Foram ainda observados sinais adicionais entre δ 2,05 e 5,37 característicos de unidades prenílicas de C_5 e C_{10}. Esses dados sugeriram a estrutura de **10** como sendo a mesma substância **8**, isolada de *P. orephila*: [(2'*E*)-3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1'-il]-6-metil-3-(3''-metilbut-2'-en-1'-il) benzeno-2,4-diol. Foram obtidos dados adicionais de RMN de ^{13}C de **10** (Figura 50), que mostrou sinais correspondentes aos 22 carbonos, sendo oito quaternários, quatro metínicos, quatro metilênicos e seis metílicos. Um perfil próximo daqueles apresentados pela substância **8** isolada de *P. oreophila* (Tabela 23, página 110).

Tabela 24. Dados de RMN de ^{1}H, ^{13}C e HMBC (300 e 75 MHz, $CDCl_3$, TMS) de **10**

Posição (C)		
	δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)	**δ ^{13}C**
1	-	118,08 (C)
2	-	153,43 (C)
3	-	111,38 (C)
4	-	152,65 (C)
5	6,26 (s, 1H)	109,73(CH)*
6	-	135,21 (C)
7	2,20 (s, 3H)	19,77 (CH_3)*
1’	3,28 (d, 2H, *J*=6,6)	25,59 (CH_2)*
2’	5,13 (tt, 1H, *J*=7,0 e 6,6)	122,49 (CH)*
3’	-	137,51 (C)
4’	2,05 (m, 2H)	39,68 (CH_2)*
5’	2,09 (m, 2H)	26,40 (CH_2)*
6’	5,05 (m, 1H)	123,69(CH)*
7’	-	131,23 (C)
8’	1,80 (d, 3H, *J*=0,94)	16,01 (CH_3)*
9’	1,58 (s, 3H)	17,65 (CH_3)*
10’	1,67 (s, 3H)	25,65 (CH_3)*
1’’	3,39 (d, 2H, *J*=7,0)	22,68 (CH_2)*
2’’	5,25 (tt, 3H, *J*=7,0 e 7,0)	122,17
3’’	-	133,43(C)
4’’	1,81 (s, 3H)	17,65(CH_3)*
5’’	1,73 (s, 3H)	25,71 (CH_3)*

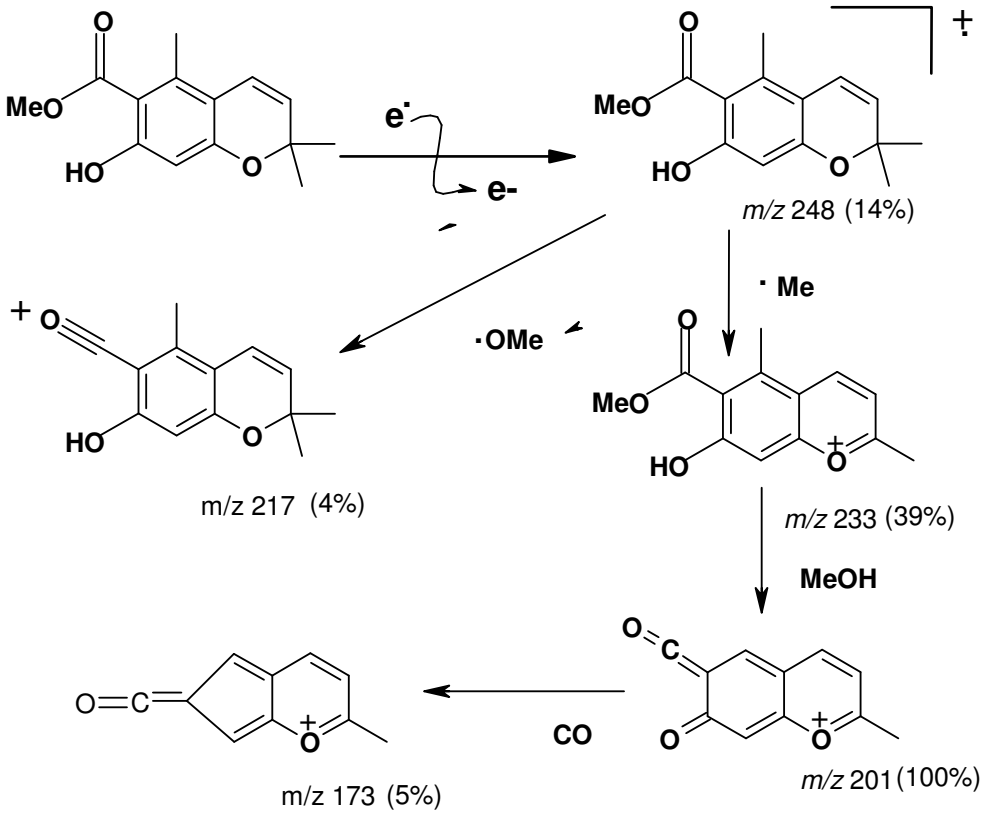
4.1.6. Cromenos

4.1.6.1. Cromenos **14** e **15**

Os espectros de RMN de ^{1}H das substâncias **14** e **15** (Figura 52 e 54) apresentaram sinais semelhantes relativos ao sistema AB em δ 5,6 (1H, d, *J* =10,0 Hz) e δ 6,5 (1H, d, *J* =10,0 Hz) que, associadas aos singletos relativos aos grupos *gem*-dimetílicos em δ 1,43 (6H) permitiram caracterizar o sistema 2,2-dimetil-2*H* cromeno (Baldoqui et al., 1999). Os espectros de RMN de ^{1}H das substâncias **13** e **14** apresentaram sinais correspondentes a um único hidrogênio aromático em δ 6,30 e 6,28, respectivamente, indicando a presença de um anel aromático pentassubstituído. Foram observados singletos adicionais correspondentes a grupos metílicos ligados a anel aromático em δ 2,48 e 2,20, respectivamente. As principais diferenças referem-se à presença de uma hidroxila quelatada em δ 11,43 no espectro de **13**. Portanto, em posição *orto* ao grupo carboxílico e, no caso de **14**, um sinal em δ 3,77, relativo a um grupo metoxílico (Tabela 25, página 114).

Os picos de seus íons moleculares (IE-EM) (Figura 51 e 53) em *m/z* 248 Da para **13 (**Esquema 24, página 114) e em *m/z* 262 Da para **14** (Esquema 25, página 92) permitiram determinar as estruturas de **14** como 7-hidróxi-2,2,5-trimetil-*2H*-cromeno-carboxilato de metila e **15** como 7-metóxi-2,2,5-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila, isoladas anteriormente de *Peperomia villipetiola* (Salazar et al., 2005).

Esquema 24. Proposta da fragmentação de **14** no espectrômetro de massas



Esquema 25. Proposta da fragmentação de **15** no espectrômetro de massas

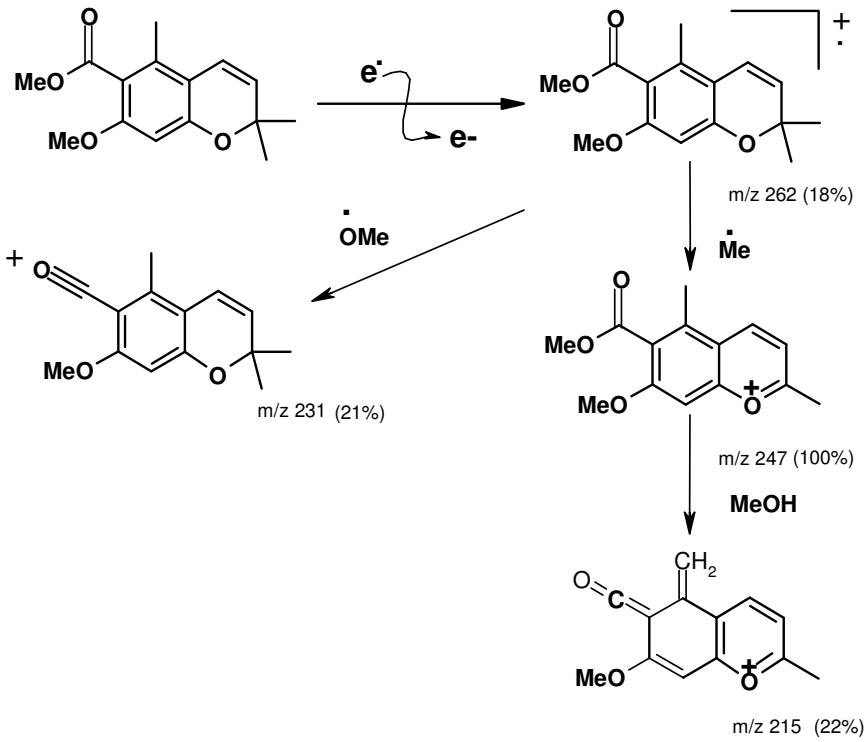
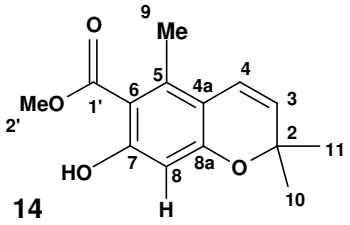
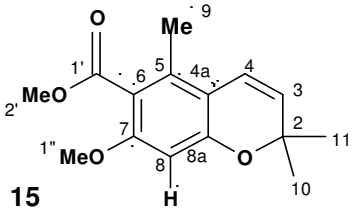


Tabela 25. Dados de RMN de ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS) de **14** e **15**

Posição (C)	 **14**	 **15**
	δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)	
2	-	-
3	5,61 (d, 1H, *J*=10,0)	5,55 (d, 1H, *J*=10,0)
4	6,56 (d, 1H, *J*=10,0)	6,45 (d, 1H, *J*=10,0)
4a	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	6,30 (s, 1H)	6,28 (s, 1H)
8a	-	-
9	2,48 (s, 3H)	2,20 (s, 3H)
10/11	1,41 (s, 6H)	1,41 (s, 6H)
1’	-	-
2’	3,93 (s, 3H)	3,89 (s, 3H)
1’’	-	3,77 (s, 3H)
5-OH	11,43 (s, 1H)	-

4.1.6.2. Cromeno **9**

O espectro de massas alta resolução (ESI-EM) de **9** apresentou o pico molecular $[M+ H]^+$ em *m/z* 327.2322 Da correspondente à fórmula molecular $C_{22}H_{30}O_2$. O espectro de massas (IE-EM) de **9** apresentou o pico molecular em $M^{+\bullet}$ *m/z* 326 Da (Figura 55), e picos em *m/z* 311 justificado pela eliminação de um radical metílico gerando um cátion estável, característico de um 2,2-dimetil-cromeno (Baldoqui et al., 1999). Observou-se ainda o íon fragmentário em *m/z* 203, devido à saída do radical C_9H_{15} e outro em *m/z* 243, devido à saída do radical $C_6H_{11}\cdot$ (Esquema 26, página 118).

O espectro na região do IV da substância **9** (Figura 56) apresentou bandas de absorção em 3.400 cm^{-1} que indicou um grupo hidroxílico na molécula e, em 1.615 cm^{-1}/1.454 cm^{-1} bandas características de deformação axial C-C de anel aromático e bandas em 832-726 cm^{-1} relativo à deformação angular fora do plano das ligações C-H do anel. O espectro apresentou ainda bandas referentes às vibrações do sistema C-O-C em 1.123 cm^{-1} do anel heterocíclico. Adicionalmente o espectro apresentou uma banda larga e intensa em 2.960-2.865 cm^{-1} atribuída à deformação axial C-H dos grupos CH, CH_2 e CH_3.

O espectro de RMN de ^1H da substância **9** (Figura 58), apresentou um singleto aromático δ 6,13 (s, 1H) e sinais relativos ao sistema AB em δ 6,57 (d, 1H, *J*= 10,0 Hz) e 5,52 (d, 1H, *J*= 10,0 Hz) que associadas aos grupos *gem*-dimetílicos em δ 1,39 (s, 6H) permitiram caracterizar o sistema 2,2-dimetil-2*H*-cromeno (Salazar et al., 2005). Também foram observados sinais em δ 5,05 (4H), 2,17 (s, 3H), 1,96 (m, 2H), 2,04 (m, 2H), três singletos metílicos em δ 1,56, 1,64, 1,75 e um único sinal em δ 3,23 (d, 2H, *J*= 6,9 Hz), que sugeriu o grupamento geranila como substituinte no anel aromático. Um sinal adicional em δ 2,17 (s, 3H) foi sugestivo de um grupo

metílico como o quarto substituinte do anel aromático. Esses dados em conjunto com os obtidos no espectro de massas e no infravermelho apontaram para o último substituinte como um grupo hidroxílico (Tabela 26, página 119).

Nos espectros de RMN de ^{13}C e HMQC (Figura 59-60) foram observados sinais correspondentes a 21 carbonos, sendo oito quaternários, quatro metínicos, quatro metilênicos e seis metílicos, sendo que um esses sinais corresponde aos grupamentos metílicos (2 CH_3) em δ 26,65, concordantes com os grupos presentes na estrutura proposta. Para determinar o posicionamento dos mesmos em torno do anel de **9** recorreu-se também aos dados de HMBC (Tabela 26, página 119). A análise desse espectro mostrou correlações entre o H6 e C4a, C5, C8 e C9, permitindo inferir seu posicionamento no carbono C6, de maneira similar o H9 foi definido no C9 em função das correlações com C6, C7 e C8 e o H1' no C1' que apresentou correlações com os C8, C8a, C7, C2' e C3'. O espectro NOESY confirmou esses posicionamentos mostrando correlações entre o H6 e o H9, e entre o H1' e os hidrogênios H9 e H10'. Deste modo, foi possível determinar **9** como sendo [(2'*E*)-3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1'-il]-2,2,7-trimetil-2*H*-cromen-5-ol. Cromeno previamente isolado de *Peperomia serpens* (Lago et al., 2006).

Esquema 26. Proposta de fragmentação de **9** no espectrômetro de massas

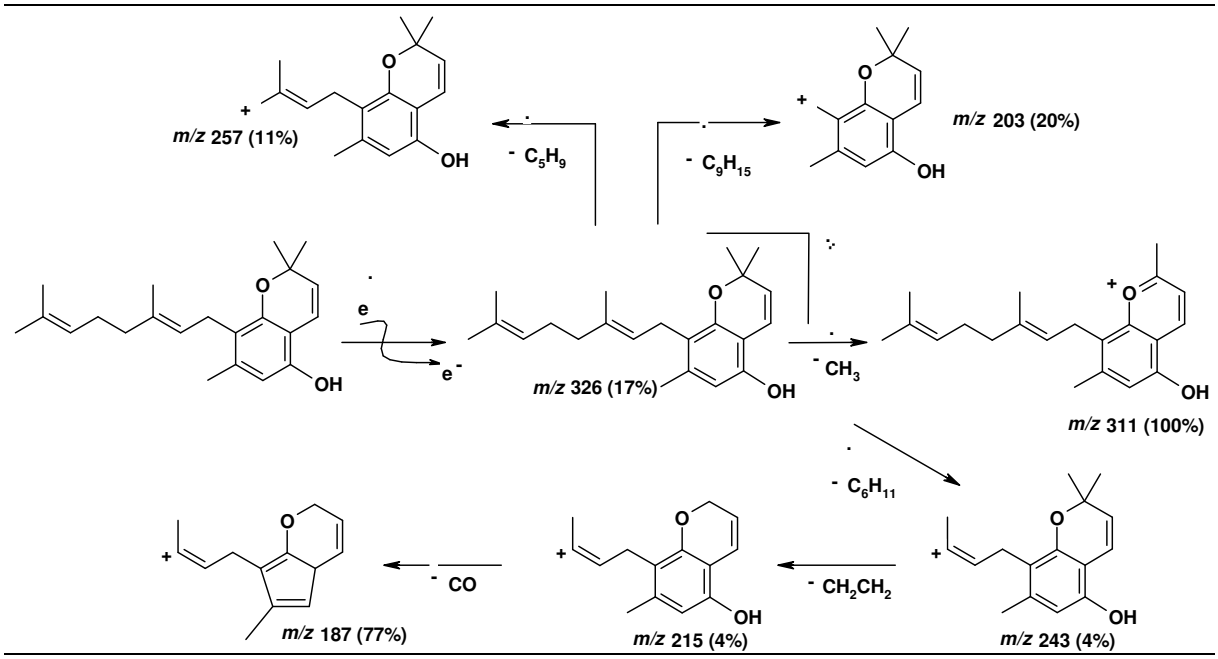
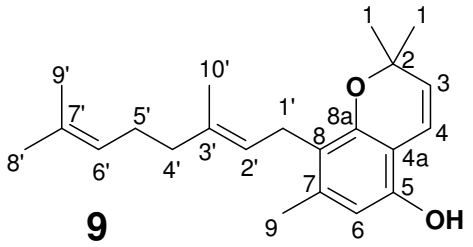


Tabela 26. Dados de RMN de ^{1}H, ^{13}C, HMBC e NOESY (500 e 125 MHz, $CDCl_3$, TMS) de **9**

Posição (C)	 **9**			
	δ ^{1}H (multiplicidade, *J*/Hz)	**δ ^{13}C**	**HMBC (H →C)**	**NOESY (H →H)**
1/1	1,39 (s, 6H)	27,65 ($2CH_3$)*	C3, C2, C1	H3
2	-	75,57 (C)	-	-
3	5,52 (d, 1H, *J*= 10,0)	128,14 (CH)*	C4a, C2, C1	H4, H1
4	6,57 (d, 1H, *J*= 10,0)	116,72 (CH)*	C8a, C4a, C5, C2, C1	H3
4a	-	107,30 (C)		-
5	-	148,87 (C)	-	-
6	6,13 (s, 1H)	109,03 (CH)*	C8, C4a, C5, C9	H9
7	-	137,67 (C)	-	-
8	-	120,58 (C)	-	-
8a	-	151,34 (C)	-	-
9	2,17 (s, 3H)	19,70 (CH_3)*	C8, C6, C7	H6, H1’
1’	3,23 (d, 2H,*J*=6,9)	24,51 (CH_2)*	C8, C8a, C7, C2’, C3’	H9, H10’
2’	5,05 (m, 2H)	123,10 (CH)*	C4’,C10’	H4’
6’		124,43 (CH)*	C4’,C8’,C9’	H8’
3’	-	134,00 (C)	-	-
4’	1,96 (m, 2H)	39,77 (CH_2)*	C2’, C3’, C5’, C10’	H6’
5’	2,04 (m, 2H)	26,69 (CH_2)*	C4’, C6’, C7’	H6’
7’	-	131,21 (C)	-	-
8’	1,64 (s, 3H)	25,64 (CH_3)*	C6’, C7’, C9’	H6’
9’	1,56 (s, 3H)	17,64 (CH_3)*	C6’, C7’, C8’	-
10’	1,75 (s, 3H)	16,16 (CH_3)*	C2’, C3’, C4’	H1’

*Correlação obtida por HMQC (300 e 75 MHz, $CDCl_3$)

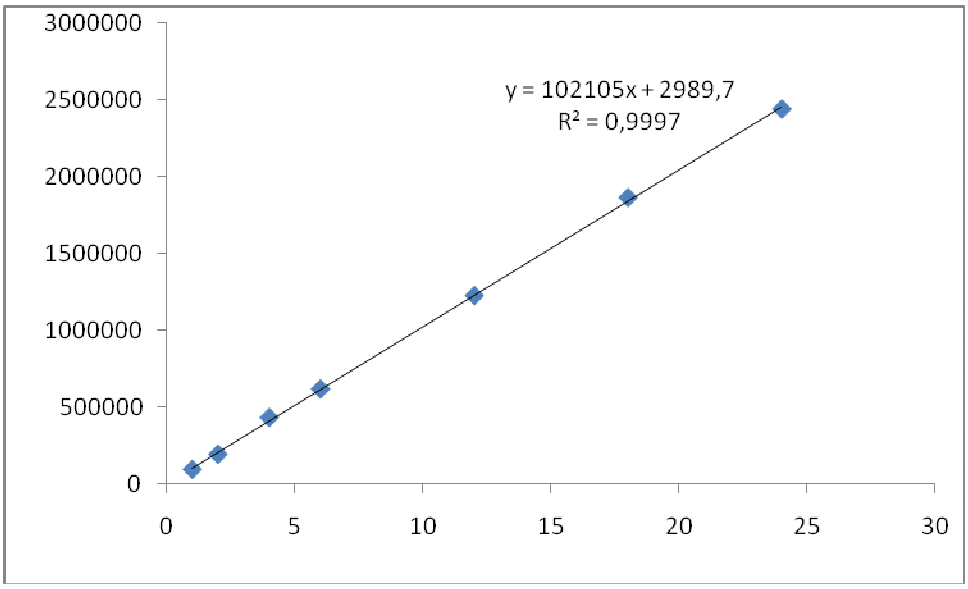
4.2. Biossíntese da acetofenona de folhas de *P. glabella*

4.2.1. Avaliação *in vitro* da atividade da enzima policetídeo sintase (PKS) em diferentes extratos enzimáticos das folhas de *Peperomia glabella*.

Inicialmente foram obtidos diversos extratos enzimáticos de folhas de *P. glabella* (Esquema 10, página 77) objetivando a detecção da atividade de PKS (Tabela 10, página 77). Na seqüência foram realizados os ensaios enzimáticos, e no final das reações as misturas reacionais foram submetidas à partição com EtOAc (3x300 uL), as fases orgânicas reunidas e concentradas, resuspendidas em 100 µL de MeOH e analisadas (20 µL) por CLAE com detecção em 288 nm. As áreas das médias dos controles foram subtraídas das médias das reações enzimáticas (Δ áreas). Essas diferenças foram quantificadas por interpolação na curva analítica (Esquema 27, página 121), os resultados encontram-se na tabela 27.

Tabela 27. Resultados dos ensaios enzimáticos

Extrato	Tampão de extração	PVPP	Δ áreas	Acetofenona formada (pmoles)
PVPP-SD	A	20% do peso do material vegetal	-	-
PVPP-D	A	20% do peso do material vegetal	-	-
A-SD	A	-	200517	990 (194ng)
A-D	A	-	-	-
B-SD	B	-	173706	850 (167ng)
B-D	B	-	-	-



Esquema 27. Curva analítica do padrão 2-hidróxi,4,6-dimetóxiacetofenona

Esses resultados mostraram ausência de atividade enzimática nos sobrenadantes dos extratos depois da dessalinização. De maneira similar o sobrenadante do extrato obtido utilizando-se PVPP na extração mostrou-se inativo, possivelmente em função do PVPP estar inativando as enzimas, semelhante a alguns casos descritos para PVP (Shaw and Lan, 1970). No entanto, os sobrenadantes dos extratos obtidos com tampão A ou B, sem dessalinização (A-SD, B-SD) (Esquema 10, página 77), resultou na formação da acetofenona desejada 2-hidróxi-4,6-dimetoxiacetofenona (**1**), indicando que o extrato bruto continha a atividade de policetideo sintase (PKS) e também de metil transferase (OMT). O produto foi identificado através de CLAE com detector UV-visível com arranjo de diodos, ESI-EM e comparação com o padrão (Figura 10 e 11, página 122).

Com a finalidade de se trabalhar com a metodologia mais simples e de melhor rendimento, embora sem grandes diferenças de rendimento produto, foi selecionado o extrato A-SD, cuja extração foi obtida com o tampão A (fosfato de potássio pH=7,5 e β-mercaptoetanol 2,5 mM) sem dessalinização.

Esses primeiros resultados sugeriram que o PKS presente no sobrenadante deve pertencer ao grupo de enzimas do tipo-chalcona sintase ("*CHS-like*") devido ao fato de realizar a biossíntese da acetofenona, cuja proposta biossintética envolve uma ciclização entre os carbonos C1 e C6, classificando-a nesse grupo (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2009; Austin and Noel, 2003). Permitiu também classificar a enzima OMT como pertencente ao grupo **1** de metioninas (Vogt et al., 2003), por não ser dependente de Mg^{2+} para que ocorra as metilações das hidroxilas da acetofenona.

