

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

ÉRICA LUIZ DOS SANTOS

Biossíntese de neolignanas
em *Ocotea catharinensis* e
filogenia molecular de Lauraceae

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
18/07/2014

ÉRICA LUIZ DOS SANTOS

**Biossíntese de neolignanas
em *Ocotea catharinensis* e
filogenia molecular de Lauraceae**

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

Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo
2014



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

**“Biossíntese de neolignanas em *Ocotea catharinensis*
e filogenia molecular de Lauraceae”**

ÉRICA LUIZ DOS SANTOS

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

Aprovada por:

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos
IQ-USP

Profa. Dra. Beatriz Helena L. Noronha Sales Maia
UFPR

Prof. Dr. Claudio diVitta
IQ-USP

Prof. Dr. Fernão Castro Braga
UFMG

São Paulo
21 de maio de 2014

*A Deus, por tudo que tem
me concedido até hoje.*

*Dedico este trabalho à minha querida mãe Tina
pelo apoio incondicional em todos os momentos
da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e recursos financeiros.

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

À Profa. Eny E. I. S. Floh pela disponibilidade das culturas celulares.

Ao Dr. André W. Santos, pelo auxílio nas análises de proteômica.

Ao Prof. Gabriel Padilla e ao Dr. Juan Rojas pela colaboração no desenvolvimento nas análises de biologia molecular.

Aos meus pais Francisco e Argentina, meus irmãos Edma e Elton, por todo amor, apoio e incentivo.

Ao Alfredo Duarte, por todo amor, carinho, compreensão e, sobretudo pela paciência. Muito obrigada!

À Nídia C. Yoshida, pela amizade, por todos esses anos de convívio. Obrigada por ser uma irmã pra mim. Não de sangue, mas com certeza uma das maiores que a vida já me deu.

Aos amigos e colegas do LQPN: Anderson, Augusto, Camila, Celso, Edgard, Eduardo, Fábio Rodrigues, Gerardo, Giovana, Harold, Igor, Karina, Lydia, Marcilio, Mauro, Renata, Tara e Yasmin, por toda a ajuda e momentos compartilhados.

Às queridas amigas Adriana Machado, Ana Paula Pitarelo, Daiane Alberton, Fernanda F. de Jesus, pela torcida e incentivo apesar da distância.

Aos amigos e colegas do BIOCEL, Amanda, André, Bruno, Carminha, Carol Arcanjo, Fernanda, Leandro e Leonardo Jo, pelo auxílio e convivência harmoniosa durante esse período.

Ao Joaquim Matheus, pela amizade, pelas boas risadas, momentos de descontração e por me ensinar a tratar os solventes utilizados nas preparações sintéticas. Muito obrigada!

Ao Andreas (B5 superior) pelo auxílio nas reações de ozonólise

Ao Marcos V. Archilha (o ML) pelas análises de RMN.

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

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

A todos, meus sinceros agradecimentos ...

"Cada planta é um livro, com informações preciosas, sobre o desenvolvimento da floresta, seu passado remoto, seu futuro. Destruir a floresta é como incendiar mil Alexandrias"

Otto R. Gottlieb

RESUMO

Santos, E. L. **Biossíntese de neolignanas em *Ocotea catharinensis* e filogenia molecular de Lauraceae**. 2014. 205p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Embriões somáticos de *Ocotea catharinensis* foram utilizados como modelo para a investigação da via biossintética para a formação de neolignanas com esqueleto benzofurânico, através do uso de precursores marcados com ^{13}C e análise dos produtos por RMN de ^{13}C . Isotopômeros de L - $[^{13}\text{C}]$ -fenilalanina administrados aos embriões, foram incorporados às neolignanas 5'-metoxiporosina e armenina B. Entre os precursores intermediários, o acetato de $[8\text{-}^{13}\text{C}]$ -coniferila, preparado a partir da condensação de Knoevenagel seguido de várias etapas, foi incorporado na neolignana 5'-metoxiporosina. No ensaio de bioconversão utilizando frações proteicas das culturas dos embriões de *O. catharinensis*, o acetato de coniferila foi convertido em isoeugenol que, junto com o eugenol, seriam os precursores hipotéticos para a formação dessas neolignanas. A análise filogenética de diversas espécies de Lauraceae indicou a proximidade entre espécies do gênero *Ocotea*, produzindo como principais metabólitos lignanas e neolignanas. Foi obtida a seqüência parcial do gene de proteína dirigente em *O. catharinensis* e *O. macrophylla* e a análise filogenética baseada na homologia das seqüências de proteína dirigente de *Ocotea* e de espécies de diferentes gêneros, indicaram um clado distinto formado para espécies de *Ocotea*. Estes dados dão suporte para a proposta de que neolignanas di-hidrobenzofurânicas seriam oriundas do acoplamento oxidativo entre unidades de *E*-isoeugenol e 5-metóxi-eugenol, com possível participação de proteína dirigente na regio- e estereoespecificidade das reações de dimerização. Baseando-se nestes resultados foi possível propor algumas etapas envolvidas na biossíntese de neolignanas.

Palavras-chave: Lauraceae, *Ocotea*, *Ocotea catharinensis*, biossíntese, incorporação, proteína dirigente.

ABSTRACT

Santos, E. L. **Biosynthesis of neolignans in *Ocotea catharinensis* and phylogeny of Lauraceae**. 2014. 205p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Somatic embryos of *Ocotea catharinensis* were used as model to investigate the biosynthetic pathway of benzofuran neolignans formation by means of feeding precursors followed by analysis with ^{13}C NMR. Isotopomers of *L*-[^{13}C]-phenylalanine were administered to embryos and incorporated into di-hydrobenzofuran neolignans. Among the intermediate precursors, [8- ^{13}C]-coniferyl acetate, prepared by Knoevenagel and several steps, was incorporated in the neolignan 5'-methoxyporosin. The studies of bioconversion using protein fraction obtained from the embryogenic cultures, the precursor coniferyl acetate was converted into isoeugenol, which together eugenol, is one of the putative precursors to the neolignans formation. Phylogenetic analysis of several species of Lauraceae indicated the proximity of *Ocotea* species producing lignans and neolignans as the main metabolites. A partial sequence of the dirigent protein gene from *O. catharinensis* and *O. macrophylla* were obtained and the phylogenetic analysis based on homology of dirigent protein sequences from *Ocotea* and from different plant genus indicated a distinct clade formed by *Ocotea* species. These findings support the hypothesis that the dihydrobenzofuran neolignans would be derived from the oxidative coupling between *E*- isoeugenol and 5- methoxy-eugenol and the dirigent protein would be involved in the regio- and stereospecificity of the dimerization reactions. Thus, it was possible to suggest some of the steps involved in the biosynthesis of neolignans.

Keywords: Lauraceae, *Ocotea*, *Ocotea catharinensis*, biosynthesis, incorporation, dirigent protein.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DIBAL-H	Hidreto de diisobutilalumínio
dl	Dubleto largo
DMAP	4-N,N-dimetilaminopiridina
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
dq	Duplo quarteto
dt	Duplo tripleto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM-ESI	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
EM-IE	Espectrometria de massas com ionização por elétrons
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
IE	Ionização por elétrons
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento

m	Multiplete
m/m	Relação massa/massa
MEOH	Metanol
MES	Ácido 2- <i>N</i> -(morfolino)-etanosulfônico
<i>m/z</i>	Relação massa carga
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
ppm	Partes por milhão
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Triplete
td	Triplo duplete
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
δ	Deslocamento químico em ppm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Árvore filogenética das ordens e famílias de Angiospermas. Os ramos são suportados por valores de <i>bootstrap</i> e Jackknife acima de 50%.....	22
Figura 1.2. Organização da região ITS. As setas indicam a orientação e posição aproximada dos iniciadores (Baldwin <i>et al.</i> , 1995).....	25
Figura 1.3. Região do gene <i>trnK</i> e seu intron contendo o marcador <i>matK</i> (Fonte: Young e Pamphilis, 2000).....	27
Figura 1.4. Metabólitos secundários do caule de <i>Ocotea catharinensis</i> (Haraguchi <i>et al.</i> , 1983).....	31
Figura 1.5. Metabólitos secundários das cascas, madeira e folhas de <i>Ocotea catharinensis</i> (Ishige <i>et al.</i> , 1991).....	32
Figura 1.6. Metabólitos secundários das folhas de <i>Ocotea catharinensis</i> (Lordello e Yoshida, 1997).....	33
Figura 1.7. Metabólitos secundários das folhas e embriões de <i>Ocotea catharinensis</i> (Funasaki, <i>et al.</i> , 2009).....	34
Figura 1.8. Diversidade estrutural das neolignanas. Representação dos sete principais esqueletos neolignânicos.....	38
Figura 3.1. (A) Cultivo <i>in vitro</i> de embriões de <i>O. catharinensis</i> ; (B) Embriões somáticos no estágio globular.....	49
Figura 3.2. Partição do extrato hidroalcoólico.....	50
Figura 3.3. Preparação dos extratos para purificação das substâncias por CCDP.....	90
Figura 3.4. Reação de PCR com os iniciadores <i>matKF</i> e <i>matKR</i> ; Gel de agarose 1,0 %, 90 V, 30 min; (OC) <i>O. catharinensis</i> ; (1394 A) <i>Aniba parviflora</i> ; (1264) <i>Licaria rodriguesii</i>	104
Figura 4.1. Neolignanas identificadas nos embriões de <i>O. catharinensis</i>	105
Figura 4.2. Perfil cromatográfico por CLAE do extrato de CHCl_3 dos embriões somáticos de <i>O. catharinensis</i>	111
Figura 4.3. Incorporação da 5'-metoxi-porosina enriquecida com isotopômeros de <i>L</i> -fenilalanina.....	114
Figura 4.4. Incorporação da armenina B enriquecida com isotopômeros de enriquecida com isotopômeros de <i>L</i> -fenilalanina.....	114
Figura 4.5. RMN de ^{13}C da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A) ; (B) Incorporação com <i>L</i> -[1- ^{13}C]-fenilalanina; (C) Incorporação com <i>L</i> -[2- ^{13}C]-fenilalanina e (D) Incorporação com <i>L</i> -[3- ^{13}C]-fenilalanina.....	117
Figura 4.6. RMN de ^{13}C da armenina B com abundância natural (A) ; (B) Incorporação com <i>L</i> -[1- ^{13}C]-fenilalanina; (C) Incorporação com <i>L</i> -[2- ^{13}C]-fenilalanina e (D) Incorporação com <i>L</i> -[3- ^{13}C]-fenilalanina.....	118
Figura 4.7. RMN de ^{13}C da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A) ; (B) 5'-metoxi porosina após incubação com ácido [8- ^{13}C]-ferúlico.....	121
Figura 4.8. RMN de ^{13}C da armenina B com abundância natural (A) ; (B) armenina B após incubação com ácido [8- ^{13}C]-ferúlico.....	121
Figura 4.9. Espectro de massas (IE) da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A) ; (B) Incorporação do ácido-[8- ^{13}C]-glicoferúlico; (A1) Ampliação de (A) ; (B1) Ampliação de (B)	124

Figura 4.10. RMN de ¹³ C da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) 5'-metoxiporosina após incubação com ácido [8- ¹³ C]-glicoferúlico.....	125
Figura 4.11. RMN de ¹³ C da armenina B com abundância natural (A); (B) armenina B após incubação com ácido [8- ¹³ C]-glicoferúlico.....	125
Figura 4.12. RMN de ¹³ C da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) 5'-metoxiporosina após incubação com álcool [8- ¹³ C]-coniferílico.....	127
Figura 4.13. Espectro de massas (IE) da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) Incorporação do acetato-[8- ¹³ C]-coniferílico; (A1) Ampliação de (A); (B1) Ampliação de (B).....	130
Figura 4.14. RMN de ¹³ C da 5'-metoxi porosina com abundância natural (A); (B) 5'-metoxiporosina após incubação com acetato [8- ¹³ C]-coniferílico.....	131
Figura 4.15. Análise por CLAE do acetato de coniferila.....	133
Figura 4.16. Análise por CLAE do eugenol.....	134
Figura 4.17. Análise por CLAE do <i>E</i> -isoeugenol.....	134
Figura 4.18. Análise por CLAE da fração enzimática dos embriões de <i>O. catharinensis</i> em tampão MES. (1); (2) e (3) substâncias presentes na fração enzimática.....	135
Figura 4.19. Análise por CLAE da conversão do acetato de coniferila em <i>E</i> -isoeugenol. (1); (2) e (3) substâncias presentes na fração enzimática; (S) substrato: acetato de coniferila; (P) produto: <i>E</i> -isoeugenol.....	135
Figura 4.20. Análise por CLAE do <i>E</i> -isoeugenol.....	137
Figura 4.21. Análise por CLAE do 5-metoxi eugenol.....	137
Figura 4.22. Análise por CLAE da 5'-metoxi-porosina.....	137
Figura 4.23. Análise por CLAE da amostra controle (extrato enzimático e tampão MES). (1); (2); (3) e (4) substâncias presentes na fração enzimática.....	138
Figura 4.24. Análise por CLAE da reação de bioconversão do <i>E</i> -isoeugenol e do 5-metoxi-eugenol. (1); (2); (3) e (4) substâncias presente na fração enzimática; (P1) Precursor 1: 5-metoxi-eugenol; (P2) Precursor 2: <i>E</i> -isoeugenol.....	138
Figura 4.25. Quantificação do DNA total em gel de agarose 1%.....	139
Figura 4.26. Amplificação da região do DNA com iniciador de proteína dirigente. Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder; controle negativo(C-); controle positivo (C+); <i>O. catharinensis</i> (OC); <i>O. macrophylla</i> (OM).....	140
Figura 4.27. Matriz alinhada através do programa MEGA [®] versão 5.05.....	141
Figura 4.28. Árvore filogenética não enraizada baseada nas seqüências de nucleotídeos do gene de proteína dirigente. Análise por Máxima Parcimônia. Busca heurística; bootstrap:1000; comprimento da árvore: 582 passos; índice de consistência (CI): 0.5241; índice de homoplasia (HI): 0.4759; índice de retenção (RI):0.6326; número de caracteres informativos: 292. As famílias dos táxons analisados estão representadas por cores.....	142
Figura 4.29. Matriz alinhada através do programa MEGA [®] versão 5.05.....	145
Figura 4.30. Árvore mais parcimoniosa baseada em seqüências de ITS de espécies de Lauraceae. Gomortega, Hordonia e Palmeria foram usadas como grupos externos (em vermelho). Dígitos acima dos ramos: valores de <i>bootstrap</i> da análise de máxima parcimônia/valores de probabilidades posteriores da análise Bayesiana. Número total de caracteres da matriz: 693, dos quais 65 foram eliminados. Análise por	

Máxima Parcimônia: Busca heurística; *bootstrap*= 1000; comprimento da árvore = 1199 passos; índice de consistência (CI) = 0,5179; índice de homoplasia (HI) = 0,4821; índice de retenção (RI) = 0,6560; algoritmobranch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 245; 250 caracteres constantes. *Score* das melhores árvores encontradas: 1199. Análise Bayesiana: busca MCMC; modelo evolutivo: General Time Reversible + Proportionin variant + Gamma (GTR+I+G); Burn in= 89000. Em verde, destacam-se as novas espécies com ITS amplificado.....148

Figura 5.1. Proposta biossintética de neolignanas di-hidrobenzofurânicas em culturas de embriogênicas de *O. catharinensis*. Precursores testados e incorporados (preto). Precursores testados (vermelho). Produto observado (verde).....151

Figura 7.1. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico.....158

Figura 7.2. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico.....158

Figura 7.3. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) do ácido ferúlico com abundância natural.....159

Figura 7.4. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico.....159

Figura 7.5. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila com abundância natural.....160

Figura 7.6. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila com abundância natural.....160

Figura 7.7. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila com abundância natural.....161

Figura 7.8. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do [8- ^{13}C]-ferulato de metila.....161

Figura 7.9. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do álcool coniferílico com abundância natural.....162

Figura 7.10. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do álcool coniferílico com abundância natural.....162

Figura 7.11. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do álcool coniferílico com abundância natural.....163

Figura 7.12. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do álcool [8- ^{13}C]-coniferílico.....163

Figura 7.13. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da vanilina glicoacetilada.....164

Figura 7.14. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da vanilina glicoacetilada.....164

Figura 7.15. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) da vanilina glicoacetilada.....165

Figura 7.16. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ácido ferúlico glicoacetilado com abundância natural.....165

Figura 7.17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) ácido ferúlico glicoacetilado com abundância natural.....166

Figura 7.18. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) ácido ferúlico glicoacetilado com abundância natural.....166

Figura 7.19. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do ácido ferúlico glicoacetilado com abundância natural.....167

Figura 7.20. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do ácido [8- ^{13}C]-glicoacetilado.....167

Figura 7.21. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 200 MHz) do ácido glicoferúlico com abundância natural.....168

Figura 7.22. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 200 MHz) do ácido glicoferúlico com abundância

natural.....	168
Figura 7.23. Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 50 MHz) do ácido glicoferúlico com abundância natural.....	169
Figura 7.24. Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 50 MHz) ácido $[\text{8-}^{13}\text{C}]$ -glicoferúlico.....	169
Figura 7.25. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila protegido com TBS com abundância natural.....	170
Figura 7.26. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila protegido com TBS com abundância natural.....	170
Figura 7.27. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do ferulato de metila protegido com TBS com abundância natural.....	171
Figura 7.28. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do $[\text{8-}^{13}\text{C}]$ -ferulato de metila protegido com TBS.....	171
Figura 7.29. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) álcool coniferílico em abundância natural protegido com TBS.....	172
Figura 7.30. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do álcool coniferílico em abundância natural protegido com TBS.....	172
Figura 7.31. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do álcool coniferílico em abundância natural protegido com TBS.....	173
Figura 7.32. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do álcool $[\text{8-}^{13}\text{C}]$ -coniferílico protegido com TBS.....	173
Figura 7.33. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de coniferila em abundância natural protegido com TBS.....	174
Figura 7.34. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de coniferila em abundância natural protegido com TBS.....	174
Figura 7.35. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) acetato de coniferila em abundância natural protegido com TBS.....	175
Figura 7.36. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de $[\text{8-}^{13}\text{C}]$ -coniferila protegido com TBS.....	175
Figura 7.37. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de coniferila com abundância natural.....	176
Figura 7.38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de coniferila com abundância natural.....	176
Figura 7.39. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de coniferila com abundância natural.....	177
Figura 7.40. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de $[\text{8-}^{13}\text{C}]$ -coniferila.....	177
Figura 7.41. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da vanilina com a hidroxila fenólica protegida com TBS.....	178
Figura 7.42. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da vanilina com a hidroxila fenólica protegida com TBS.....	178
Figura 7.43. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) da vanilina com a hidroxila fenólica protegida com TBS.....	179
Figura 7.44. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do iodeto de etil trifetilfosfônio.....	179

Figura 7.45. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do iodeto de etil trifetilfosfônio.....	180
Figura 7.46. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do iodeto de [1,2- ^{13}C]-etil trifetilfosfônio.....	180
Figura 7.47. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do <i>Z</i> - e <i>E</i> -isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS.....	181
Figura 7.48. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do <i>Z</i> - e <i>E</i> -isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS.....	181
Figura 7.49. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do <i>E</i> -isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS após reação de fotoisomerização.....	182
Figura 7.50. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do <i>E</i> -isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS após reação de fotoisomerização.....	182
Figura 7.51. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do <i>E</i> -isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS.....	183
Figura 7.52. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do <i>E</i> -isoeugenol.....	183
Figura 7.53. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do <i>E</i> -isoeugenol.....	184
Figura 7.54. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do acetato de 4-alil-2,6-dimetoxifenila.....	184
Figura 7.55. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de 4-alil-2,6-dimetoxifenila.....	185
Figura 7.56. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de 4-alil-2,6-dimetoxifenila.....	185
Figura 7.57. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do fenilacetaldéido acetilado.....	186
Figura 7.58. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do fenilacetaldéido acetilado.....	186
Figura 7.59. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do fenilacetaldéido acetilado.....	187
Figura 7.60. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do iodeto de metil trifetilfosfônio.....	187
Figura 7.61. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do iodeto de metil trifetilfosfônio.....	188
Figura 7.62. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de 4-alil-2,6-dimetoxifenila.....	188
Figura 7.63. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de 4-alil-2,6-dimetoxifenila.....	189
Figura 7.64. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do 5-metoxi eugenol.....	189
Figura 7.65. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do 5-metoxi eugenol.....	190
Figura 7.66. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do 5-metoxi eugenol.....	190
Figura 8.1. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do extrato de clorofórmio dos embriões.....	191
Figura 8.2. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do extrato de CHCl_3 dos embriões.....	191
Figura 8.3. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do extrato de clorofórmio dos embriões.....	192
Figura 8.4. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do extrato de hexano dos embriões.....	192
Figura 8.5. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da 5'-metoxiporosina.....	193
Figura 8.6. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da 5'-metoxiporosina em abundância natural.....	193
Figura 8.7. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da 5'-metoxiporosina.....	194
Figura 8.8. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de abundância natural da 5'-metoxiporosina.....	194
Figura 8.9. Espectro de massas (EI) da 5'-metoxiporosina.....	195
Figura 8.10. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da armenina B.....	195
Figura 8.11. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da armenina	

B.....	196
Figura 8.12. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da armenina B.....	196
Figura 8.13. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da armenina B.....	197
Figura 8.14. Espectro de massas (EI) da armenina B.....	197
Figura 8.15. Espectro de massas (ESI) de incorporação de ^{13}C na 5'-metoxi porosina. (A) Controle; (B)–(D) 5'-metoxiporosina incorporada com L-[1- ^{13}C], L-[2- ^{13}C] e L-[3- ^{13}C]-fenilalanina, respectivamente.....	198
Figura 8.16. Espectro de massas (ESI) de incorporação de ^{13}C na armenina B. (A) Controle; (B) – (D) armenina B incorporada com L-[1- ^{13}C], L-[2- ^{13}C] e L-[3- ^{13}C] fenilalanina, respectivamente.....	199
Figura 8.17. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina enriquecida com L-[1- ^{13}C]-fenilalanina.....	200
Figura 8.18. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina enriquecida com L-[2- ^{13}C]-fenilalanina.....	200
Figura 8.19. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina enriquecida com L-[3- ^{13}C]-fenilalanina.....	201
Figura 8.20. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da armenina B enriquecida com L-[1- ^{13}C]-fenilalanina.....	201
Figura 8.21. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da armenina B enriquecida com L-[2- ^{13}C]-fenilalanina.....	202
Figura 8.22. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da armenina B enriquecida com L-[3- ^{13}C]-fenilalanina.....	202
Figura 8.23. Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico na 5'-metoxiporosina. (A) Controle; (B) 5'-metoxiporosina após incubação com ácido [8- ^{13}C]-ferúlico.....	203
Figura 8.24. Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico na armenina B. (A) Controle; (B) armenina B após incubação com ácido [8- ^{13}C]-ferúlico.....	203
Figura 8.25. Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação do álcool [8- ^{13}C]-coniferílico na 5'-metoxiporosina. (A) Controle; (B) 5'-metoxiporosina após incubação com álcool [8- ^{13}C]-coniferílico.....	204
Figura 8.26. Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação do álcool [8- ^{13}C]-coniferílico na armenina B. (A) Controle; (B) armenina B após incubação com álcool [8- ^{13}C]-coniferílico.....	204
Figura 8.27. Espectro de RMN-2D (HSQC, CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina após incubação com acetato de [8- ^{13}C]-coniferila.....	205
Figura 8.28. Espectro de RMN-2D (HMBC, CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina após incubação com acetato de [8- ^{13}C]-coniferila.....	205