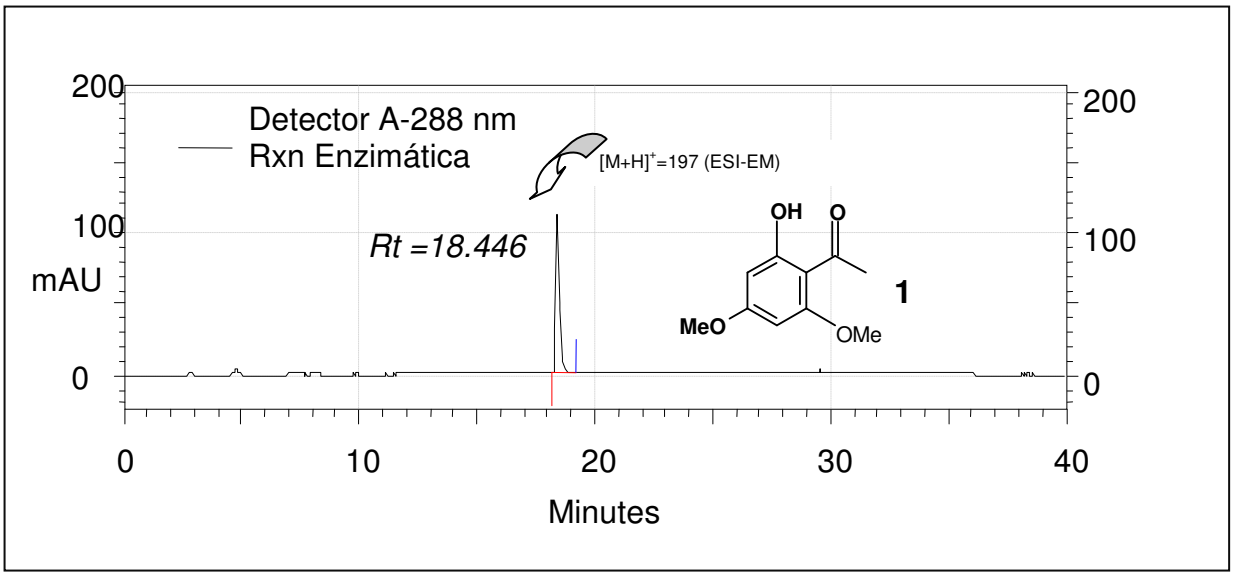


Figura 10. Cromatograma (CLAE) do produto de reação utilizando o extrato enzimático A-SD

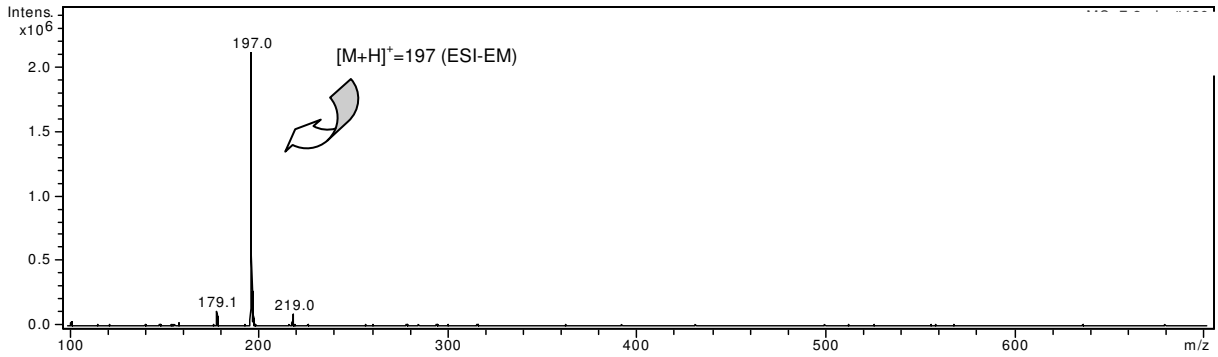
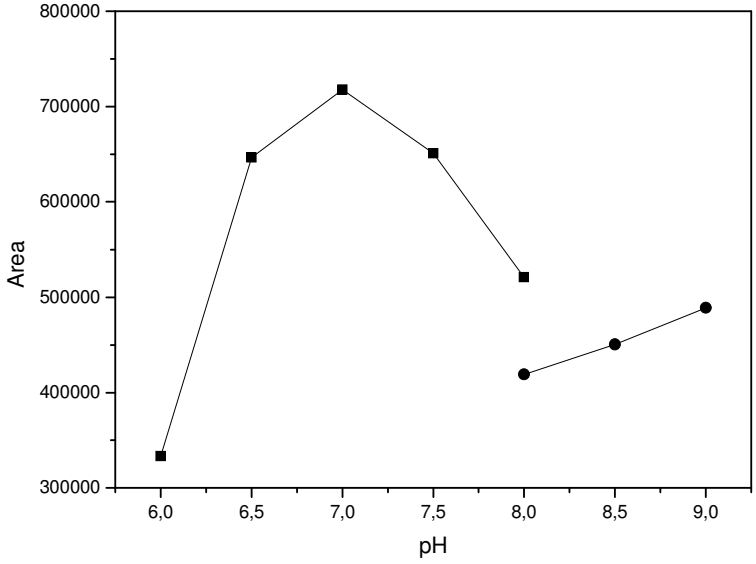


Figura 11. Espectro de massas (ESI-EM) da acetofenona formada como produto da reação enzimática

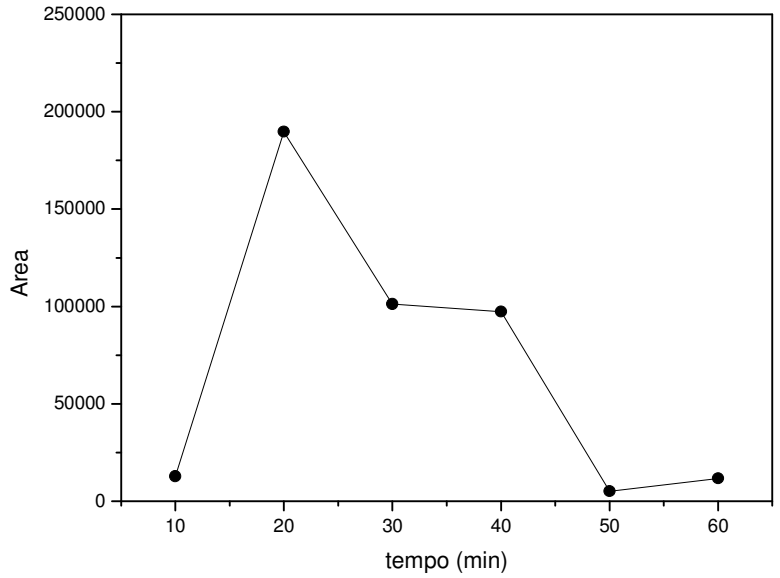
4.2.2. Otimização das condições da reação enzimática (pH, tempo, temperatura, e saturação dos substratos)

Foi determinado o pH ótimo em pH=7,0 (fosfato de potássio 0,1 M e β-mercaptoetanol 2,5 mM) o que sugere que neste pH as duas enzimas, policetídeo sintase e metiltransferase (Esquema 28), apresentam seus grupos ionizáveis na forma iônica apropriada, de tal maneira que conseguem manter a conformação do sítio ativo, ligar-se aos substratos e catalisar a reação. Portanto, é esperado que em outros pHs o declínio da atividade possa ser resultante da formação da forma iônica inapropriada da enzima ou por inativação da enzima ou combinação desses fatores.



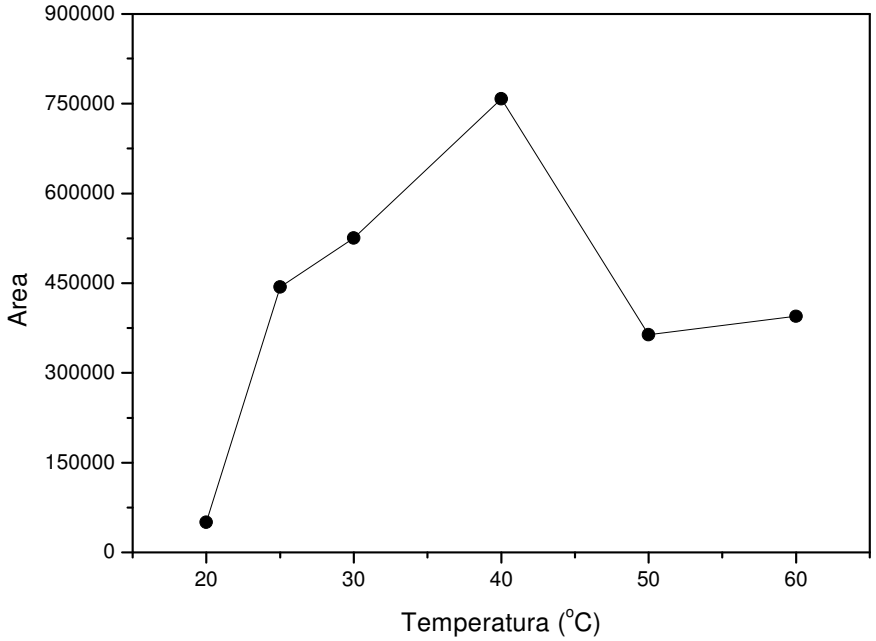
Esquema 28. Determinação do pH ótimo de reação enzimática (Fosfato de potássio pH=6,0 a 8,0 e Tris-HCl pH=8,0 a 9,0)

Do estudo dos tempos pré-determinados (10-60 min), obteve-se que o tempo ótimo da reação foi de 20 minutos e que, depois de 40 minutos, a concentração do acetofenona decai, eventualmente devido à degradação do produto formado (Esquema 29).



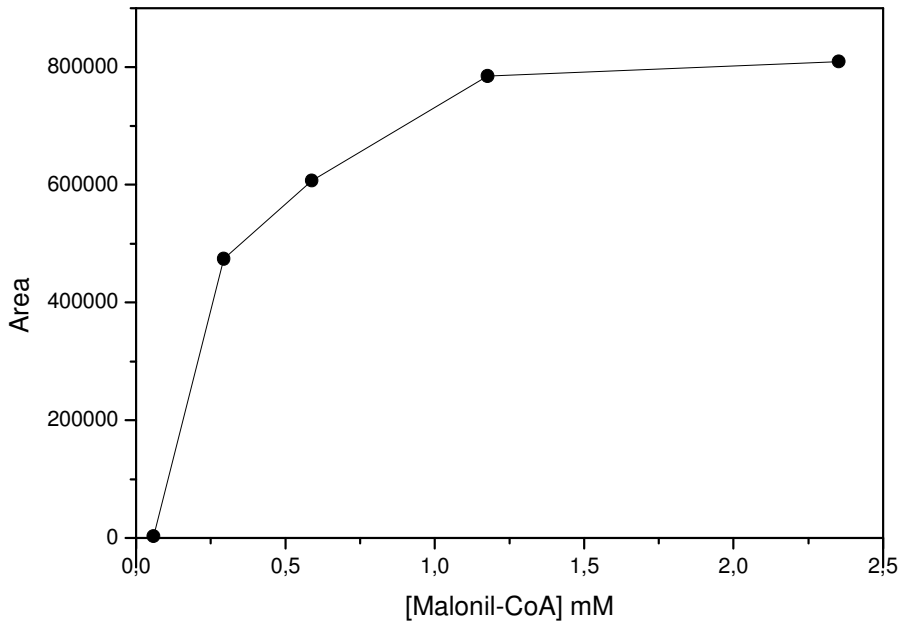
Esquema 29. Determinação do tempo ótimo de reação enzimática

O estudo do efeito da temperatura (20-60°C) mostrou um ótimo em 40°C, sendo que em temperaturas maiores observa-se um decaimento da produção do acetofenona (Esquema 30). O incremento de temperatura implica num aumento da energia cinética das moléculas dos reagentes, resultando num maior numero de colisões por unidade de tempo. No caso das reações enzimaticamente catalisadas, se observa também um comportamento semelhante, porém até um determinado ponto. Isso pode ser explicado ao fato de que as enzimas são complexas moléculas de proteínas. Sendo que seu sítio catalítico atua como resultado de uma precisa e alta organização de estruturas terciárias com específicos grupos R com a finalidade de formar o sítio estereoespecífico e o centro catalítico no qual vai se ligar o substrato. E tal estrutura terciária é mantida principalmente por ligações não covalentes fracas que podem ser desfeitas na medida do aumento da temperatura.



Esquema 30. Determinação da temperatura ótima de reação enzimática

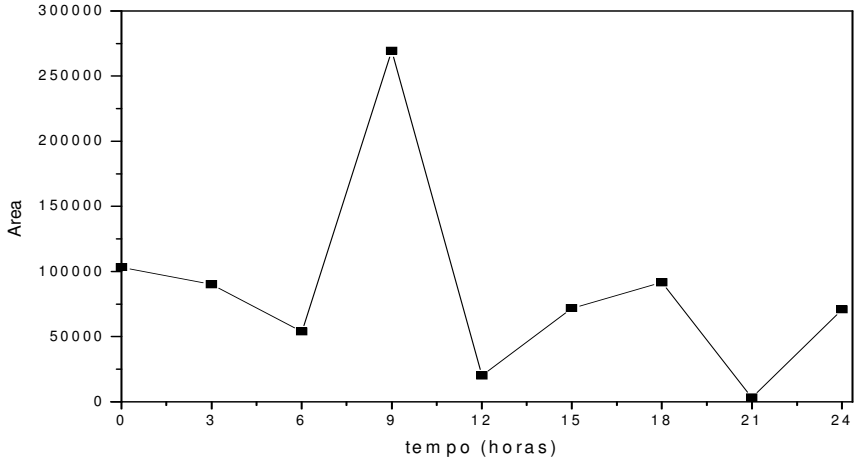
A variação das concentrações dos substratos acetil CoA e malonil CoA foi estudada (0,02 mM - 0,06 mM; 0,10 mM - 0,30 mM; 0,2 mM - 0,6 mM; 0,4 mM - 1,2 mM; 0,8mM - 2,4mM), resultando que em concentrações acima de 0,4 mM de acetato CoA e 1,2 mM de malonil CoA não há incremento significativo na formação do produto (Esquema 31). O que sugere que na região estudada, as concentrações que fornecem um máximo de produto são 0,4 mM de acetato CoA e 1,2 mM de malonil CoA. Porém, para o estudo de outros ótimos do ensaio enzimático deve-se selecionar concentrações menores para observar as possíveis variações.



Esquema 31. Determinação da concentração da saturação dos substratos na enzima

4.2.3. Estudo da variação circadiana da atividade de PKSs

O estudo do horário de maior expressão das duas enzimas envolvidas na biossíntese de acetofenona em *Peperomia glabella* mostrou que a maior expressão das enzimas policetídeo sintase e metiltransferase ocorrem em torno das 9 horas da manhã (Esquema 32). A quantificação do 2-hidróxi-4,6-dimetóxiacetofenona nas suas folhas mostrou uma maior produção de fenóis às 9 horas da manhã, coincidindo com o horário de maior expressão de enzimas (Esquema 33).



Esquema 32. Determinação do horário ótimo de coleta de maior atividade enzimática para a formação de 2-hidróxi-4,6-dimetóxiacetofenona em *P. glabella*

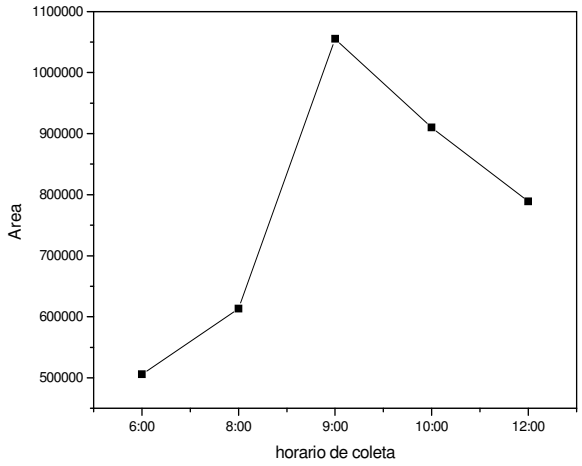


Figura 33. Variação da formação de 2-hidróxi-4,6-dimetóxiacetofenona entre 6:00-12:00 h em *P. glabella*

4.3. Estudo de genes PKSs

4.3.1. Amplificação das regiões alvo utilizando a reação em cadeia de polimerase (PCR) com os iniciadores LC1 e LC2c

Nesta etapa os estudos de amplificação da região KS através de PCR foram realizadas com os ADNs de *P. urocarpa, P. serpens* e *P.glabella* utilizando o método da tabela 13 (página 66). Foi obtida apenas uma banda com um tamanho de aproximadamente 700 pb com *P. glabella* (Figura 12), que não foi passível de reprodução nos experimentos seguintes sob as mesmas condições. Esse primeiro resultado não é indicativo que as outras espécies de *Peperomia* não apresentem regiões KS homólogas às presentes nos genes PKS de fungos envolvidos na síntese de policetídeos não reduzidos.

Foram realizados estudos utilizando-se várias reações em cadeia da polimerase com os iniciadores LC1/LC2c, com o objetivo de otimizar o método de amplificação. Foram consideradas diferentes temperaturas de anelamento em 45, 48, 50, 53, 55, 58 e 60℃, variações no número de ciclos, bem como diferentes concentrações de DNA (100 ng, 200 ng, 500 ng e 1000 ng). Não entanto, tais experimentos não resultaram na observação de bandas esperadas entre 700 e 800 pb. Como controle positivo foi utilizado o fungo endofítico *Aspergillus terreus*, para o qual foram constatadas as amplificações em todas as temperaturas utilizadas no termociclador. O controle negativo foi constituido por H_2O ao invés de ADN. Esses resultados mostraram que não foi possível a otimização da reação de amplificação muito possivelmente em função da natureza dos iniciadores que não foram os mais adequados na prospecção em espécies de *Peperomias*.

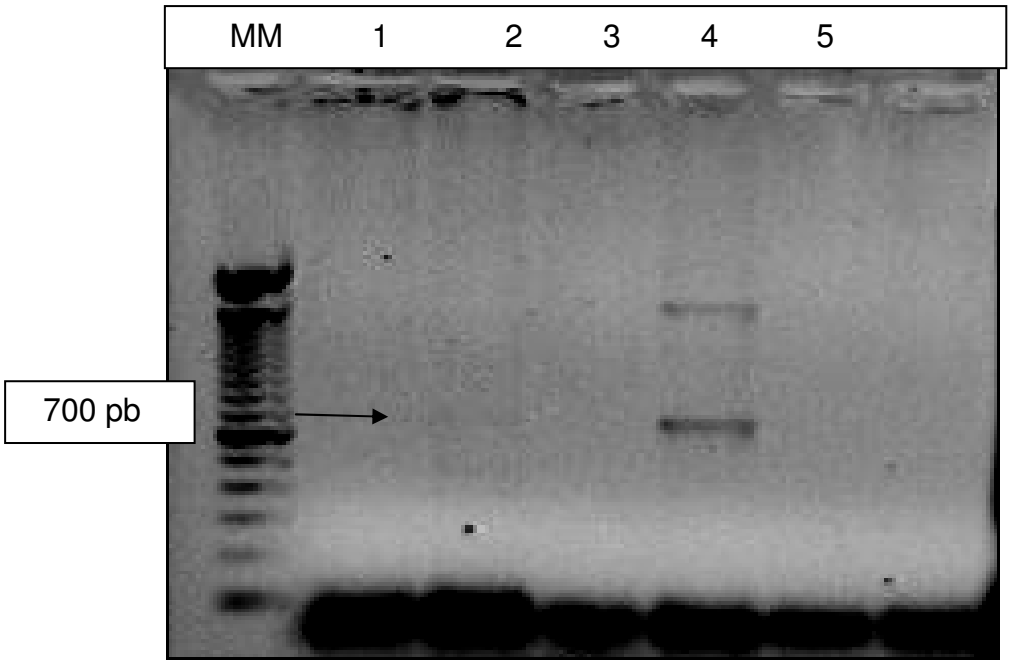


Figura 12. Produtos de PCR utilizando iniciadores Lc1 e LC2c, sendo 1= *P. urocarpa, 2= P. glabella, 3= P. arifolia, 4*=controle positivo, 5 =controle negativo

4.3.2. Amplificação das regiões alvo utilizando a reação em cadeia de polimerase (PCR) com os iniciadores AOR1 e AOR2

Para o estudo de amplificação das regiões KS através de PCR, um segundo par de iniciadores AOR1/AOR2 foi utilizado. Devido ao fato desse par de iniciadores ser inédito, foi necessário otimizar as condições da reação de cadeia em polimerase em todas as etapas. Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (45-60°C) (Figura 2), concentrações de $MgCl_2$ (de 0,5 em 0,5 mM, de 3,0 - 6,0 mM) e também as concentrações dos iniciadores (0,5 - 1,2 mM), ADN (100 ng - 1000 ng). O único resultado foi obtido somente para *P. urocarpa* (Figura 13) com temperatura de anelamento de 56°C, uma banda com tamanho aproximado de 800 pb e bandas

inespecíficas a temperaturas inferiores. Essa amplificação também não foi reproduzida nos seguintes experimentos e sob condições otimizadas.

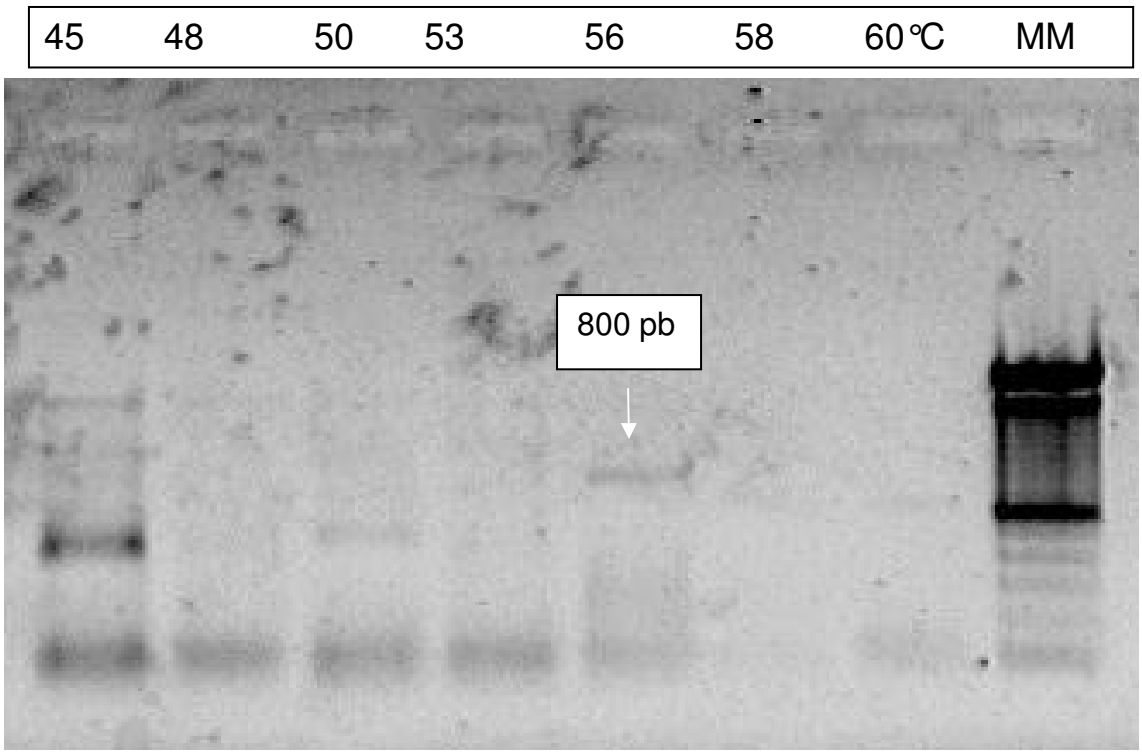


Figura 13. Produtos do PCR a diferentes temperaturas utilizando ADN *P. urocarpa* e os iniciadores AOR1/AOR2 (MM=marcador molecular 100pb)

4.3.3 Amplificação das regiões alvo utilizando a reação em cadeia de polimerase (PCR) com os iniciadores AOS1 e AOS2

O terceiro par de iniciadores foi desenhado a partir de alinhamento da região KS de AviM de *Streptomyces viridochromogenes* e proteínas de sete plantas superiores com maior similaridade na suas seqüências protéicas no BLAST. Essa escolha foi feita com o intuito de se obter um par de iniciadores mais próximos dos moldes alvo de plantas superiores. A diferença dos outros dois pares de iniciadores baseados exclusivamente em seqüências de fungos e bactérias.

De maneira semelhante aos casos anteriores foram obtidos os ADNs genômicos. No entanto, desta vez foram extraídas nove espécies de Peperomias, exceto de *P. orephila* (Tabela 1, página 26), incluindo os ADNs de P. *urocarpa, P. glabella e P. arifolia* (Figura 14).

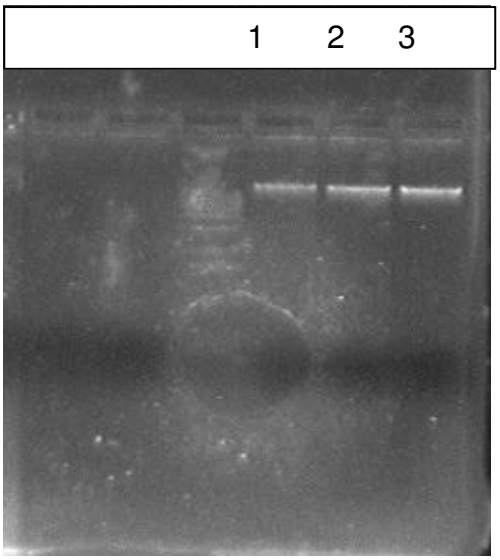


Figura 14. ADNs genômicos de *Peperomia urocarpa* (1), *P. glabella* (2) e *P. arifolia* (3)

De maneira semelhante aos estudos anteriores, iniciou-se os estudos de otimização de temperatura de anelamento entre 52 a 65 ºC, com acréscimos de 2 ºC, porém sem nenhuma amplificação ou arraste de (''smear''). Decidiu-se então utilizar várias temperaturas decrescentes de anelamento numa mesma reação, conhecido como *"touch down",* utilizada no caso de não se conhecer a temperatura de anelamento dos iniciadores. Foi também estudada a concentração ótima de $MgCl_2$ (3,9 mM até 5,9 mM), quantidade de ADN por reação (500, 750, 1000 e 2000 ng), concentração de iniciadores (0,5; 0,8; 1,0 e 1,5 µM), unidades de enzima por reação (0,5; 0,8; 1,0 e 1,2 U), concentração de dntps (0,2; 0,5 e 1,0 µM). As melhores condições para amplificação foi o intervalo de temperatura de *"touch down"*

de 65-55 ºC, [$MgCl_2$]=5,5 mM, 750 ng de ADN genômico, [Iniciadores]=1 µM, 1U de enzima taq e [dntps]=0,5 µM.

As amplificações realizadas em condições otimizadas resultaram na obtenção de três bandas em nove Peperomias estudadas.

Segundo o marcador de massa molecular de 100 pb utilizado, as bandas apresentam um tamanho aproximado de 400, 550 e 750 pb (Figura 15).

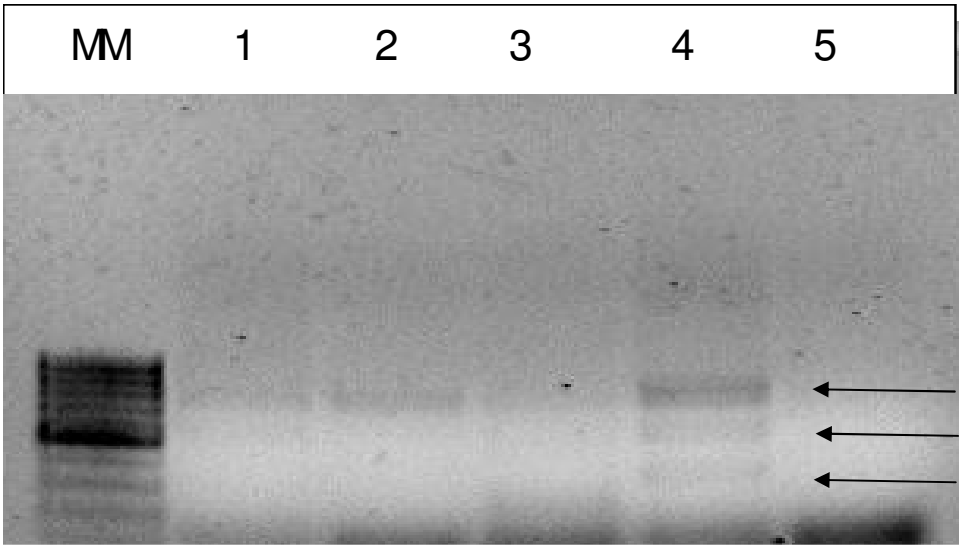


Figura 15. Amplificações utilizando como molde ADNs genômicos de *Peperomia urocarpa* (1), *P. glabella* (2), *P. arifolia* (3), *P. nítida* (4) e controle negativo (5)

Considerando-se que era esperada a amplificação de uma banda entre 700 e 800 pb em função do tamanho da região KS de AviM de *Streptomyces viridochromogenes*, a banda de aproximadamente 750 pb poderia ser uma amplificação relativa a uma PKS das Peperomias estudadas, sendo necessário o seu seqüenciamento para confirmação. Especulativamente, as duas outras bandas poderiam também ser provenientes de genes contendo regiões para condensação aldólica e alongamento de cadeias carbônicas.

Posteriormente, as três bandas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,2%) preparativa e purificadas individualmente com o KIT de purificação. As frações foram submetidas à nova amplificação (Esquema 14, tabela 16, página 90) com a finalidade de aumentar o rendimento da banda para seqüenciamento. Entretanto, na segunda purificação foi observada a degradação das bandas. Dessa forma, outros métodos de purificação deverão ser testados.

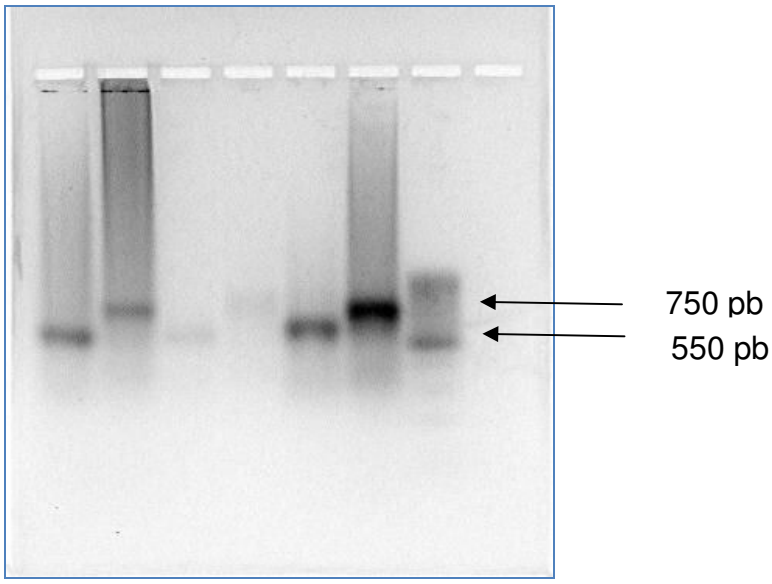


Figura 16. Bandas de 550 e 750 pb purificadas

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os estudos fitoquímicos realizados com extratos das espécies *Peperomia oreophila, P. arifolia, P. urocarpa* e *P. nitida* resultaram no isolamento de duas lignanas (**1-2**), duas isobutilamidas aromáticas (**3-4**), três derivados de ácido cinâmico (**5-7**), um fenilpropanoide (**13**), três fenóis diprenilados (**8, 10-12**), quatro cromenos (**9**, **14-15**). Sendo inéditas a substância [(2'*E*)-3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1'-il]-6-metil-3-(3''-metilbut-2''-en-1''-il) benzeno-2,4-diol (**8**/**10**)

De uma forma geral, os extratos dessas espécies apresentaram-se relativamente complexos, especialmente no caso de *P. oreophila*, cuja variedade de classes de metabólitos secundários não seria adequada para estudos biossintéticos. Assim sendo, a espécie *Peperomia glabella*, cuja composição de metabólitos baseada em uma acetofenona, foi selecionada para estudos biossintéticos. Uma racionalização de sua biossíntese indicou que sua natureza era policetídica e, tendo a espécie disponível, foram realizados diversos experimentos em condições de conversões in vitro, no qual foi possível observar a formação da acetofenona. A fração solúvel dos extratos enzimáticos das folhas demonstrou a atividade de policetideo sintase (PKS) e também de O-metiltransferase (OMT). Essa PKS deve pertencer ao grupo de enzimas do tipo-chalcona sintase ("*CHS-like*") e a enzima OMT ao grupo **1** de metioninas.

Em função do desconhecimento sobre as características da PKS de *Peperomias*, foi realizado um estudo de possíveis fatores que controlam a biossíntese da acetofenona. Uma primeira abordagem envolveu o estudo da variação circadiana da atividade de PKS, sendo que o horário de maior expressão

das enzimas foi as 9 h da manhã. A quantificação do teor de acetofenona nas folhas foi concordante com o horário de maior expressão de enzima.

O estudo de genes de PKSs não resultou em amplificação das regiões KSs utilizando os iniciadores LC1/LC2c e AOR1/AOR2. Tal fato não indica necessariamente que espécies de *Peperomia* não apresentam as regiões KS homólogas aos presentes nos genes PKS de fungos ou de bactérias que produzam policetídeos. È possível que o desenho dos iniciadores não tenha sido adequado para essas amplificações. O estudo de regiões KSs realizado com os iniciadores AOS1/AOS2 em espécies de *Peperomia* resultou na amplificação da banda de tamanho próximo de 750 pb como esperado. O seqüenciamento permitirá determinar o tamanho e identidade dessas regiões e se existe homologia entre as seqüências dessas *Peperomias* e a região KS do gene *AviM* de *Streptomyces viridochromogenes* que expressa o ácido orselínico.

O estudo de regiões KSs realizado com os iniciadores AOS1/AOS2 levou a amplificação de duas bandas de aproximadamente 400 e 550 pb que poderiam também ser provenientes de genes contendo regiões para condensações e alongamento de cadeias carbônicas, sendo também necessário o seu seqüenciamento para confirmação.

Os resultados obtidos apontam para a importância das espécies de *Peperomia* como fonte de produtos de origem policetídica e para o estudo biossintético de metabólitos relacionados ao ácido orselínico e à acetofenona.

REFERÊNCIAS

Abe I, Abe T, Wanibuchi K, Noguchi H. Enzymatic formation of quinolone alkaloids by a plant type III polyketide synthase. Org Lett. 2006 Dec;8(26):6063-5.

Abe I, Oguro S, Utsumi Y, Sano Y, Noguchi H. Engineered biosynthesis of plant polyketides: Chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase. J Am Chem Soc. 2005 Sep;127(36):12709-16.

Abe I, Takahashi Y, Morita H, Noguchi H. Benzalacetone synthase - A novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in Rheum palmatum. Eur J Biochem. 2001 Jun;268(11):3354-9.

Abe I, Utsumi Y, Oguro S, Morita H, Sano Y, Noguchi H. A plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone. J Am Chem Soc. 2005 Feb;127(5):1362-3.

Abe I, Utsumi Y, Oguro S, Noguchi H. The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide. Febs Letters. 2004 Mar;562(1-3):171-6.

Abe T, Morita H, Noma H, Kohno T, Noguchi H, Abe I. Structure function analysis of benzalacetone synthase from Rheum palmatum. Bioorg Med Chem Lett. 2007 Jun;17(11):3161-6.

Achenbach H, Fietz W, Worth J, Waibel R, Portecop J. Constituents of tropical medicinal-plants .19. GCMS-investigations of the constituents of piper-amalago - 30 new amides of the piperine-type. Planta Med. 1986 Feb(1):12-8.

Ahlert J, Shepard E, Lomovskaya N, Zazopoulos E, Staffa A, Bachmann BO, Huang KX, Fonstein L, Czisny A, Whitwam RE, Farnet CM, Thorson JS. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. Science. 2002 Aug;297(5584):1173-6.

Akiyama T, Shibuya M, Liu HM, Ebizuka Y. p-Coumaroyltriacetic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from Hydrangea macrophylla var. thunbergii. Eur J Biochem. 1999 Aug;263(3):834-9.

Aponte JC, Verastegui M, Malaga E, Zimic M, Quiliano M, Vaisberg AJ, et al. Synthesis, cytotoxicity, and anti-Trypanosoma cruzi activity of new chalcones. J Med Chem. 2008 Oct;51(19):6230-4.

Austin MB, Bowman ME, Ferrer JL, Schroder J, Noel JP. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. Chem Biol. 2004 Sep;11(9):1179-94.

Austin MB, Noel AJP. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. Nat Prod Rep. 2003 Feb;20(1):79-110.

Bacher A, Rieder C, Eichinger D, Arigoni D, Fuchs G, Eisenreich W. Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. Fems Microbiol Rev. 1998 Dec;22(5):567-98.

Baldoqui DC, Kato MJ, Cavalheiro AJ, Bolzani VD, Young MCM, Furlan M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. Phytochemistry. 1999 Aug;51(7):899-902.

Bayma JD, Arruda MSP, Muller AH, Arruda AC, Canto WC. A dimeric ArC2 compound from *Peperomia pellucida*. Phytochemistry. 2000 Dec;55(7):779-82.

Beerhues L. Benzophenone synthase from cultured cells of Centaurium erythraea. Febs Letters. 1996 Apr;383(3):264-6.

Benevides PJC, Sartorelli P, Kato MJ. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii.* Phytochemistry. 1999 Sep;52(2):339-43.

Bingle LEH, Simpson TJ, Lazarus CM. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. Fungal Genet Biol. 1999 Apr;26(3):209-23.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-54.

Bringmann G, Noll TF, Gulder T, Dreyer M, Grune M, Moskau D. Polyketide folding in higher plants: Biosynthesis of the phenylanthraquinone knipholone. J Org Chem. 2007 Apr;72(9):3247-52.

Burke SJ, Jacobs H, McLean S, Reynolds WF. Structural and spectral assignment by 2D NMR of a new prenylated benzopyrancarboxylic acid and structural reassignment of a related compound. Magn Reson Chem. 2003 Feb;41(2):145-6.

Calle, AJ. Contribucion al estudio de algunas espécies de la familia Piperaceae. Revista Colombiana de Ciencias Quimico-Farmaceuticas. 1983 Nov;4 (1):47-57.

Charles R, Garg SN, Kumar S. An orsellinic acid glucoside from *Syzygium aromatica*. Phytochemistry. 1998 Nov;49(5):1375-6.

Chen CM, Jan FY, Chen MT, Lee TJ. Peperomins-a, peperomins-b and peperomins-c, novel secolignans from peperomia-japonica. Heterocycles. 1989 Mar;29(3):411-4.

Chen CM, Jan FY, Chen MT, Lee TJ. peperomins-a, peperomins-b and peperomins-c, novel secolignans from peperomia-japonica. Heterocycles. 1989 Mar;29(3):411-4.

Cheng MJ, Lee SJ, Chang YY, Wu SH, Tsai IL, Jayaprakasam B, Chen IS. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. Phytochemistry. 2003 Jul;63(5):603-8.

Corothie E, Ilija H. Studies on neutral constituents of *Aragoa-lucidula*.

Planta Med. 1975;27(2):182-4.

Cronquist A, An integrated system of classification of flowering in plants: New York; Ed. Columbia University, 1981.

Cunningham BDM, Lowe PR, Threadgill MD. Structural studies on bio-active compounds .12. Tautomerism and conformation of aryl-substituted 1-(2-hydroxyphenyl)-3-phenylpropane-1,3-diones in the solid-phase and in solution. J Chem Soc-Perkin Trans 2. 1989 Sep(9):1275-83.

D'Auria JC, Chen F, Pichersky E, editors. The SABATH family of MTS in Arabidopsis thaliana and other plant species. Annual Meeting of the Phytochemical-Society-of-North-America; 2002 Jul 20-24; Merida, Mexico: Elsevier Science Bv.

DelleMonache F, Compagnone RS. A secolignan from *Peperomia glabella*. Phytochemistry. 1996 Nov;43(5):1097-8.

Dewick PM. Medicinal Natural Products, A biosynthetic Approach: England; John Wiley & Sons., 1994.

Dudareva N, Raguso RA, Wang JH, Ross EJ, Pichersky E. Floral scent production in Clarkia breweri - III. Enzymatic synthesis and emission of benzenoid esters. Plant Physiol. 1998 Feb;116(2):599-604.

Eckermann C, Schroder G, Eckermann S, Strack D, Schmidt E, Schneider B, et al. Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. Phytochemistry. 2003 Feb;62(3):271-86.

Eckermann S, Schroder G, Schmidt J, Strack D, Edrada RA, Helariutta Y, et al. New pathway to polyketides in plants. Nature. 1998 Nov;396(6709):387-90.

Favier L, Tonn C, Guerreiro E, Rotelli A, Pelzer L. Anti-inflammatory activity of acetophenones from Ophryosporus axilliflorus. Planta Med. 1998 Oct;64(7):657-9.

Felippe LG, Baldoqui DC, Kato MJ, Bolzani VD, Guimaraes EF, Cicarelli RMB, Furlan M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. Phytochemistry. 2008 Jan;69(2):445-50.

Ferrer JL, Zubieta H, Dixon RA, Noel JP. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. Plant Physiol. 2005 Mar;137(3):1009-17.

Fliegmann J, Schroder G, Schanz S, Britsch L, Schroder J. Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from scots pine (pinus-sylvestris), and differential regulation of these and related enzyme-activities in stressed plants. Plant Mol Biol. 1992 Feb;18(3):489-503.

Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R. Plant Polyketide Synthases: A fascinating group of enzymes. Plant Physiol Biochem. 2009 Mar;47(3):167-74.

Fuller RW, Blunt JW, Boswell JL, Cardellina JH, Boyd MR. HIV-inhibitory natural products. 49. Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from Allanblackia *stuhlmannii.* J Nat Prod. 1999 Jan;62(1):130-2.

Gaisser S, Trefzer A, Stockert S, Kirschning A, Bechthold A. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tu57. J Bacteriol. 1997 Oct;179(20):6271-8.

Gaucher GM, Shepherd MG. Isolation of orsellinic acid synthase. Biochem Biophys Res Commun. 1968;32(4):664-671.

Goldoni L, Cravotto G, Penoni A, Tollari S, Palmisano G. The rhodium carbenoid route to 3-aryl-4-hydroxycoumarins: Synthesis of derrusnin. Synlett. 2005 Apr(6):927-30.

Govindachari TR, Kumari GNK, Partho PD. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. Phytochemistry. 1998 Dec;49(7):2129-31.

Greger H, Hofer O. New unsymmetrically substituted tetrahydrofurofuran lignans from Artemisia-absinthium - assignment of the relative stereochemistry by lanthanide induced chemical-shifts. Tetrahedron. 1980;36(24):3551-8.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999; 41():95-98.

Helbsing S, Riederer M, Zotz G. Cuticles of vascular epiphytes: Efficient barriers for water loss after stomatal closure?. Ann Bot. 2000 Oct;86(4):765-9.

Hill AM. The biosynthesis, molecular genetics and enzymology of the polyketide-derived metabolites. Nat Prod Rep. 2006;23(2):256-320.

Honda NK, Vilegas W. The chemistry of lichens. Quim Nova. 1999 Jan-Feb;22(1):110-25.

Huang PL, Won SJ, Day SH, Lin CN. A cytotoxic acetophenone with a novel skeleton, isolated from *Cynanchum taiwanianum*. Helv Chim Acta. 1999;82(10):1716-20.

Ibdah M, Zhang XH, Schmidt J, Vogt T. A novel $Mg2^{+}$-dependent *O*-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*. J Biol Chem. 2003 Nov;278(45):43961-72.

Junghanns KT, Kneusel RE, Groger D, Matern U. Differential regulation and distribution of acridone synthase in Ruta graveolens. Phytochemistry. 1998 Sep;49(2):403-11.

Kaul RB. Role of multiple epidermis in foliar succulence of *Peperomia* (Piperaceae). Botanical Gazette. 1977;138(2):213-8.

Kim BG, Lee HJ, Park Y, Lim Y, Ahn JH. Characterization of an *O*-methyltransferase

from soybean. Plant Physiol Biochem. 2006 Apr;44(4):236-41.

Kitamura ROS, Romoff P, Young MCM, Kato MJ, Lago JHG. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). Phytochemistry. 2006 Nov;67(21):2398-402.

Kobayashi S, Ding CK, Nakamura Y, Nakajima I, Matsumoto R. Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a Vitis stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). Plant Cell Reports. 2000 Sep;19(9):904-10.

Lago JHG, de Oliveira A, Guimaraes EF, Kato MJ. 3-ishwarone and 3-ishwarol, rare sesquiterpenes in essential oil from leaves of *Peperomia oreophila* hensch. J Braz Chem Soc. 2007;18(3):638-42.

Lam TH, Shaw M. Removal of phenolics from plant extracts by grinding with anion exchange resin. Biochem Biophys Res Commun. 1970;39(5):965-&.

Li N, Wu JL, Hasegawa T, Sakai J, Bai LM, Wang LY, Kakuta S, Furuya Y, Ogura H, Kataoka T, Tomida A, Tsuruo T, Ando M. Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. J Nat Prod. 2007 Jun;70(6):998-1001.

Li N, Wu JL, Hasegawa T, Sakai J, Bai LM, Wang LY, Kakuta S, Furuya Y, Ogura H, Kataoka T, Tomida A, Tsuruo T, Ando M. Bioactive lignans from *Peperomia duclouxii.* J Nat Prod. 2007 Apr;70(4):544-8.

Li N, Wu JL, Hasegawa T, Sakai J, Wang LY, Kakuta S, Furuya Y, Tomida A, Tsuruo T, Ando M. Bioactive dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. J Nat Prod. 2006 Feb;69(2):234-9.

Li N, Wu JL, Sakai J, Ando M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from Peperomia duclouxii. J Nat Prod. 2003 Nov;66(11):1421-6.

Li YZ, Huang J, Gong Z, Tian XQ. A novel norlignan and a novel phenylpropanoid from *Peperomia tetraphylla.* Helv Chim Acta. 2007;90(11):2222-6.

Liu B, Raeth T, Beuerle T, Beerhues L. Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase. Planta. 2007 May;225(6):1495-503.

Liu BY, Falkenstein-Paul H, Schmidt W, Beerhues L. Benzophenone synthase and chalcone synthase from Hypericum androsaemum cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. Plant J. 2003 Jun;34(6):847-55.

Liu CJ, Deavours BE, Richard SB, Ferrer JL, Blount JW, Huhman D, Dixon RA, Noel JP. Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant defense responses. Plant Cell. 2006 Dec;18(12):3656-69.

Lobo AM, Lourenço AM. Biossíntese de Produtos Naturais: Lisboa; IST Press, 2007.

Lorimer SD, Perry NB. Antifungal hydroxy-acetophenones from the new-zealand liverwort, *Plagiochila-fasciculata*. Planta Med. 1994 Aug;60(4):386-7.

Mahiou V, Roblot F, Hocquemiller R, Cave A, Barrios AA, Fournet A, Ducrot PH. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. J Nat Prod. 1995 Feb;58(2):324-8.

Mahiou V, Roblot F, Hocquemiller R, Cave A, DeArias AR, Inchausti A, Yaluff G, Fournet A. New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. J Nat Prod. 1996 Jul;59(7):694-7.

Mann J, Chemical Aspects of Biosynthesis: Oxford; Oxford University Press, 1994.

Mateeva NN, Kode RN, Redda KK. Synthesis of novel flavonoid derivatives as potential HIV-integrase inhibitors. J Heterocycl Chem. 2002 Nov-Dec;39(6):1251-8.

Mbah JA, Tchuendem MHK, Tane P, Sterner O. Two chromones from *Peperomia vulcanica*. Phytochemistry. 2002 Aug;60(8):799-801.

Noel JP, Dixon RA, Pichersky E, Zubieta C, Ferrer JL, editors. Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. Annual Meeting of the Phytochemical-Society-of-North-America; 2002 Jul 20-24; Merida, Mexico: Elsevier Science Bv.

Okada Y, Ito K. Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). Biosci Biotechnol Biochem. 2001 Jan;65(1):150-5.

Paniego NB, Zuurbier KWM, Fung SY, van der Heijden R, Scheffer JJC, Verpoorte R. Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus L.*) cones. Eur J Biochem. 1999 Jun;262(2):612-6.

Preisigmuller R, Gnau P, Kindl H. The inducible 9,10-dihydrophenanthrene pathway - characterization and expression of bibenzyl synthase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. Arch Biochem Biophys. 1995 Feb;317(1):201-7.

Raharjo TJ, Chang WT, Choi YH, Peltenburg-Looman AMG, Verpoorte R. Olivetol as product of a polyketide synthase in *Cannabis sativa* L. Plant Sci. 2004 Feb;166(2):381-5.

Ross JR, Nam KH, D'Auria JC, Pichersky E. S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. Arch Biochem Biophys. 1999 Jul;367(1):9-16.

Rubio OC, Cuellar AC, Rojas N, Castro HV, Rastrelli L, Aquino R. A polyisoprenylated benzophenone from *Cuban propolis*. J Nat Prod. 1999 Jul;62(7):1013-5.

Sala A, Recio MD, Giner RM, Manez S, Rios JL. New acetophenone glucosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with antiinflammatory activity. J Nat Prod. 2001 Oct;64(10):1360-2.

Salazar KJM, Paredes GED, Lluncor LR, Young MCM, Kato MJ. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. Phytochemistry. 2005 Mar;66(5):573-9.

Schuz R, Heller W, Hahlbrock K. Substrate-specificity of chalcone synthase from petroselinum-hortense - formation of phloroglucinol derivatives from aliphatic substrates. J. Biol. Chem. 1983;258(11):6730-4.

Scope R K, Protein purification, principles and practice: New York; springer, 1993.

Seeram NP, Jacobs H, McLean S, Reynolds WF. A prenylated benzopyran derivative from *Peperomia clusiifolia*. Phytochemistry. 1998 Nov;49(5):1389-91.

Seeram NP, Lewis AW, Jacobs H, Nair MG, McLean S, Reynolds WF. Proctoriones A-C: 2-acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii.* J Nat Prod. 2000 Mar;63(3):399-402.

Settimj G, Disimone L, Delgiudice MR. New gas-chromatographic method for estimation of reserpine and rescinnamine. J. Chromatog. 1976;116(2):263-70.

Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. Curr Opin Chem Biol. 2003 Apr;7(2):285-95.

Soares MG, de Felippe APV, Guimaraes EF, Kato MJ, Ellena J, Doriguetto AC. 2-Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone from leaves of *Peperomia glabella*. J Braz Chem Soc. 2006 Nov-Dec;17(7):1205-10.

Song MS, Kim DG, Lee SH. Isolation and characterization of a jasmonic acid carboxyl methyltransferase gene from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). J Plant Biol. 2005 Sep;48(3):292-7.

Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. Nat Prod Rep. 2001;18(4):380-416.

Steyemark AS. Flora de Venezuela. Vol. 2. Caracas: Ed. Educación Ambiental; 1984. 227.

Tanaka T, Asai F, Iinuma M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. Phytochemistry. 1998 Sep;49(1):229-32.

Taylor DW, Hickey LJ. Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiosperms. Plant Syst Evol. 1992;180(3-4):137-56.

Velozo LSM, Ferreira MJP, Santos MIS, Moreira DL, Emerenciano VP, Kaplan MAC. Unusual chromenes from *Peperomia blanda.* Phytochemistry. 2006 Mar;67(5):492-6.

Velozo LSM, Ferreira MJP, Santos MIS, Moreira DL, Guimaraes EF, Emerenciano VP, Kaplan MAC. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. Fitoterapia. 2009 Mar;80(2):119-22.

Vidgren J, Svensson LA, Liljas A. Crystal-structure of catechol *O*-methyltransferase. Nature. 1994 Mar;368(6469):354-8.

Villegas LF, Marcalo A, Martin J, Fernandez ID, Maldonado H, Vaisberg AJ, Hammond GB. (+)-epi-alpha-bisabolol is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: Investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. J Nat Prod. 2001 Oct;64(10):1357-9.

Wanke S, Jaramillo MA, Borsch T, Samain MS, Quandt D, Neinhuis C. Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. Mol Phylog Evol. 2007 Feb;42(2):477-97.

Websites of the Schröder Group [homepage on the Internet]. Freiburg: Schröder Group; 2008 [citado 27 nov. 1998]. http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/O-Methyltransferases.html

Wu JL, Li N, Hasegawa T, Sakai J, Kakuta S, Tang WX, Oka S, Kiuchi M, Ogura H, Kataoka T, Tomida A, Tsuruo T, Ando M. Bioactive tetrahydrofuran lignans from Peperomia dindygulensis. J Nat Prod. 2005 Nov;68(11):1656-60.

Wu JL, Li N, Hasegawa T, Sakai J, Mitsui T, Ogura H, Kataoka T, Oka S, Kiuchi M, Tomida A, Turuo T, Li MJ, Tang WX, Ando M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. J Nat Prod. 2006 May;69(5):790-4.

Xu S, Li N, Ning MM, Zhou CH, Yang QR, Wang MW. Bioactive compounds from Peperomia pellucida. J Nat Prod. 2006 Feb;69(2):247-50.

Yoneyama N, Morimoto H, Ye CX, Ashihara H, Mizuno K, Kato M. Substrate specificity of N-methyltransferase involved in purine alkaloids synthesis is dependent upon one amino acid residue of the enzyme. Mol Genet Genomics. 2006 Feb;275(2):125-35.

Zhang GL, Li N, Wang YH, Zheng YT, Zhang Z, Wang MW. Bioactive lignans from *Peperomia heyneana*. J Nat Prod. 2007 Apr;70(4):662-4.

Zubieta C, He XZ, Dixon RA, Noel JP. Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant *O*-methyltransferases. Nat Struct Biol. 2001 Mar;8(3):271-9.