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Gradiente de eluição em CLAE dos ensaios enzimáticos.....	93
Tabela 3.2. Seqüências dos iniciadores para proteína dirigente.....	96
Tabela 3.3. Iniciadores utilizados na amplificação da região ITS.....	98
Tabela 3.4. Espécies da família Lauraceae coletadas para análise.....	100
Tabela 3.5. Espécies da família Myristicaceae coletadas para análise.....	101
Tabela 3.6. Seqüências dos iniciadores utilizados na amplificação da região <i>matk</i>	103
Tabela 3.7. Temperaturas de cada uma das linhas do termociclador.....	103
Tabela 4.1. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da 5'-metoxiporosina.....	107
Tabela 4.2. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da armenina B.....	109
Tabela 4.3 Incorporação de isotopômeros de <i>L</i> -fenilalanina nas neolignanas 1 e 2	115
Tabela 4.4. Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, ¹ J) e HMBC (C-H, ⁿ J) (H 500 MHz, C 125 MHz, CDCl ₃).....	132
Tabela 4.5. Quantificação do DNA de <i>O. catharinensis</i> e <i>O. macrophylla</i>	139

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Filogenia e evolução de espécies de Lauraceae.....	21
1.2 Metabólitos secundários de <i>Ocotea catharinensis</i>	29
1.3 Biossíntese de neolignanas.....	35
1.4 Proteína dirigente.....	41
2. OBJETIVOS.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.3 Material vegetal.....	48
3.3.1 Multiplicação dos embriões somáticos de <i>O. catharinensis in vitro</i>	49
3.3.2 Obtenção dos extratos e isolamento das neolignanas dos embriões somáticos de <i>O. catharinensis</i>	49
3.3.2.1 Perfil cromatográfico dos extratos dos embriões somáticos.....	51
3.4 Preparação dos substratos utilizados nas reações de incorporação e conversão enzimática.....	51
3.4.1 Preparação do ácido [8- ¹³ C]-ferúlico.....	52
3.4.2 Preparação do álcool [8- ¹³ C]-coniferílico.....	53
3.4.3 Preparação do ácido [8- ¹³ C]-glicoferúlico.....	55
3.4.4 Preparação do acetato de [8- ¹³ C]-coniferila.....	58
3.4.5 Preparação do <i>E</i> -isoeugenol.....	63
3.4.6 Preparação do 5-metoxieugenol.....	68
3.4.7 Dados espectrométricos e propriedades físicas dos substratos preparados para os ensaios biossintéticos.....	72
3.5 Incorporação <i>in vitro</i> dos precursores nos embriões somáticos.....	86
3.5.1 Administração da L[1- ¹³ C]- [2- ¹³ C]-[3- ¹³ C]-fenilalanina.....	86
3.5.2 Administração do ácido [8- ¹³ C]-ferúlico.....	87
3.5.3 Administração do ácido [8- ¹³ C]-glicoferúlico.....	88
3.5.4 Administração do álcool [8- ¹³ C]-coniferílico.....	89
3.5.5 Administração do acetato de [8- ¹³ C]-coniferila.....	89
3.6 Ensaio de conversão enzimática.....	91
3.7 Filogenia molecular.....	94
3.7.1 Preparo do material vegetal.....	94
3.7.2 Extração de DNA.....	94

3.7.3	Quantificação de DNA.....	95
3.7.4	Amplificação do gene de proteína dirigente.....	96
3.7.5	Amplificação e sequenciamento da região ITS	98
3.7.5.1	Análise filogenética.....	99
3.7.6	Ampliação e sequenciamento da região matK.....	102
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
4.1	Análise dos extratos dos embriões somáticos de <i>O. catharinensis</i>	105
4.1.1	Isolamento e identificação das neolignanas.....	106
4.1.2.	Perfil cromatográfico dos extratos dos embriões.....	111
4.2	Biossíntese de neolignanas benzofurânicas e estudo de incorporação dos precursores enriquecido com carbono treze.....	112
4.2.1	Análise das incorporações de L[1- ¹³ C]- [2- ¹³ C]-[3- ¹³ C]-fenilalanina.....	113
4.2.2	Análise da incorporação do ácido [8- ¹³ C]-ferúlico.....	120
4.2.3	Análise da incorporação do ácido [8- ¹³ C]-glicoferúlico.....	122
4.2.4	Análise da incorporação do álcool [8- ¹³ C]-coniferílico.....	126
4.2.5	Análise da incorporação do acetato de [8- ¹³ C]-coniferila.....	128
4.4	Conversão enzimática.....	133
4.4.1	Conversão enzimática utilizando como substrato o acetato de coniferila.....	133
4.4.2	Conversão enzimática utilizando o <i>E</i> -isoeugenol e o 5-metoxieugenol.....	136
4.5	Amplificação e sequenciamento do gene de proteína dirigente.....	139
4.5.1	Quantificação de DNA.....	139
4.5.2	Filogenia da proteína dirigente.....	142
4.6	Amplificação e sequenciamento da região de ITS.....	144
4.6.1	Alinhamento da matriz análise filogenética da região ITS.....	144
5.	CONCLUSÕES.....	149
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
7.	APÊNDICE A: ESPECTROS DOS PRECURSORES SINTETIZADOS.....	158
8.	APÊNDICE B: ESPECTROS DOS PRODUTOS NATURAIS.....	191
ANEXO 1	206

1. INTRODUÇÃO

1.1. Filogenia e evolução de espécies de Lauraceae

As plantas sempre foram classificadas de acordo com suas características morfológicas micro- e macroscópicas. Entretanto, o emprego de estruturas moleculares de metabólitos secundários, a quimiosistemática, teve um considerável impacto na sistemática de plantas e um novo sistema de classificação foi desenvolvido de acordo com a distribuição destes metabólitos em um mesmo clado, implicando em forte significado filogenético ou ecológico para a sua ocorrência (Gottlieb, 1984; Wink, 2003; Reynolds, 2007).

Gottlieb (1982) propôs uma análise baseada em correlações de índices de oxidação de metabólitos secundários com índices de avanços evolutivos morfológicos (índice de Sporne), tornando a quimiosistemática menos dependente do enfoque da simples presença/ausência sugerindo correlações de tendência evolutiva em angiospermas. Propôs ainda esquemas biossintéticos baseados na fitoquímica comparativa de substâncias isoladas, classes de substâncias e padrões de substituição em classes de ocorrência uma mesma família de plantas, especialmente de Lauraceae e Myristicaceae entre outras (Gottlieb, 1972).

Os estudos acerca da origem e diversificação das Angiospermas ainda permanecem em discussão por serem considerados temas de alta complexidade e, desde a proposição da teoria da evolução por Darwin, tem sido considerada um “mistério abominável” (Davies *et al.*, 2004; Pleasant, 1982). Entretanto, com os recentes avanços das técnicas de biologia molecular somados a conjuntos de dados de áreas diversas, tais como morfológicos, biogeográficos e químicos, análises mais robustas tem sido realizadas sobre as relações filogenéticas entre os indivíduos.

Com a geração de uma grande quantidade de dados moleculares, consórcios de pesquisadores, tais como o *Angiosperm Phylogeny Group*, têm utilizado esse conjunto de dados para reconstruir, com a adição de novos dados, a história evolutiva dos organismos (Wächtershäuser, 2007) (**Figura 1.1**). As espécies que constituem o clado denominado Angiospermas basais são constituídas por famílias que apresentam características comuns a espécies consideradas primitivas e evolutivamente distintas, tais como as monocotiledôneas.

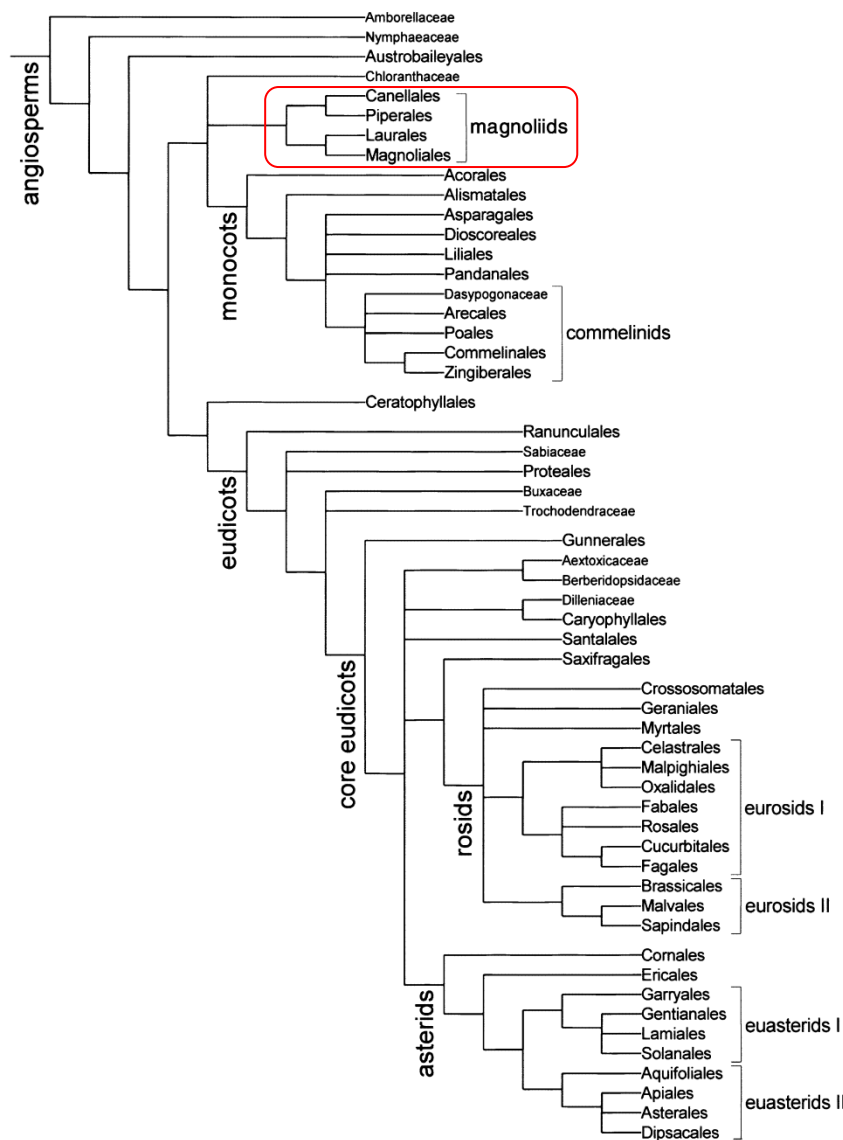


Figura 1.1. Árvore filogenética das ordens e famílias de Angiospermas. Os ramos são suportados por valores de *bootstrap* e Jackknife acima de 50% (Wächtershäuser, 2007).

Lauraceae constitui-se numa ampla família de plantas, essencialmente arbóreas, que compreende cerca de 50 gêneros e aproximadamente 3000 espécies. Registros fósseis datam que as primeiras espécies de Lauraceae apareceram durante a metade do período Cretáceo sendo considerada umas das famílias mais primitivas de Angiospermas pertencentes ao clado Magnoliidae (Kato *et al.*, 1998).

Estudos filogenéticos recentes, que englobam as classificações tradicionais utilizando dados morfológicos e extensas análises filogenéticas, apontam que a maior diversidade de Lauraceae ocorre na região dos trópicos e neotrópicos e podem ser distribuídas em cinco principais clados: Cinamomeae (ao qual pertence o complexo *Ocotea*), grupo *Persea*, *Laurae*, *Cryptocaryeae* e *Chlorocardium/Mezilaurus* (Suh *et al.*, 2003).

Algumas espécies de Lauraceae são amplamente comercializadas e apreciadas pelo valor culinário, tais como o abacate (*Persea americana*) e a canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyne e *C. cassia* Nees). As espécies de *Ocotea* fornecem madeiras de qualidade e espécies como *O. catharinensis* e *O. acutifolia* são utilizadas na construção civil e carpintaria. A exploração dos óleos essenciais das espécies de Lauraceae também tem movimentado cifras expressivas, uma vez que as essências das plantas de *C. canphora* (L.) Presl., popularmente conhecida como cânfora e *Aniba rosaeodora*, fonte de linalol, são mundialmente utilizadas na indústria farmacêutica e de perfumaria (Marchand *et al.*, 1997).

Os metabólitos secundários de ocorrência mais frequente em Lauraceae são neolignanas fenilpropanóides (Aiba *et al.*, 1977; Dasilva *et al.*, 1989; Decarvalho *et al.*, 1988; Gottlieb *et al.*, 1976; Ishige *et al.*, 1991; Marques *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 1980; Rodrigues *et al.*, 1992; Trevisan *et al.*, 1984), flavonóides, (David *et al.*,

1994a; Rossi et al., 1997), pironas (Nehme *et al.*, 2008) e alcalóides (Franca *et al.*, 1975; Smit, 2004).

As análises de seqüenciamento do DNA têm demonstrado sua robustez na reconstrução e elucidação de árvores filogenéticas de Angiospermas (Herebian et al., 2009; Koeduka *et al.*, 2006). O método é baseado na homologia de determinadas regiões, podendo assim, estabelecer afinidades entre espécies pertencentes a diversas ordens (Reynolds, 2007; Wanke *et al.*, 2006).

Esta poderosa ferramenta de taxonomia molecular tem avançado de forma impressionante após o advento do PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A reação de PCR permite amplificar regiões selecionadas do DNA e o desenvolvimento de métodos rápidos de seqüenciamento, bem como programas computacionais avançados, têm permitido analisar um conjunto bastante numeroso de amostras, com casos de até 560 espécies (Soltis *et al.*, 2000; Wink, 2003).

Nos genomas de angiospermas existem regiões de DNA que propiciam comparações em diferentes níveis hierárquicos. Certos segmentos são adequados para inferências filogenéticas em níveis mais altos (famílias e acima dela), enquanto outros são mais apropriados para inferências em níveis inferiores como gêneros, espécies ou populações. Estas regiões são denominadas de marcadores moleculares e têm sido muito utilizadas para caracterizar populações de plantas. Estas permitem avaliar os níveis de diversidade genética e relações filogenéticas inter- e intraespecíficas (Johnson e Soltis, 1994; Baldwin *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2004).

Inferências filogenéticas geralmente são realizadas seqüenciando-se duas regiões do DNA do cloroplasto; o *trnK* e gene *matK* e uma região do DNA nuclear, o ITS (*Internal transcribed spacer*) que é largamente utilizado em análises filogenéticas para comparação entre espécies (Jaramillo e Manos, 2001; Wink, 2003).

A região ITS de do DNA nuclear ribossômico (18S-26S) é uma fonte muito útil de caracteres para estudos filogenéticos em muitos táxons de angiospermas. Esta região inclui três componentes: a subunidade 5,8S, cuja sequência é altamente conservada evolutivamente e os dois espaçadores ITS1 e ITS2 (White *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1995) (**Figura 1.2**). As regiões ITS evoluem rapidamente e, portanto, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos relativamente curtos (500 a 800 pb), aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitem que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (Baldwin *et al.*, 1995; Moricca *et al.*, 1998; Elsalam *et al.*, 2003).

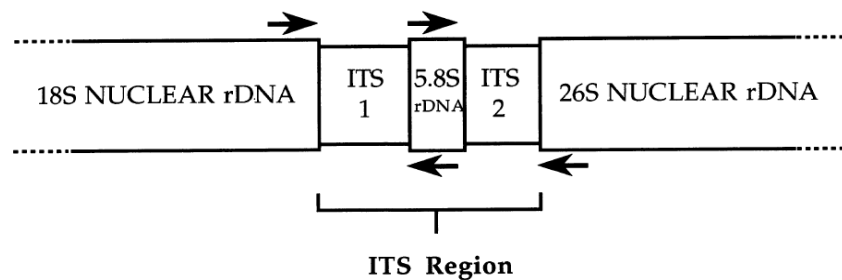


Figura 1.2 Organização da região ITS. As setas indicam a orientação e posição aproximada dos iniciadores (Baldwin *et al.*, 1995)

Por outro lado, a limitação primária dos dados de ITS para estudos filogenéticos em angiospermas se deve a esse pequeno número de caracteres que esta região apresenta (500 a 800 pb). Estudos têm demonstrado que sequências curtas são, na maioria das condições e tipos de análises, menos efetivas para a reconstrução de árvores filogenéticas que sequências maiores (Baldwin *et al.*, 1995). Entretanto, no caso das regiões ITS suas sequências apresentam grandes variações, tornando-as alvos ideais para a diferenciação entre organismos estreitamente relacionados. Adicionalmente restrições no número de caracteres úteis

da região ITS podem ser impostas, durante o alinhamento das sequências, pela necessidade de deletar pequenas regiões (*indels*) resultando em análises incertas. Estas limitações requerem que dados de outras fontes, isto é, a partir de sequências maiores, sejam combinados com os dados da região *ITS* para obter caracteres suficientes e dar suporte à resolução filogenética (Baldwin *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2004).

O gene *matK* faz parte do genoma do cloroplasto e tem sido usado frequentemente para estudos de análise filogenética em Angiospermas. O gene *matK* é composto por cerca de 1500 pares de base (pb) e está localizado dentro do intron do cloroplasto do gene *trnK* (**Figura 1.3**) (Young e Pamphilis, 2000), que codifica uma maturase de intron II envolvido no “*splicing*” do tRNA. O intron circundante *trnK* tem sido sequenciado para aumentar a resolução, e tem apresentado sinal filogenético similar ao do gene *matK*. Como consequência, a região é expandida, resolvendo relações intraespecíficas e intergenéricas (Wanke *et al.*, 2006; Wanke *et al.*, 2007a). O tamanho e as altas taxas de substituições em suas sequências torna esse gene uma fonte valiosa de informações para resolver questões sistemáticas e evolutivas em vários níveis taxonômicos (Jhonson e Soltis, 1994; Hilu e Liang 1997). A região *matK* foi selecionada para investigar relações entre espécies de Piperaceae, constatando a ancestralidade do gênero *Verhuellia* e suas relações com outros gêneros da família, demonstrando ser um gênero distinto de Piperaceae (Wanke *et al.*, 2007b).

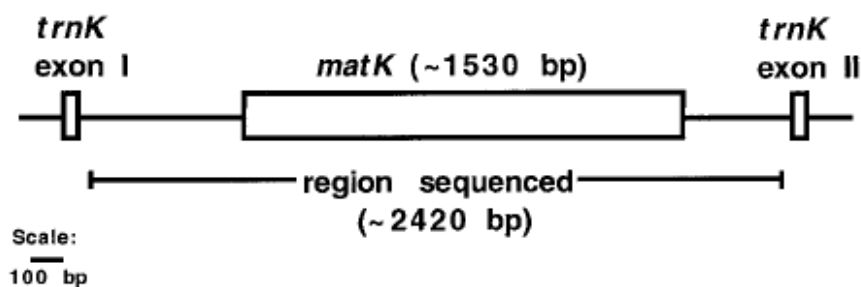


Figura 1.3 Região do gene *trnK* e seu intron contendo o marcador *matK* (Fonte: Young e Pamphilis, 2000)

A sistemática de Lauraceae possui ainda muitas lacunas (Chanderbali *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004). Por isso, a combinação de dados moleculares juntamente com os fitoquímicos e análise das relações biossintéticas das substâncias é uma importante ferramenta para resolver espécies desta família intimamente relacionadas e para geração de hipóteses sobre divergências ancestrais evolutivas.

Atualmente, metabólitos secundários têm sido utilizados para esclarecer relações filogenéticas difíceis de abordar por outros métodos e também para questionar visões filogenéticas propostas anteriormente. Recentes em técnicas como espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) têm possibilitado análise de proteínas celulares e metabólitos (proteoma e metaboloma, respectivamente), resultando em uma evolução na maneira em que sistemas biológicos são analisados e visualizados (Soltis *et al.*, 1999; Dixon *et al.*, 2003).

No entanto, a ocorrência de determinadas classes de produtos naturais em famílias não relacionadas, indica a atuação de fatores e mecanismos de seleção de genes não totalmente conhecidos. Portanto, a ocorrência de uma classe de substâncias em táxons distintos não é necessariamente uma indicação de relação estreita entre eles, podendo ser resultante de um processo evolutivo convergente (Wink, 2003).

Nos grupos de plantas de altos níveis hierárquicos, sabe-se que a evolução morfológica é acompanhada pela progressiva oxidação de metabólitos secundários pertencentes a uma classe biossintética particular (Doyle e Endress, 2000). Metabólitos secundários são, sobretudo, produtos de oxidação dos metabólitos primários, e as sequências biossintéticas geralmente iniciam-se com condensações e reduções dos metabólitos primários e são finalizados pelas etapas oxidativas (Birch, 1973; Gottlieb, 1989). Neste processo o oxigênio não opera diretamente, pela oxidação do precursor apropriado, mas indiretamente pelo estabelecimento de condições para as transformações do esqueleto da estrutura química (Gottlieb e Yoshida, 1984).

Deste modo, os metabólitos secundários são considerados marcadores quimiotaxonômicos pela diversidade estrutural que aquela classe de substância apresenta em um determinado táxon e não necessariamente pela presença/ausência destes compostos. Por isso, são alvos ideais para o estudo da conexão entre vias biossintéticas e seqüências evolutivas (Gottlieb e Yoshida 1984; Doyle e Endress, 2000). Como exemplo dessa relação, pode-se citar o processo adaptativo evolutivo das plantas para o ambiente terrestre. As plantas originaram-se primeiramente em um ambiente aquático. O sucesso da adaptação evolutiva para o meio terrestre foi alcançado devido à formação de compostos fenólicos derivados da via fenilpropanoídica, como as ligninas que estão presentes nos tecidos vasculares da parede celular exercendo a função de sustentação do vegetal, que ao contrário das outras vias biossintéticas que atuam tanto em plantas aquáticas quanto terrestres, esta via precursora das ligninas e lignanas, se manifesta apenas em plantas terrestres. Entretanto, estes metabólitos possuem funções fisiológicas totalmente distintas nos vegetais (Davin e Lewis, 2000; Pichersky e Gang, 2000).

Esta via biossintética pode ser suposta como um complexo sistema regulador biológico que tem evoluído em tecidos vasculares das plantas durante sua transição para o ambiente terrestre e que hoje, sabe-se que é essencial para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos vegetais. Entretanto, como essa via é organizada e controlada ainda não é totalmente compreendida (Davinet *et al.*, 2003).

O estabelecimento da homologia dos dados fitoquímicos nas unidades taxonômicas depende do estudo das relações biossintéticas das substâncias. Padrões de distribuição de metabólitos aparentemente confusos podem ser explicados pela homologia ou pela ausência dela. No caso dos dados químicos pode haver mais de uma rota biossintética para sintetizar a mesma substância. Logo, conhecer as vias biossintéticas é fundamental para fazer inferências filogenéticas a partir dos dados químicos. A importância da via biossintética nos estudos filogenéticos diz respeito à definição de caracteres, que devem ser independentes entre si. Como as substâncias de uma dada rota estão relacionadas e dependem umas das outras no processo de biossíntese, elas não podem ser definidas como caracteres. É mais adequado que sejam considerados estados de um caráter, nesse caso, a própria via em que são produzidas (Birch, 1973; Barkman, 2001).

1.2. Metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis*

Dentro de Lauraceae, o gênero *Ocotea* é um dos mais estudados fitoquimicamente. Este gênero produz uma variedade de metabólitos secundários, sendo a maioria deles derivados de fenilpropanóides, incluindo várias subclasses de lignanas e neolignanas (Dasilva *et al.*, 1989; David *et al.*, 1994a; David *et al.*, 1994b; Decarvalho *et al.*, 1988; Dias *et al.*, 1986; Felicio *et al.*, 1986; Franca *et al.*, 1975;

Gomes *et al.*, 1983; Haraguchi *et al.*, 1983; Ishige *et al.*, 1991; Marques *et al.*, 1992; Romoff *et al.*, 1984; Smit, 2004).

Ocotea catharinensis (Lauraceae) é uma espécie originária da Mata Atlântica do Brasil, encontrada nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo e bastante explorada por produzir madeira de excelente qualidade. Em consequência disso e aliada à dificuldade para propagação levou sua população natural diminuir significativamente, resultando na sua inclusão na lista das espécies ameaçadas de extinção. Desde que *O. catharinensis* foi incluída como uma espécie ameaçada de extinção, um sistema de embriogênese somática foi desenvolvido com o objetivo de uma propagação maciça (Funasaki *et al.*, 2009; Viana e Mantel 1999).