Apêndice

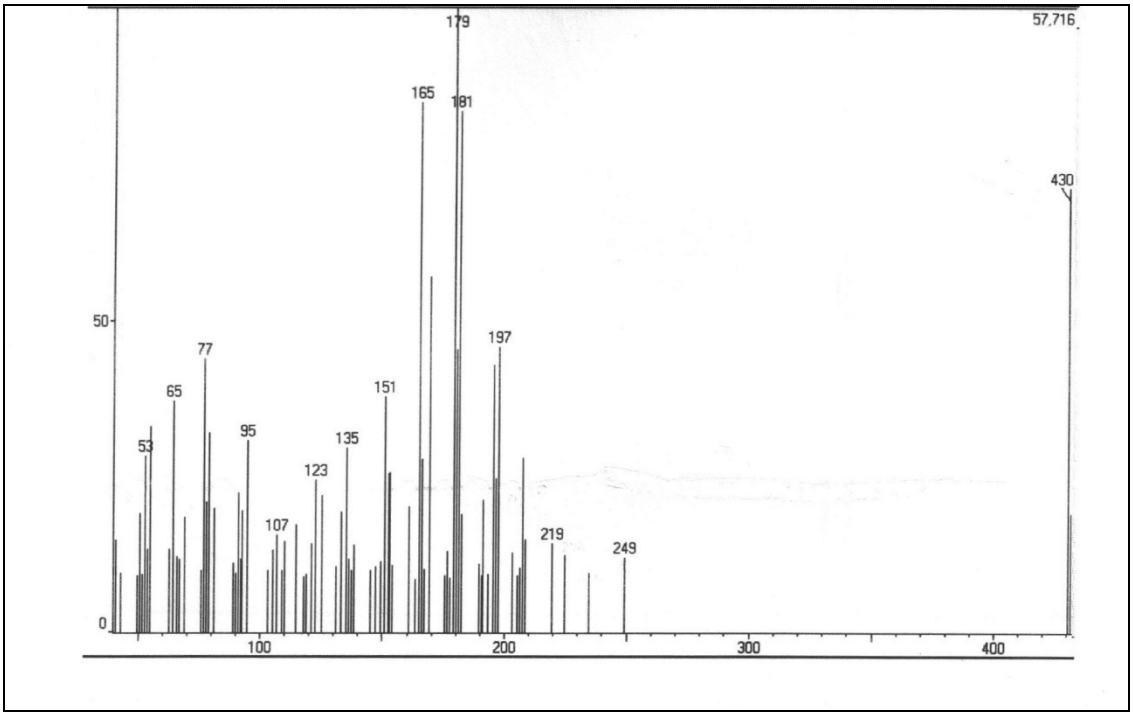


Figura 17. Espectro de massas de **1** por I. E. (70 ev)

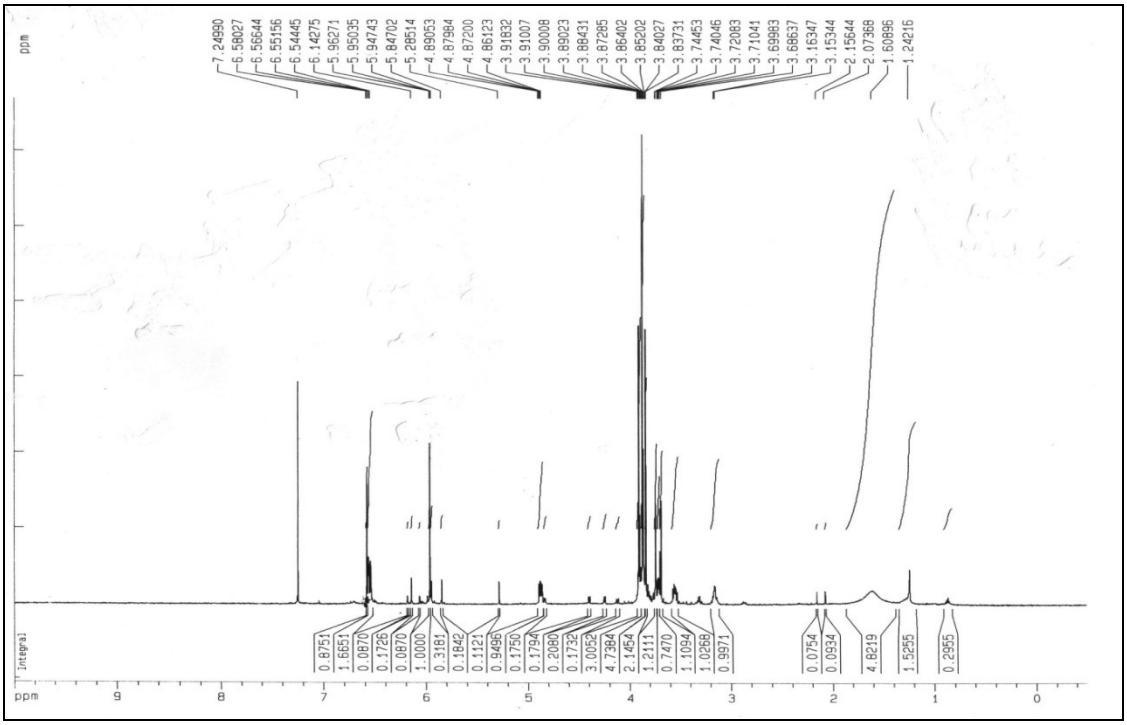


Figura 18. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **1**

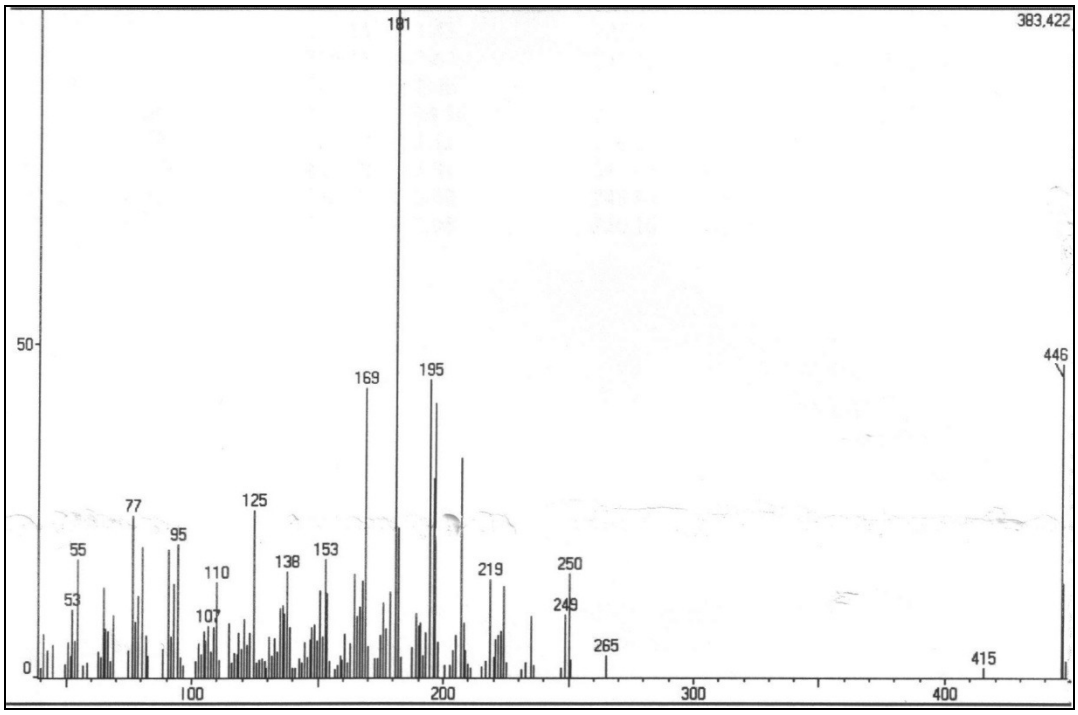


Figura 19. Espectro de Massas de **2** por I. E. (70 ev)

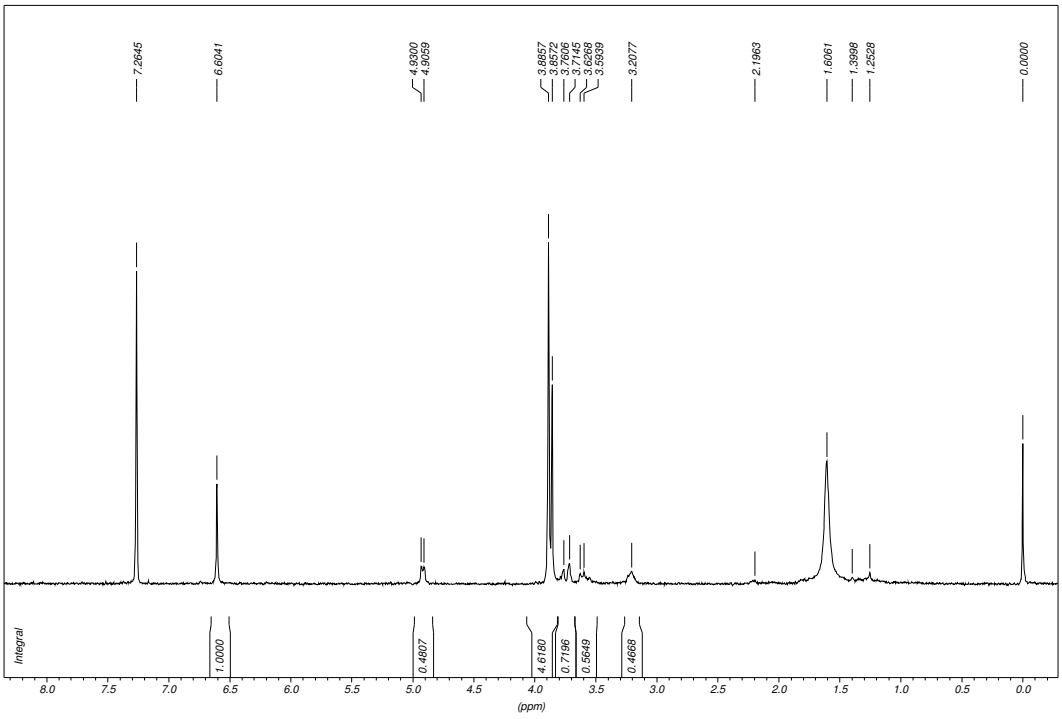


Figura 20. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **2** (CDCl3, 200 MHz)

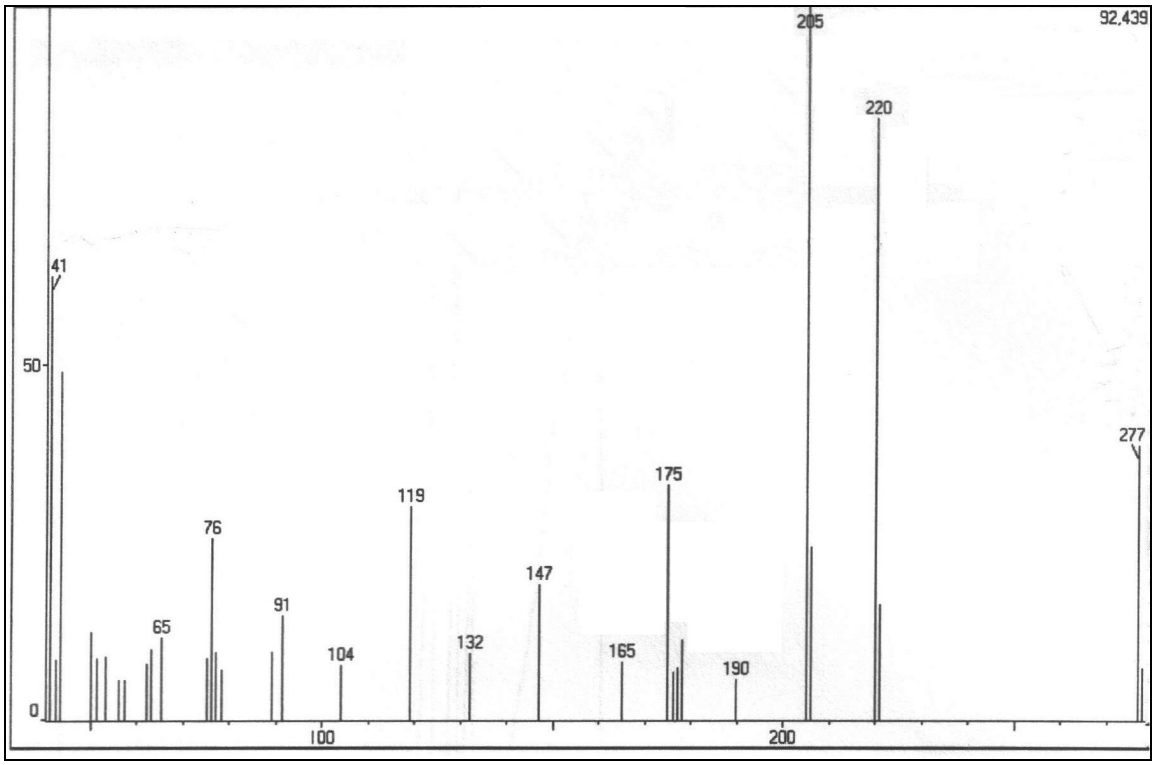


Figura 21. Espectro de massas de **3** por I. E. (70 ev)

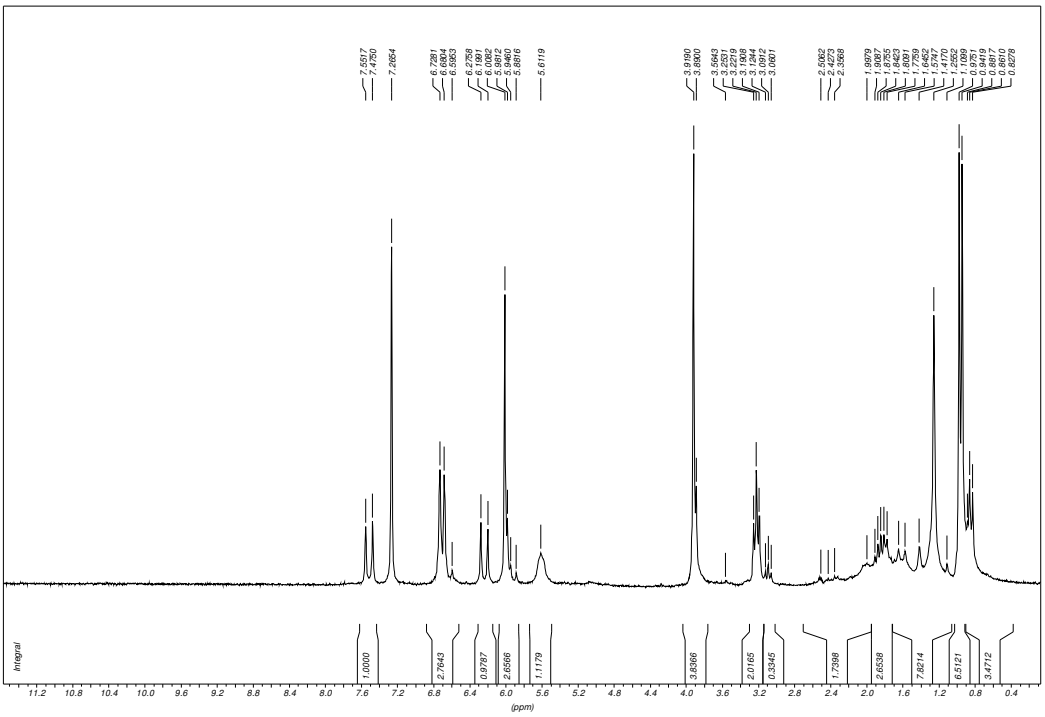


Figura 22. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **3** ($CDCl_3$, 200 MHz)

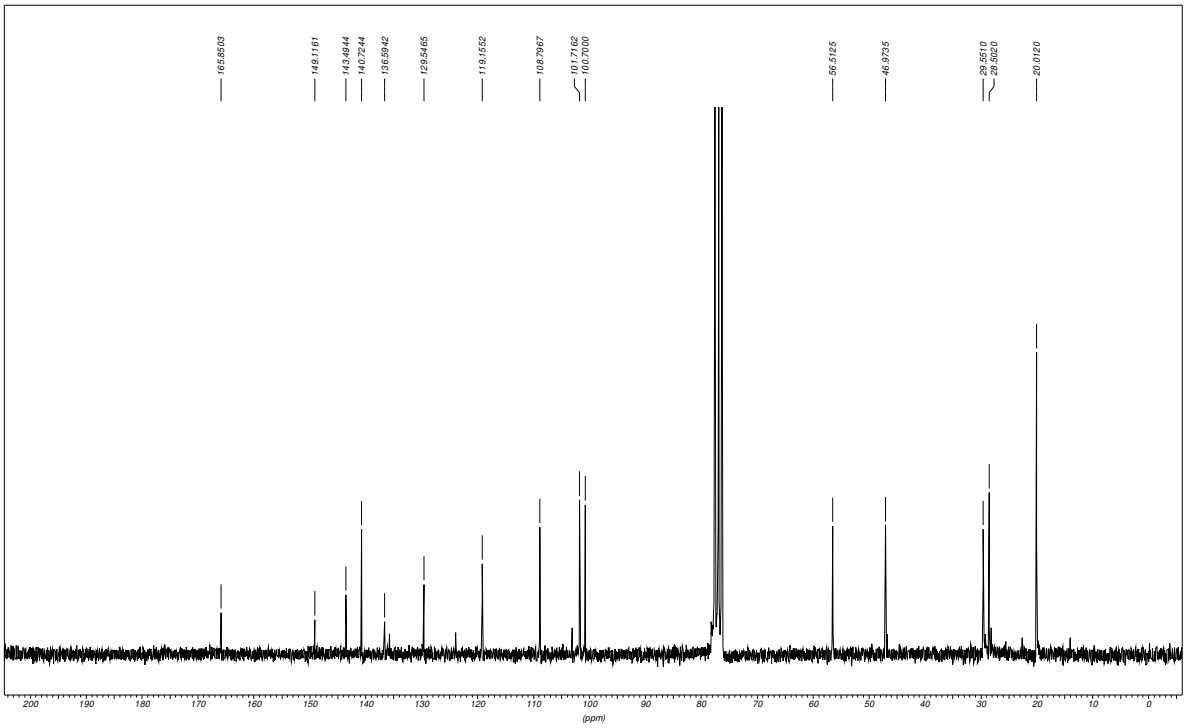


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C de **3** (CDCl3, 75 MHz)

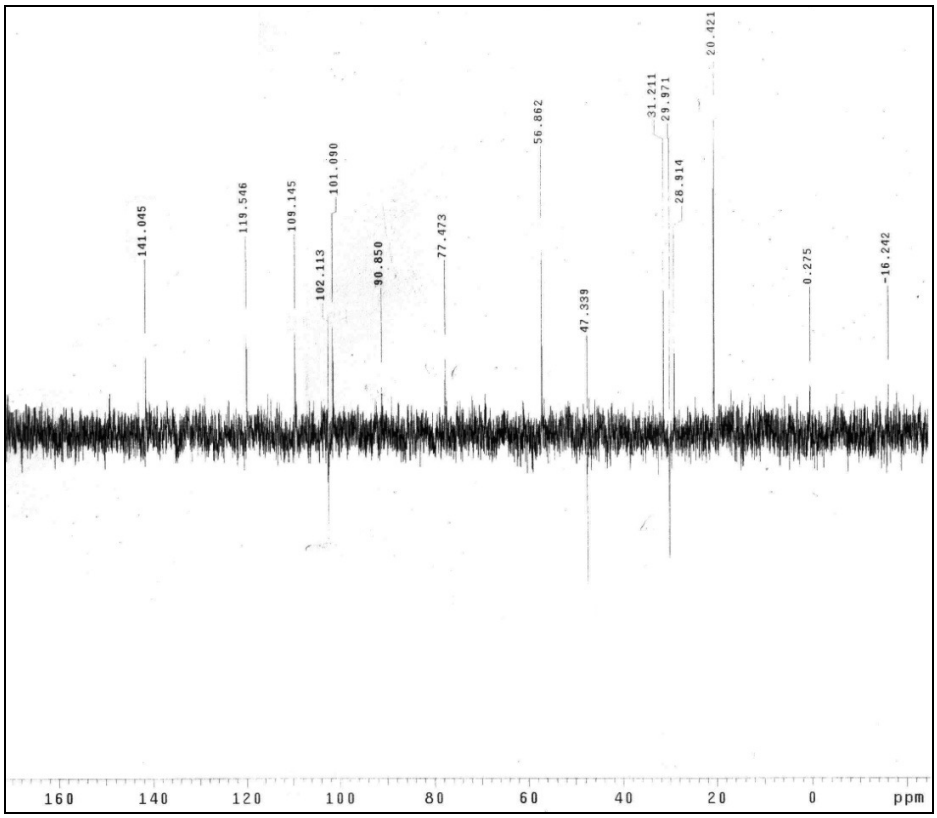


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C-Dept 135º de **3** (CDCl3, 75 MHz)

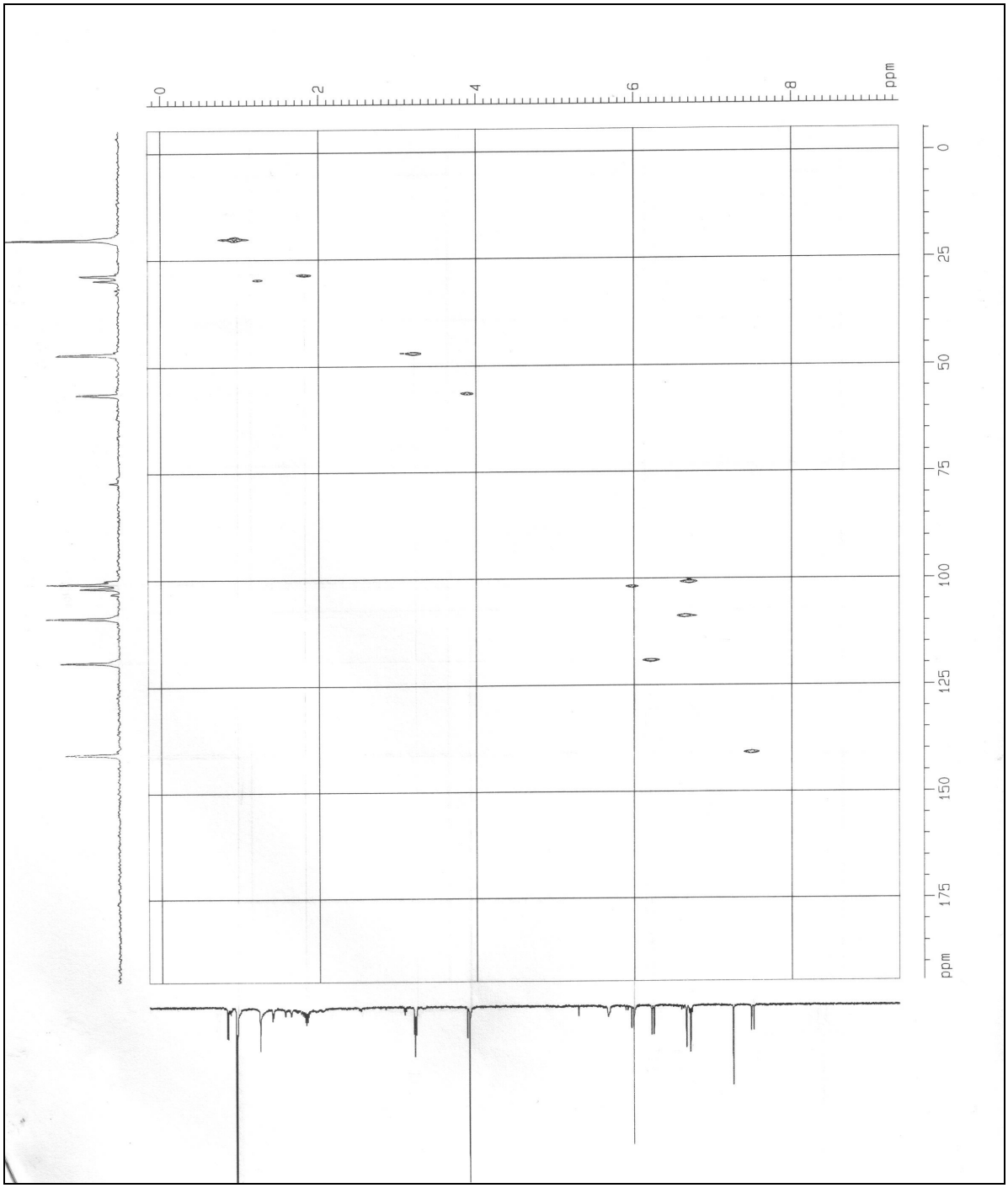


Figura 25. Espectro de HMQC da substancia **3** ($CDCl_3$, 300 e 75 MHz)

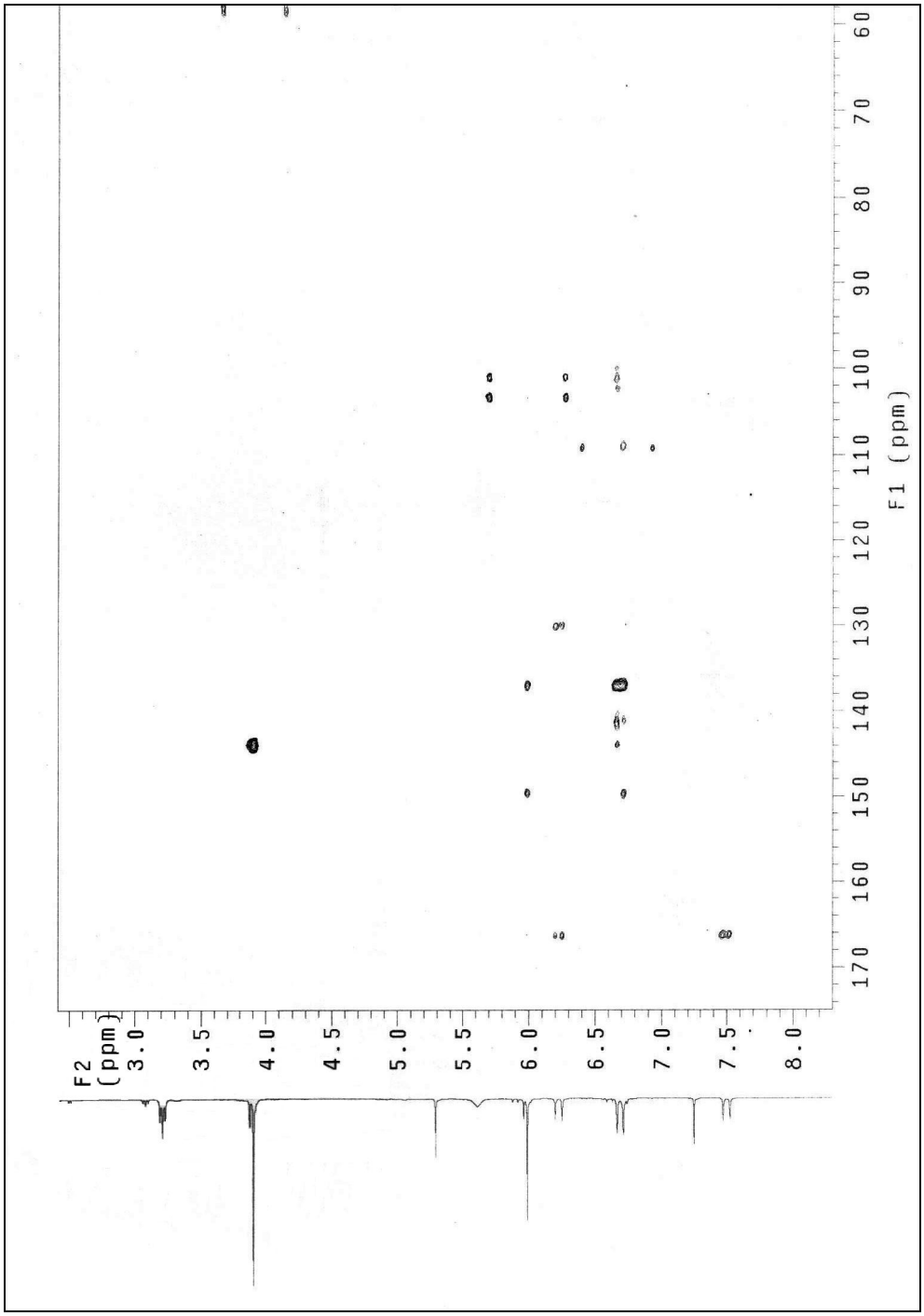


Figura 26. Espectro de HMBC de **3** ($CDCl_3$, 500 e 125 MHz)

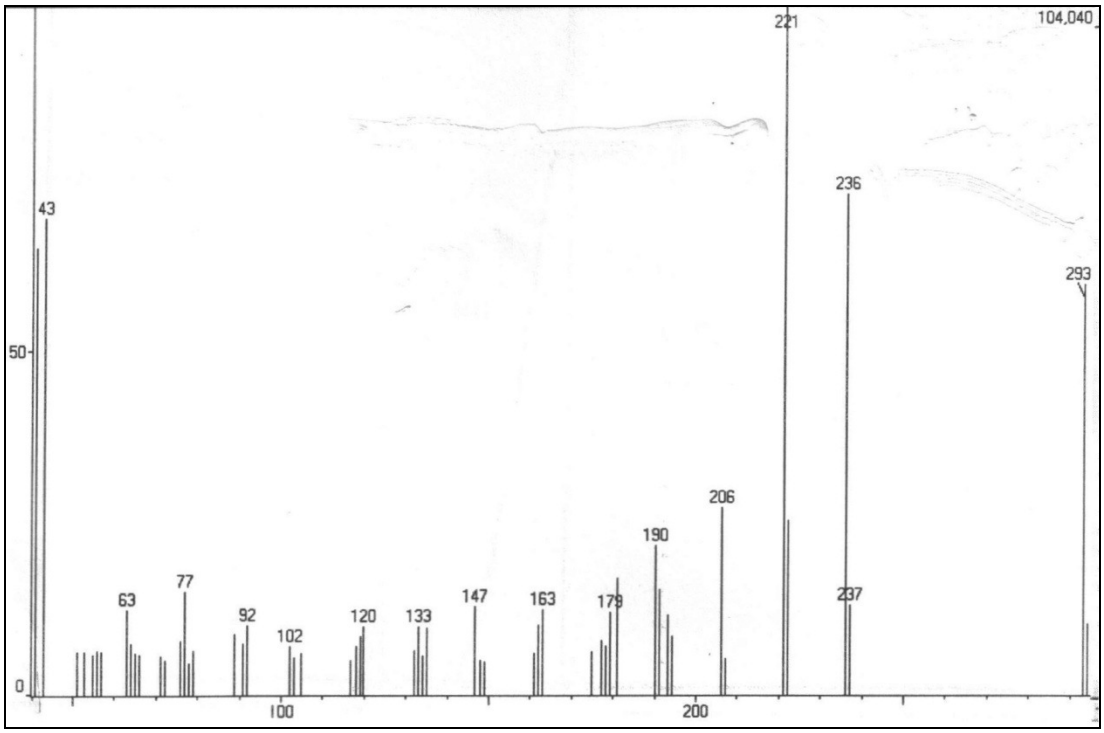


Figura 27. Espectro de massas de **4** por I. E. (70 ev)

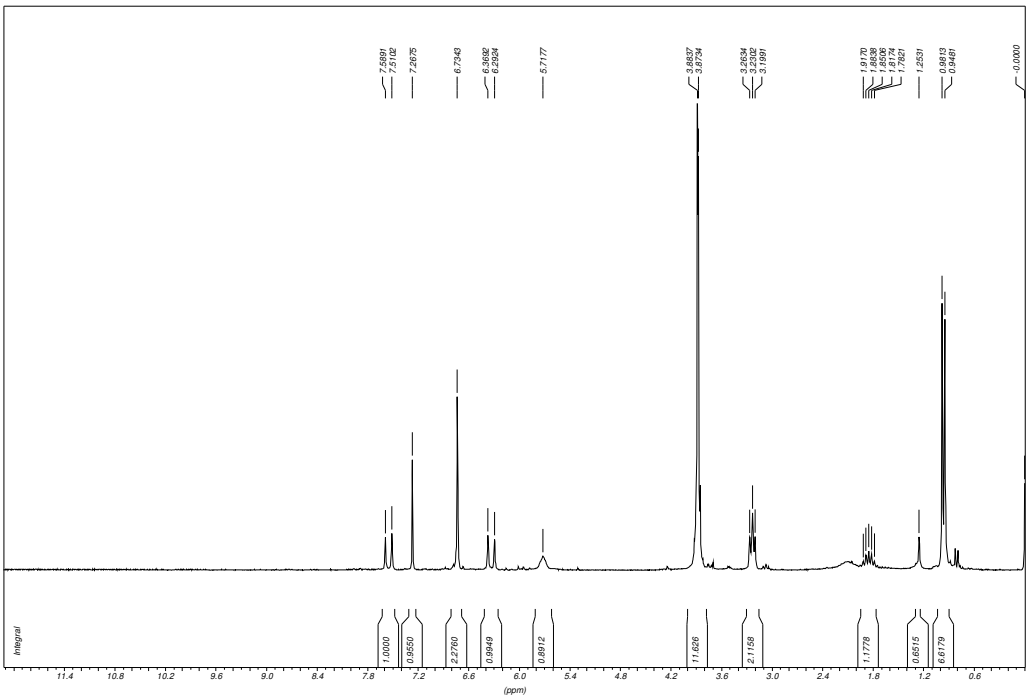


Figura 28. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **4** ($CDCl_3$, 200 MHz)

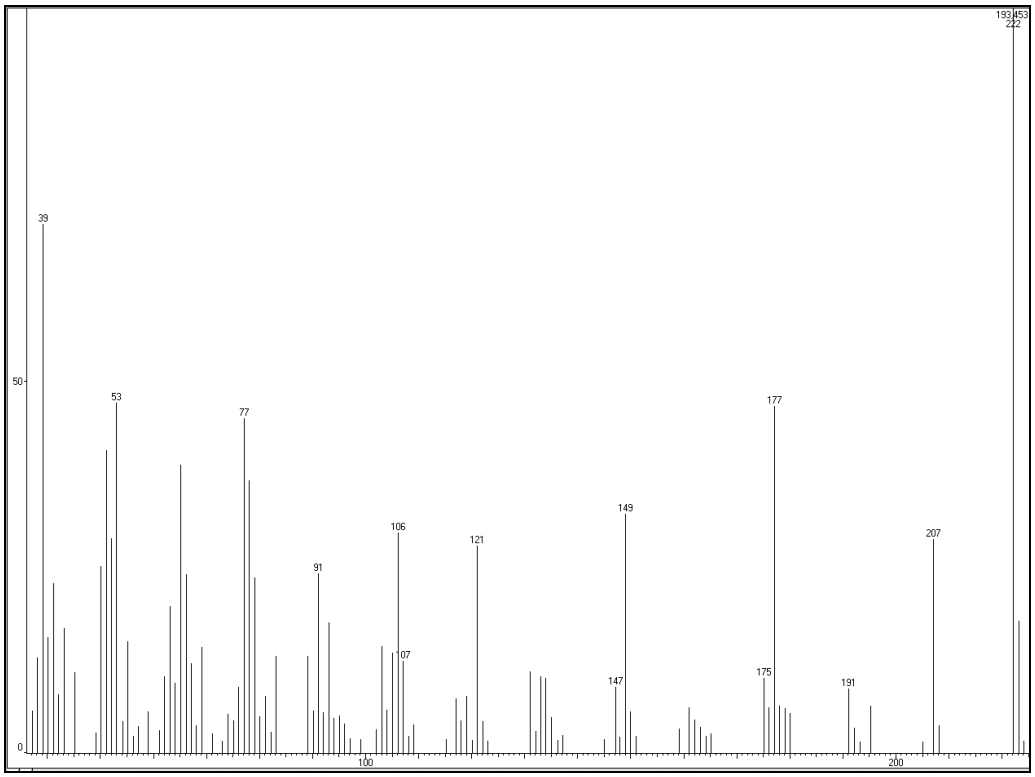


Figura 29. Espectro de massas de **13** por I. E. (70 ev)

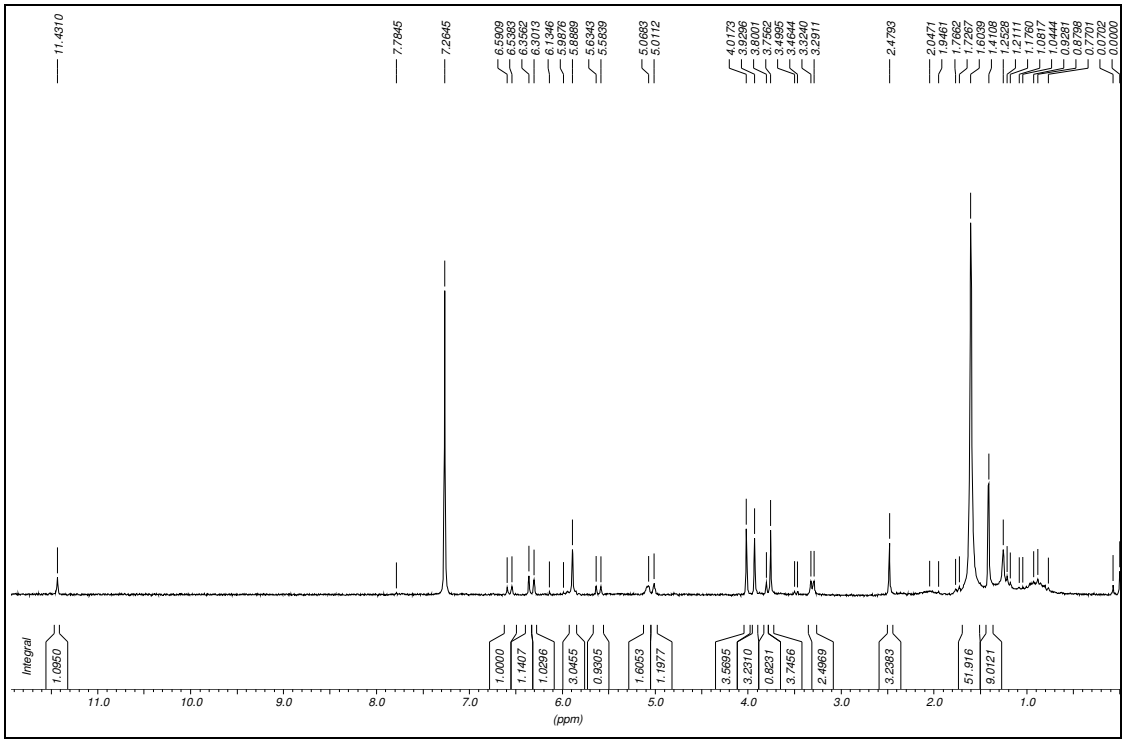


Figura 30. Espectro de RMN de ^{1}H das substâncias **13** e **14** ($CDCl_3$, 200 MHz)

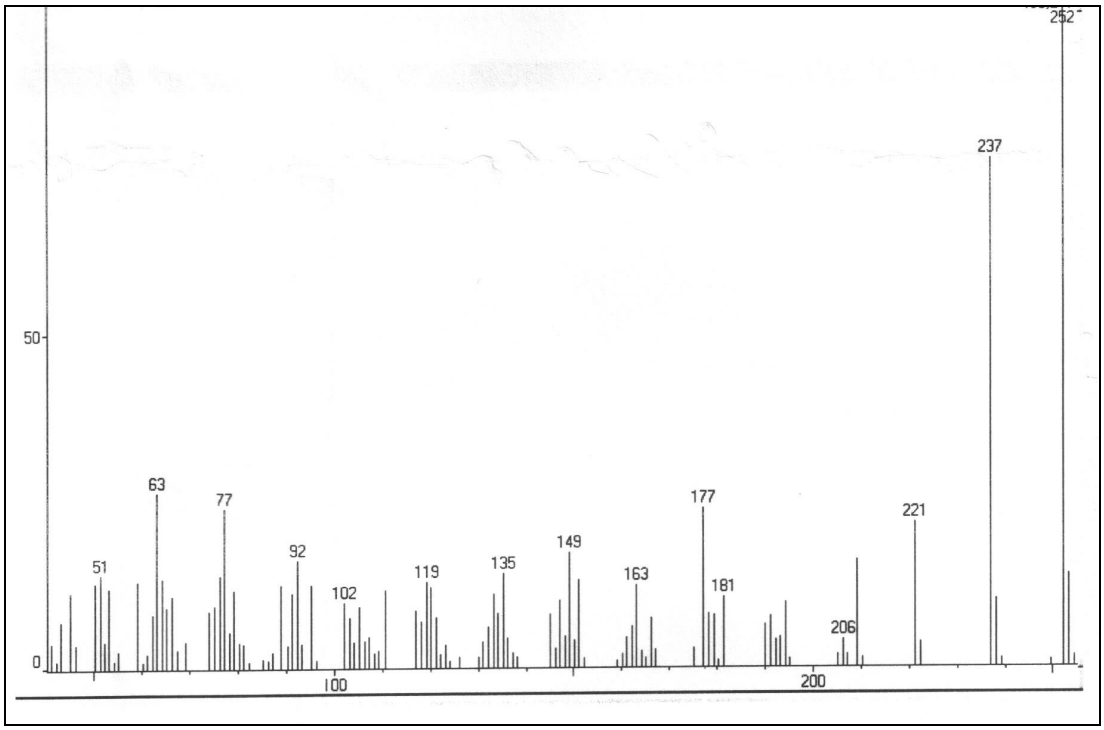


Figura 31. Espectro de massas de **5** por I. E. (70 ev)

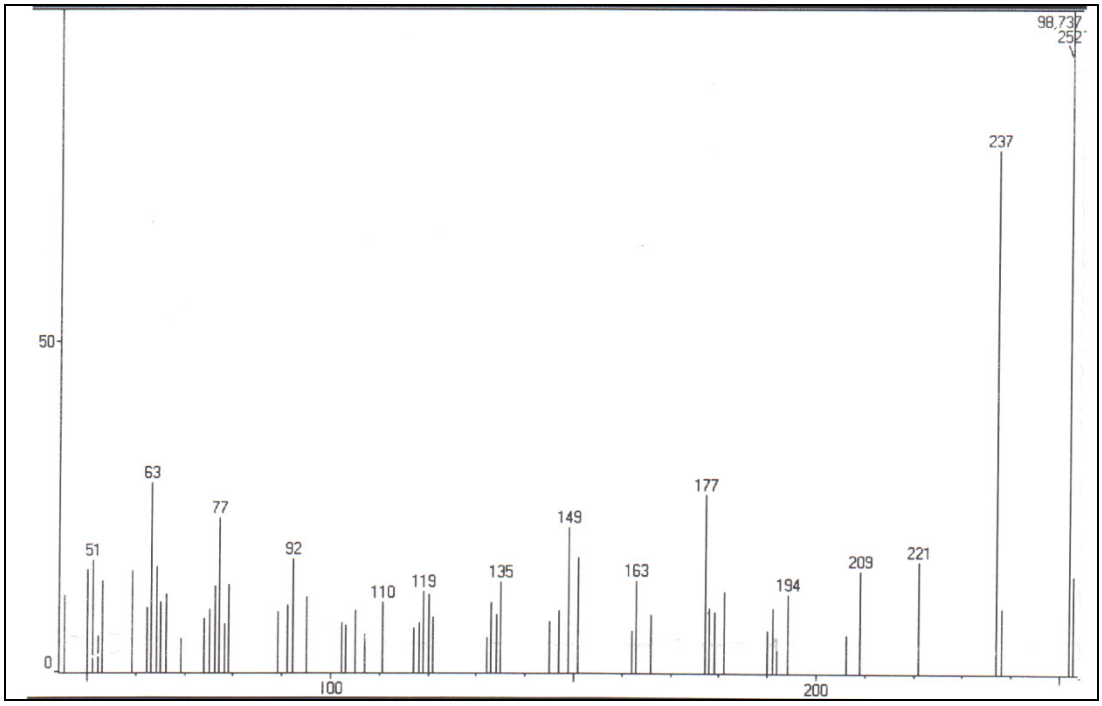


Figura 32. Espectro de massas de **6** por I. E. (70 ev)

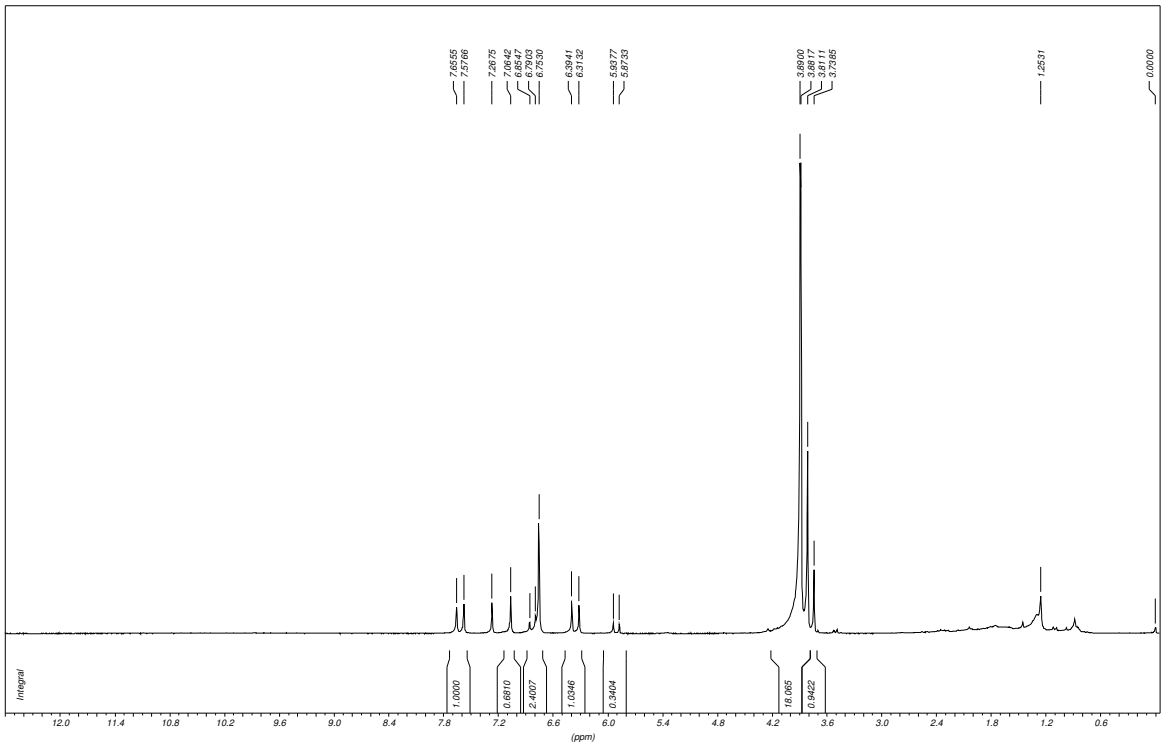


Figura 33. Espectro de RMN de ^{1}H das substâncias de **5** e **6** ($CDCl_3$, 200 MHz)

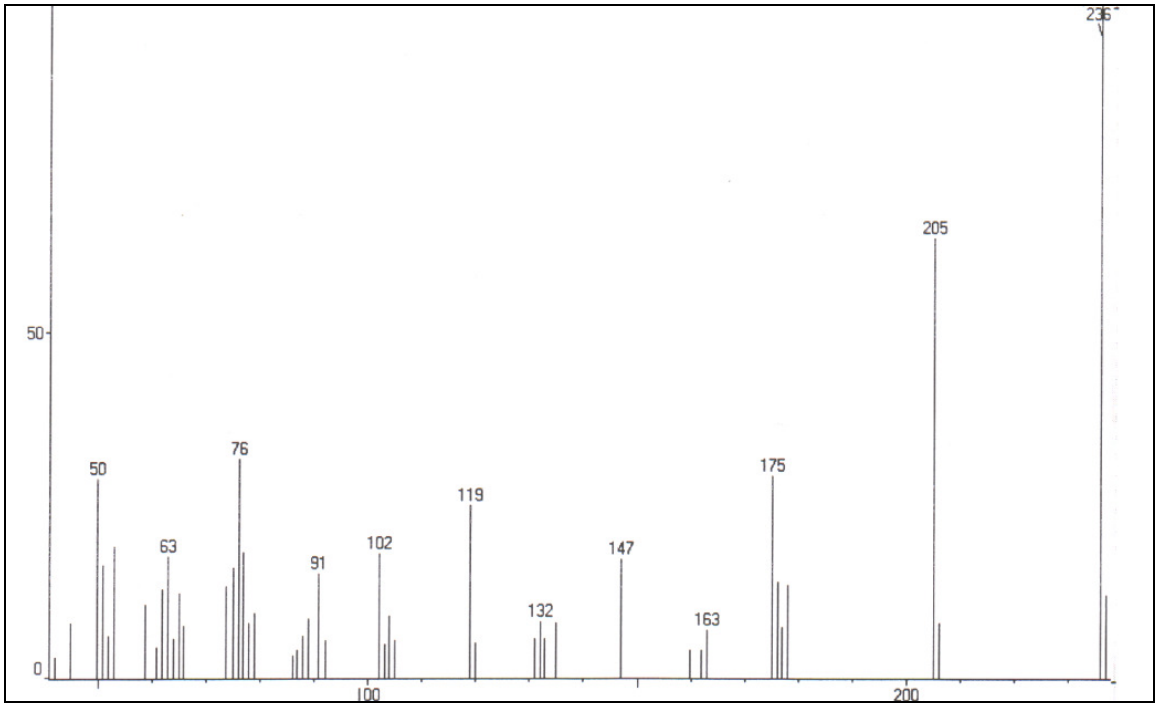


Figura 34. Espectro de massas de **7** por I. E. (70 ev)

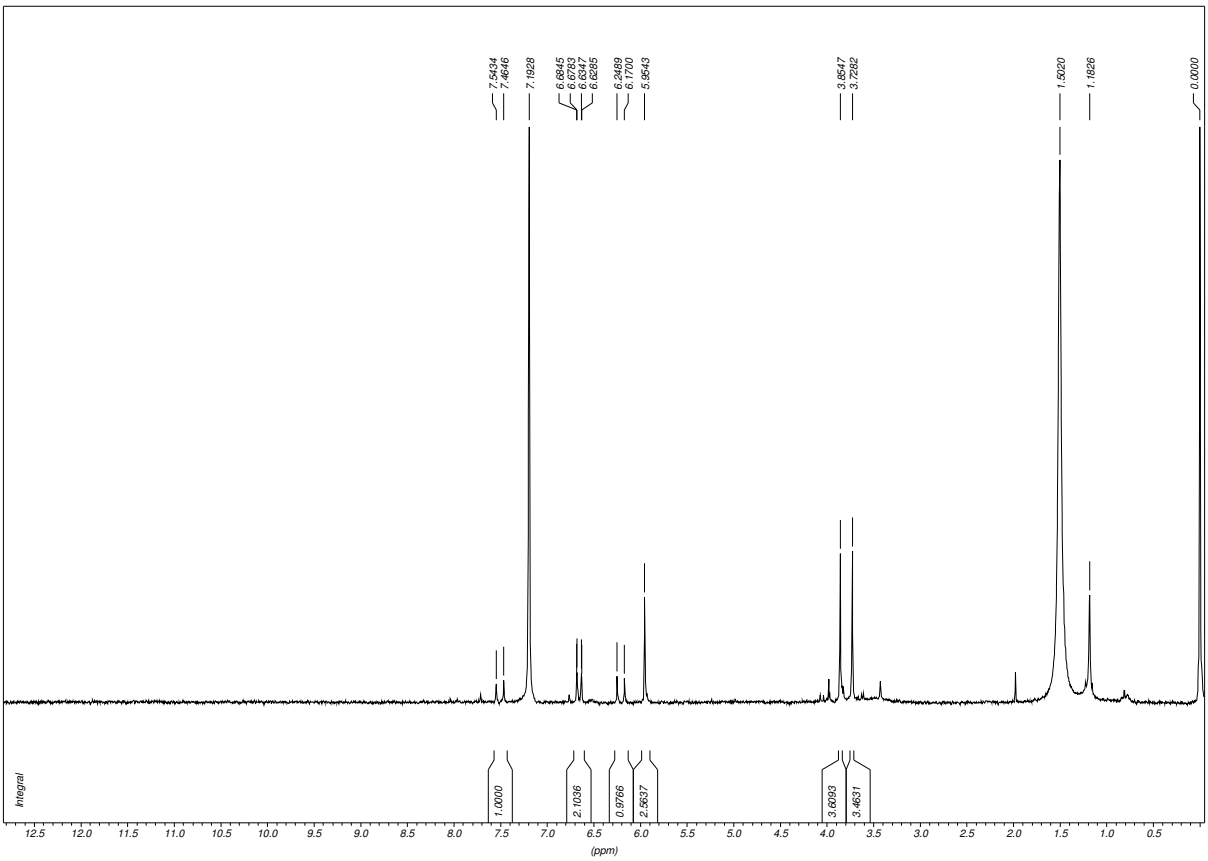


Figura 35. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** ($CDCl_3$, 200 MHz)

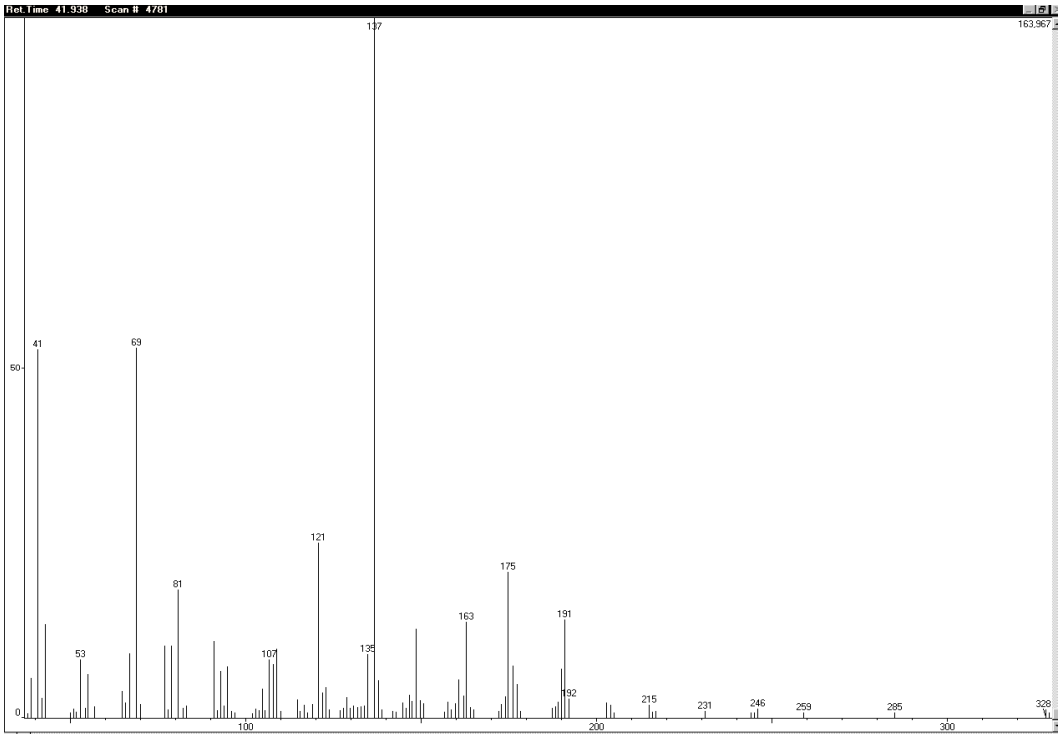


Figura 36. Espectro de massas de **11** por I. E. (70 ev)