Desta maneira, diversos estudos fitoquímicos de *O. catharinensis* incluindo embriões somáticos, caule e folhas mostraram que neolignanas especialmente aquelas de esqueleto tipo benzofurânico e biciclooctânico, constituem no principal grupo biogenético desta espécie, devido à frequência, variedade de substituintes e configurações (**Figura 1.4; Figura 1.5; Figura 1.6; Figura 1.7**) (Haraguchi *et al.*, 1983; Ishige *et al.*, 1991; Lordello e Yoshida, 1997; Funasaki *et al.*, 2009).

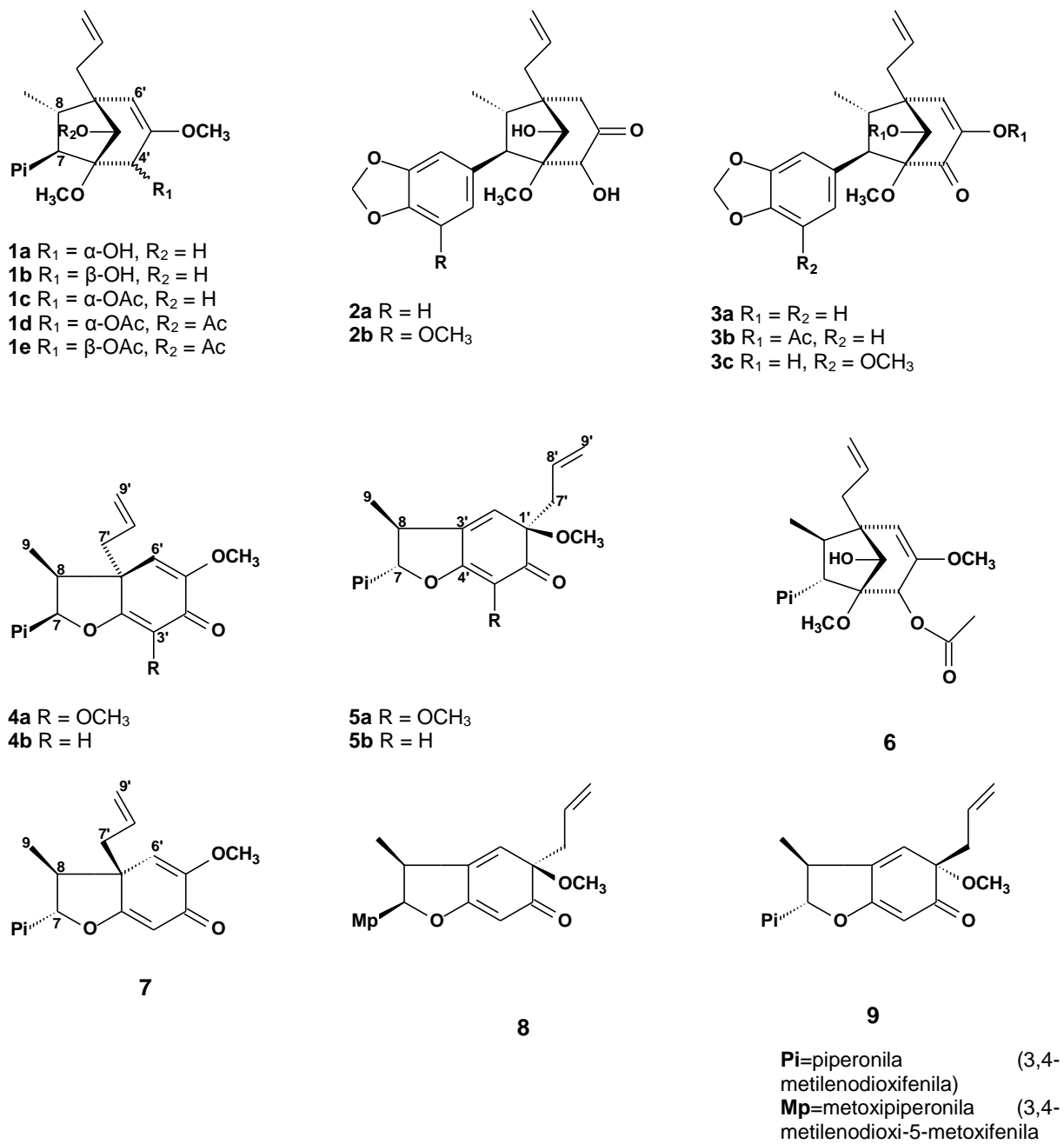


Figura 1.4. Metabólitos secundários do caule de *Ocotea catharinensis* (Haraguchi *et al.*, 1983)

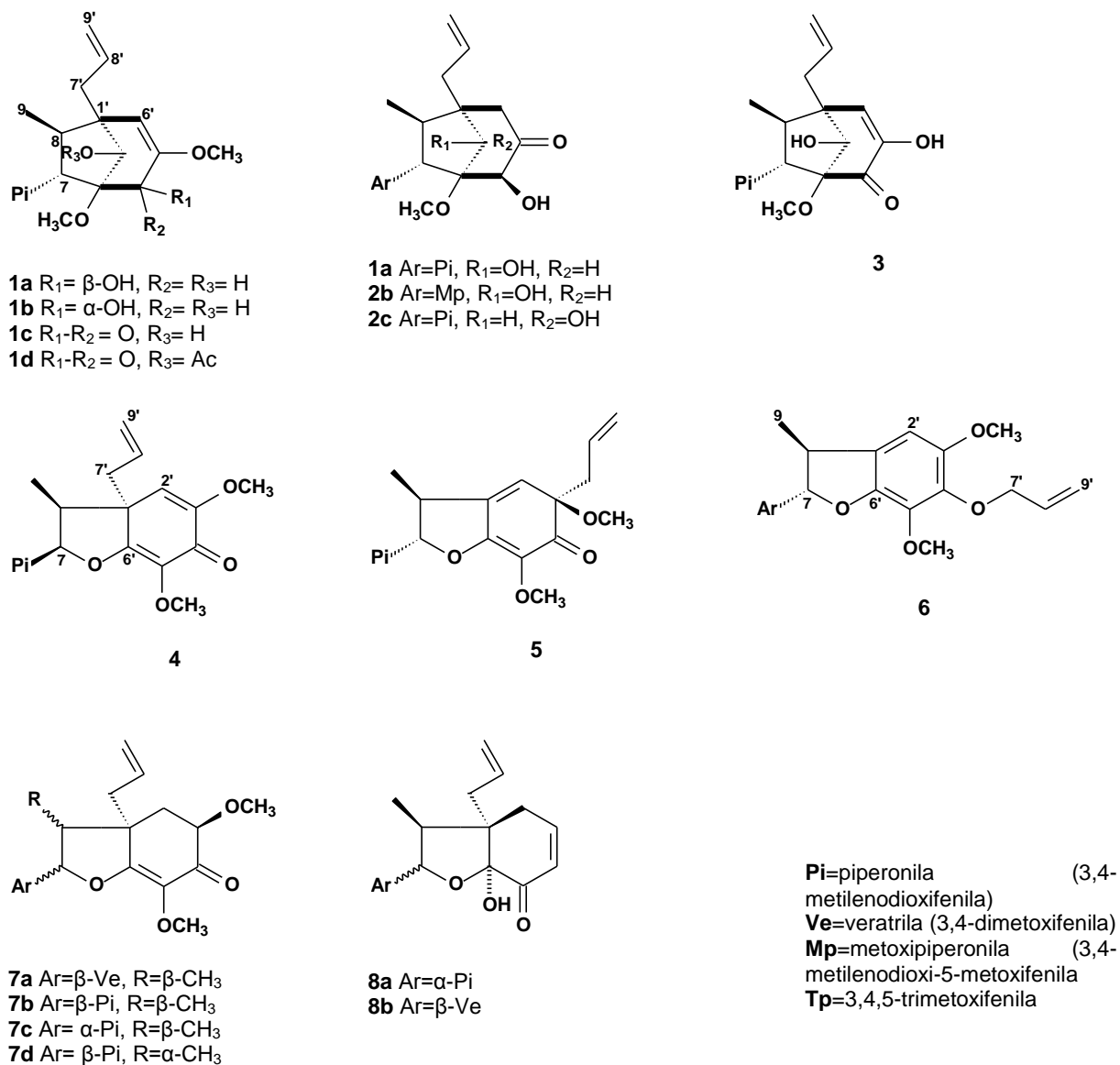


Figura 1.5. Metabólitos secundários das cascas, madeira e folhas de *Ocotea catharinensis* (Ishige et al., 1991)

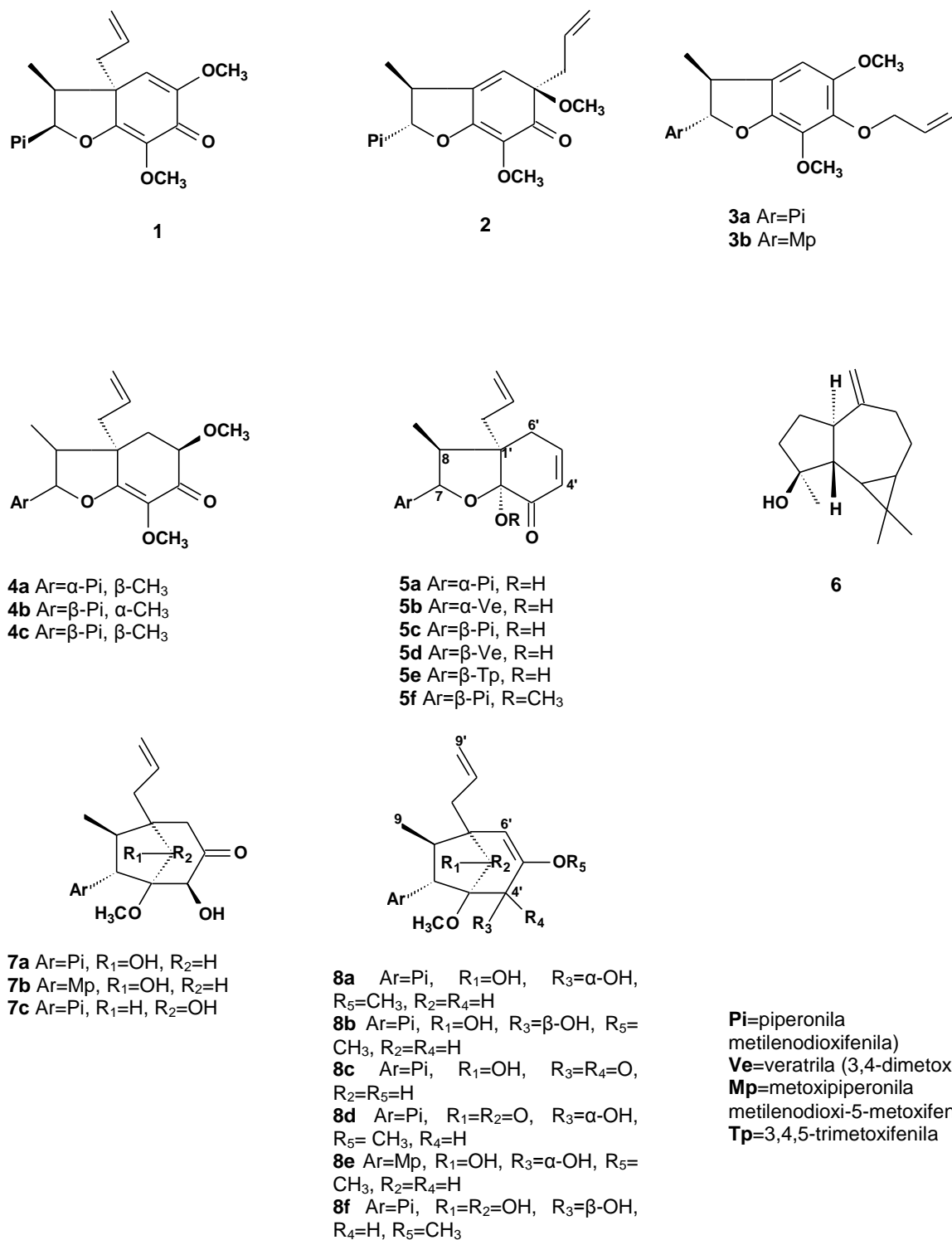


Figura 1.6. Metabólitos secundários das folhas de *Ocotea catharinensis* (Lordello e Yoshida, 1997)

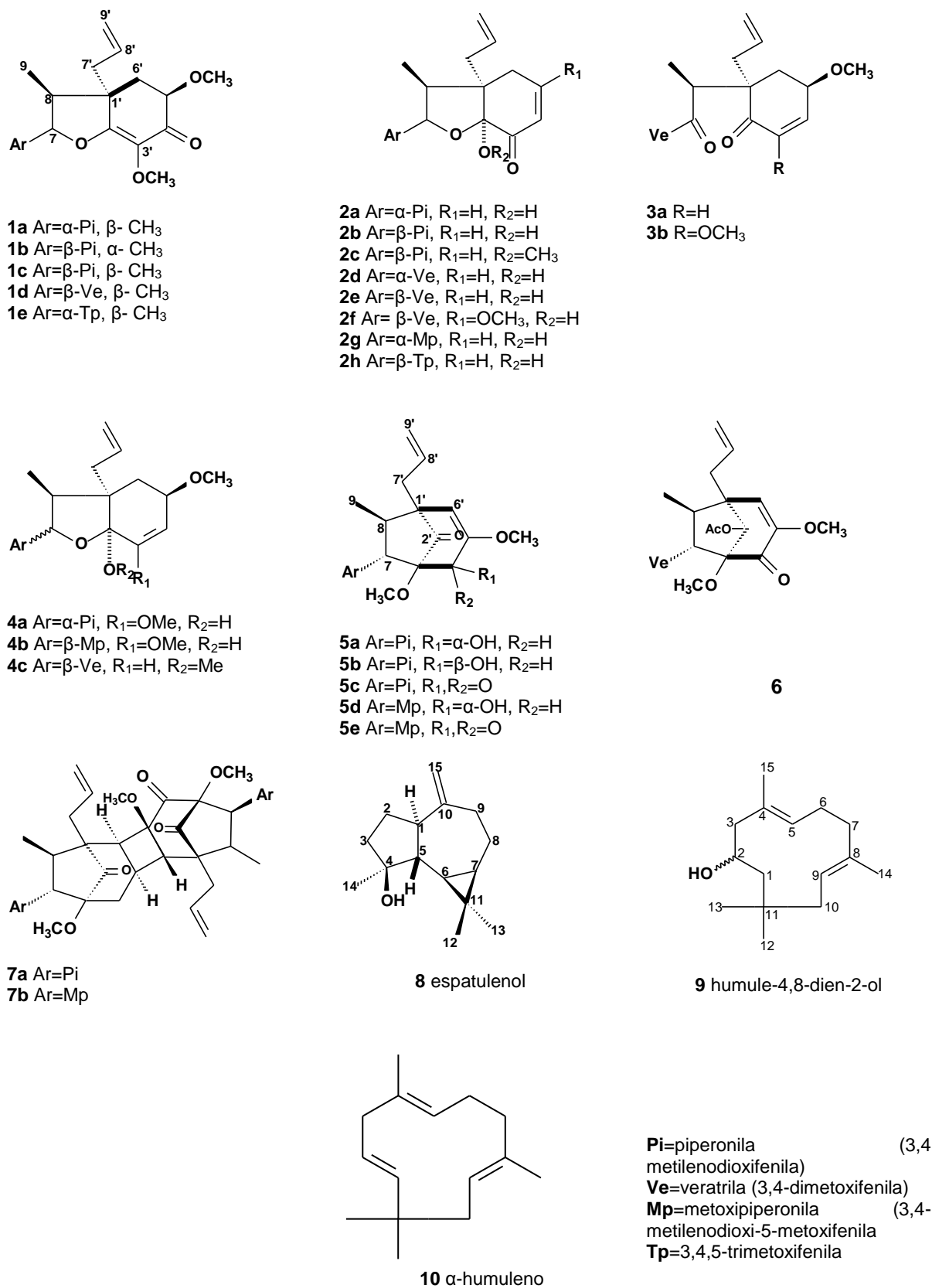
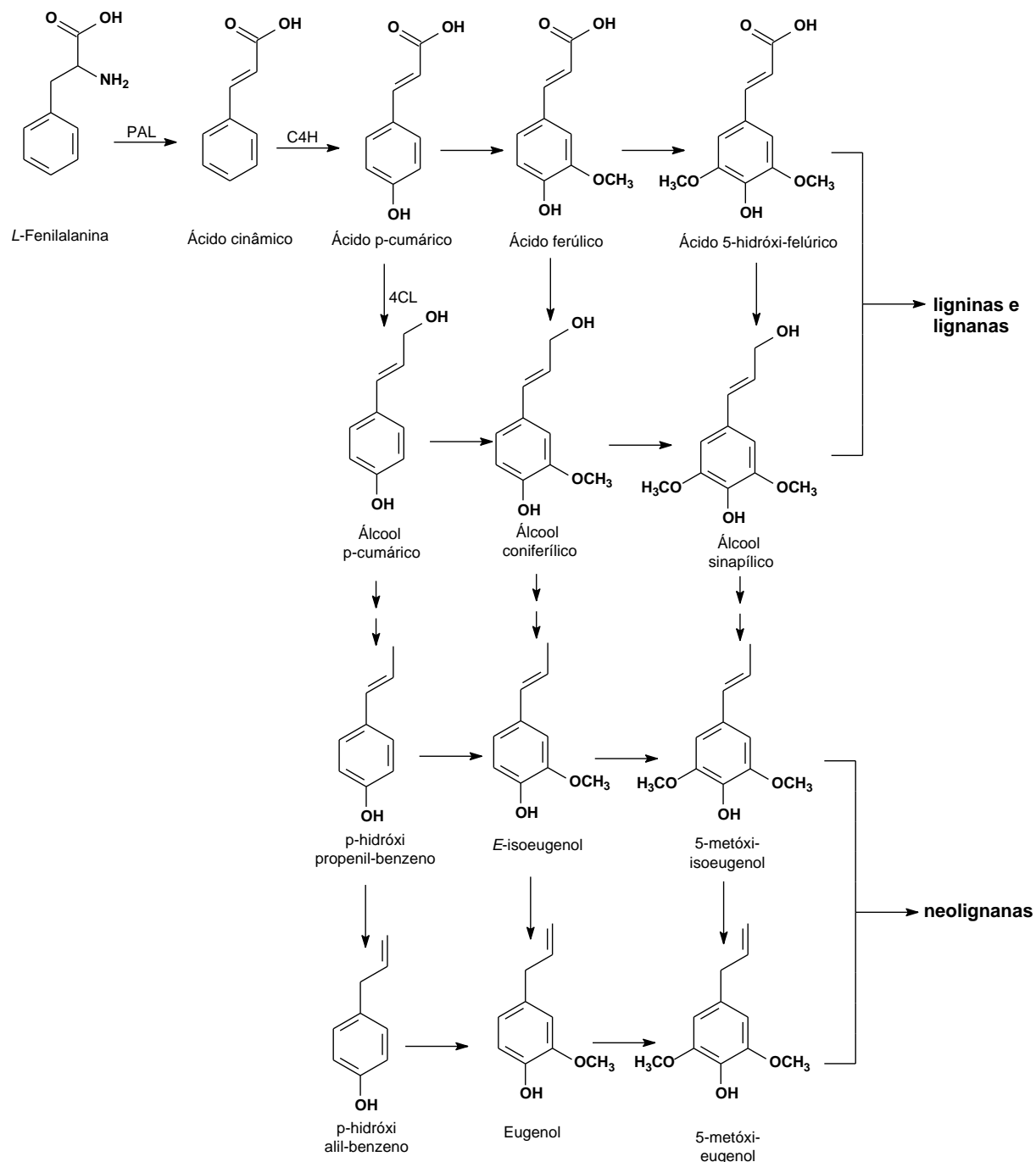


Figura 1.7. Metabólitos secundários das folhas e embriões de *Ocotea catharinensis* (Funasaki et al., 2009)

A partir do perfil químico desta espécie, que mostra o acúmulo de neolignanas, foi proposto um estudo biossintético desta classe de compostos em culturas embriogênicas de *O. catharinensis*. Estes metabólitos possuem ocorrência relativamente restrita no reino vegetal, sendo isolados de algumas espécies de Lauraceae, Piperaceae e Myristicaceae e ainda pouco investigados quanto a sua biossíntese ou significado evolutivo (Sartorelli *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2004).

1.3. Biossíntese de neolignanas

As lignanas, neolignanas e compostos relacionados requerem como via biossintética básica a via fenilpropanoídica que tem como precursores os aminoácidos *L*-fenilalanina e *L*-tirosina, produtos finais da via do ácido chiquímico. A primeira etapa desta via é a desaminação da *L*-fenilalanina pela enzima PAL (fenilalanina-amônia-liase) formando o ácido cinâmico. A enzima ácido cinâmico 4-hidroxilase (C4H) catalisa a introdução do grupo hidroxila em *para* no anel aromático do ácido cinâmico, produzindo o ácido *p*-cumárico. O grupo carboxílico do ácido *p*-cumárico é ativado pela ligação com o tioéster-CoA, catalisada pela enzima hidroxicinamato:CoA ligase (4CL). Estas são etapas iniciais da via fenilpropanoídica. Outras etapas de hidroxilações, metilações e reduções fornecem álcoois cinâmicos com diferentes substituintes e, por redução destes, resultam na formação de diversos fenilpropanóides que são precursores das ligninas, lignanas e neolignanas (Dewick, 2001; Dixon *et al.*, 2001; Anterola *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2003; Ferrer *et al.*, 2008) (**Esquema 1.1**).

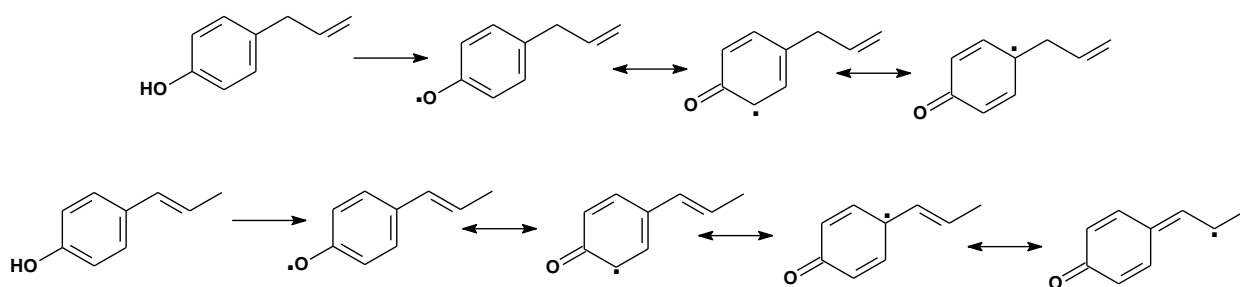


Esquema 1.1. Rota biossintética de fenilpropanóides

A distinção precisa entre lignanas e neolignanas foi motivo de muitas controvérsias. Várias propostas de acoplamento entre unidades de dímeros foram sugeridas para a formação destes metabólitos (Gottlieb e Yoshida, 1984). A designação lignana foi introduzida por Haworth e aplicada a substâncias cujos esqueletos carbônicos eram formados por duas unidades *n*-propilbenzênicas (C₆C₃),

ligadas pelos carbonos β de suas cadeias laterais (C_3) (Haworth, 1942). No entanto, reconheceu-se a existência de muitos esqueletos adicionais em que a união das unidades (C_6C_3) ocorria de diversas maneiras, tornando a definição absoluta (Gottlieb, 1978; Gottlieb e Yoshida, 1984). Gottlieb, estudando a química de Lauraceae, introduziu o termo neolignana (Gottlieb, 1972) e posteriormente, foi definido como sendo metabólitos derivados da condensação oxidativa de alilfenóis e propenilfenóis entre si ou cruzadas (Gottlieb, 1978; Gottlieb e Yoshida, 1984). Por outro lado, considera-se que dimerizações de fenilpropanóides oxidados no C-9 (ácidos e alcoóis) produzam lignanas através do acoplamento oxidativo entre si mediadas por enzimas específicas (Gottlieb, 1978; Umezawa, 2003; Moss, 2000).

É proposto que a formação de neolignanas ocorra por mecanismos de acoplamento oxidativo. Supostamente, radicais fenóxidos são iniciados por oxidases através de catálise oxidativa de um elétron de alil e/ou propenilfenóis (Gottlieb, 1989). Estes radicais podem apresentar várias estruturas canônicas de ressonância (**Esquema 1.1**), resultando na deslocalização do elétron livre nas posições 1, 3, 4 e 8 (Gottlieb e Yoshida, 1984).