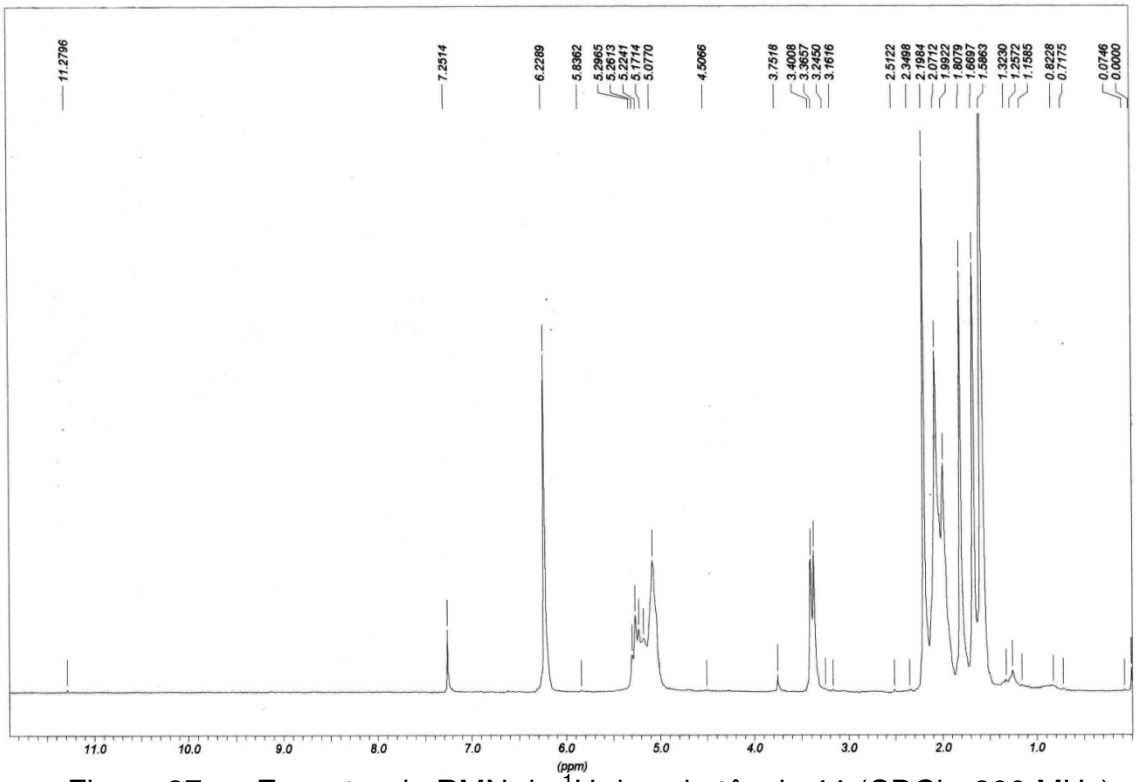


Figura 37. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **11** ($CDCl_3$, 200 MHz)

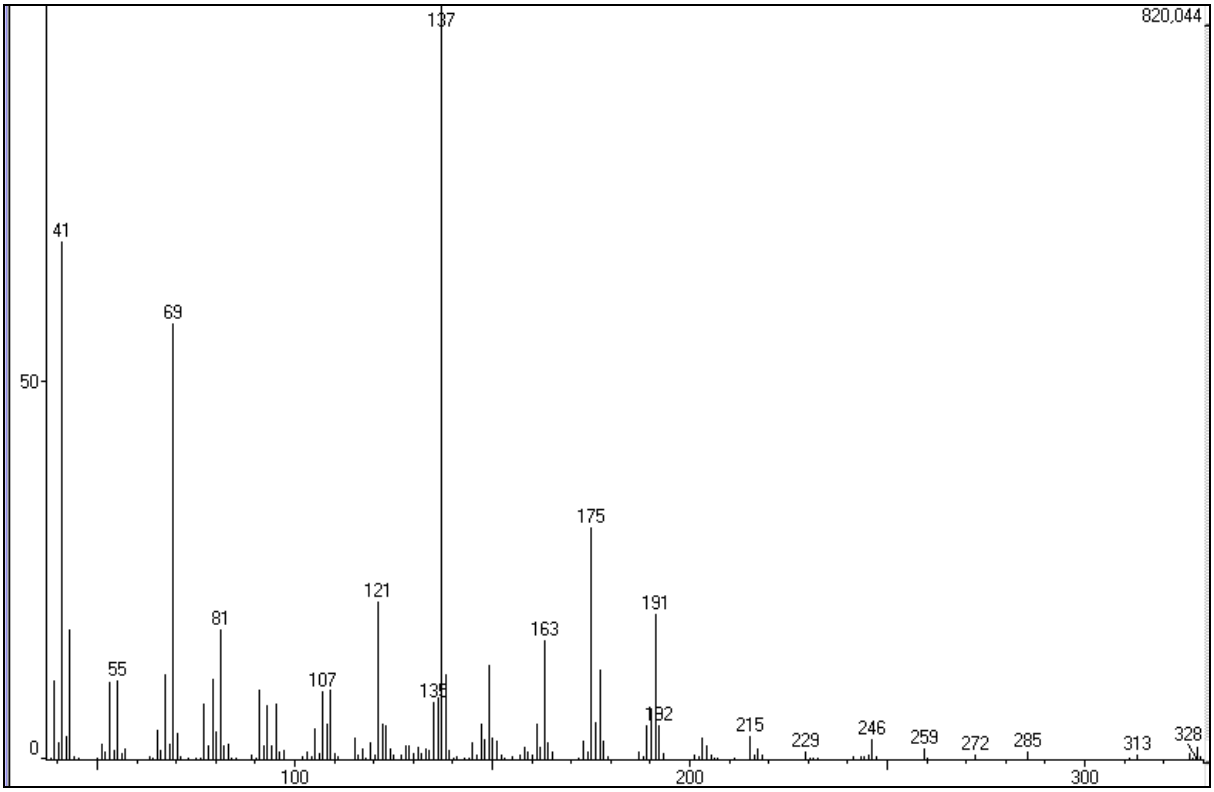


Figura 38. Espectro de massas de **12** por I. E. (70 ev)

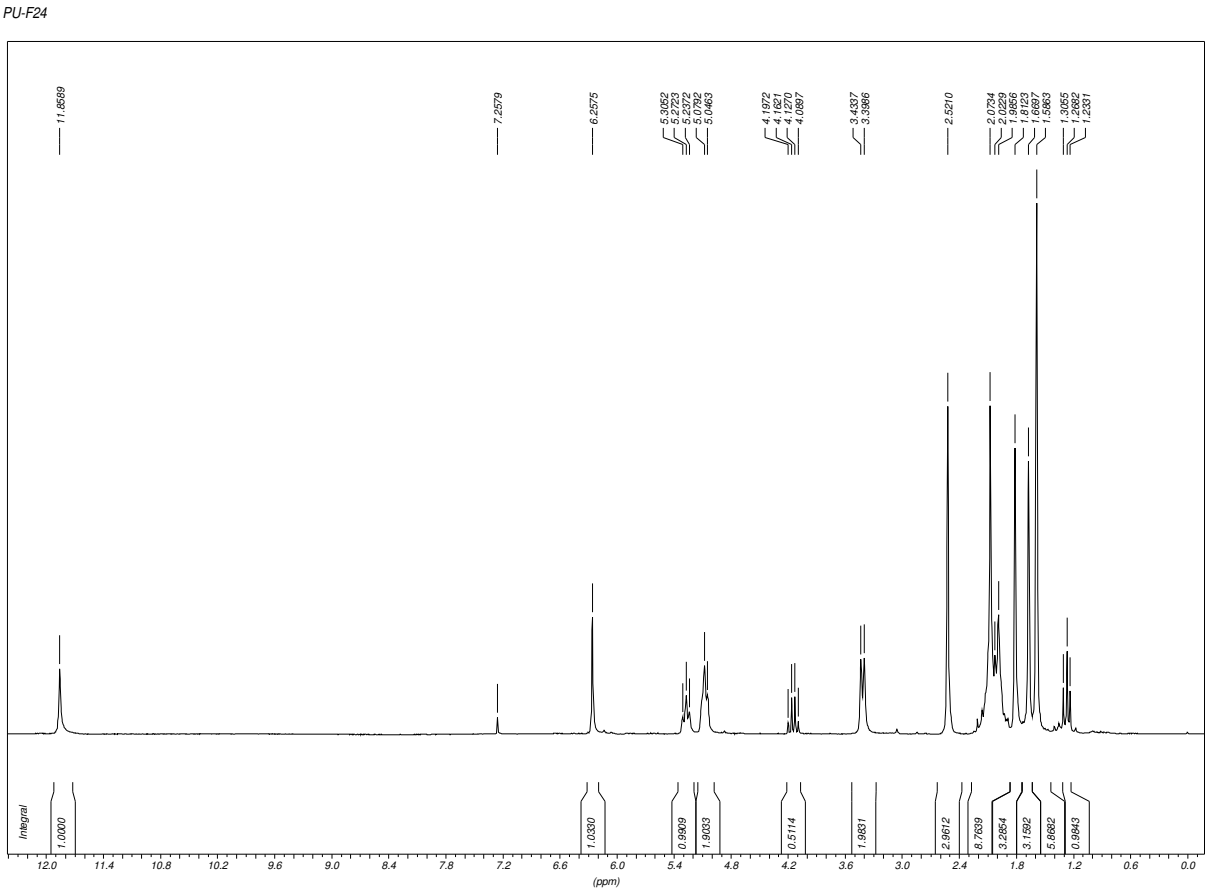


Figura 39. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **12** ($CDCl_3$, 200 MHz)

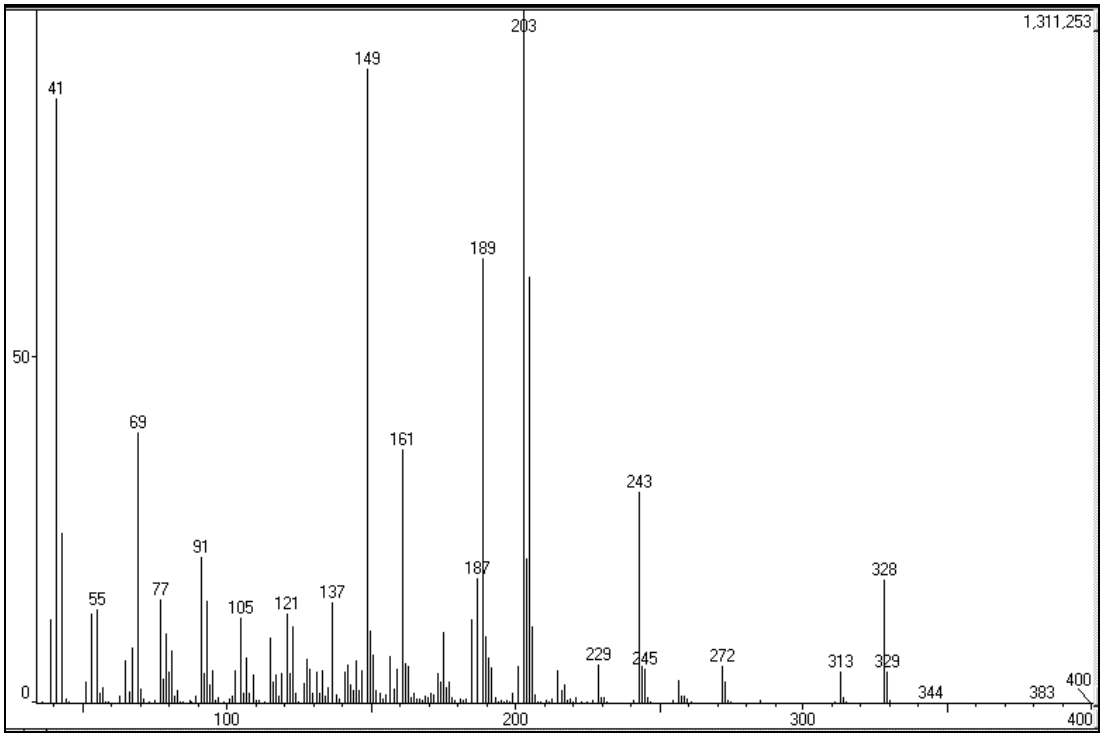


Figura 40. Espectro de massas de **8** por I. E. (70 ev)

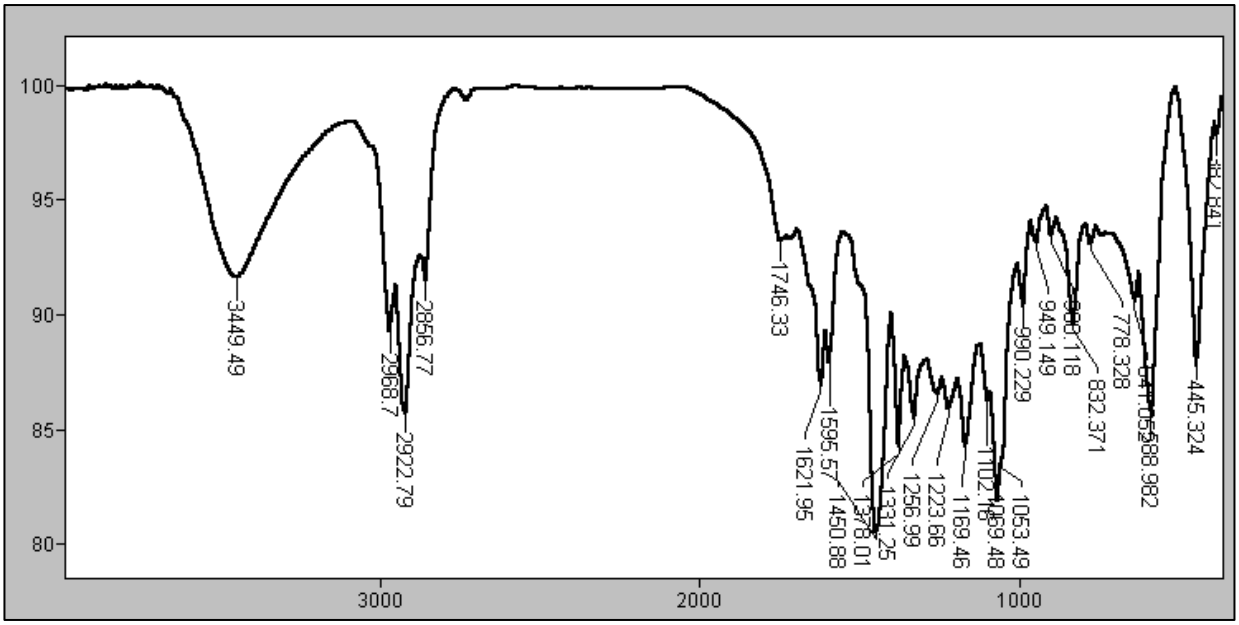


Figura 41. Espectro no IV da substância **8**

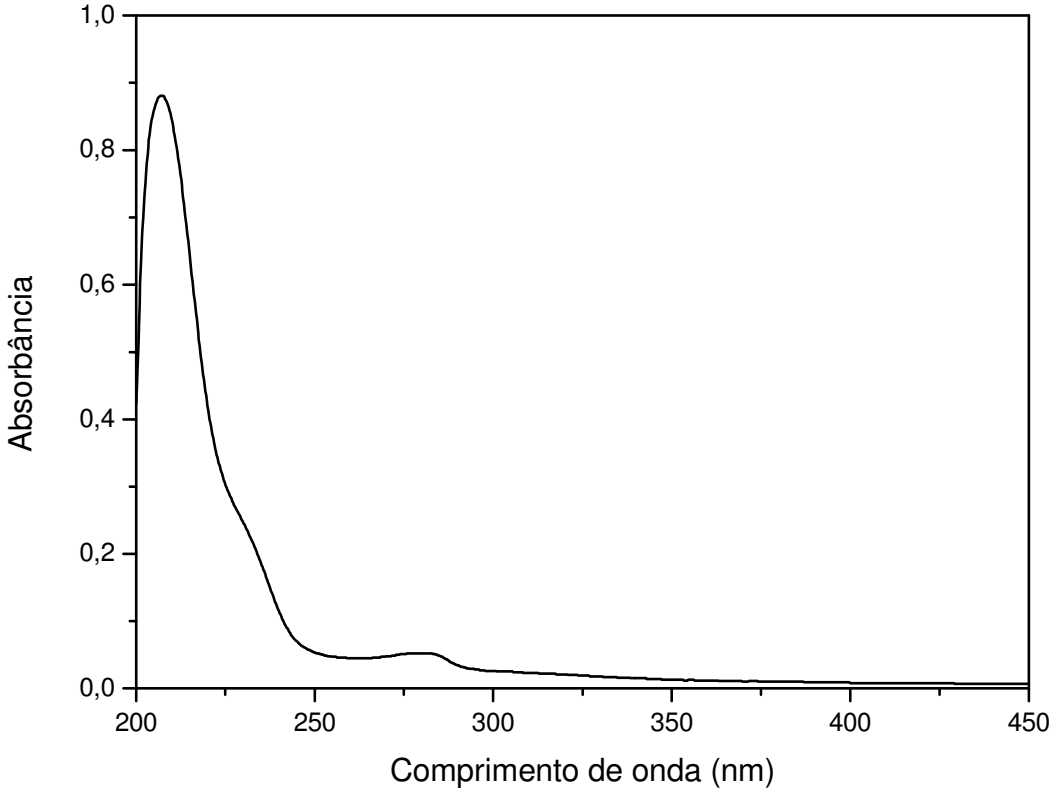


Figura 42. Espectro no UV da substância **8**

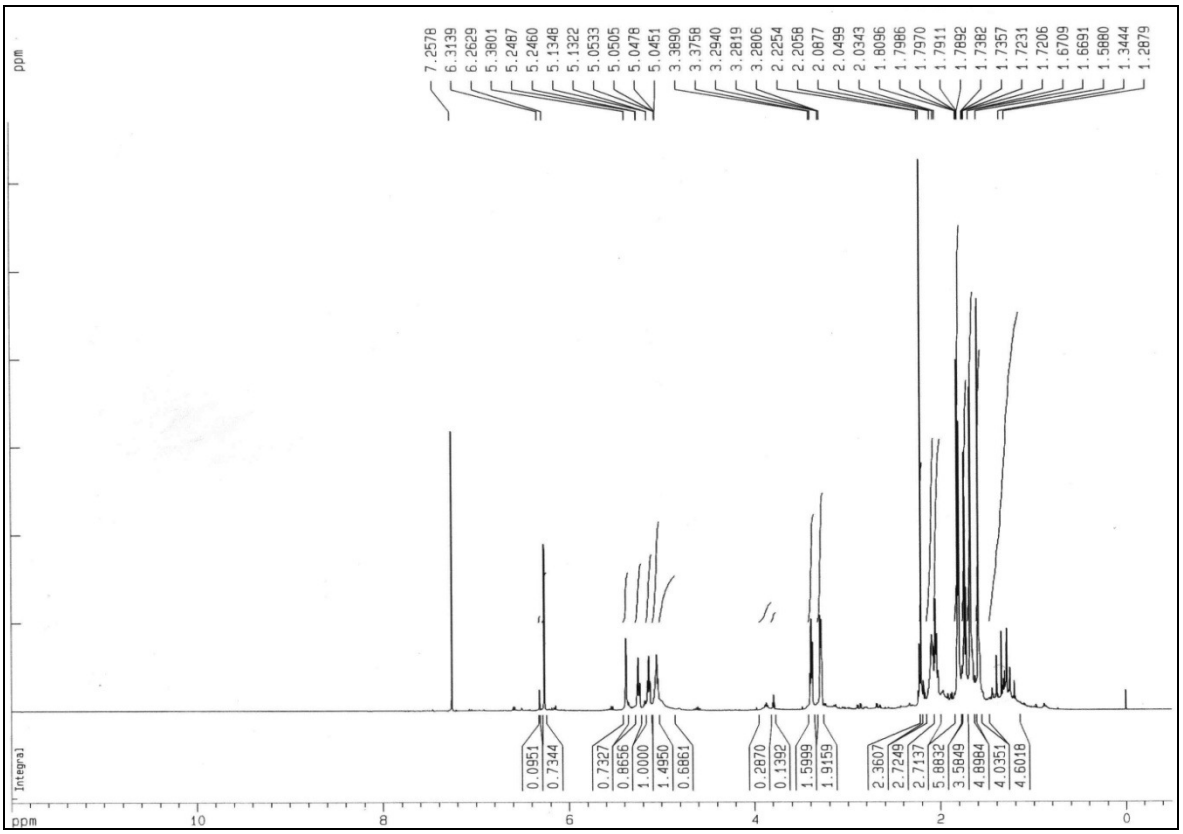


Figura 43. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **8** ($CDCl_3$, 500 MHz)

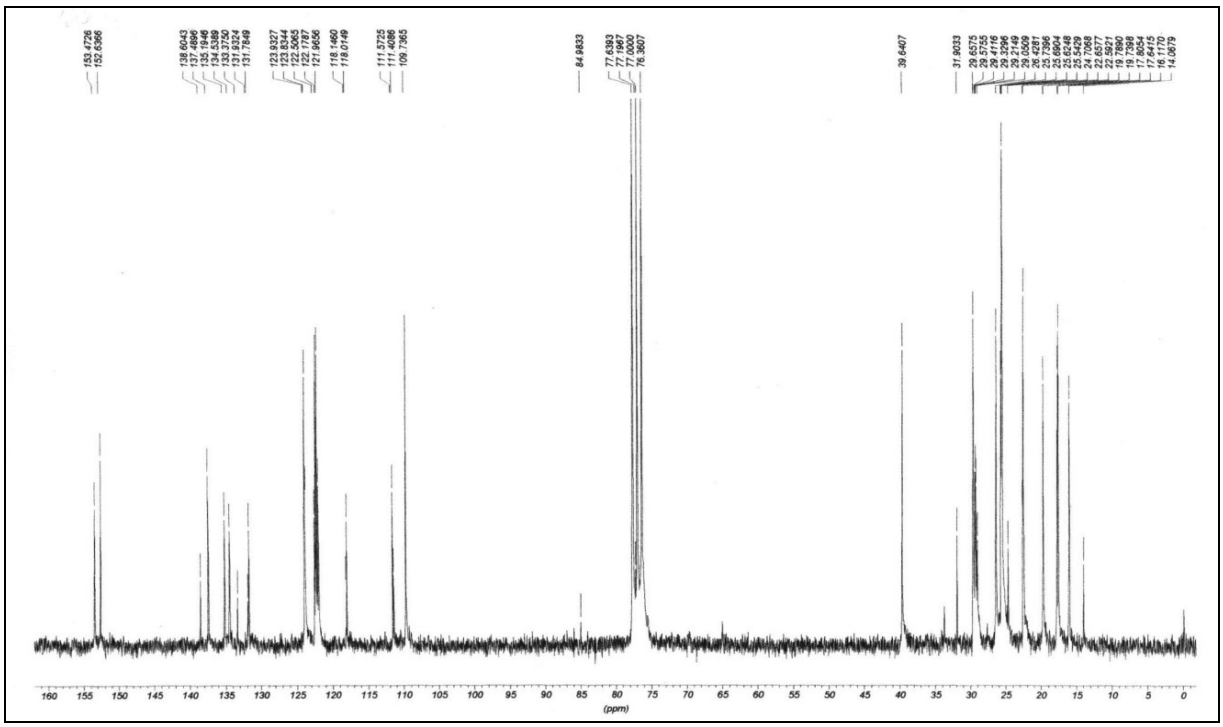


Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C de **8** ($CDCl_3$, 75 MHz)

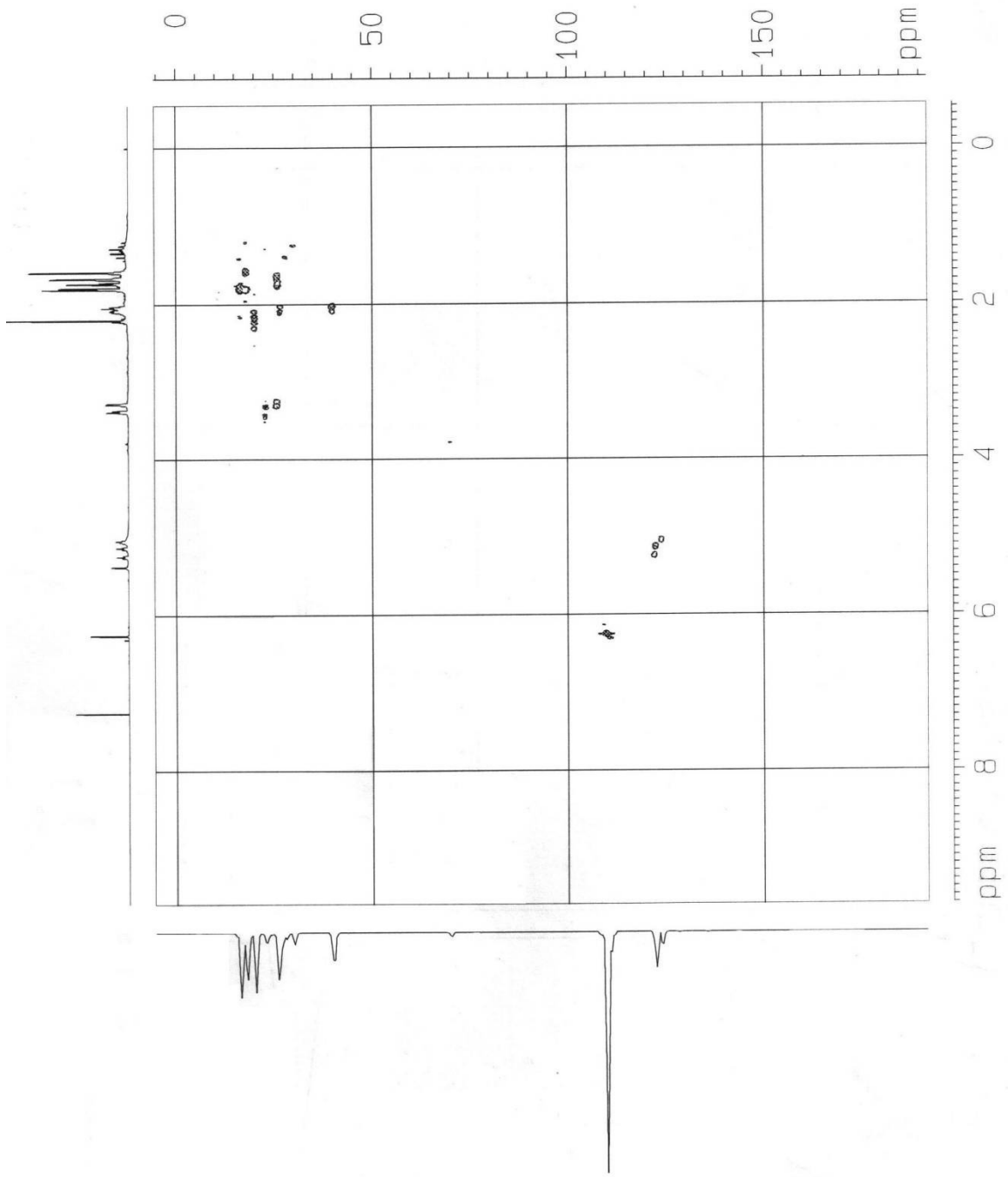


Figura 45. Espectro de HMQC da substância **8** ($CDCl_3$, 300 e 75 MHz)