Esquema 1.2. Estruturas canônicas de ressonância de alil- e propenilfenóis

Os radicais fenóxidos sofrerão acoplamentos oxidativos intramoleculares e dependendo da posição do elétron livre no momento da ligação, designa o tipo de acoplamento ocorrido. As combinações dos radicais oriundos de alil e/ou

propenilfenóis através das posições 8.8', 8.1', 8.3', 3.3', 3.O.4', 2.O.3' e 8.O.4' resultam em sete esqueletos neolignânicos fundamentais (**Figura 1.8**) (Gottlieb, 1978; Gottlieb e Yoshida, 1984).

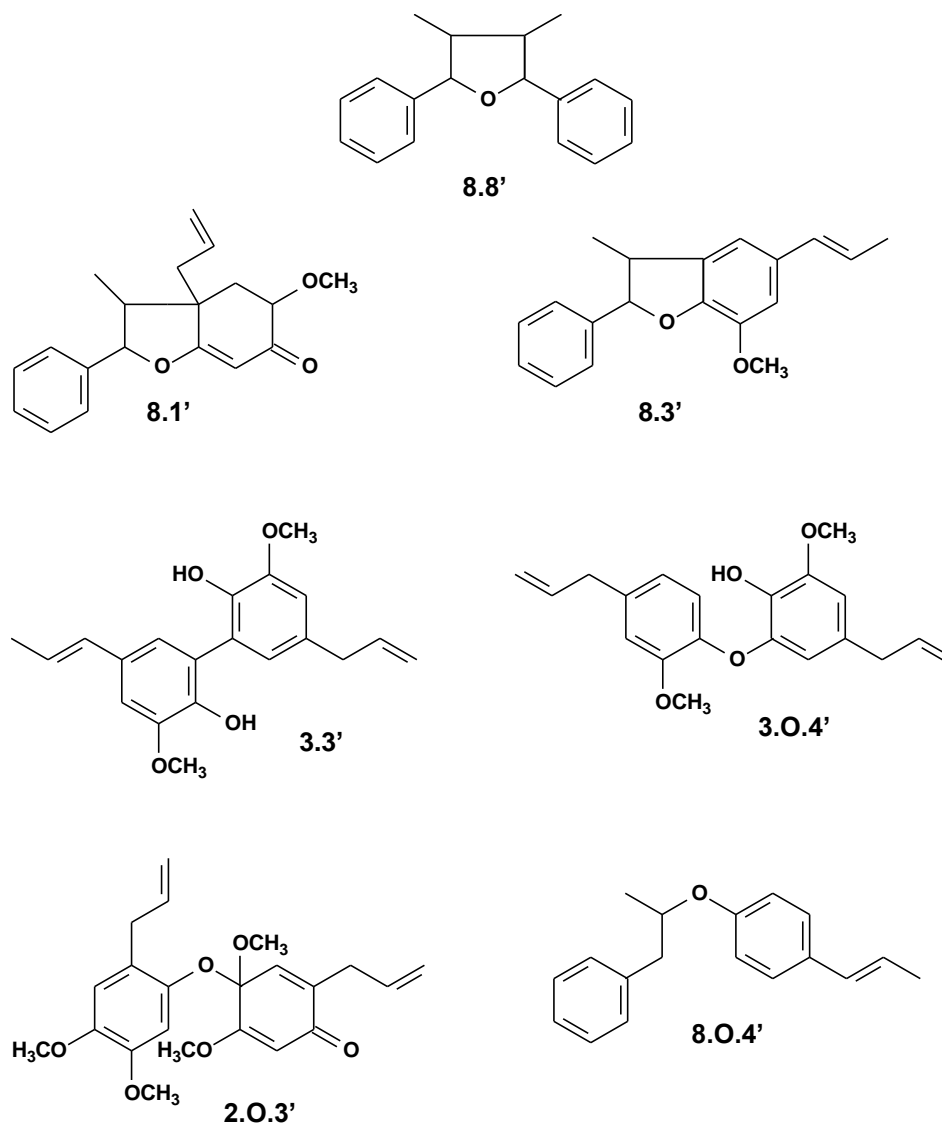
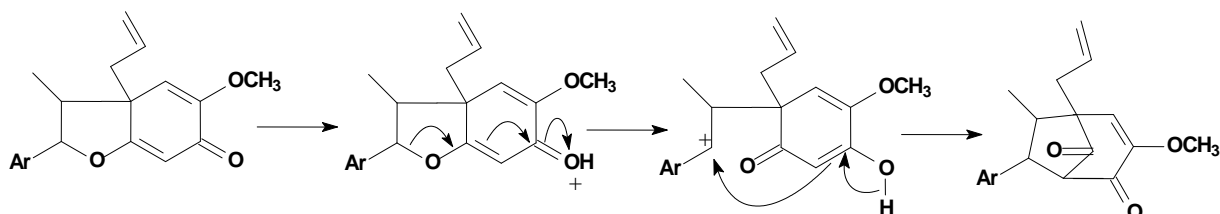


Figura 1.8. Diversidade estrutural das neolignanas. Representação dos sete principais esqueletos neolignânicos

Todos estes tipos neolignânicos estão eventualmente, sujeitos a ciclizações e rearranjos intramoleculares secundários. As neolignanas do tipo benzofurânicas, 8.1' e 8.3' (**Figura 1.8**), por exemplo, interconvertem-se facilmente em neolignanas biciclo [3.2.1] octânicas, pois os éteres enólicos são O-desmetilados em contato com

um traço de ácido em cetonas, resultando na isomerização da neolignana benzofurânica por catálise ácida (Gottlieb e Yoshida, 1984; Alvarenga *et al.*, 1977) (Esquema 1.3).

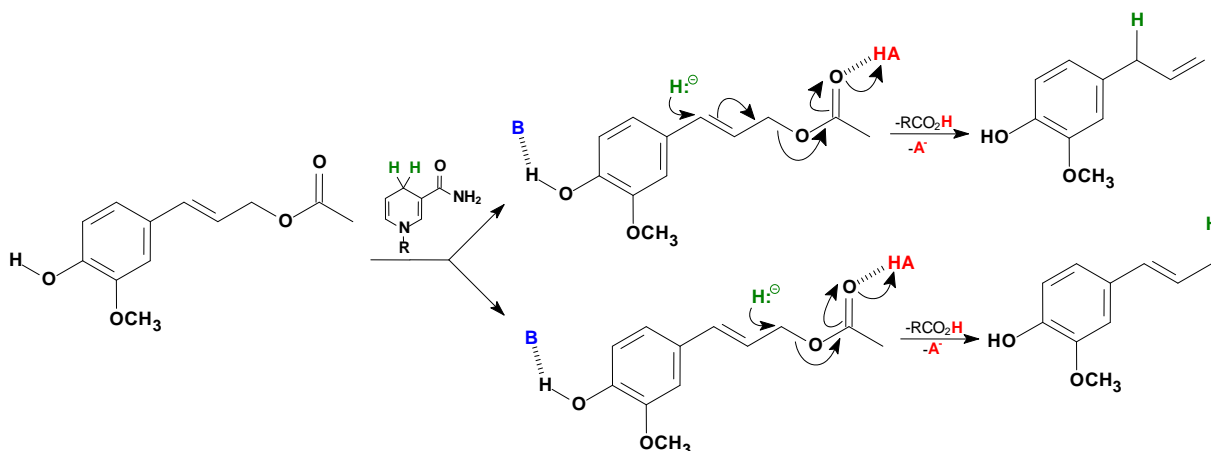


Esquema 1.3. Interconversão de neolignana benzofurânica em biciclooctânica

Vários estudos têm sido dirigidos no sentido de entender a formação de alil- e propenilfenóis. No entanto, as vias biossintéticas previstas, geralmente incluem passos comuns à via dos fenilpropanóides.

Por exemplo, a acetilação do álcool *p*-cumárico para formar um intermediário com um bom grupo de saída, tem sido estudada em experimentos de conversão enzimática em culturas celulares de manjeriço (*Ocimum basilicum*). As culturas possuem uma enzima específica a eugenol sintase (EGS) que, utiliza acetato de coniferíla e NADPH para formar o eugenol (Gamez *et al.*, 1990; Moran *et al.*, 2008). No caso das culturas de flores de *Petunia* constatou-se uma enzima homóloga ao do manjeriço, a isoeugenol sintase (IGS) que também utiliza acetato de coniferíla e NADPH como substratos para catalisar a formação de isoeugenol (Herdewijn and Kiotasakürek, 2007; Kelman and Kelman, 2003). Para a eliminação do grupo acetato e formação de alil- e propenilfenóis são propostos dois mecanismos. O primeiro consiste em um mecanismo direto de redução, seguida da eliminação do grupo acetato sendo que, se o ataque nucleofílico do hidreto oriundo do NADPH ocorrer no

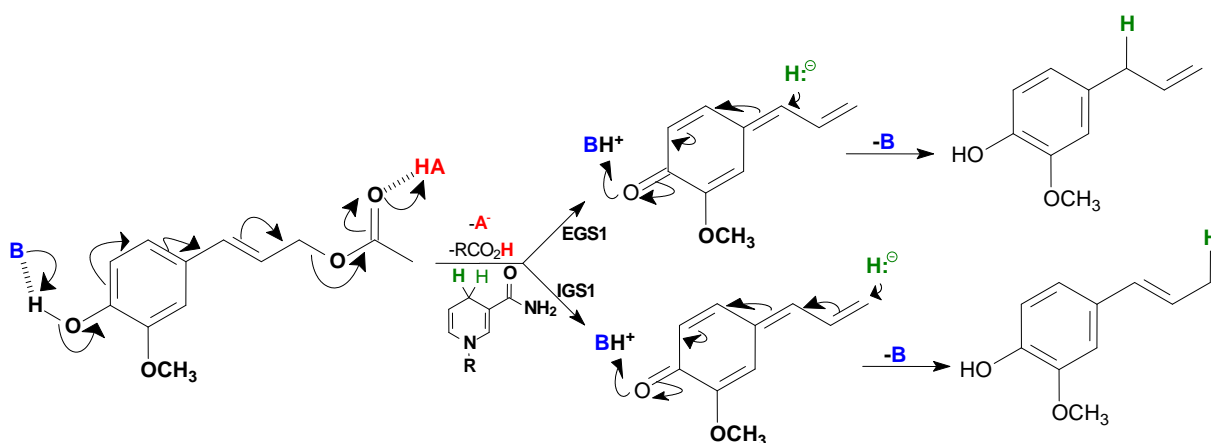
carbono C-7 da cadeia lateral, leva à formação do alilfenol enquanto que se o ataque ocorrer no carbono C-9, leva ao propenilfenol (Koeduka *et al.*, 2006) (**Esquema 1.4**).



Esquema 1.4. Proposta dos mecanismos que levam à formação do eugenol e isoeugenol.

Mecanismo 1: Ataque direto de hidreto seguido de eliminação (Koeduka *et al.*, 2006).

No segundo mecanismo é proposta a formação de um intermediário quinona-metídeo e posteriormente, ocorre o ataque do hidreto para a formação do alil- e propenilfenol (**Esquema 1.5**) (Herdewijn *et al.*, 2007; Koeduka *et al.*, 2006).



Esquema 1.5. Proposta dos mecanismos que levam à formação do eugenol e isoeugenol.

Mecanismo 2: formação do intermediário quinona metídeo (Koeduka *et al.*, 2006). (Koeduka *et al.*, 2006).

É crescente o interesse científico por fenilpropanóides, pois são componentes importantes em muitas especiarias usadas por seres humanos e, portanto, têm desempenhado papéis importantes na nutrição humana Koeduka *et al.*, 2008).

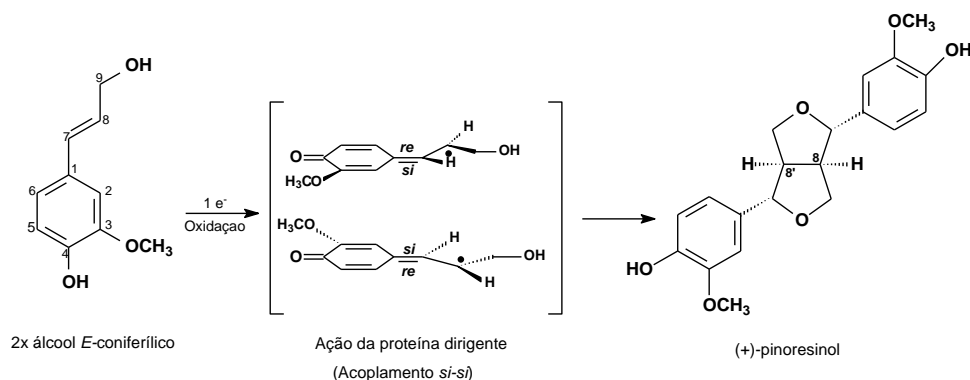
Também desempenham importantes funções nas plantas que os produzem. Nesse sentido, intensas investigações nas últimas décadas evidenciam que os fenilpropanóides possuem uma importante função no processo de adaptação evolutiva das plantas para o meio terrestre e no seu mecanismo de defesa, tornando-se razoável admitir que desempenhem um papel na adaptação ecológica (Pichersky e Gang, 2000; Vassão *et al.*, 2006)

1.4. Proteína dirigente

Ainda de acordo com a via fenilpropanoídica que dá origem às ligninas, lignanas e supostamente às neolignanas, esta via é catalisada por diferentes enzimas e a consequência natural disso é que normalmente lignanas e neolignanas são enantiomericamente puras, devido à ocorrência de um controle estereoquímico. O controle enantiosseletivo para a biossíntese de ligninas é menor, e as enzimas culminam por gerar produtos racêmicos (Dewick, 2001). Verificou-se que esse rígido controle enantiosseletivo deve-se a uma classe de proteínas denominadas de proteínas dirigentes (Davin *et al.*, 1997; Gang *et al.*, 1999).

A régio- e a estereoespecificidade das reações de acoplamento bimolecular de radicais fenólicos, apresentam especial importância na biossíntese de lignanas, que são claramente controladas de alguma maneira *in vivo*; sendo que o acoplamento por oxidases *in vitro*, tais como lacases, produzem somente produtos racêmicos. Em outros estudos, verificou-se que peroxidases e outras oxidases comparáveis foram incapazes de realizar controle régio- e estereoespecífico. Logo algum outro agente deveria atuar (Davin *et al.*, 1997). Este controle foi entendido com maior clareza ao ser isolada uma proteína denominada de proteína dirigente, de 78 kDa de resolução, a partir de *Forsythia intermedia* no estudo da rota biossintética

para a formação da lignana (+)-pinoresinol, que na presença de oxidases ou de um radical, realizou o acoplamento fenóxi-radicalar estereosseletivo *in vitro* (**Esquema 1.6**) (Davin *et al.*, 1997; Gang *et al.*, 1999; Davin *et al.*, 2000; Davin *et al.*, 2005).



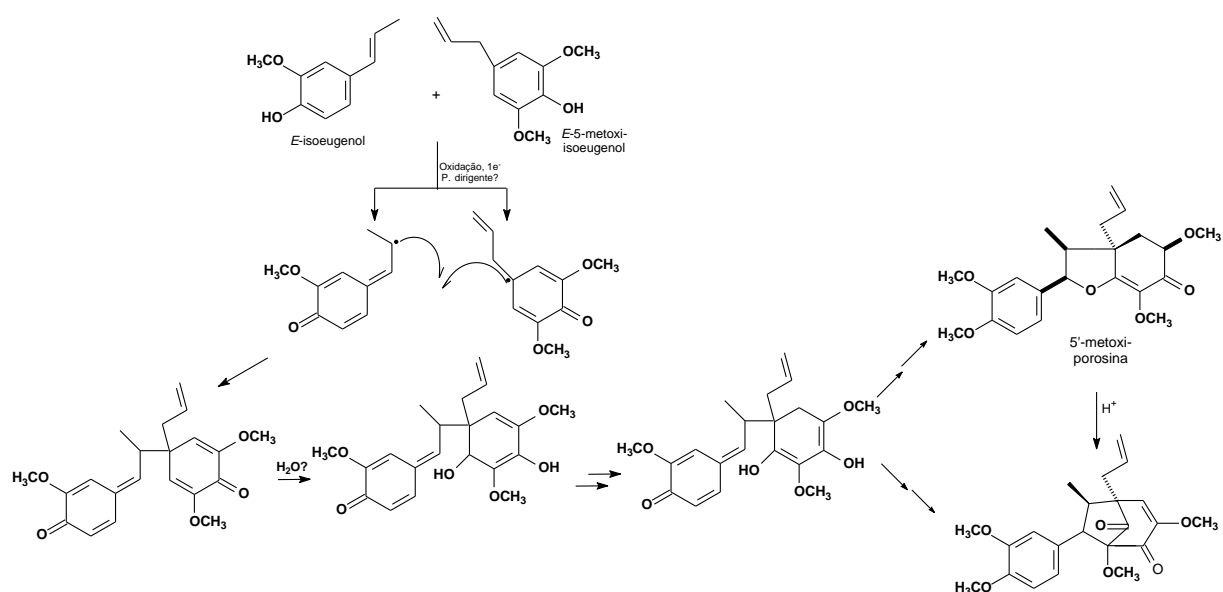
Esquema 1.6. Acoplamento estereosseletivo para formar a lignana (+)-pinoresinol

Estudos iniciais de cinética sugeriram que a proteína funcionou de maneira muito singular, em que primeiro uma oxidase gera radicais livres intermediários, pois por si só a proteína dirigente não possui um sítio cataliticamente ativo (oxidativo) e presume-se que seu mecanismo de ação envolva a captura desse intermediário radicalar oriundo do álcool *E*-coniferílico, com conseqüente acoplamento estereosseletivo formando como produto o (+)-pinoresinol (Davin *et al.*, 1997; Davin *et al.*, 2000). Em síntese, proteínas dirigentes determinam tanto a regioquímica e a estereosseletividade do acoplamento fenóxi-radicalar. O controle estereosseletivo para a formação do (+)-pinoresinol para esta proteína tem sido estendido, desde então, para descrever o controle regioespecífico do acoplamento oxidativo de alilfenóis na biossíntese de lignanas, norlignanas e neolignanas (Gang *et al.*, 1999; Davin *et al.*, 2005).

Estudos envolvendo análise de expressão de genes envolvidos na resposta à predação e estresse mecânico, apontaram para a participação das proteínas dirigentes na defesa de espécies de *Picea*. A análise filogenética empregando as

seqüências de aminoácidos das proteínas dirigentes permitiu identificar famílias de proteínas dirigentes, de acordo com a proximidade filogenética das famílias das plantas analisadas (Ralph *et al.*, 2006; Ralph *et al.*, 2007)

Com base nas substâncias isoladas das espécies de Lauraceae, foi proposta por Gottlieb em 1972 uma rota biossintética onde neolignanans do tipo benzofurânicas seriam oriundas do acoplamento oxidativo cruzado entre alil- e propenilfenóis, a partir da via fenilpropanoída (**Esquema 1.7**).



Esquema 1.7. Proposta para formação de neolignanans do tipo benzofurânicos e biciclooctânicos a partir da via fenilpropanoídica

Devido à sua abundância nos embriões de *O. catharinensis* e fácil obtenção a partir de extrato bruto, as neolignanans do tipo benzofurânicos 5'-metoxiporosina e armenina B, que são os principais metabólitos encontrados nos embriões somáticos, foram escolhidas como modelo para investigar a rota biossintética de neolignanans benzofurânicos. Até o presente momento, não há comprovação desta proposta biossintética.

2. OBJETIVOS

Baseado na proposta biossintética de que neolignanas são oriundas da via fenilpropanoídica, propôs-se investigar esta rota utilizando-se como modelo embriões somáticos de *O. catharinensis*. Paralelamente foi realizado um estudo filogenético de espécies da família Lauraceae, com intuito de organizar dados moleculares e químicos e analisar se as espécies podem ser agrupadas de acordo com suas classes de metabólitos secundários, como subsídio para análises fitoquímicas e compreensão de parte dos processos evolutivos.

Assim, os itens a seguir, foram definidos como principais etapas:

- ✓ Estudar hipóteses biossintéticas para a formação de neolignanas através da administração de precursores marcados de caráter geral e intermediários da via fenilpropanoídica em culturas de células e por meio de estudos de bioconversão, utilizando frações enzimáticas.
- ✓ Obter dados de seqüenciamento dos genes envolvidos na biossíntese de neolignanas, destacando-se o rastreamento de proteínas dirigentes, as quais possivelmente estão envolvidas no controle estereosseletivo do acoplamento oxidativo de alil- e propenilfenóis na formação de neolignanas, e suas relações evolutivas com outros gêneros e famílias de plantas.
- ✓ Realizar estudo filogenético nas espécies de Lauraceae, no intuito de estabelecer relações entre classes de substâncias que ocorrem em determinados gêneros e/ou espécies desta família.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Tratamento dos reagentes e solventes

3.1.1. Solventes orgânicos

Os solventes orgânicos foram tratados como descrito em Amarego e Chai, 2003. Piridina e a piperidina foram, respectivamente, destiladas à pressão reduzida na presença de KOH (25 g/L), armazenadas sobre peneira molecular de 4 Å, estocadas em dessecador sob vácuo e protegidas da luz. Éter etílico (Et₂O) e o tetraidrofurano (THF), separadamente, foram deixados sob agitação na presença de CuSO₄ (30 g/L) por 4 horas e em seguida destilados. Aos respectivos destilados, adicionaram-se fios de sódio e uma ponta de espátula de benzofenona, os quais foram aquecidos sob refluxo até apresentar coloração azulada e, em seguida, utilizados para as preparações sintéticas. Diclorometano, em grau espectroscópico, foi deixado sob cloreto de cálcio anidro (CaCl₂) por 12 h, filtrado e destilado a pressão reduzida na presença de hidreto de cálcio (CaH₂). Foi estocado sobre peneira molecular de 4 Å, protegido da luz e atmosfera de N_{2(g)} seco. Tolueno em grau de HPLC foi utilizado sem tratamento prévio.

Nas análises cromatográficas e espectroscópicas foram utilizados solventes de grau analítico (Merck[®], Tedia[®] e J.T. Baker[®]) e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore[®]).

3.1.2. Reagentes

Os reagentes obtidos comercialmente com alto grau de pureza, foram utilizados sem purificação prévia, exceto quando indicado.

3.2. Equipamentos

3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas em aparelho Shimadzu modelo SCL-10Avp, equipado com duas bombas analíticas modelo LC-10AD, conectadas a um detector de arraste de diodos modelo SPD-M10Avp e um injetor automático modelo SIL-9A, controlados por um módulo de comunicação SCL-10AVP. As amostras foram realizadas em coluna Phenomenex® de fase reversa C-18 (Luna C-18 150 x 4,6 mm, 5 μ) e os dados analisados pelo programa de computador Class-VP versão 6.10. O sistema de solventes utilizado nas análises por CLAE consistiu de uma mistura de CH₃CN:H₂O (2:3) – 18min; CH₃CN:H₂O (4:1) – 2 min; CH₃CN – 2 min; CH₃CN – 2 min; CH₃CN:H₂O (2:3) – 6 min. As amostras analisadas foram solubilizadas em MeOH:H₂O (8:1 v/v), e em seguida filtradas em filtro Millex® de 0,45 μ . A eluição foi acompanhada com detector em $\lambda = 280$ nm.

3.2.2. Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa

As análises por CCDA foram efetuadas em placas da Merck®, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F254, com suporte em alumínio de espessura 0,2 mm. As análises em CCDP foram desenvolvidas em placas de vidro de tamanho 20 x 20 cm, espessura de 1,0 mm de sílica gel 60 da Merck® e indicador de fluorescência F₂₅₄. As placas foram reveladas sob luz ultravioleta com comprimentos de onda 254 e 366 nm e/ou nebulizadas com solução de solução de vanilina sulfúrica (5,1 g de vanilina, 50 mL de ácido sulfúrico concentrado e 800 mL de etanol), seguida de aquecimento.

3.2.3. Cromatografia em camada delgada preparativa radial (*chromatotron*)

Para a cromatografia em camada delgada preparativa radial foram utilizadas placas de vidro redondas, recobertas com uma camada de 2,0 mm de espessura de Kieselgel 60 F₂₅₄, contendo gesso. As amostras foram solubilizadas em hexano: acetato de etila, aplicadas na parte central da placa (cerca de 100 mg) e as frações foram recolhidas pela borda da placa por meio de erlenmeyers. A eluição destas amostras foi realizada em um *Chromatotron*. As revelações das substâncias foram realizadas sob luz ultravioleta.

3.2.4. Cromatografia de coluna

A purificação de substâncias através de cromatografia de coluna foi realizada em CC de vidro, com comprimento e diâmetro de acordo com as massas de amostras a serem fracionadas. Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 com 0,063 – 0,200 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck® e sílica de fase reversa C18. A proporção de sílica utilizada para empacotar a coluna foi de aproximadamente 20 vezes a massa da amostra a ser purificada.

3.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (“electrospray”, modo positivo) (CLAE/MS-ESI)

Os extratos provenientes das incorporações foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massas (CLAE/MS). Na análise por CLAE, o detector utilizado foi por arraste de diodos modelo Shimadzu SPD-M10Avp. Os dados foram analisados pelo programa de computador Class-VP versão 6.10. A análise por espectrometria de massas foi

realizada em um equipamento da Bruker, Esquire 2000 plus em modo “electrospray” positivo, voltagem do capilar 4,5 kV e do skimmer 70 V.

3.2.6. Espectrometria de massas

Os espectros de massas, com ionização por impacto de elétrons foram registrados em um espectrômetro de massa Shimadzu modelo GCMS-QP2010, equipado com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm. d.i, 0,25).

3.2.7. Ressonância Magnética Nuclear

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ - USP). Os espectros foram registrados em espectrômetros Bruker AC200 (200 MHz), Varian Gemini 200 (200 MHz), Varian Inova 300 (300 MHz) e Bruker DRX 500 (500 MHz). As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados (Isotec[®] inc. e Aldrich[®]). Os deslocamentos químicos (δ) dos espectros obtidos estão descritos como ppm em relação ao sinal do TMS, utilizado como padrão interno de referência em todas as amostras (0,05%).

3.3. Material vegetal

A coleta dos frutos de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae) foi realizada no Parque Estadual da Serra da Cantareira do Instituto Florestal de São Paulo, São Paulo-SP em maio de 2008, pelo grupo da Profa. Dra. Eny lochevet Segal Floh do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

3.3.1. Multiplicação dos embriões somáticos de *Ocotea catharinensis* *in vitro*

Para obtenção dos embriões somáticos de *O. catharinensis*, as sementes foram tratadas e inoculadas de acordo com a metodologia de Moura-Costa *et. al.*, 1993. Os embriões foram mantidos em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium; Lloyd McCown, 1981), suplementado com sacarose (20g/L), sorbitol (22g/L), glutamina (0,4 g/L) e fitagel (Phytgel, Sigma Co., USA) (2g/L) . O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH antes da adição do fitagel. Em seguida, os meios foram distribuídos em tubos de ensaio (8 mL/tubo), fechados e autoclavados a 120°C por 15 minutos, a 1,1 Kg/cm². Após 21 semanas de cultivo, os embriões somáticos no estágio globular foram inoculados em novo meio de cultura, para a manutenção das culturas embriogênicas *in vitro* (Figura 3.1).

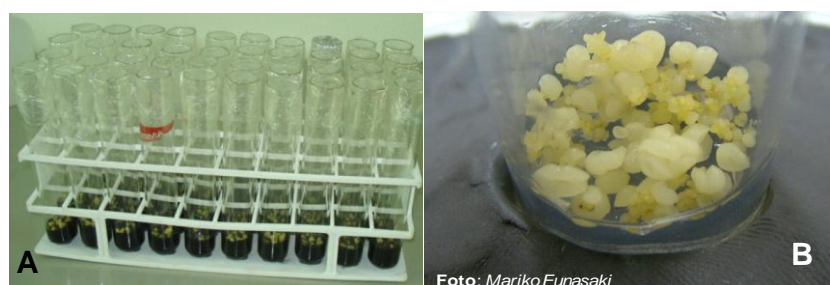


Figura 3.1. (A) Cultivo *in vitro* de embriões de *O. catharinensis*; (B) Embriões somáticos no estágio globular

3.3.2. Obtenção dos extratos e isolamento das neolignanas dos embriões somáticos *Ocotea catharinensis*

Foi realizada uma prévia triagem nos embriões de *O. catharinensis*, objetivando avaliar seu potencial como substrato para o estudo biossintético de neolignanas. Para tanto, os embriões frescos (100 g) foram triturados em N_{2(l)} e submetidos à extração com MeOH:H₂O 9:1. O extrato hidroalcoólico foi submetido à

partição com hexano (para a eliminação de material graxo) e posteriormente com clorofórmio como descrito na Figura 3.2.

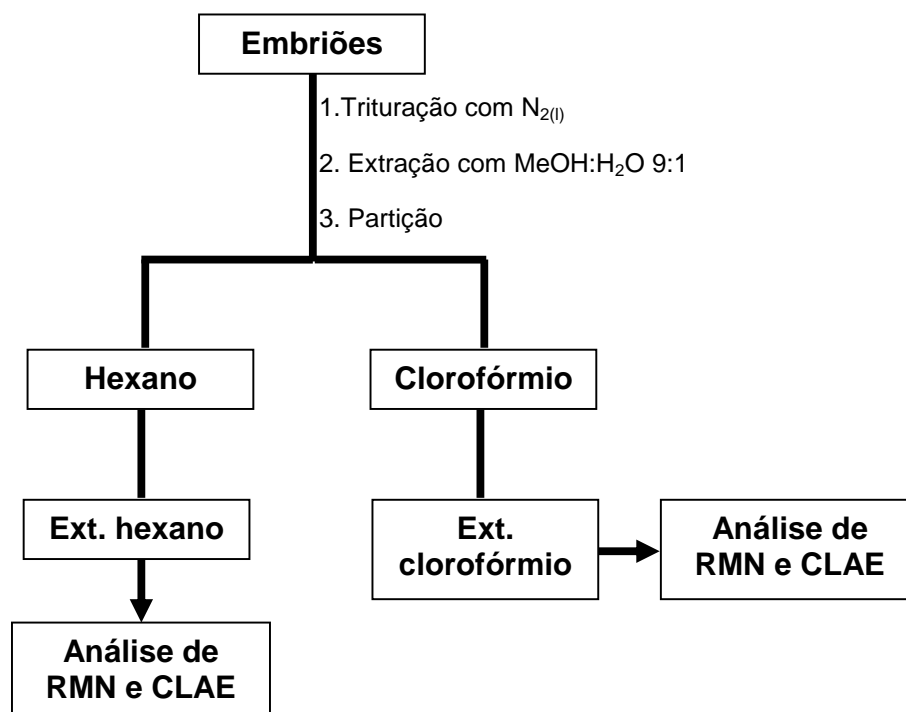


Figura 3.2. Partição do extrato hidroalcoólico

Devido a quantidade insuficiente da massa do extrato, foram acumulados mais embriões somáticos (132,0 mg) e repetida a extração com MeOH:H₂O 9:1, utilizando aparelho ultraturrax (T25 basic, IKA Labortechnik[®]) a 11.000 rpm. O extratos em clorofórmio foram reunidos (480 mg), fracionados em coluna cromatográfica, empacotada com sílica *flash*, eluída com CH₂Cl₂:AcOEt (1:2), seguidos de CH₂Cl₂ : Acetona (1:1) (Funasaki *et al.*, 2009). As frações foram agrupadas após análise por CCDA. O conjunto de amostras referentes às neolignanas 5'-metoxiporosina e armenina B (substâncias majoritárias à luz UV) foram submetidas à separação por CCDP. As neolignanas foram utilizadas como

amostras controles, nas reações de incorporação com os precursores marcados com carbono treze.

3.3.2.1. Perfil cromatográfico dos extratos dos embriões somáticos

Foi observado o perfil cromatográfico dos extratos dos embriões em hexano e clorofórmio. Foram utilizadas como padrões de referência, as substâncias isoladas no item 3.3.2 e as neolignanas presentes no banco de padrões do LQPN-IQUSP, anteriormente isoladas dos embriões de *O. catharinensis*.

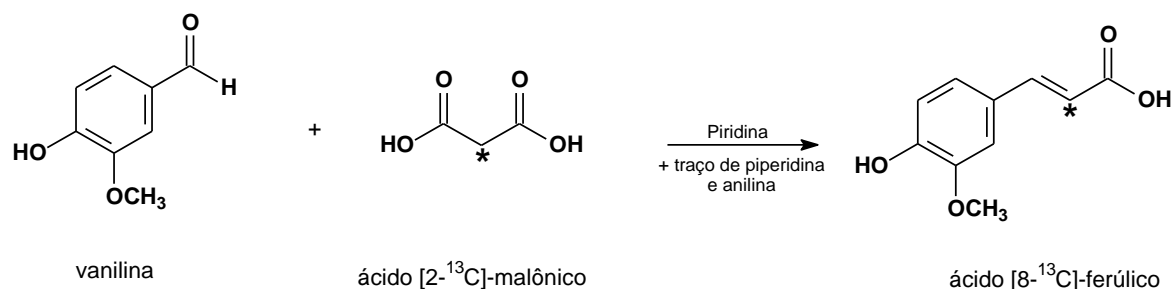
Os extratos foram filtrados em filtro Millipore 0,45 µm a fim de remover qualquer tipo de material em suspensão e em filtro Sep-Pack C-18 eluído em MeOH:H₂O (9:1) a fim de eliminar matriz lipofídica.

Para a análise cromatográfica foi utilizada uma condição pré-estabelecida. As investigações foram realizadas em uma coluna analítica Luna C18 (Phenomenex[®], 25 cm x 4,6 mm, 5 µm). Foi utilizada como fase móvel, CH₃CN:H₂O com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, eluída em gradiente de CH₃CN:H₂O (2:3) por 18 minutos, CH₃CN:H₂O (4:1) por 2 minutos, CH₃CN 100% por 2 minutos, voltando de 35 a 45 min à condição inicial. A eluição foi acompanhada com detector em 280 nm.

3.4. Preparação dos substratos utilizados nas reações de incorporação e nos ensaios enzimáticos

Os substratos foram sintetizados primeiramente com reagentes não marcados com carbono treze e utilizados nos ensaios *in vitro* de conversão enzimática, enquanto os enriquecidos com ¹³C foram usados nas reações de incorporação nos embriões somáticos de *O. catharinensis*. Os dados espectrométricos e propriedades físicas destes substratos estão descritos no item 3.4.7.

3.4.1. Preparação do ácido [8-¹³C]-ferúlico



Esquema 3.1. Reação de condensação de Knoevenagel

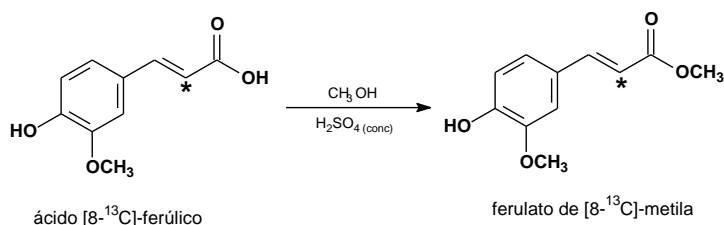
O ácido [8-¹³C]-ferúlico e álcool [8-¹³C]-coniferílico foram preparados como descrito em Katayama *et al.*, 1992.

O ácido [8-¹³C]-ferúlico foi preparado através da condensação de Knoevenagel entre o ácido [2-¹³C]-malônico e a vanilina catalisados por aminas aromáticas. Em um balão de 125 mL munido de agitação magnética e condensador de refluxo foi adicionado 642 mg (3,08 mmol) de ácido [2-¹³C]-malônico, 878 mg (5,77 mmol) de vanilina dissolvidos em 3,5 mL de piridina, uma gota de piperidina e uma gota de anilina previamente destiladas. A mistura reacional foi mantida sob refluxo em banho de óleo de silicone a 60°C por 24 horas, depois por mais 1h a 100°C e esfriada a temperatura ambiente. Esta preparação foi realizada por duas vezes. A suspensão foi solubilizada em 15 mL de água a 80°C, resfriada a temperatura ambiente e acidificada com HCl (pH 1-2). A solução opaca resultante foi extraída com acetato de etila (3 x 50mL), as fases orgânicas foram combinadas e concentradas a cerca de 25 mL do volume e extraídas com uma solução de NaHCO₃ 5% (2 x 50mL). As frações aquosas foram reunidas e extraídas com diclorometano (4 x 20 mL), para remover a vanilina que não reagiu, acidificadas com HCl concentrado (pH 1-2) e extraídas com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases com acetato de etila foram extraídas com solução saturada de NaCl (80 mL), secas com

Na₂SO₄ anidro e evaporadas, fornecendo os cristais de ácido [8-¹³C]-ferúlico (973 mg, 81,0%) que foi confirmado pelos espectros de RMN de ¹H (**Figura 7.1, Apêndice A**) e RMN de ¹³C (**Figura 7.4 , Apêndice A**). O produto final, cerca de 2,0 g, foi utilizado sem purificar.

3.4.2. Preparação do álcool [8-¹³C]-coniferílico

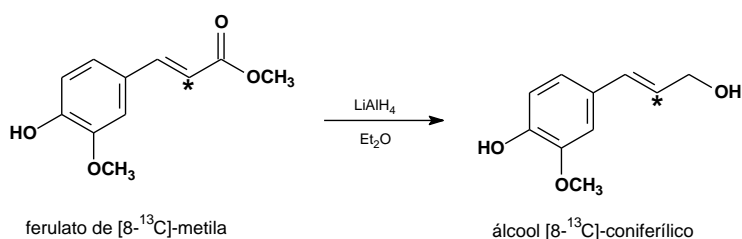
Etapa 1: Reação de esterificação do ácido [8-¹³C]-ferúlico



Em um balão do fundo redondo, contendo pérolas de porcelana, foi adicionado 1,5 g (7,72 mmol) de ácido [8-¹³C]-ferúlico, preparado previamente no item **3.4.1**, dissolvidos em 90 mL de metanol e 300 µL de ácido sulfúrico concentrado. A temperatura foi aumentada antes do refluxo começar, com o solvente de refluxo seco continuamente por meio de um extrator soxhlet contendo CaCl₂ e sílica gel azul a granel. Após 9 h de reação, a mistura foi esfriada a temperatura ambiente, neutralizada com 6,0 g de NaHCO₃, filtrada e evaporada até a secura em rotaevaporador. O resíduo resultante foi transferido para um funil de separação de 250 mL, solubilizado em 70 mL de diclorometano e 50 mL de água destilada. A fase aquosa foi novamente extraída com diclorometano (3 x 70 mL). As fases orgânicas foram combinadas, evaporadas a 25 mL do volume e extraídas com 70 mL de solução de NaCl saturada, secas sobre Na₂SO₄ e evaporadas sob pressão reduzida.

Foram obtidos 1,48 g (92,5%) do produto e foi identificado pelos espectros de RMN de ^1H (Figura 7.5, Apêndice A) e RMN de ^{13}C (Figura 7.8, Apêndice A). O produto foi utilizado sem purificar.

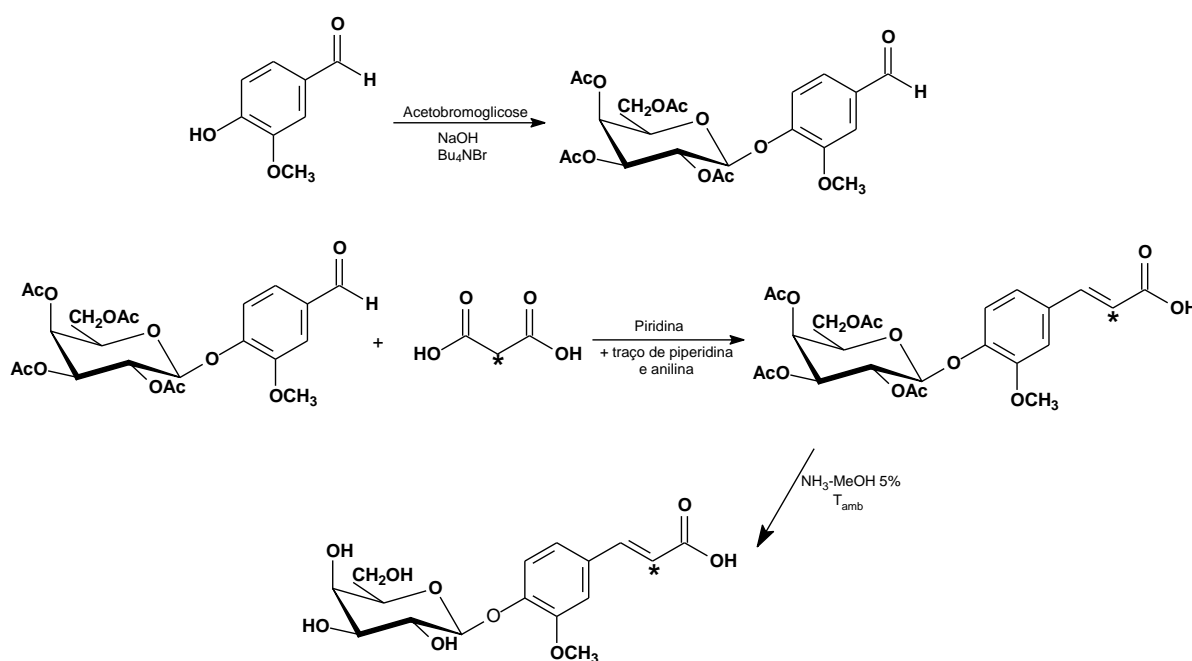
Etapa 2: Redução do ferulato de [8- ^{13}C]-metila a álcool [8- ^{13}C]-coniferílico



A um balão de três bocas de 100 mL, munido de agitação magnética, funil de adição, septo e sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados 500 mg (12,54 mmol) de LiAlH_4 solubilizados em 15 mL de éter etílico seco, à -25°C . Foi adicionada à solução, gota a gota, sob agitação, por cerca de 40 minutos uma solução de 479,26 mg (12,53 mmol) de ferulato de [8- ^{13}C]-metila diluída em 15 mL de éter etílico seco. A mistura foi agitada por 1h, a -25°C e acompanhada por CCDA, Hexano: AcOEt 7:3. Após este período, o balão contendo a mistura reacional foi transferido para um béquer de 400 mL contendo gelo picado e foi adicionado lentamente ao balão, 5 mL de acetato de etila para destruir o excesso de LiAlH_4 . A solução resultante foi transferida para um funil de separação de 125 mL, adicionados 50 mL de acetato de etila e água destilada que, foi adicionada lentamente para que ocorresse a formação do precipitado do sal de lítio. A solução foi filtrada e a fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 50 mL) para extrair o sal de lítio. As fases orgânicas foram reunidas, extraídas com 50 mL de solução saturada de NaCl , filtradas sob Na_2SO_4 , secas em rotaevaporador fornecendo 398 mg (79,6 %) do produto bruto. Parte do álcool [8- ^{13}C]-coniferílico foi aplicado em CPP e eluído com

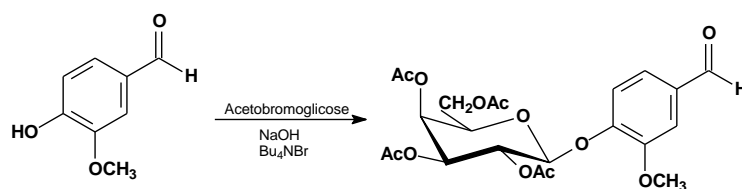
CH₂Cl₂:EtOH 97:3 por duas vezes. A fração correspondente ao álcool [8-¹³C]-coniferílico foi extraído da sílica com acetona. O produto puro foi confirmado pelos espectros de RMN de ¹H (Figura 7.9, Apêndice A) e RMN de ¹³C (Figura 7.12, Apêndice A).

3.4.3. Preparação do ácido [8-¹³C]-glicoferúlico



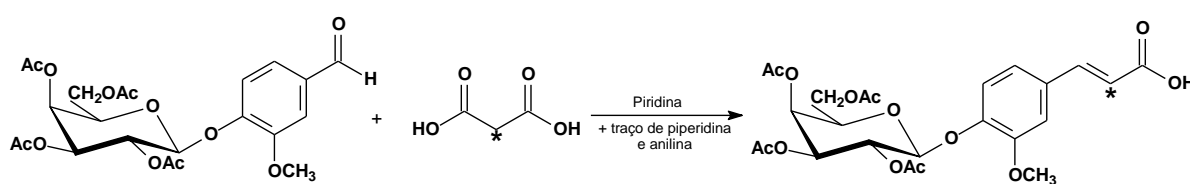
Esquema 3.2 Proposta para a preparação do ácido [8-¹³C]-glicoferúlico

Etapa 1: Glicoacetilação da vanilina



O protocolo foi realizado de acordo com Mohri *et. al.*, 2003. Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionada uma solução contendo 22 mL de clorofórmio, 2,0 g (13,11 mmol) de vanilina, 2,69 g (8,82 mmol) de acetobromoglicose e 2,14 g (6,53 mmol) de brometo de tetra *n*-butilamônio (Bu₄NBr). Em seguida, à temperatura ambiente, sob agitação, foram adicionados 22 mL de NaOH (1,0 mol.L⁻¹). A mistura resultante foi agitada vigorosamente por 1h, a temperatura ambiente e, acompanhada por CCDA, hexano:AcOEt (7:3), até o reagente de partida ser totalmente consumido. A solução resultante foi extraída com AcOEt (2 x 30 mL) e as fases orgânicas combinadas, lavadas com solução de NaOH (1,0 mol.L⁻¹), solução de NaCl saturada, secas com NaSO₄ anidro e evaporadas até a secura em rotaevaporador. O produto obtido foi recristalizado em etanol fornecendo 2,85 g (43,6%) e identificado por RMN de ¹H (Figura 7.13, Apêndice A) e RMN de ¹³C (Figura 7.15, Apêndice A).

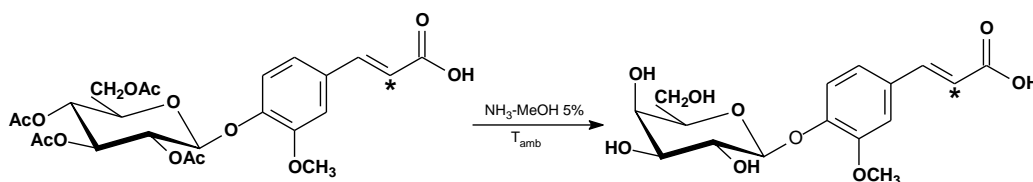
Etapa 2: Reação de condensação de Knoevenagel



A metodologia utilizada nesta reação foi desenvolvida de acordo com o item 3.4.1 e Stöckigt e Klischies, 1977. O ácido acetilado foi preparado através da reação de condensação de Knoevenagel. Em sistema montado de acordo com o item 3.4.1 foram adicionados a um balão de 100 mL, 100 mg (0,961 mmol) de ácido [2-¹³C]-malônico, 949,88 mg (1,05 mmol) da vanilina glicoacetilada, 3,5 mL de piridina, uma gota de piperidina e uma gota de anilina previamente destiladas. Decorridos o tempo

de reação, a mistura reacional foi diluída em 2,0 mL de água Milli-Q e 500 μ L de ácido acético. O ácido acetilado foi recristalizado com álcool etílico 95%, rendendo 904,32 mg (93,5%) do produto puro. O ácido tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil [8- 13 C]-ferúlico foi identificado pelos espectros de RMN de 1 H (**Figura 7.16, Apêndice A**) e RMN de 13 C (**Figura 7.20, Apêndice A**).