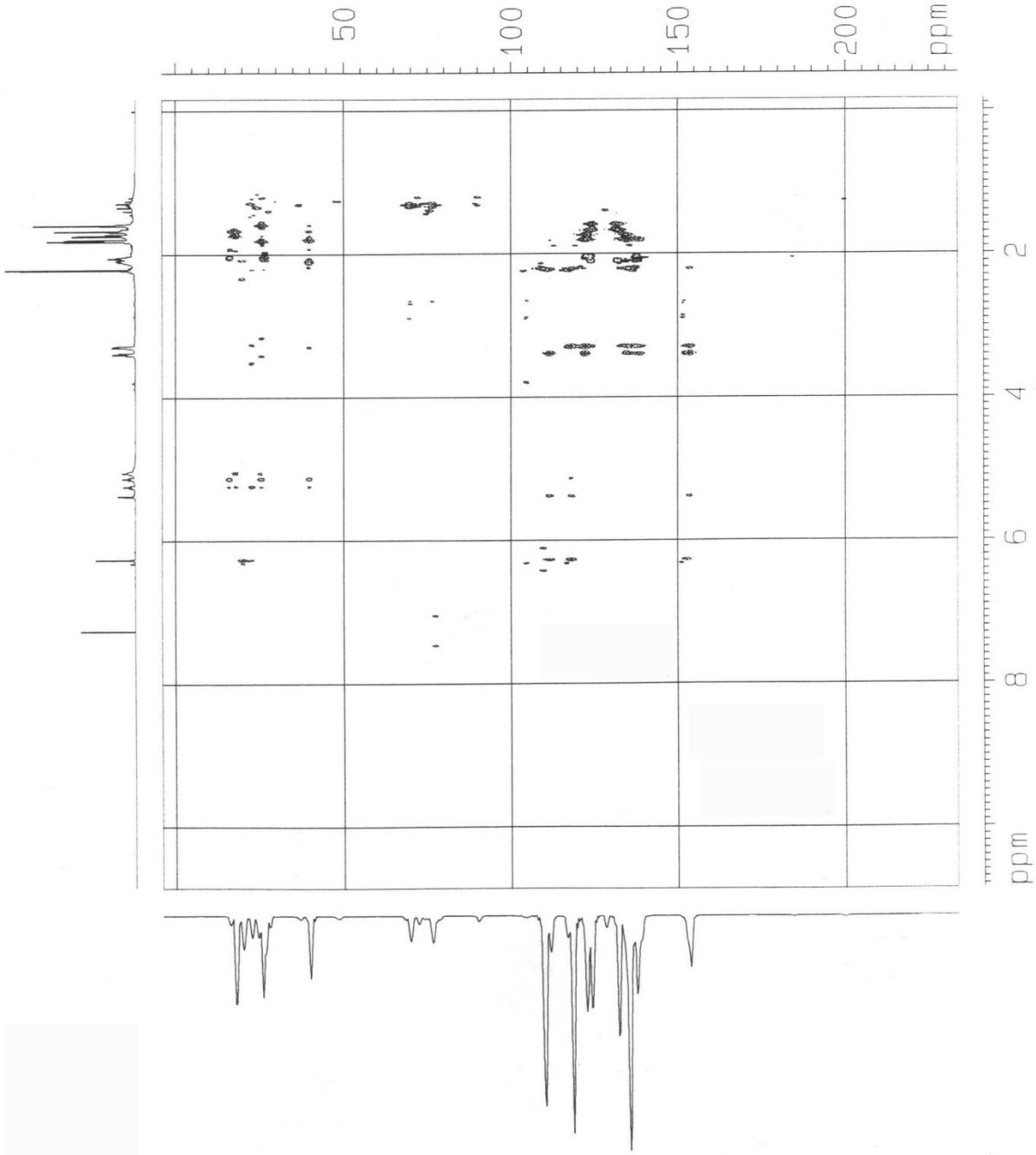


Figura 46. Espectro de HMBC de **8** ($CDCl_3$, 500 e 125 MHz)

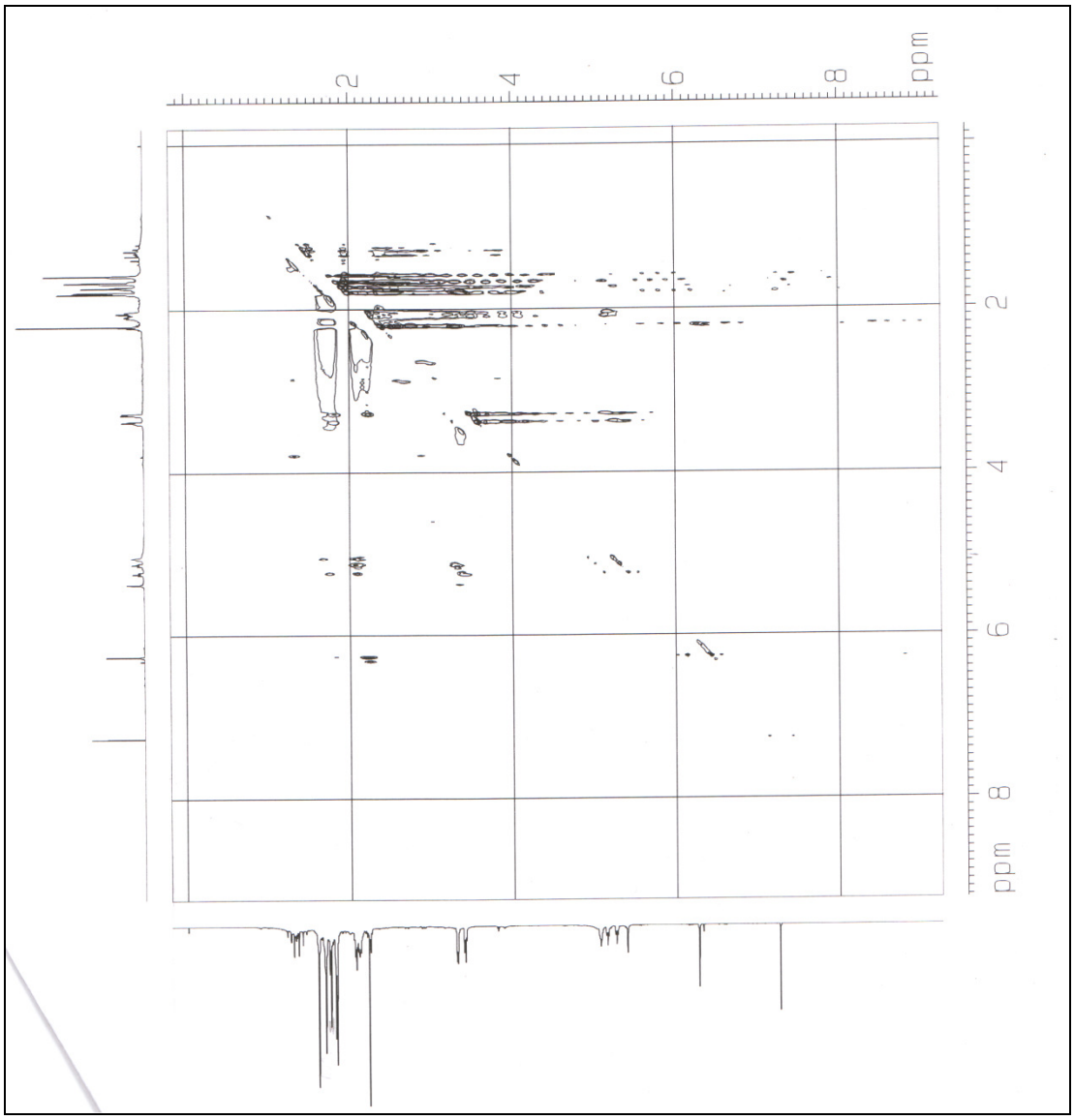


Figura 47. Espectro de NOESY de **8** ($CDCl_3$, 500 e 125 MHz)

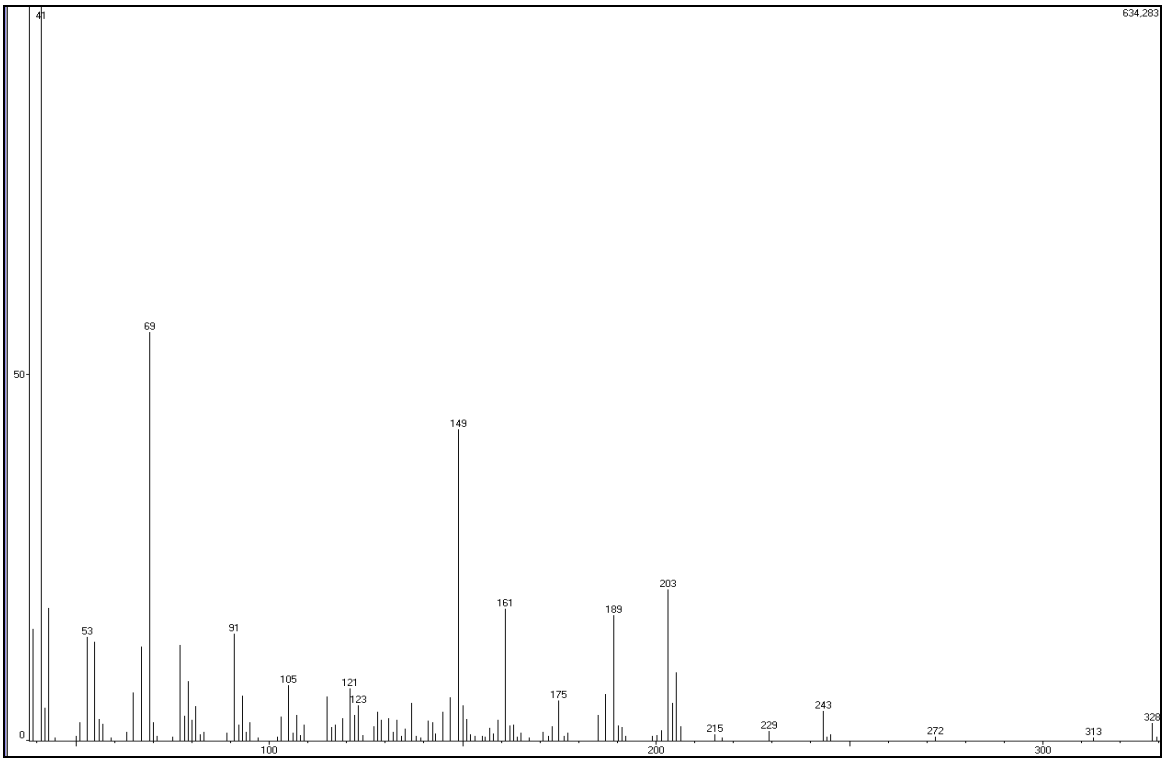


Figura 48. Espectro de massas de **10** por I. E. (70ev)

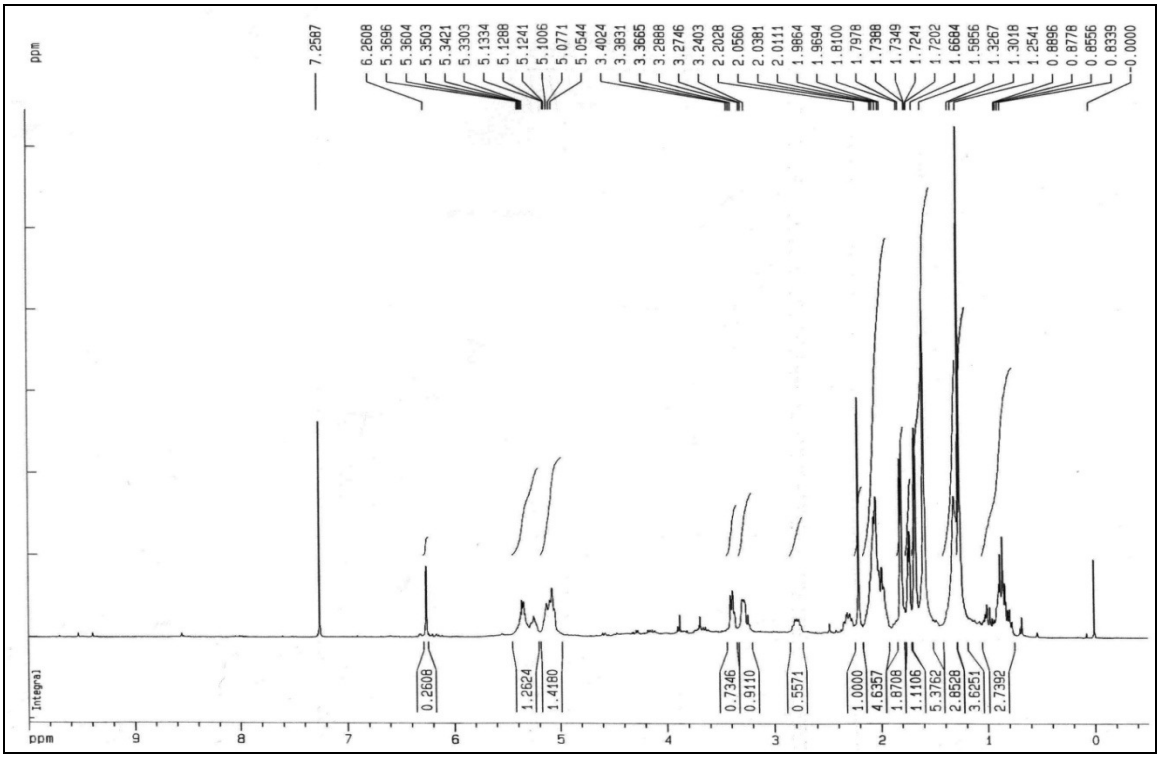


Figura 49. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **10** ($CDCl_3$, 300 MHz)

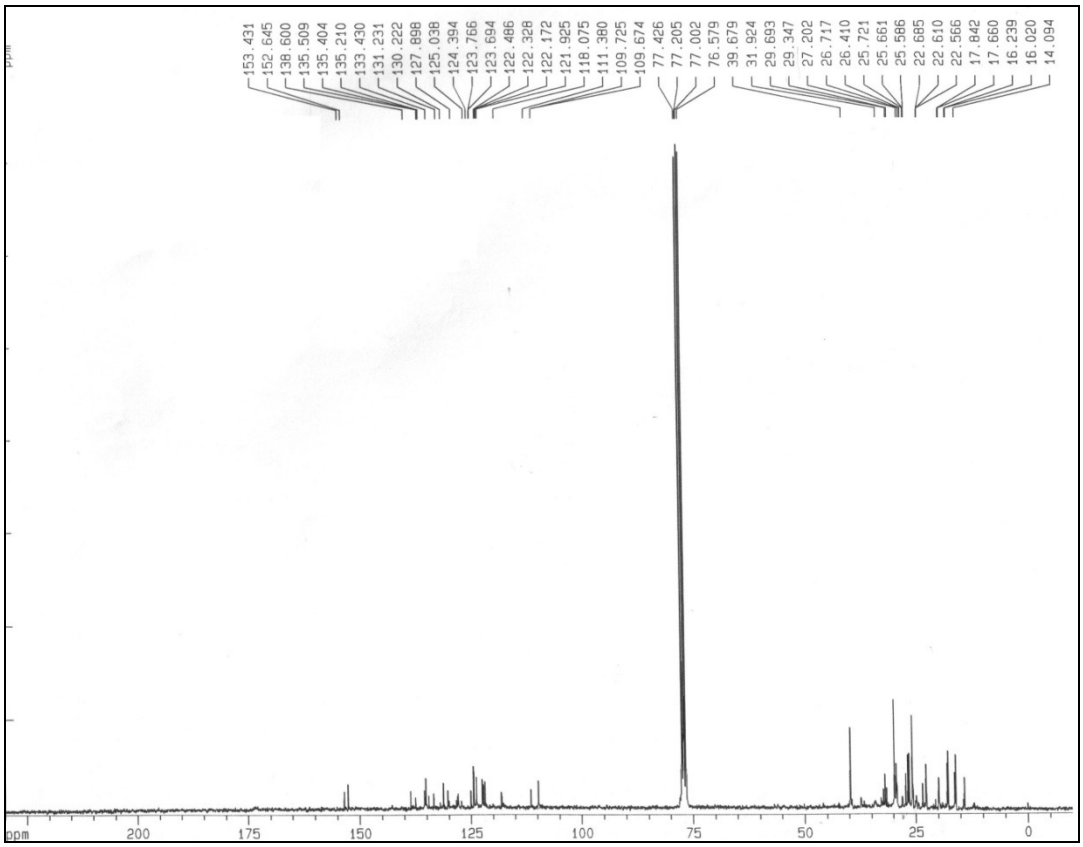


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C de **10** ($CDCl_3$, 75 MHz)

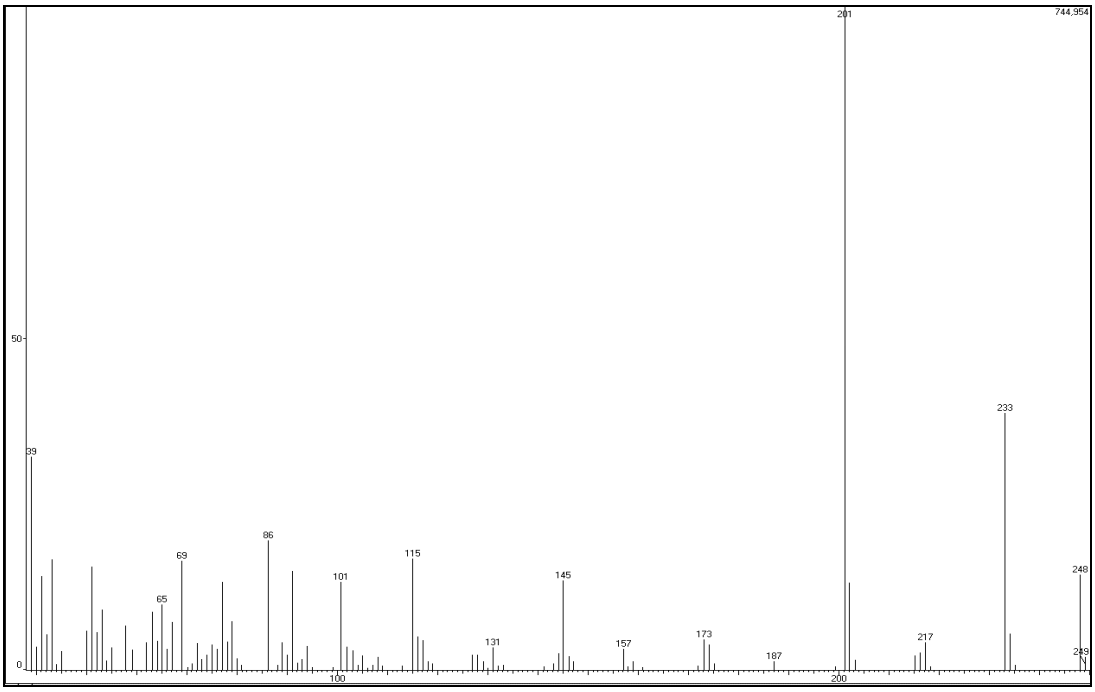


Figura 51. Espectro de massas de **14** por I. E. (70 ev)

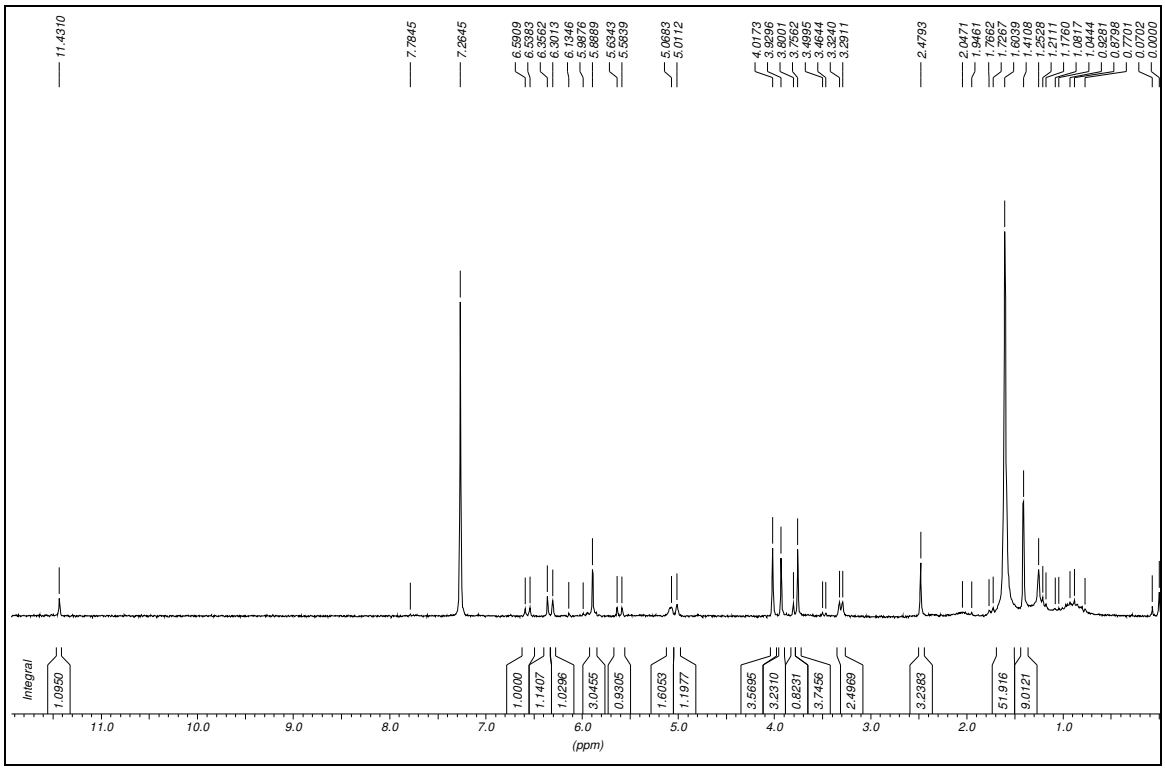


Figura 52. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **14** ($CDCl_3$, 200 MHz)

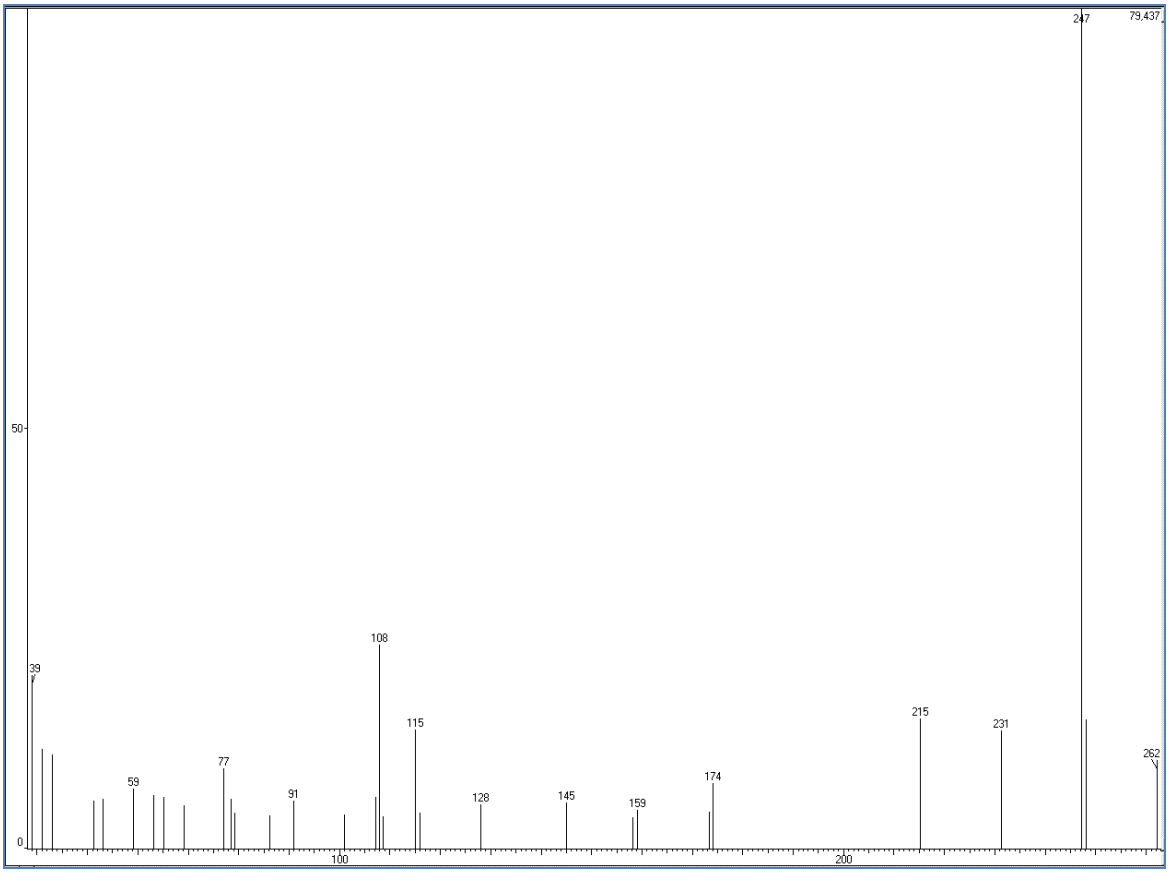


Figura 53. Espectro de massas de **15** por I. E. (70 ev)