Etapa 3: Formação do ácido [8- 13 C]-glicoferúlico

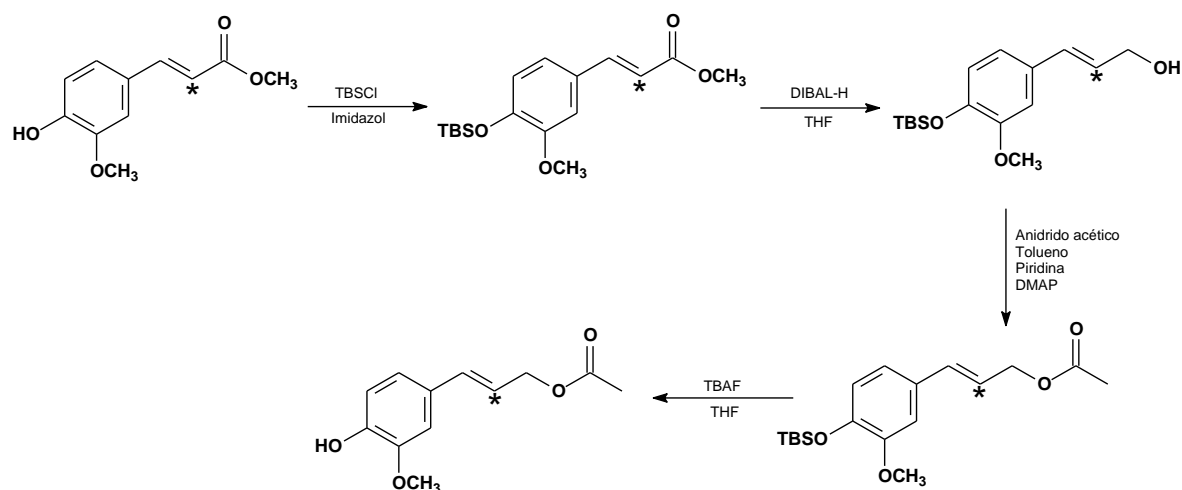


A desacetilação do tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil ácido [8- 13 C]-ferúlico foi realizada segundo Mohri *et. al.*, 2003 com algumas modificações. Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionada uma solução de tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil ácido [8- 13 C]-ferúlico (500 mg, 0,953mmol) em 5% NH_3 -MeOH (50 mL). A solução foi agitada por 2 horas, a temperatura ambiente e acompanhada por CCDA de sílica C18, MeOH:H₂O (1:1), até o material de partida ser totalmente consumido. A mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida e posteriormente, foi extraída com água (20 mL) e AcOEt (20 mL) (na fase aquosa contém o produto glicosilado e na orgânica parte do produto que não foi glicosilado). As respectivas fases foram concentradas em rotaevaporador. O resíduo da fase aquosa (280 mg) foi solubilizado em metanol, gotas de água Milli-Q e em seguida, aplicado em uma coluna cromatográfica (CC) de sílica C18, eluída com MeOH:H₂O 1:1. As frações contendo o produto foram combinadas e evaporadas a vácuo, fornecendo 213 mg (62,7%) do produto puro. Os espectros de RMN de 1 H (**Figura**

7.21, Apêndice A) e RMN de ^{13}C (Figura 7.24, Apêndice A) confirmaram a presença do ácido [8- ^{13}C]-glicoferúlico.

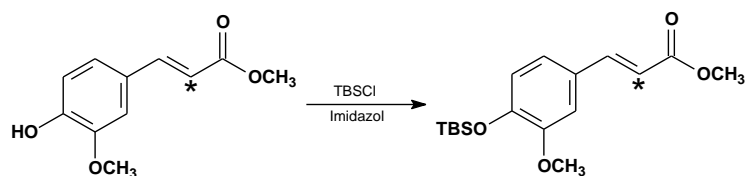
3.4.4. Preparação do acetato de [8- ^{13}C]-coniferila

A preparação deste precursor foi desenvolvida em quatro etapas de acordo com Bastos *et al.*, 2005 e Koeduka *et al.*, 2006 (Esquema 3.5). O éster [8- ^{13}C]-ferulato de metila foi previamente preparado no item 3.4.2 (Etapa 1).



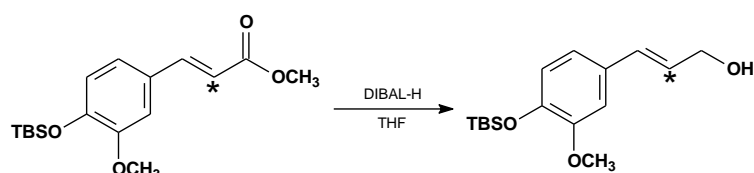
Esquema 3.3. Proposta para a preparação do acetato de [8- ^{13}C]-coniferila

Etapa 1: Proteção da hidroxila fenólica do [8- ^{13}C]-ferulato de metila com cloreto de *tert*-butildimetilsilano



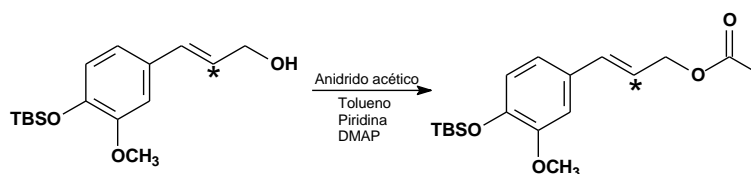
O [8-¹³C]-ferulato de metila (500 mg, 2,40 mmol), cloreto de *tert*-butildimetilsilano (434,07 mg, 2,88 mmol, 1,2 eqv) e imidazol (326 mg, 4,8 mmol, 2 eqv.) foram adicionados em um balão de 50 mL de fundo redondo. O balão aberto foi colocado dentro de um béquer, envolvido por vermiculite e, o conjunto foi posicionado dentro de um forno de microondas convencional. A mistura reacional foi aquecida por 2 minutos em potência de 90 W. Após o tempo decorrido, foi observada a formação de duas fases líquidas dentro do frasco. Após um período de resfriamento (2-3 min), a mistura reacional foi aquecida novamente em potência de 180 W. A reação foi acompanhada por CCDA, hexano:AcOEt (7:3), até o [8-¹³C]-ferulato de metila ser totalmente consumido. A reação foi finalizada pela adição de 15 mL de água Milli-Q, seguida de extração com éter etílico. As fases orgânicas foram combinadas, secas sob NaSO₄ e evaporadas sob pressão reduzida. Esta metodologia foi realizada em duas etapas partindo de 500 mg e 450 mg do [8-¹³C]-ferulato de metila. O produto bruto foi purificado por *chromatotron*, eluído com hexano:AcOEt (7:3) resultando em 1,21 g (82,3%) do produto puro que foi identificado por RMN de ¹H (**Figura 7.25, Apêndice A**) e RMN de ¹³C (**Figura 7.28, Apêndice A**).

Etapa 2: Reação de redução do éster a álcool



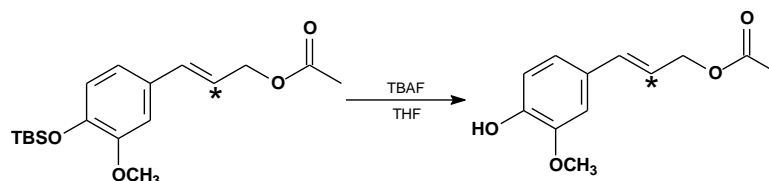
Em um balão de três bocas contendo agitação magnética, funil de adição, septo e sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados, a temperatura ambiente, 1,0 g (3,11 mmol) do éster preparado na etapa 1 (**item 3.4.4**) e 30 mL de THF seco destilado sob sódio metálico e benzofenona. A mistura reacional foi resfriada a 0°C em banho de gelo e agitada por 30 min. Depois deste período foi adicionado gota a gota, através de um funil de adição, 30 mL do hidreto de diisobutilalumínio em THF (DIBAL-H, 10,0 eq.) por um período de 1,0 h. O banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente, sob agitação por cerca de 2,0 h. A reação foi acompanhada por CCDA, hexano:AcOEt (7:3), até todo o material de partida ser consumido. A mistura reacional foi novamente resfriada a 0°C e finalizada pela adição de 62 mL da solução aquosa do sal de Rochele a 100 mM (tartarato de sódio e potássio). Foram adicionados 50 mL de acetato de etila ao meio reacional e, o resíduo do sal de alumínio foi solubilizado pela adição de cerca de 10 mL de HCl (1,0 mol.L⁻¹). A mistura bifásica foi filtrada em celite e foram adicionados 62 mL de solução saturada de NaCl. A fase aquosa foi novamente extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas, seca sob NaSO₄ e concentrada em rotaevaporador. O produto bruto obtido foi purificado por *chromatotron*, eluído com hexano:AcOEt (7:3). As frações contendo o álcool foram reunidas, concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, fornecendo 848 mg (92,7 %) do produto puro que foi confirmado pelos sinais de RMN de ¹H (**Figura 7.29, Apêndice A**) e RMN de ¹³C (**Figura 7.32, Apêndice A**).

Etapa 3: Reação de acetilação de álcool

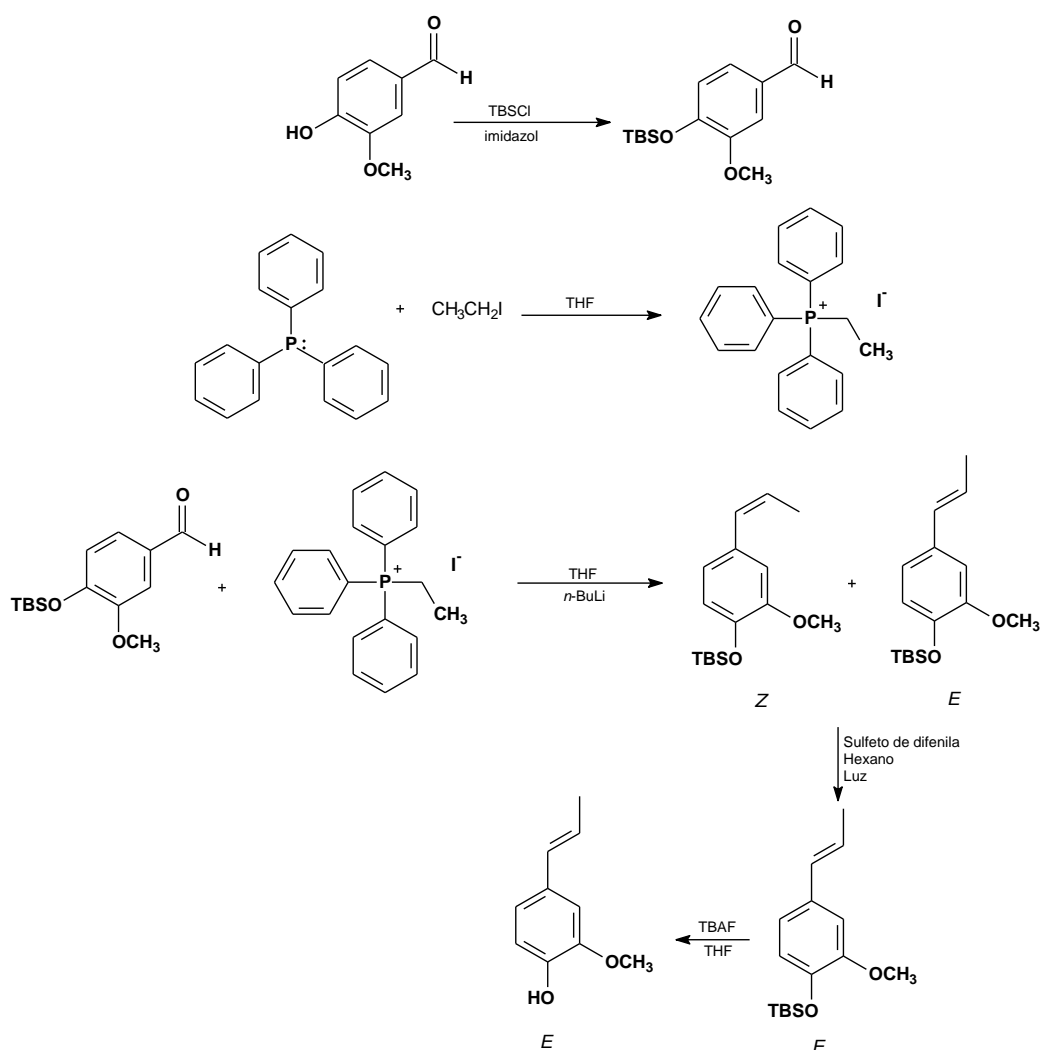


Um sistema com um balão de três bocas de 50 mL foi montado de acordo com o item **3.4.4 (Etapa 2)**. Foram adicionados ao balão, a temperatura ambiente, 802 mg (2,52 mmol) do álcool [8-¹³C]-coniferílico com a hidroxila fenólica protegida com TBS, 5,31 mL de tolueno, 2,12 mL de piridina (25,22 mmol) destilados e secos, 500 µL de anidrido acético (5,05 mmol) e 3,18 mg de 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,027 mmol). A mistura reacional foi acompanhada por CCDA (Hexano : AcOEt, 7:3), a qual indicou quando o material de partida foi totalmente consumido. A reação ficou sob agitação por aproximadamente uma hora. O produto bruto da reação foi concentrado sob pressão reduzida, com sucessivas lavagens com tolueno (20 mL) para eliminar o excesso de anidrido e piridina. O óleo resultante foi solubilizado em 25 mL de acetato de etila, extraído com HCl 1,0 mol.L⁻¹ (3 x 25 mL) e solução saturada de NaCl (2 x 25 mL). As fases aquosas foram combinadas e novamente extraídas com acetato de etila (3 x 25 mL). As fases orgânicas foram agrupadas, secas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e concentradas em rotaevaporador. O produto bruto foi purificado por *chromatotron*, eluído com Hexano : AcOEt (7:3), resultando em 704,0 mg (82,7%) do produto puro que foi identificado por RMN de ¹H (Figura 7.33, Apêndice A) e RMN de ¹³C (Figura 7.36, Apêndice A).

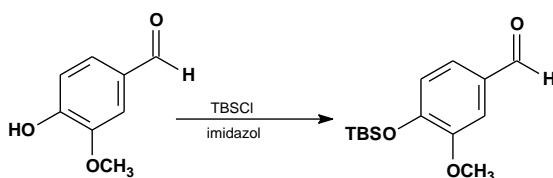
Etapa 4: Reação de desproteção da hidroxila fenólica do acetato de [8-¹³C]-coniferila



Foram adicionados a um balão de três bocas, munido de agitação magnética, funil de adição, septo, sob atmosfera de nitrogênio e a temperatura ambiente, 500 mg (1,49 mmol) de acetato de [8-¹³C]-coniferila com a hidroxila fenólica protegida com TBS e 15 mL de THF seco. A solução foi resfriada a 0°C em banho de gelo, sob agitação por 30 min. Após este período, por meio de um funil de adição, foi adicionado lentamente ao meio reacional mantido a 0°C, 3,0 mL de fluoreto de tetrabutílamônio a 1,2 mol.L⁻¹ em THF. Em seguida, a reação foi mantida sob agitação por mais 30 min. Foram adicionados à mistura reacional 30 mL de acetato de etila frio, seguidos de 30 mL de solução de HCl a 1 mol.L⁻¹ e 30 mL de solução saturada de NaCl. Foram separadas as fases e as aquosas foram novamente extraídas com AcOEt (2 x 30 mL). As fases orgânicas foram agrupadas, secas sob Na₂SO₄ e concentradas em rotaevaporador. O produto bruto (423 mg) foi submetido a CC, eluída com CH₂Cl₂:MeOH (9:1), resultando em em 212 mg (64,4%) do produto puro que foi identificado pelos espectros de RMN de ¹H (**Figura 7.37, Apêndice A**) e RMN de ¹³C (**Figura 7.40, Apêndice A**).

3.4.5 Preparação do *E*-isoeugenolEsquema 3.4. Proposta para a preparação do *E*-isoeugenol

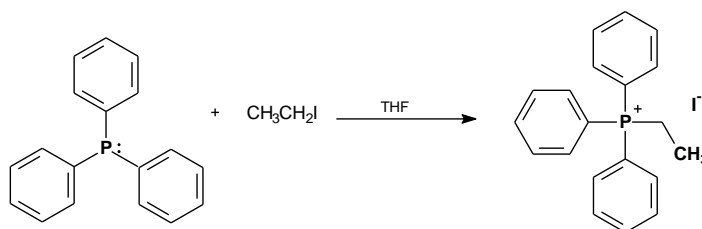
Etapa 1: Proteção da hidroxila fenólica com TBS



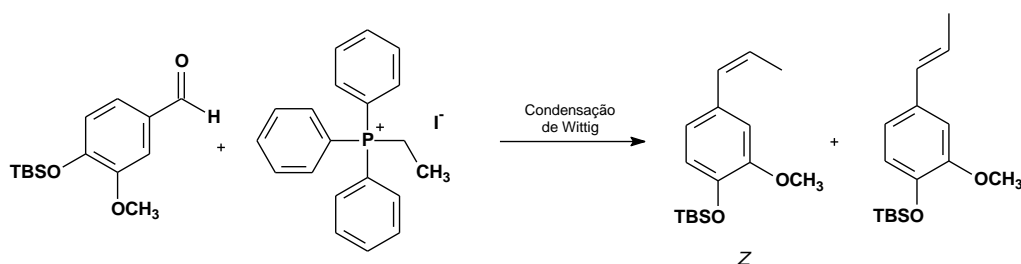
A metodologia utilizada nesta reação foi desenvolvida de acordo com o item 3.4.4, etapa 1. A vanilina (500 mg, 3,28 mmol), cloreto de *tert*-butildimetilsilano (593,23 mg, 3,94 mmol, 1,2 eqv.) e imidazol (446,46 mg, 6,56 mmol, 2,0 eqv.) foram

adicionados a um balão de 50 mL de fundo redondo. O sistema foi mantido aberto e submetido a um forno de microondas convencional, seguidos de aquecimento e, a reação foi acompanhada por CCDA (**item 3.4.4**). Esta metodologia foi realizada em três etapas partindo de 500 mg de vanilina. O produto bruto foi purificado por *chromatotron*, eluído com hexano:AcOEt (7:3) resultando em 2,28 g (87,02 %) do produto puro que foi identificado por RMN de ^1H (**Figura 7.41, Apêndice A**) e RMN de ^{13}C (**Figura 7.43, Apêndice A**).

Etapa 2: Preparação do iodeto de etil trifenilfosfônio



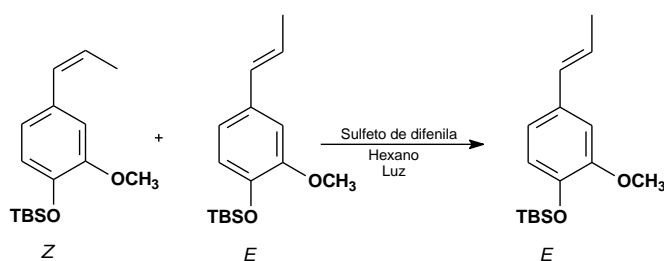
Em um balão de fundo redondo de 500 mL foram dissolvidos 12 mL (150 mmol) de iodoetano e 39,40 g (150 mmol) de trifenilfosfina em 100 mL de THF seco. A reação foi mantida sob refluxo e agitação por cerca de 96 horas a 95°C. Ao final deste período, foi observada a formação de um sólido branco que foi lavado com hexano gelado através de filtração em funil de Buchner. Em seguida, o sólido foi seco em dessecador sob pressão por aproximadamente 90 horas (Cardona, 1986; Martins, 2002). Foram obtidos 58,26 g do produto bruto. O iodeto de etil-trifenilfosfônio foi confirmado pelos dados de RMN de ^1H (**Figura 7.44, Apêndice A**) e RMN de ^{13}C (**Figura 7.46, Apêndice A**).

Etapa 3: Reação de condensação de Wittig

Este protocolo foi desenvolvido de acordo com Bastos *et al.*, 2004, com algumas modificações. A um sistema com um balão de três bocas de 125 mL, contendo agitação magnética, funil de adição, septo e sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados 30 mL de THF seco. O solvente foi resfriado a -75°C e adicionados gota a gota, por meio de uma seringa 4,0 mL (8,57 mmol) de *n*-BuLi em hexano a $2,16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A solução de coloração amarelo-clara foi mantida sob agitação por 30 minutos a 0°C . Após este período foram adicionados, a 0°C , 3,76 g (8,98 mmol) do iodeto de etil- trifenilfosfônio. Ao adicionar o sal, a solução mudou a coloração de amarelo pálido para vermelho-vinho. A solução foi mantida sob agitação por mais 30 minutos. Decorridos este período, foram adicionados gota a gota, por cerca de 30 minutos, uma solução de 2,28 g (8,57 mmol) de vanilina com a hidroxila fenólica protegida com TBS em 10 mL de THF seco. A solução final passou a apresentar coloração amarelo-clara e foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Após este período, foram adicionados 50 mL de água Milli-Q à reação. A fase aquosa foi extraída com hexano (5 x 50 mL) seguida de extração com AcOEt (2 x 50 mL). As fases orgânicas separadamente foram concentradas em rotaevaporador. Em seguida, a fase em hexano foi filtrada por uma CC de sílica e lavada com porções de hexano 100%, seguidos de Hexano : AcOEt (9:1). O solvente foi eliminado em rotaevaporador resultando em 682 mg

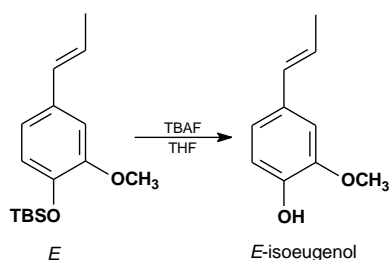
(28,6%) de um óleo amarelado. O produto foi identificado por RMN de ^1H (**Figura 7.47, Apêndice A**) que indicou a formação de uma mistura dos isômeros *Z*- e *E*-isoeugenol.

Etapa 4: Reação de fotoisomerização do *E*- e *Z*-isoeugenol



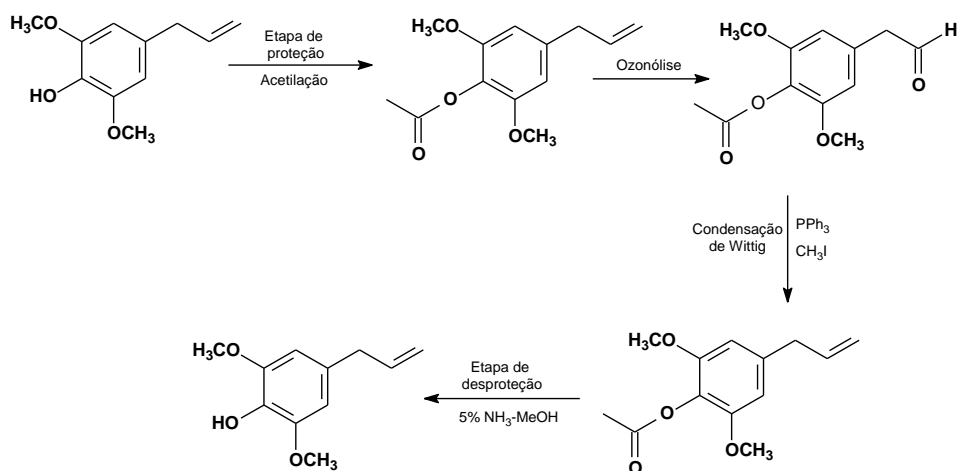
Esta reação foi desenvolvida de acordo com Moussebois e Dale, 1966 e Martins, 2002. Foi realizada uma reação de fotoisomerização do produto obtido na etapa 3, para obter excesso do *E*-isoeugenol.

Em uma ampola de vidro contendo agitador magnético, foram adicionados 340 mg (1,28 mmol) do *E*- e *Z*-isoeugenol com a hidroxila protegida com TBS e 80 μL (0,384 mmol, 0,3 eqv.) de sulfeto de difenila em 3,0 mL de hexano seco. Foi incidido luz (60 Watts) diretamente no sistema fechado (a temperatura ambiente e mantido sob agitação em óleo de silicone) por 16 horas. No final deste período, o sistema foi aberto e o solvente evaporado. O produto bruto (298 mg, 83% de rendimento) foi purificado por CCDP eluída em hexano:AcOEt 100:1. O produto puro foi confirmado por RMN de ^1H (**Figura 7.49, Apêndice A**) e RMN de ^{13}C (**Figura 7.51, Apêndice A**).