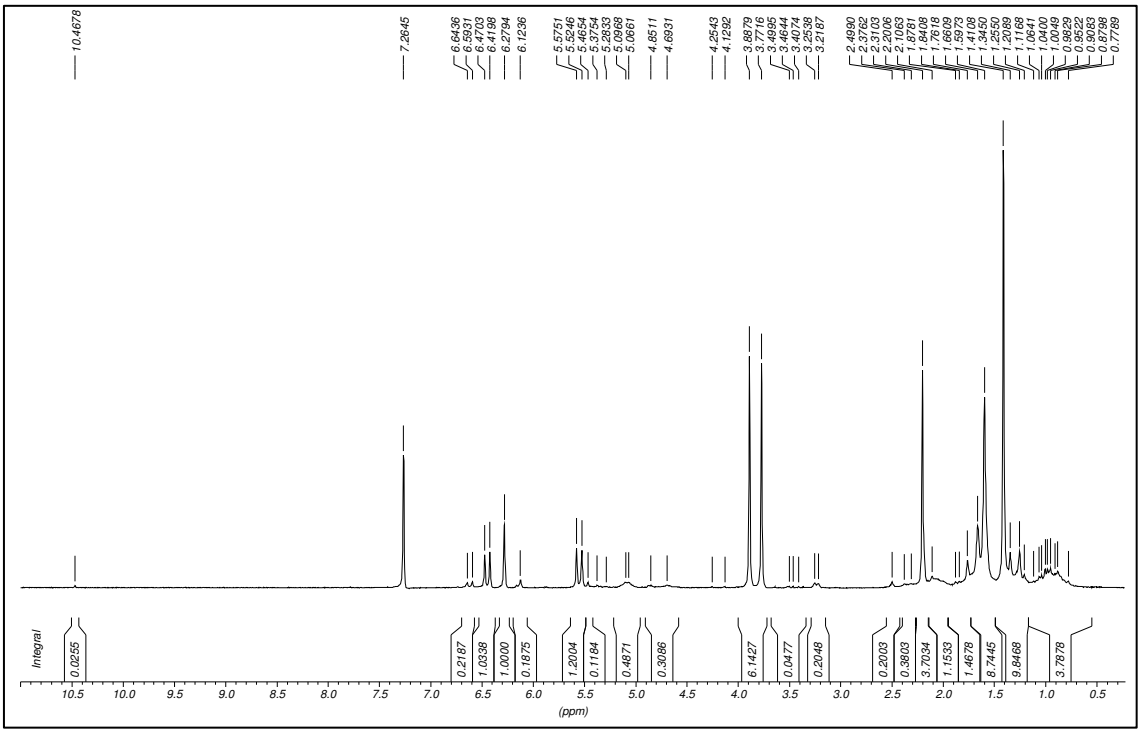


Figura 54. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **15** ($CDCl_3$, 200 MHz)

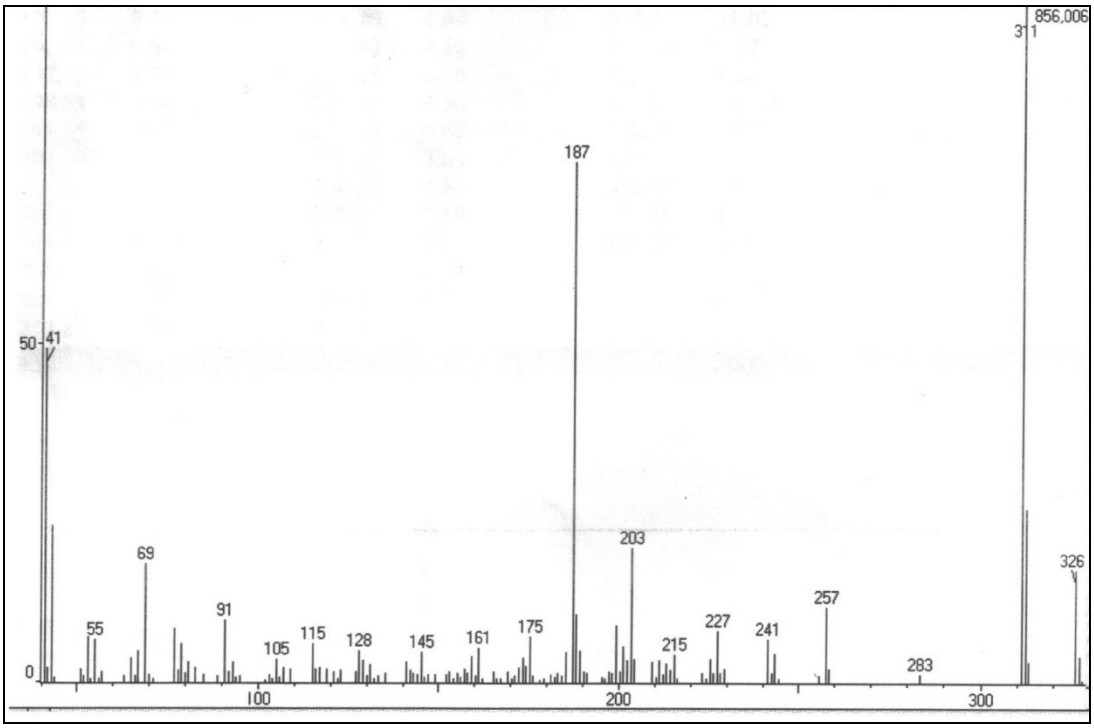


Figura 55. Espectro de massas de **9** por I. E. (70 ev)

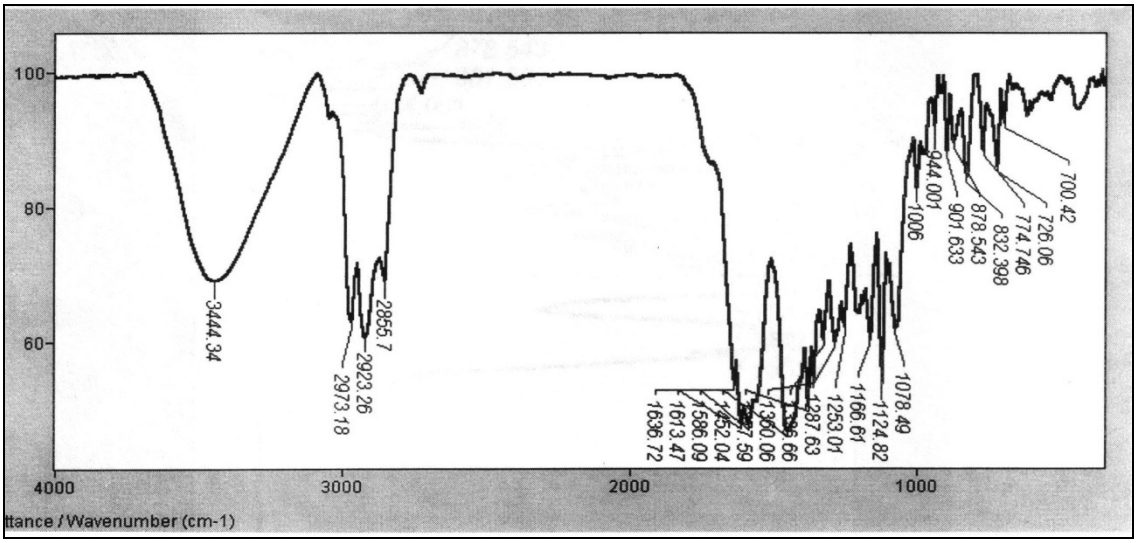


Figura 56. Espectro no IV da substância **9**

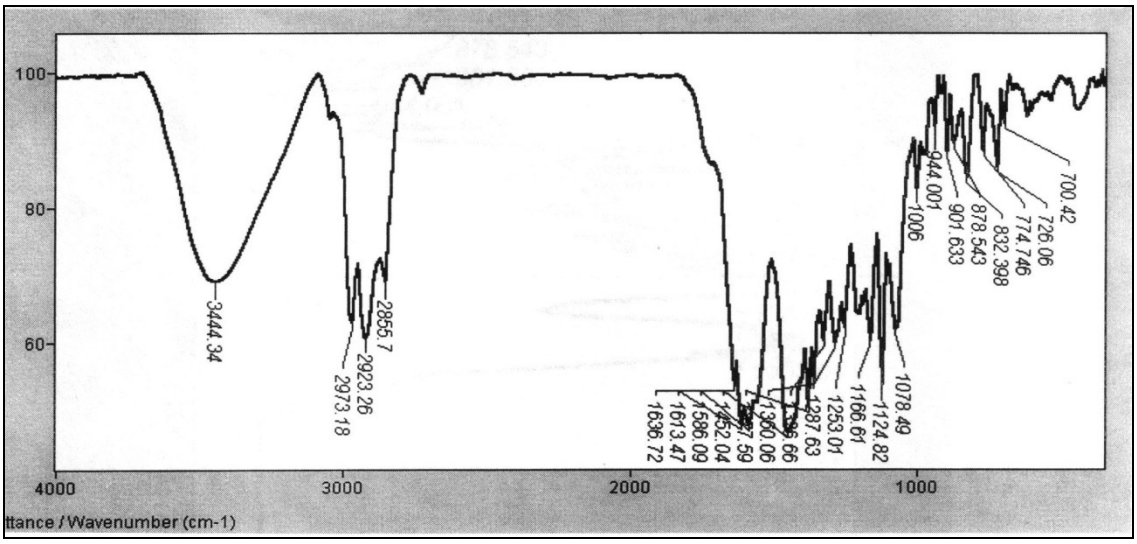


Figura 57. Espectro no UV da substância **9**

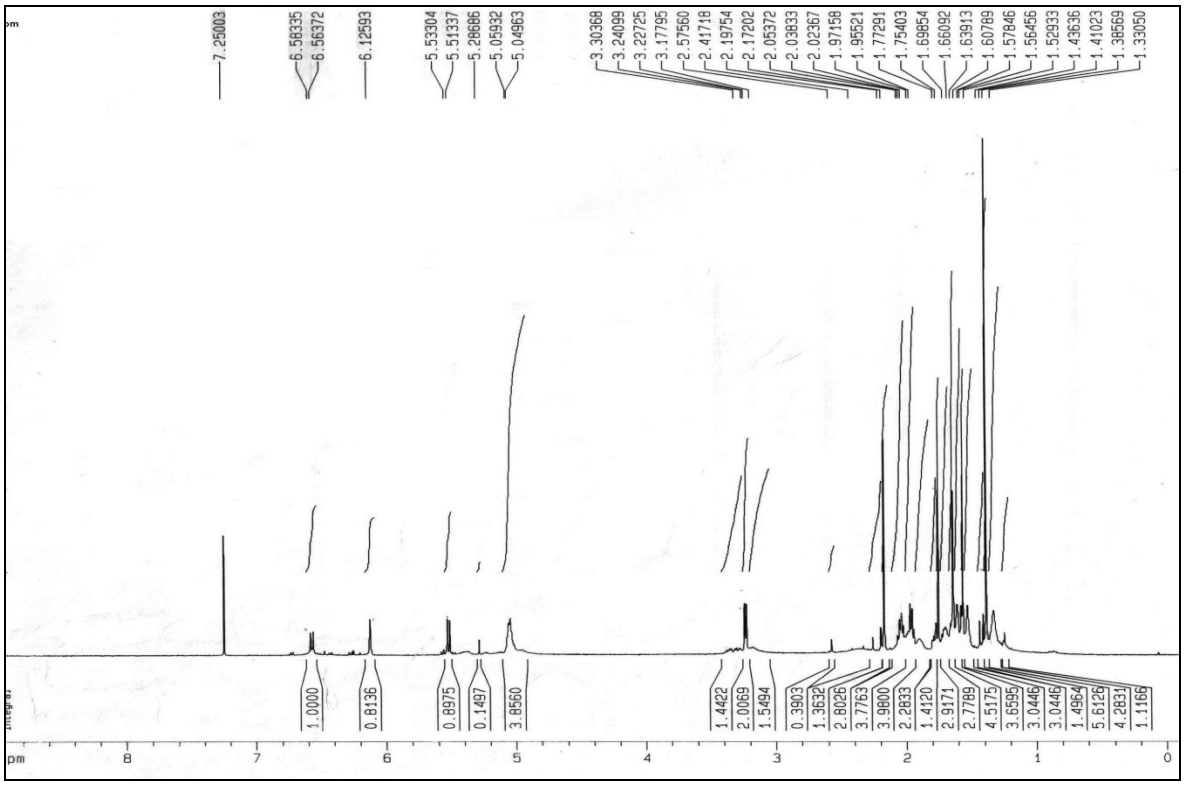


Figura 58. Espectro de RMN de ^{1}H da substância **9** ($CDCl_3$, 200 MHz)

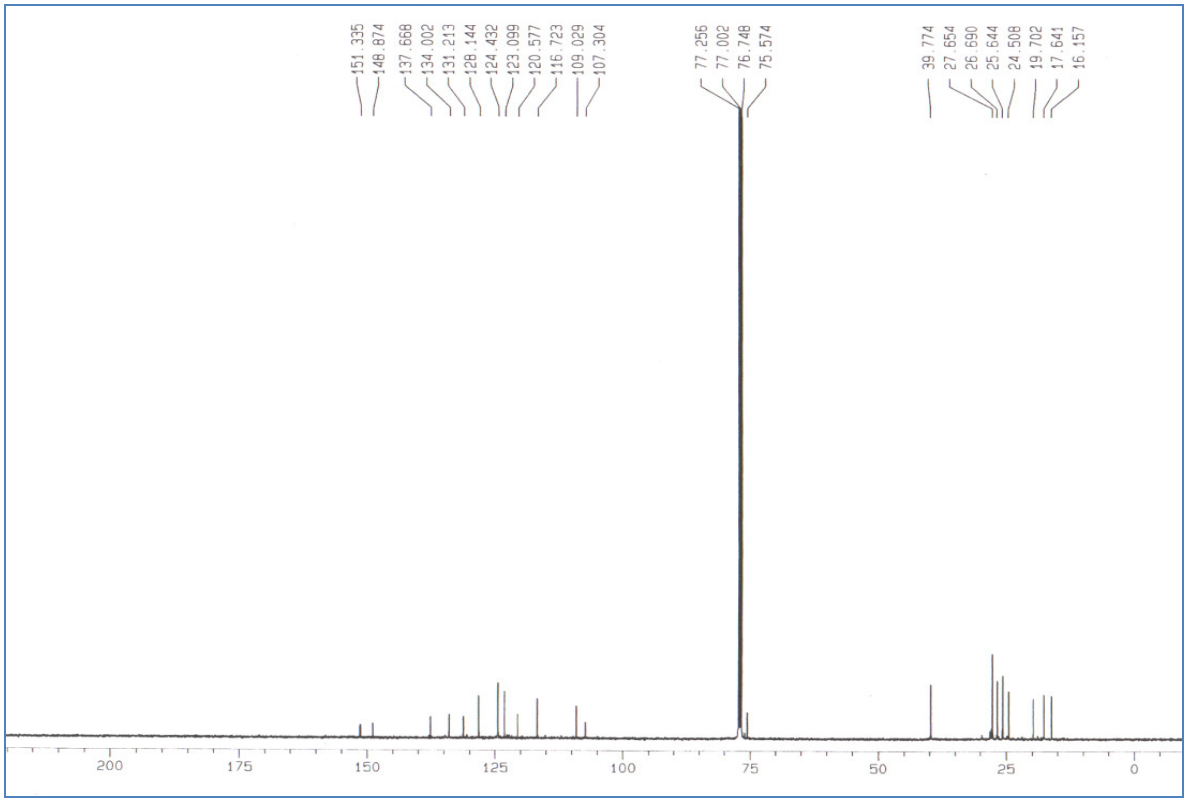


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C de **9** ($CDCl_3$, 75 MHz)

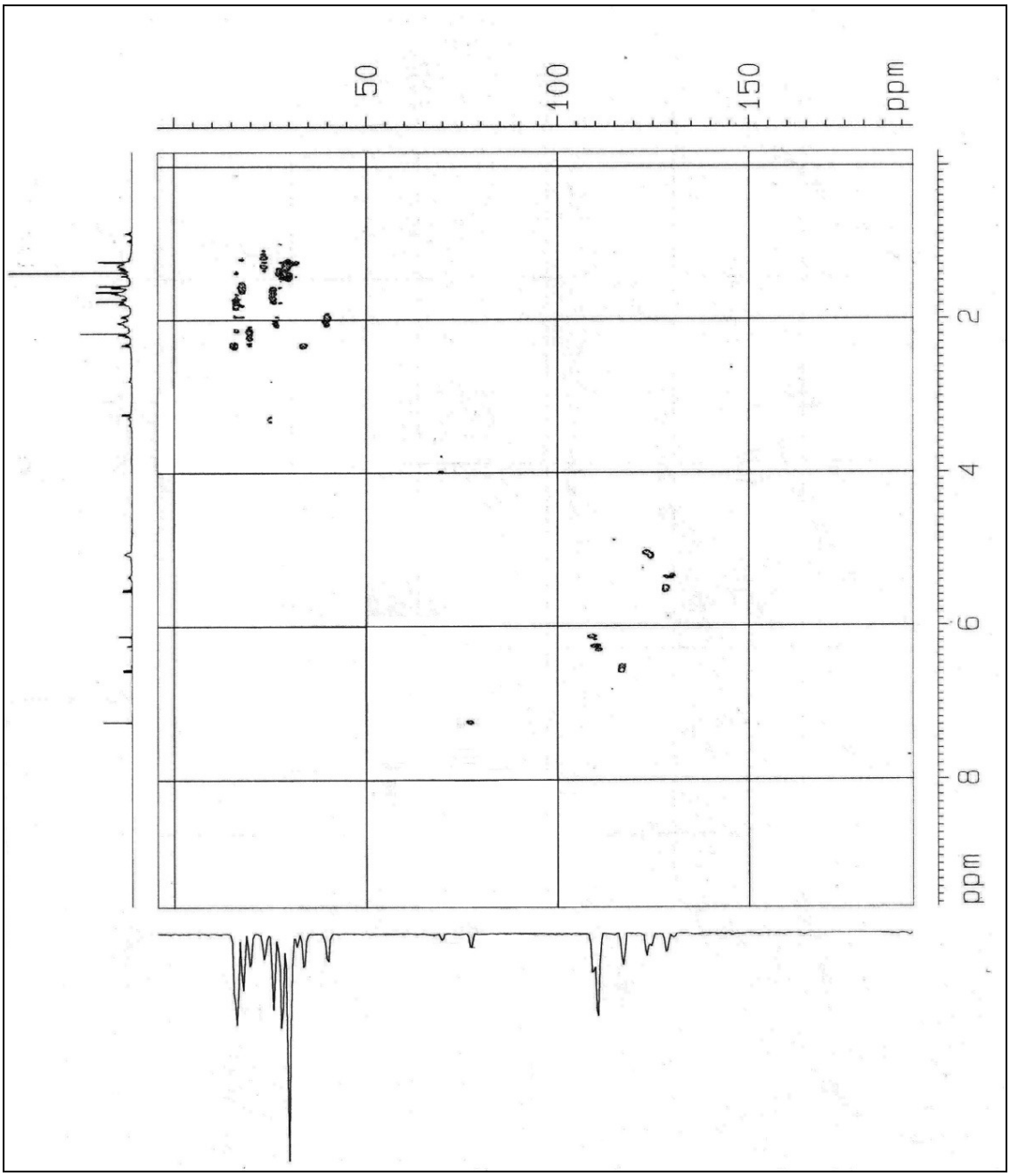


Figura 60. Espectro de HMQC da substância **9** ($CDCl_3$, 300 e 75 MHz)

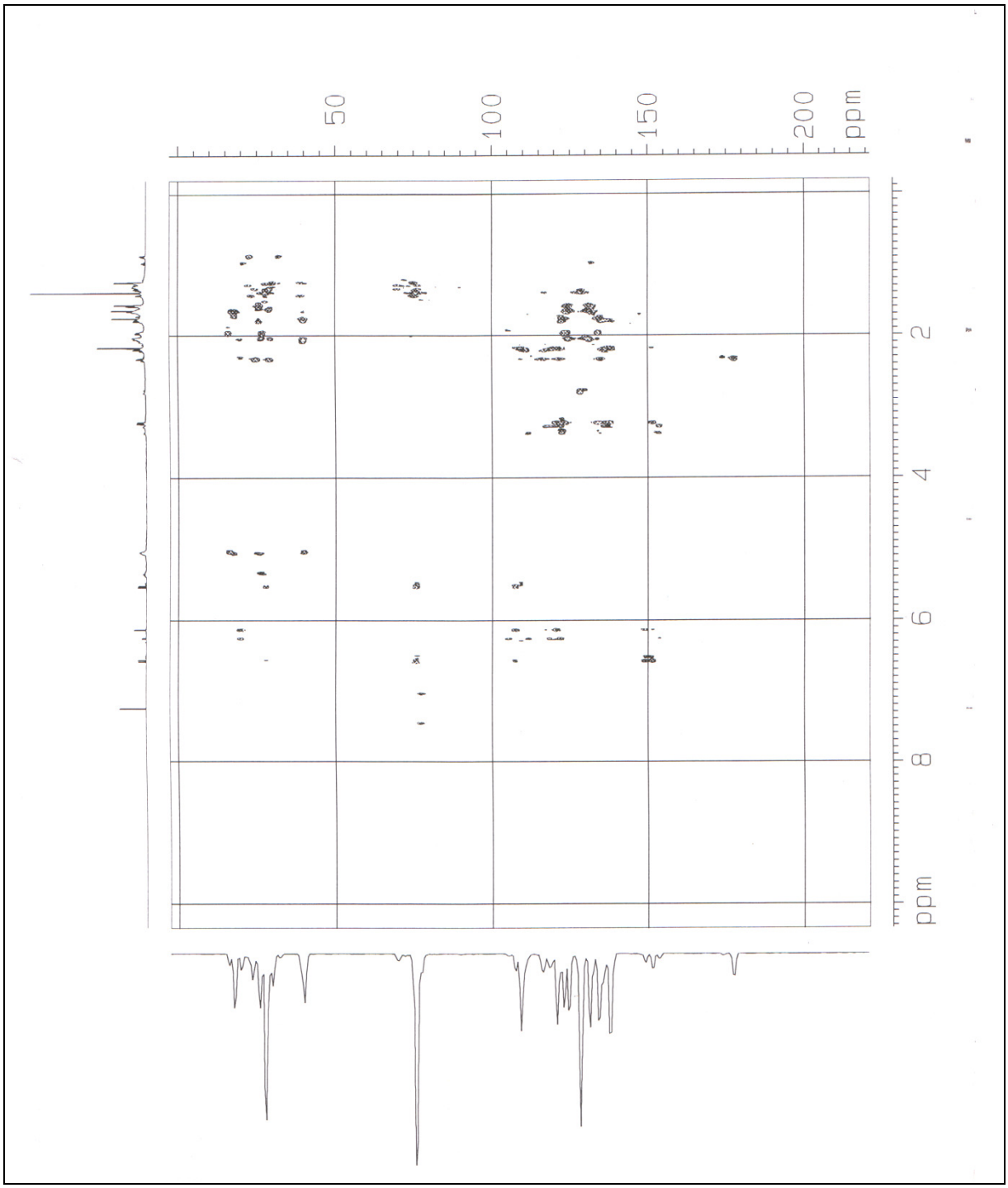


Figura 61. Espectro de HMBC de **9** ($CDCl_3$, 500 e 125 MHz)

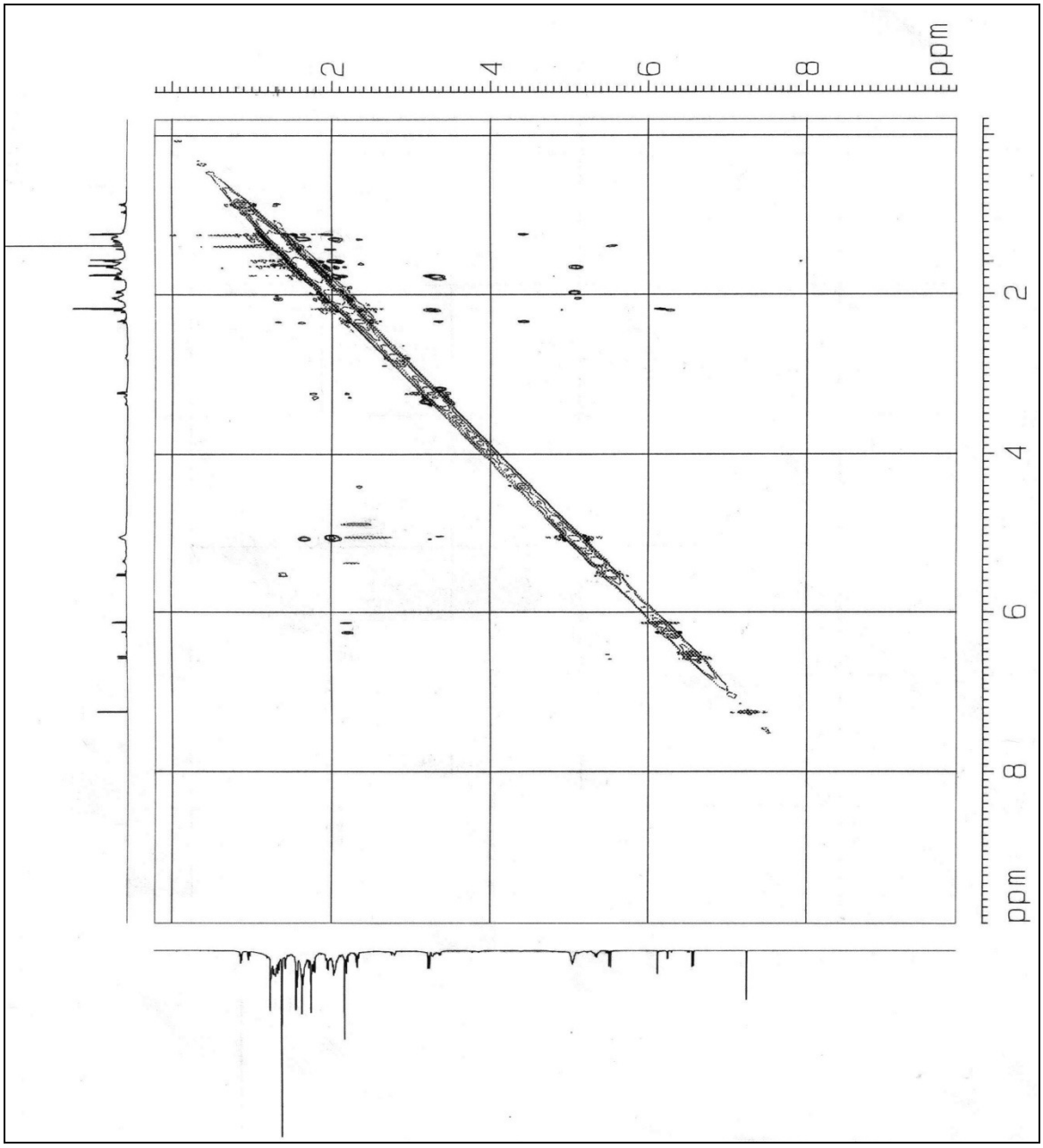


Figura 62. Espectro de NOESY de **9** ($CDCl_3$, 500 e 125 MHz)