Etapa 5: Reação de desproteção da hidroxila fenólica do *E*-isoeugenol

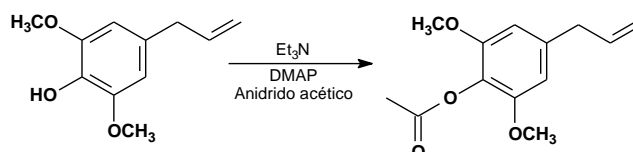
A reação foi realizada de acordo com o item **3.4.4**, etapa 4. A um sistema montado conforme o item citado, foram adicionados 250 mg (0,898 mmol) do *E*-isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS e 3,0 mL de THF seco. A solução foi resfriada a 0°C em banho de gelo e mantida sob agitação por 30 min. Após este período, por meio de um funil de adição, foi adicionado lentamente ao meio reacional mantido a 0°C, 312 µL de fluoreto de tetrabutilamônio a 1,2 mol.L⁻¹ em THF. A mistura foi mantida sob agitação por 30 min, acompanhada por CCDA e eluída com hexano:AcOEt (7:3), seguida de extração com acetato de etila. O produto bruto (200 mg) foi purificado por CC eluída com hexano:AcOEt 8:2. Foram obtidos 152 mg (61 % de rendimento) do produto puro que foi confirmado por RMN de ¹H (**Figura 7.52, Apêndice A**) e RMN de ¹³C (**Figura 7.53, Apêndice A**).

3.4.6 Preparação do 5-metoxi-eugenol



Esquema 3.5. Proposta para a preparação do 5-metoxi-eugenol

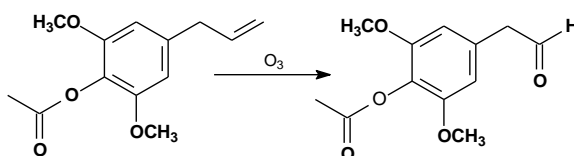
Etapa 1: Reação de proteção da hidroxila fenólica



O protocolo foi desenvolvido de acordo com Boschi *et al.*, 2006. A reação foi realizada em um balão de três bocas de 50 mL, sob atmosfera de nitrogênio e funil de adição. Foi preparada uma solução de 2,0 mL (10,3 mmol) de 5-metoxi-eugenol comercial em 20 mL de diclorometano. Foram adicionados a esta solução 2,86 mL de trietilamina (20,5 mmol) e 0,04 g (0,29 mmol) de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura foi resfriada a 0°C e foram adicionados gota a gota, através de um funil de adição 1,93 mL (20,5 mmol) de anidrido acético. A mistura reacional foi deixada sob agitação, a temperatura ambiente, por 20 min. A solução final foi diluída em 30 mL de diclorometano, lavada com solução saturada de NaCl (2 x 30 mL), seca sob Na₂SO₄ e evaporada em rotaevaporador. Foram obtidos 2,30 g, 97% de

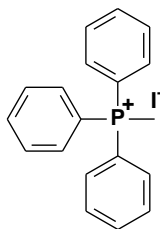
rendimento do produto o qual, foi utilizado sem purificar. A formação do 4-alil-2,6-dimetoxifenil acetato foi confirmada pelas análises de RMN de ^1H (Figura 7.54, Apêndice A) e RMN de ^{13}C (Figura 7.56, Apêndice A).

Etapa 2: Reação de ozonólise do 4-alil-2,6-dimetoxifenil acetato



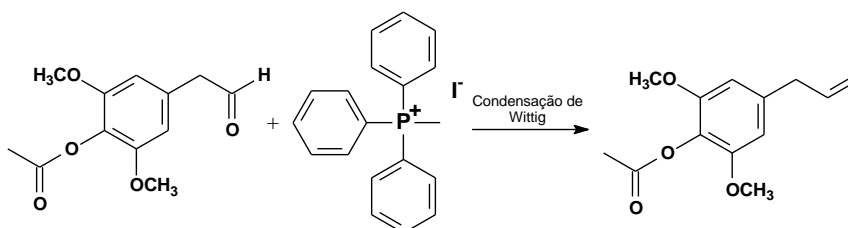
A ozonólise foi realizada conforme descrito em Schiaffo e Dussault, 2008, com algumas modificações. O 4-alil-2,6-dimetoxifenil acetato, 500 mg (2,12 mmol) foi colocado em um balão de fundo redondo e solubilizado em acetona: H_2O 95:5 em uma concentração de $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A solução foi resfriada a 0°C e um fluxo de O_3/O_2 foi borbulhada na mistura reacional através de uma pipeta descartável acoplada a uma bomba de aquário. A reação foi acompanhada por CCDA, hexano: AcOEt 7:3. Após o material de partida ser totalmente consumido, a mistura reacional foi diluída em 25 mL de água e extraída com diclorometano (2 x 25mL). As fases orgânicas foram reunidas e concentradas em rotaevaporador. Esta reação foi repetida por mais três vezes, partindo de 500 mg do reagente. O produto bruto foi purificado por *chromatotron* e eluído com hexano:AcOEt (7:3). As frações foram acompanhadas por CCDA. As frações contendo o produto foram reunidas, concentradas em rotaevaporador, fornecendo 772 g, (38 % de rendimento) do produto puro, que foi identificado pelos sinais de RMN de ^1H (Figura 7.57, Apêndice A) e RMN de ^{13}C (Figura 7.59, Apêndice A).

Etapa 3: iodeto de metil-trifenilfosfônio



O iodeto de metil-trifenilfosfônio encontrava-se disponível no laboratório, logo não foi necessário prepará-lo. Os espectros RMN de ^1H (**Figura 7.60**, **Apêndice A**) e RMN de ^{13}C (**Figura 7.61**, **Apêndice A**) confirmaram sua estrutura.

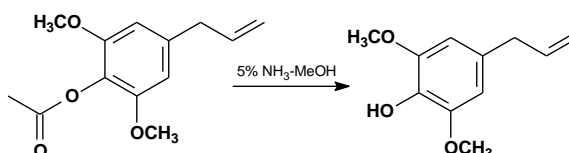
Etapa 4: Reação de condensação de Wittig



Esta reação foi realizada de acordo com o item **3.4.5**, etapa 3. Foram adicionados em 6,0 mL de THF seco, resfriado a -75°C , 1,5 mL (3,24 mmol, 1 eqv.) de *n*-BuLi em hexano ($2,16 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). A solução foi mantida sob agitação por 30 minutos a 0°C e após este período, foram adicionados 1,57 g (3,88 mmol) do iodeto de metil-trifenilfosfônio. Após a adição do sal, a reação foi mantida sob agitação por mais 30 minutos a 0°C e posteriormente, foi adicionada, gota a gota, uma solução de 772 mg (3,24 mmol) do aldeído acetilado em 3,0 mL de THF seco. O sistema foi deixado sob agitação a temperatura ambiente, por 24 h. A reação foi finalizada pela adição de 5 mL de água Milli-Q, seguidos de extração com hexano e acetato de etila. O produto bruto foi purificado por CC, eluída com Hexano : AcOEt (9:1)

seguidos de AcOEt 100%. O produto puro 234 mg (30,6%) foi identificado por RMN de ^1H (Figura 7.62, Apêndice A) e RMN de ^{13}C (Figura 7.63, Apêndice A).

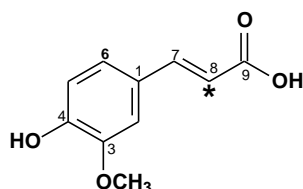
Etapa 5: Reação de desproteção do grupo acetato



A desacetilação do 5-metoxi-eugenol foi realizada de acordo com o item **3.4.3**, etapa 3. Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionada uma solução de 234 mg (0,99 mmol) do 5-metoxi-eugenol acetilado em 5% NH₃-MeOH (23,4 mL). A solução foi agitada por cerca de 2 horas, a temperatura ambiente e acompanhada por CCDA, Hexano : AcOEt 7:3, até o material de partida ser totalmente consumido. A mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida e posteriormente, solubilizada em 20 mL de AcOEt e 20 mL de água Milli-Q. A fase aquosa foi novamente extraída com AcOEt (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram concentradas e submetidas a CC eluída com hexano:AcOEt 7:3. O produto puro 5-metoxi-eugenol (128 mg, 66,6 % de rendimento) foi confirmado pelos dados de RMN de ^1H (Figura 7.64, Apêndice A) e RMN de ^{13}C (Figura 7.66, Apêndice A).

3.4.7. Dados espectrométricos e propriedades físicas dos substratos preparados para os ensaios biossintéticos

Ácido [8-¹³C]-ferúlico



Fórmula molecular: C₁₀H₁₀O₄

Massa molecular: 195,02 u.m.a

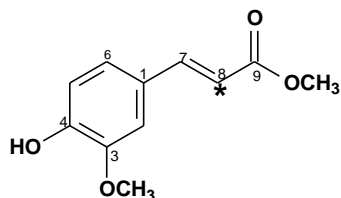
Estado físico: cristal amarelado

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 9,54 (1H, s; 4-OH); 7,51 (1H, d, *J* = 15,8 Hz; H7); 7,28 (1H, d, *J* = 1,9 Hz; H2); 7,09 (1H, dd, *J* = 1,9 e 8,2 Hz; H6); 6,80 (1H, d, *J* = 8,2 Hz; H5); 6,39 (1H, d, *J* = 15,8 Hz; H8); 3,81 (3H, s; 3-OCH₃) (**Figura 7.1, Apêndice A**).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆): δ 168,5 (C9); 149,5 (C3); 148,3 (C4); 145,0 (C7); 126,2 (C1)*; 123,3 (C6)*; 116,0 (C8); 115,9 (C5)*; 111,5 (C2)*; 56,1 (3-OCH₃) (**Figura 7.4, Apêndice A**). *Os sinais podem estar trocados.

Preparação do álcool [8-¹³C]-coniferílico

1. [8-¹³C]-Ferulato de metila



Fórmula molecular: C₁₁H₁₂O₄

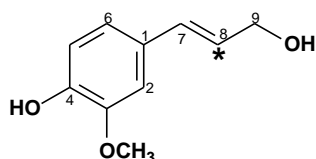
Massa molecular: 209,06 u.m.a

Estado físico: sólido amorfo amarelado

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7,67 (1H, d, *J* = 16,0 Hz; H7); 7,10 (1H, m, H2); 7,06 (1H, dd, *J* = 1,3 e 8,5 Hz; H6); 6,94 (1H, d, *J* = 8,5 Hz; H5); 6,33 (1H, d, *J* = 16,0 Hz; H8); 3,93 (3H, s; 3-OCH₃); 3,80 (3H, s; 9-OCH₃) (**Figura 7.5, Apêndice A**).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 168,0 (C9); 148,3 (C3); 147,1 (C4)*; 145,3 (C7)*; 127,1 (C1); 123,2 (C6); 115,3 (C8); 115,0 (C2)*; 109,7 (C5)*; 56,2 (3-OCH₃); 51,9 (9-OCH₃) (**Figura 7.8, Apêndice A**). *Os sinais podem estar trocados.

2. Álcool [8-¹³C]-coniferílico



Fórmula molecular: C₁₀H₁₂O₃

Massa molecular: 181,05 u.m.a

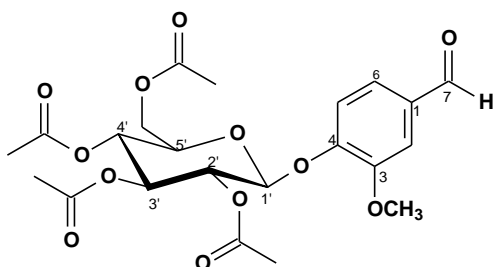
Estado físico: sólido levemente amarelado

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,86-6,91 (3H, m; H2; H5 e H6); 6,57 (1H, dt, *J* = 1,3 e 15,8 Hz; H7); 6,22 (1H, dt, *J* = 5,7 e 15,8 Hz; H8); 5,74 (1H, sl; 4-OH); 4,31 (2H, dd, *J* = 1,3 e 5,7 Hz; H9); 3,89 (3H, s; 3-OCH₃) (**Figura 7.9, Apêndice A**).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 146,6 (C3); 145,5 (C4); 131,3 (C7); 129,2 (C1); 126,1 (C8); 120,2 (C6); 114,5 (C5)*; 108,4 (C2)*; 63,7 (C9); 55,8 (3-OCH₃) (Figura 7.12, Apêndice A). *Os sinais podem estar trocados.

Preparação do ácido [8- ^{13}C]-glicoferúlico

1. vanilina glicoacetilada



Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$

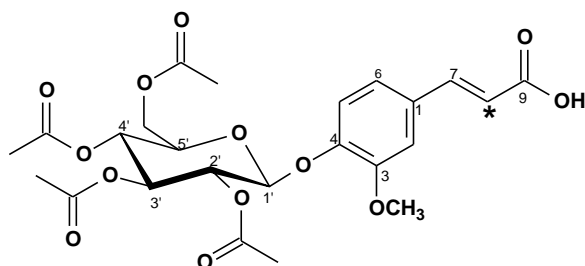
Massa molecular: 482,14

Estado físico: cristal levemente marrom

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 9,90 (1H, s; 7-CHO); 7,43 (1H, d, $J = 8,7$ Hz; H5); 7,41 (1H, m; H2); 7,24 (1H, d, $J = 8,7$ Hz; H6); 3,90 (3H, s; 3-OCH₃) açúcar: δ 5,10-5,35 (4H, m; H-1', H-2', H-3', H-5'); 4,10-4,33 (2H, m; 5'-CH₂COOCH₃); 3,82-3,87 (1H, m; H4'); 2,05-2,08 (12H, m, CH₃COO-) (Figura 7.13, Apêndice A).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 191,0 (C7); 170,3, 170,6, 169,5 e 169,4 (C=O); 151,1 (C3); 125,4 (C6); 132,5 (C1); 125,4 (C6); 118,3 (C5); 110,9 (C2); 56,2 (3-OCH₃) açúcar: 99,8 (C1'); 72,5 (C2'); 72,4 (C5'); 71,1 (C4'); 68,4 (C3'); 62,0 (5'-CH₂COOCH₃); 20,7 (OCOCH₃) (Figura 7.15, Apêndice A).

2. ácido [8-¹³C]-ferúlico glicoacetilado



Fórmula molecular: C₂₄H₂₈O₁₃

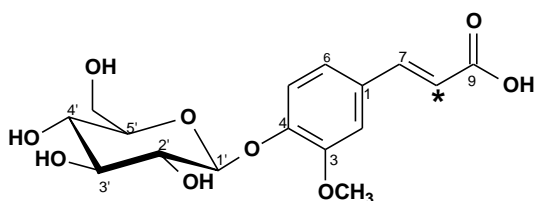
Massa molecular: 525,17

Estado físico: sólido amarelado

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7,72 (1H, d, *J* = 15,8 Hz; H8); 7,07-7,12 (3H, m; H-2; H5 e H6); 6,37 (1H, d, *J* = 15,8 Hz; H7); 3,85 (3H, s; 3-OCH₃) **açúcar:** δ 5,30 (1H, m; H2')*; 5,17 (1H, m; H3')*; 5,04 (1H, m; H1')*; 4,10-4,33 (2H,ddd, *J* = 4,95 e 15,8 Hz; 5'-CH₂COOCH₃); 3,82-3,87 (2H, m; H4' e H5'); 2,05-2,08 (12H, m; 2',3',4',5'-OCOCH₃) (**Figura 7.16, Apêndice A**). *Os sinais podem estar trocados.

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 169,3 (C9); 150,8 (C3); 148,1 (C4); 146,2 (C7)*; 130,6 (C1); 122,0 (C6); 119,4 (C8); 116,9 (C5)*; 111,6 (C2)*; 56,0 (3-OCH₃) **açúcar:** 169,3-170,6 (-OCOCH₃); 100,2 (C1')*; 72,2 (C2')*; 71,1 (C3')*; 71,1 (C5'); 68,4 (C4'); 62,0 (-CH₂COOCH₃); 20,6 (-OCOCH₃) (**Figura 7.20, Apêndice A**). *Os sinais podem estar trocados.

3. ácido [8-¹³C]-glicoferúlico



Fórmula molecular: C₁₆H₂₀O₉

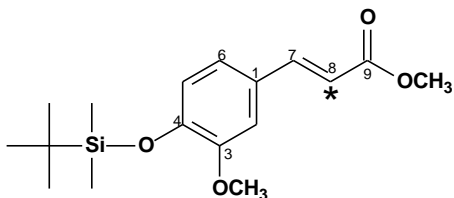
Massa molecular: 357,11 u.m.a

Estado físico: sólido amorfo

levemente marrom

RMN de ¹H (200 MHz, D₂O): δ 7,41 (1H, d, *J* = 15,9 Hz; H7); 7,12-7,19 (3H, m, H2, H5 e H6); 6,41 (1H, d, *J* = 15,9 Hz; H8); 3,87 (3H, s; 3-OCH₃) **açúcar:** 5,13 (1H, m, H1'); 3,91-3,96 (1H, dd, *J* = 2,1 e 12,3 Hz, -CH₂OH); 3,50-3,80 (5H, m, H2', H3', H4', H5' e -CH₂OH); 2,00 (4H, s, 2',3',4'-OH e 5'-CH₂OH) (**Figura 7.21, Apêndice A**).

RMN de ¹³C (50 MHz, D₂O): δ 169,5 (C9); 150,3 (C3); 148,5 (C4); 147,6 (C7); 125,6 (C6); 123,6 (C1); 118,2 (C8); 114,2 (C2); 103,0 (C5); 58,3 (3-OCH₃) **açúcar:** 79,2 (C5'); 78,4 (C3'); 75,6 (C2'); 72,8 (C4'); 63,6 (-CH₂OH); 63,4 (C1') (**Figura 7.24, Apêndice A**).

Preparação do acetato de [8-¹³C]- coniferila1. [8-¹³C]-ferulato de metila protegido com TBS

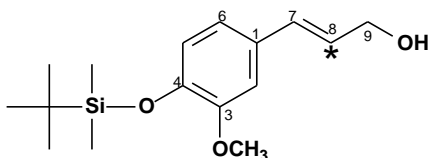
Fórmula molecular: C₁₇H₂₆O₄Si

Massa molecular: 323,20 u.m.a

Estado físico: sólido branco

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7,67 (1H, d, *J* = 15,7 Hz, H7); 7,00-7,04 (2H, m, H2 e H5); 6,86 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H6); 6,34 (1H, d, *J* = 15,7 Hz, H8); 3,83 (3H, s; 3-OCH₃); 3,80 (3H, s; 9-OCH₃); 0,99 (9H, s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂); 0,17 (6H, s; - (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (Figura 7.25, Apêndice A).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 168,1 (C9); 151,6 (C3); 147,9 (C4); 145,3 (C7); 128,6 (C1); 122,6 (C6)*; 121,5 (C5); 115,9 (C8); 111,3 (C2)*; 55,8 (3-OCH₃); 52,0 (9-OCH₃); 26,0 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂; 18,9 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂; -4,2 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (Figura 7.28, Apêndice A).

2. álcool [8-¹³C]-coniferílico protegido com TBS

Fórmula molecular: C₁₆H₂₆O₃Si

Massa molecular: 295,17 u.m.a

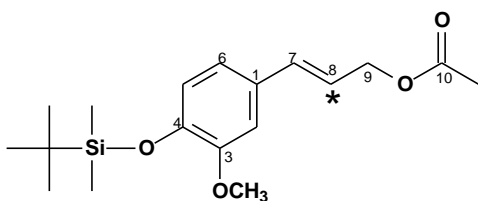
Estado físico: óleo incolor

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,77-6,91 (3H, m, H2, H5 e H6); 6,50 (1H, d, *J* = 15,7 Hz, H7); 6,30 (1H, dt, *J* = 6,3 e 15,7 Hz, H8); 4,30 (2H, sl, H9); 3,82 (3H, s; 3-

OCH₃); 0,99 (9H, s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂); 0,15 (6H, s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (Figura 7.29, Apêndice A).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 151,0 (C3); 145,0 (C4); 131,4 (C7); 130,6 (C1); 126,5 (C8); 120,9 (C6)*; 119,6 (C5)*; 109,8 (C2)*; 63,9 (C9); 55,4 (3-OCH₃); (CH₃)₃CSi(CH₃)₂; 18,4 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂; -4,7 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (Figura 7.32, Apêndice A). Os sinais podem estar trocados.

3. acetato de [8-¹³C]-coniferila protegido com TBS



Fórmula molecular: C₁₈H₂₈O₄Si

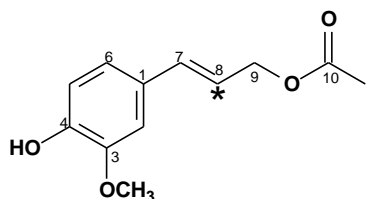
Massa molecular: 337,18 u.m.a

Estado físico: óleo levemente amarelado

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,77-6,91 (3H, m, H2, H5 e H6); 6,63 (1H, d, J = 15,8 Hz, H7); 6,23 (1H, dt, J = 6,7 e 15,8 Hz, H8); 4,72 (2H, dd, J = 1,3 e 6,7 Hz, H9); 2,09 (3H, s, H11); 3,82 (3H, s; 3-OCH₃); 0,99 (9H, s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂); 0,15 (6H, s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (Figura 7.33, Apêndice A).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 170,6 (C10); 150,8 (C3); 145,0 (C4); 134,6 (C7); 129,7 (C1); 121,0 (C5); 120,9 (C8); 119,4 (C6); 109,4 (C2); 65,4 (C9); 55,3 (3-OCH₃); 25,7 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂; 20,6 (C11); 18,4 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂; -4,5 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (Figura 7.36, Apêndice A).

4. acetato de [8-¹³C]-coniferila



Fórmula molecular: C₁₂H₁₄O₄

Massa molecular: 222,9 u.m.a

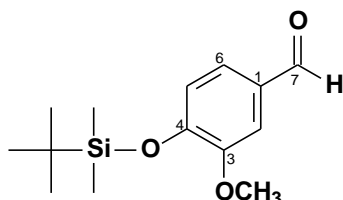
Estado físico: óleo incolor

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,88-6,93 (3H, m, H2, H5 e H6); 6,63 (1H, d, *J* = 15,8 Hz, H7); 6,21 (1H, dt, *J* = 6,7 e 15,8 Hz, H8); 5,65 (1H, s; 4-OH); 4,72 (2H, dd, *J* = 1,2 e 6,7 Hz, H9); 3,91 (3H, s; 3-OCH₃); 2,10 (3H, s, H11) (**Figura 7.37, Apêndice A**).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 170,9 (C10); 146,6 (C3); 146,0 (C4); 134,4 (C7); 128,3 (C1); 120,7 (C5); 120,6 (C8); 118,5 (C6); 108,7 (C2); 65,1 (C9); 56,6 (3-OCH₃); 21,3 (C11) (**Figura 7.40, Apêndice A**).

Preparação do *E*- isoeugenol

1. vanilina com hidroxila fenólica protegida com TBS



Fórmula molecular: C₁₄H₂₂O₃Si

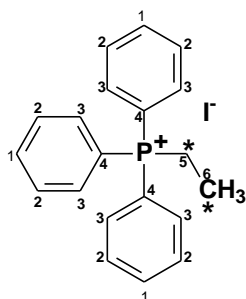
Massa molecular: 266,13

Estado físico: cristal amarelado

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 9,85 (1H, s; COH); 7,41 (1H, d, *J* = 2,03 Hz, H2); 7,39 (1H, dd, *J* = 2,03 e 8,0 Hz, H5); 6,98 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H6); 3,87 (3H, s; 3-OCH₃); 1,00 (9H, s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂); 0,20 (6H,s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (**Figura 7.41, Apêndice A**).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 191,0 (C7); 151,4 (C4); 151,3 (C3); 131,0 (C1); 126,5 (C5); 110,0 (C2); 120,7 (C6); 55,2 (3-OCH₃); 25,6 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂; 18,6 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂; -4,6 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (**Figura 7.43, Apêndice A**).

2. iodeto de [1,2-¹³C]-etil trifenilfosfônio



Fórmula molecular: C₂₀H₂₀PI

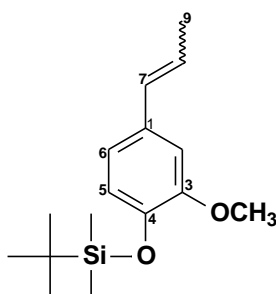
Massa molecular: 418,25 u.m.a

Estado físico: cristal branco

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 7,69-7,90 (15H, m, H1, H2 e H3); 3,74 (2H, m, H5); 1,49 (1H, m, H6) (Figura 7.44, Apêndice A).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 135,0 e 135,0 (C1); 133,3 e 133,5 (C3); 130,5 e 130,3 (C2); 118,4 e 116,7 (C4); 17,2 e 16,5 (C5); 6,4 e 6,5 (C6) (Figura 7.46, Apêndice A).

3. Z- e E-isoeugenol protegido com TBS



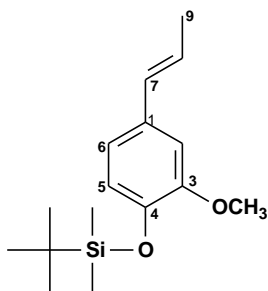
Fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{Si}$

Massa molecular: 278,17 u.m.a

Estado físico: óleo amarelado

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 6,85 (1H, d, $J = 1,65$, H5); 6,78 (2H, m, H2 e H6); 6,34 (1H, dq, $J = 1,65$ e $13,2$ Hz, H7); 6,13 (1H, dq, $J = 6,6$ e $13,2$ Hz, H8); 1,86 (3H, dd, $J = 1,65$ e $6,6$ Hz, H9) (*E*); 3,80 (3H, s; 3-OCH₃); 1,91 (3H, dd, $J = 1,65$ e $6,6$ Hz, H9) (*Z*); 0,99 (9H, s; $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$); 0,14 (6H, s; $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$) (Figura 7.47, Apêndice A).

4. *E*-isoeugenol protegido com TBS



Fórmula molecular: C₁₆H₂₆O₂Si

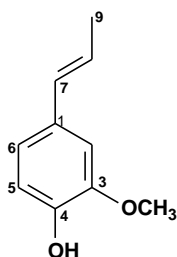
Massa molecular: 278,17 u.m.a

Estado físico: óleo amarelado

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,85 (1H, d, *J* = 1,65, H5); 6,78 (2H, m, H2 e H6); 6,34 (1H, dq, *J* = 1,65 e 13,2 Hz, H7); 6,13 (1H, dq, *J* = 6,6 e 13,2 Hz, H8); 3,80 (3H, s; 3-OCH₃); 1,86 (3H, dd, *J* = 1,65 e 6,6 Hz, H9); 0,99 (9H, s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂); 0,14 (6H, s; (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (Figura 7.49, Apêndice A).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 150,9 (C3); 144,2 (C4); 131,9 (C1); 130,8 (C7); 123,7 (C8); 120,9 (C5); 118,7 (C6); 109,4 (C2); 55,4 (3-OCH₃); 25,7 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂); 18,4 (C9); 18,3 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂); -4,7 (CH₃)₃CSi(CH₃)₂) (Figura 7.51, Apêndice A).

5. *E*-isoeugenol



Fórmula molecular: C₁₀H₁₂O₂

Massa molecular: 164,20 u.m.a

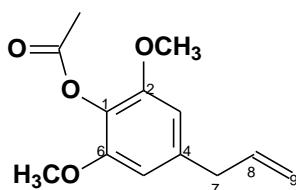
Estado físico: óleo amarelado

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,83-6,86 (3H, m, H2, H5 e H6); 6,32 (1H, dq, *J* = 1,6 e 15,7 Hz, H7); 6,08 (1H, dq, *J* = 6,7 e 15,7 Hz, H8); 5,56 (1H, 4-OH); 3,89 (3H, s; 3-OCH₃); 1,86 (3H, dd, *J* = 1,6 e 6,7 Hz, H9) (Figura 7.52, Apêndice A).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 146,5 (C3); 144,7 (C4); 130,6 (C1); 130,7 (C7); 123,4 (C8); 119,3 (C6); 114,3 (C5); 107,9 (C2); 55,8 (3-OCH₃); 18,3 (C9) (Figura 7.53, Apêndice A).

Preparação do 5-metoxieugenol

1. acetato de 4-alil-2,6-dimetoxifenila



Fórmula molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$

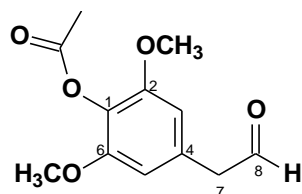
Massa molecular: 236,26

Estado físico: óleo incolor

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 6,44 (2H, s, H3 e H5); 5,86-6,06 (1H, m, H8); 5,07-5,18 (2H, m, H7); 3,81 (6H, s; OCH₃); 3,38 (2H, d, $J = 6,8$ Hz, H9); 2,33 (3H, s, CH₃COO) (Figura 7.54, Apêndice A).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 169,0 (CH₃COO); 151,9 (C2 e C6); 138,6 (C4); 136,9 (C8); 126,9 (C1); 116,3 (C9); 105,1 (C3 e C5); 56,1 (2 e 6-OCH₃); 40,7 (C7); 20,5 (CH₃COO) (Figura 7.56, Apêndice A).

2. fenilacetaldéido acetilado



Fórmula molecular: C₁₂H₁₄O₅

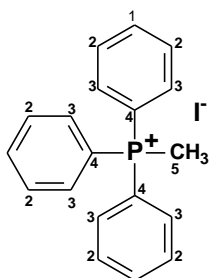
Massa molecular: 238,28 u.m.a

Estado físico: óleo amarelo

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 9,64 (1H, s; CHO); 6,38 (2H, s, H3 e H5); 3,72 (6H, s; OCH₃); 3,55 (2H, d, *J* = 2,3 Hz, H7); 2,25 (3H, s, CH₃COO) (**Figura 7.57, Apêndice A**).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 190,6 (C8); 167,6 (CH₃COO); 152,5 (C2 e C6); 133,9 (C4); 126,1 (C1); 105,6 (C3 e C5); 55,9 (2 e 6-OCH₃); 50,7 (C7); 20,0 (CH₃COO) (**Figura 7.59, Apêndice A**).

3. iodeto de metil trifenilfosfônio



Fórmula molecular: C₁₉H₁₈PI

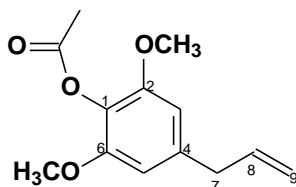
Massa molecular: 405,22 u.m.a

Estado físico: cristal branco

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7,70-7,88 (15H, m, ArH); 3,23 (3H, d, *J* = 13,5 Hz); (**Figura 7.60, Apêndice A**).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 135,1 e 135,0 (C1); 133,2 e 132,9 (C3); 130,5 e 130,2 (C2); 119,4 e 117,8 (C4); 11,9 e 10,8 (C5) (**Figura 7.61, Apêndice A**).

3. 4-alil-2,6-dimetoxifenil acetato



Fórmula molecular: C₁₃H₁₆O₄

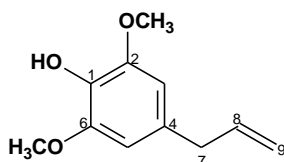
Massa molecular: 236,26

Estado físico: óleo incolor

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,44 (2H, s, H3 e H5); 5,86-6,06 (1H, m, H8); 5,07-5,18 (2H, m, H7); 3,81 (6H, s; OCH₃); 3,38 (2H, d, *J* = 6,8 Hz, H9); 2,33 (3H, s, CH₃COO) (Figura 7.62, Apêndice A).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 169,0 (CH₃COO); 151,9 (C2 e C6); 138,6 (C4); 136,9 (C8); 126,9 (C1); 116,3 (C9); 105,1 (C3 e C5); 56,1 (2 e 6-OCH₃); 40,7 (C7); 20,5 (CH₃COO) (Figura 7.63, Apêndice A).

4. 5-metoxi-eugenol



Fórmula molecular: C₁₁H₁₄O₃

Massa molecular: 194,23

Estado físico: óleo amarelado

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,41 (2H, s, H3 e H5); 5,85-6,05 (1H, m, H8); 5,41 (1H, s, OH); 5,04-5,14 (2H, m, H7); 3,87 (6H, s, 2 e 6-OCH₃); 3,33 (2H, d, *J* = 6,5 Hz, H9) (Figura 7.64, Apêndice A).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 146,8 (C2 e C6); 137,5 (C8); 132,8 (C1); 130,9 (C4); 115,6 (C9); 105,0 (C3 e C5); 56,1 (2 e 6-OCH₃); 40,2 (C7) (Figura 7.66, Apêndice A).

3.5. Incorporação *in vitro* dos precursores nos embriões somáticos

3.5.1. Administração da L-[1-¹³C], L-[2-¹³C] e L-[3-¹³C]-fenilalanina

Após 21 dias de cultivo *in vitro*, os embriões somáticos foram transferidos para placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro. Estes foram deixados nas placas por 30 min, à temperatura ambiente, para desidratação. Todo o material foi previamente autoclavado e o experimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

Foram testadas soluções contendo 0,25; 0,5 e 1,0 mg da L-[1-¹³C]-fenilalanina em 100 µL de água Milli-Q. Foram preparadas alíquotas de 1,0 mL de solução aquosa do precursor, nas respectivas concentrações e, administradas em 1,0 g de embrião em placas de Petri, sem as folhas de papel de filtro. Cada uma das concentrações foram testadas em triplicata, em t = 12, 24, 48, 72 e 96 horas, em sala de cultura, na presença de luz incandescente, a 25°C, com reposição da solução do precursor quando necessário. Como controle foi utilizado 1,0 g de embrião sem a adição do precursor marcado.

Posteriormente, as amostras foram trituradas em nitrogênio líquido, extraídas com MeOH:H₂O (9:1), seguidas de partição apenas com clorofórmio. O solvente foi evaporado em capela de exaustão e as amostras foram ressuspensas em MeOH:H₂O 9:1, filtradas em filtro Millipore 0,45 µm e submetidas à análise por CLAE/EM (ESI), para quantificar a incorporação do precursor nas neolignanas.

Pela análise por CLAE/EM (ESI), foi verificado que o melhor tempo de incubação foi o t = 72 h e concentração de 1,0 mg/100 µL. A L-[2-¹³C]-fenilalanina e a L-[3-¹³C]-fenilalanina, foram testadas nesta mesma condição, com os experimentos sendo realizados em triplicata e posterior análise por CLAE/EM (ESI).

No caso da incubação dos embriões com os respectivos isotopômeros da *L*-fenilalanina, foram incubados 8,0 g de embriões divididos em placas de Petri com 4,0 g cada e administrados aos embriões de cada placa, 800 µL da solução (1mg/100 µL) por 72 horas, com reposição da solução (800 µL) a cada 24 h. As neolignanas foram isoladas e submetidas a análises de RMN de ^1H e de ^{13}C (**item 3.5.6**).

3.5.2. Administração do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico

A incubação do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico com os embriões somáticos foi realizada nas mesmas condições que os isotopômeros da *L*-fenilalanina. Na primeira tentativa de incorporação, o ácido [8- ^{13}C]-ferúlico foi solubilizado em 0,5 µL de DMSO, 0,5 µL de solução de NaOH 0,5% e o volume completado com água Milli-Q (Rahman *et al.*, 1990). Cada uma das concentrações, 0,25, 0,5 e 1,0 mg do ácido em 100 µL da solução foram testadas nos $t = 12, 24, 48, 72$ e 96 horas. Para quantificar a porcentagem de incorporação, os extratos foram analisados por CLAE/EM (ESI). No entanto, não foi observada incorporação de carbono treze nas neolignanas em nenhuma das condições testadas.

Na segunda tentativa, o ácido [8- ^{13}C]-ferúlico foi solubilizado em H_2O :Acetona (4:1) (Funasaki, 2006) e foi testado nas mesmas condições da primeira incubação. Novamente as análises por CLAE/EM (ESI) mostraram que, ao comparar os dados das amostras incubadas com os controles, não ocorreu incorporação de carbono treze na neolignanas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Mesmo não observando incorporação por CLAE/EM (ESI), os embriões foram incubados em quantidades maiores (**mesmas do item 3.5.1**) solubilizando o ácido [8- ^{13}C]-ferúlico em H_2O : Acetona (4:1) a 0,5 mg em 100 µL, no $t = 48$ h, com

reposição da solução do precursor a cada 24 h. Nestas condições os embriões encontravam-se menos oxidados. Foram feitos extratos e as neolignanas foram isoladas e submetidas à análises de RMN de ^1H e ^{13}C (**item 3.5.6**).

3.5.3. Administração do ácido [8- ^{13}C]-glicoferúlico

Devido à baixa solubilidade do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico em meio aquoso, foi sintetizado o ácido [8- ^{13}C]-glicoferúlico. Os embriões foram incubados nas mesmas condições dos precursores anteriores, sendo que as concentrações testadas em 0,25; 0,5 e 1,0 mg do ácido [8- ^{13}C]-glicoferúlico foram totalmente solubilizadas em 100 μL de água Milli-Q. Cada uma das concentrações foram testadas nos $t = 12, 24, 48, 72$ e 96 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os extratos dos embriões incubados e das amostras controle foram submetidos à análise de CG/MS (EI). Não foi observado incorporação de carbono treze nas neolignanas, em nenhuma das condições testadas. Novamente, foram incubados 4,0 g de embriões, em placas de Petri distintas e administrados 800 μL (1,0 mg/100 μL) do ácido [8- ^{13}C]-glicoferúlico em solução aquosa, por cerca de 100 horas, pois mesmo os embriões sendo servíveis a todo este tempo fora do meio de cultura, esperava-se que houvesse hidrólise e apenas a forma aglicona do ácido fosse incorporada. Também foram isoladas as neolignanas e estas submetidas à análise de RMN de ^1H e de ^{13}C (**item 3.5.6**).

3.5.4. Administração do álcool [8-¹³C]-coniferílico

O álcool [8-¹³C]-coniferílico foi administrado nos embriões nas mesmas condições do ácido [8-¹³C]-ferúlico, sendo que as concentrações em 0,25; 0,5 e 1,0 mg foram testadas em 100 µL de H₂O : Acetona (4:1). Cada uma das concentrações foram incubadas com os embriões nos t = 12, 24, 48, 72 e 96 horas. As análises de CLAE/EM (ESI), não apresentaram incorporação do precursor nas neolignanas.

Os embriões também foram incubados com álcool [8-¹³C]-coniferílico em quantidades maiores, nas mesmas condições que as do ácido [8-¹³C]-ferúlico, para posterior isolamento das neolignanas e análises de RMN.

3.5.5. Administração do acetato de [8-¹³C]-coniferila

Os embriões foram incubados com as respectivas concentrações teste: 0,25; 0,5 e 1,0 mg em 100 µL de solução contendo 0,5 µL de metanol e, o volume foi ajustado com água Milli-Q. As concentrações foram testadas, separadamente, nos t = 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

Os extratos foram preparados de acordo com o item 3.5.1. As frações foram submetidas à análises por CG/MS (EI). No t = 72 h e concentração 1,0 mg/100 µL, foi verificado o enriquecimento com carbono treze na neolignana 5'-metoxi-porosina. A neolignana armenina B, não foi observada na análise por CG/MS.

Foram incubados 4,0 g de embriões (experimento realizado em duplicata) e administrados 800 µL da solução do acetato de [8-¹³C]-coniferila solubilizado em 0,5 µL de metanol e, o volume ajustado com água Milli-Q (1mg/100 µL) no t = 72 h, com reposição da solução do precursor a cada 24 h. As neolignanas foram isoladas de acordo com o item 3.5.6 e submetidas à análises de RMN de ¹H e de ¹³C.

3.5.6. Preparação dos extratos dos embriões incubados com precursores enriquecidos com carbono treze

Após encontrar as melhores condições de incorporação, os embriões foram incubados em quantidades maiores (8,0 g) com os precursores marcados com carbono treze. Mesmo aqueles que não apresentaram incorporação, também tiveram suas neolignanas isoladas e submetidas às análises de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Os extratos incubados com os precursores marcados foram preparados de acordo com o item 3.3.2. No entanto, os extratos em clorofórmio (100 mg) foram submetidos a separação por CCDP Hexano : AcOEt (7:3), rendendo cerca de 6,0 mg das neolignanas puras, 5'-metoxiporosina e armenina B (**Figura 3.3**).

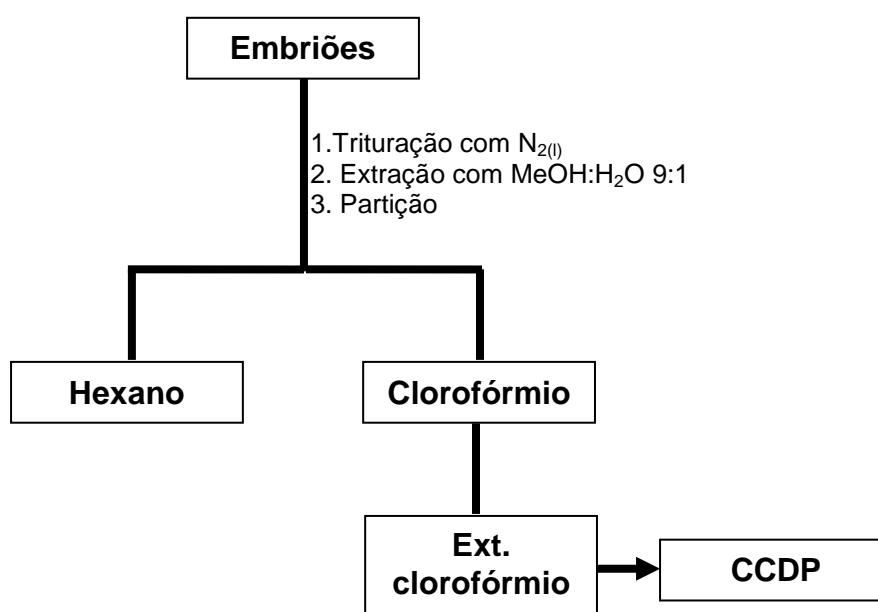


Figura 3.3. Preparação dos extratos para purificação das substâncias por CCDP

3.6. Ensaio de conversão enzimática

Os ensaios de conversões enzimáticas foram desenvolvidos de acordo com Martins, 2002, Ralph *et al.*, 2004 e Vassão *et al.*, 2006.

3.6.1. Extração das proteínas solúveis dos embriões somáticos de *O. catharinensis*

Foram pesados cerca de 8,0 g de embriões de *O. catharinensis*, após 21 dias de cultivo *in vitro*. Os embriões foram pulverizados na presença de nitrogênio líquido, com gral e pistilo. Foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 e 10% (m/m) (800 mg) de PVPP. A solução foi homogeneizada com gral e pistilo por 5 minutos. O extrato foi centrifugado por 30 minutos a 9.000 rpm (4°C). O sobrenadante foi filtrado em gaze e o resíduo foi armazenado a (4°C), para posterior extração das proteínas da parede celular. O sobrenadante obtido, contém as proteínas solúveis, que foram precipitadas pela adição de solução de (NH₄)₂SO₄ a 80%. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi ressuspensão em 3,0 mL de tampão fosfato. Todas as etapas foram realizadas a 4°C. A solução foi armazenada a -80°C, por 12 horas.

3.6.2. Extração das proteínas contidas nos microsossomos celulares

O resíduo obtido após a segunda centrifugação (**item 3.6.1**) foi ressuspensão em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,5. O extrato foi homogeneizado com gral e pistilo. A preparação foi centrifugada por 90 minutos, a 48.000 rpm (4°C).

O sobrenadante obtido contém as proteínas insolúveis, que foram precipitadas pela adição de solução de (NH₄)₂SO₄ a 80%. Foi realizada

centrifugação por 90 minutos a 48.00 rpm (4°C). O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi ressuspenso em 3,0 mL de tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,5. Esta solução corresponde às proteínas contidas nos microsossomos celulares e foi armazenada a -80°C, por 24 horas. Todas as etapas foram realizadas a 4°C.

3.6.3. Quantificação das proteínas nos extratos enzimáticos

A quantidade de proteínas presentes no extrato enzimático foi determinada pelo método de Bradford, 1976. Para cada ensaio foi realizada a curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), pois BSA foi utilizada como a proteína padrão. O teor de proteínas solúveis obtidas no extrato enzimático foi de 8,32 mg/mL enquanto que para a fração correspondente às proteínas contidas nos microsossomos celulares foi de 4,21 mg/mL.

3.6.4. Ensaio de incubação do acetato de coniferila com os extratos enzimáticos

O acetato de coniferila previamente sintetizado (**item 3.4.4**) foi testado com várias frações enzimáticas, obtidas a partir dos embriões somáticos de *O. catarinensis*.

A conversão enzimática foi realizada para uma reação contendo 200 µL de volume final, 100 µL de extrato enzimático, uma solução de 20 µL de acetato de coniferila a 25 mM em metanol, 76 µL de tampão MES a 40 mmol.L⁻¹ (pH = 5,0) e 4 µL de NADPH a 50 mmol.L⁻¹. Após 30 minutos de incubação a 28°C, a reação foi finalizada pela extração com acetato de etila (2 x 500 µL). Como controle, foi incubado somente o precursor e somente a preparação enzimática em tampão MES a 40 mmol.L⁻¹ (pH = 5,0). No ensaio de conversão enzimática, os padrões foram

incubados nas mesmas condições das reações, sem adição das frações enzimáticas.

As frações enzimáticas, o precursor (acetato de coniferila) e os possíveis produtos da reação (eugenol e *E*-isoeugenol) foram analisados por CLAE, em coluna Phenomenex® de fase reversa C-18 (Luna C-18 150 x 4,6 mm, 5 µ), com fluxo de 1 mL.min⁻¹, acompanhada com detector em λ = 280 nm e, utilizando o gradiente descrito na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Gradiente de eluição em CLAE dos ensaios enzimáticos

Tempo (min)	Gradiente A (%) (H ₂ O)	Gradiente B (%) (CH ₃ CN)
	80	20
27,0	50	50
28,5	0	100
31,5	0	100
33,0	80	20
50,0	80	20
55,0	80	20

3.6.5. Ensaios de incubação do *E*-isoeugenol e 5-metoxi-eugenol com os extratos enzimáticos

O *E*-isoeugenol e o 5-metoxi-eugenol, precursores finais da via fenilpropanoídica, foram incubados juntamente com as frações enzimáticas dos embriões de *O. catharinensis* em diversas condições, para verificar o acoplamento entre os dois precursores e posterior conversão nas respectivas neolignanas; 5'-metoxi-porosina e armenina B.

A reação de conversão enzimática foi realizada com 100 µL de extrato enzimático, 10 µL de *E*-isoeugenol a 25 mM e 10 µL de 5-metoxi-eugenol a 25 mM em metanol, 5 µL de peroxidase de raiz forte a 1mg/mL, 5 µL de H₂O₂ a 10 mmol.L⁻¹,

5 μL de NADPH a 50 mmol.L^{-1} , 110 μL de tampão MES a 40 mmol.L^{-1} (pH = 5,0) e 5 μL de NADPH a 50 mmol.L^{-1} , contendo 250 μL de volume final. Após 1,0 h de incubação a 28°C, a reação foi finalizada pela extração com acetato de etila (2 x 500 μL).

Os precursores, os possíveis produtos da reação, o controle e as frações enzimáticas foram analisados por CLAE de acordo com as condições da tabela 3.1.

3.7. Filogenia molecular

3.7.1. Preparo do material vegetal

Para obtenção dos dados moleculares, as folhas das espécies das famílias Lauraceae e Myristicaceae, foram coletadas, cortadas em pequenos fragmentos, mantidas em tubos plásticos contendo sílica gel azul (4-8 mm) como indicador de umidade, até a extração do DNA total. As folhas frescas e os embriões de *O. catharinensis*, foram coletados e imediatamente submetidos à extração de DNA.

3.7.2. Extração de DNA

O DNA total do material vegetal foi extraído de acordo com o procedimento de Ferreira & Grattapaglia, 1996. Posteriormente, foi extraído utilizando o kit da Promega[®]. Entretanto, ambos os métodos falharam por apresentarem um *pellet* muito grande, viscoso e escuro, indicando excesso de contaminantes como proteínas e/ou polissacarídeos. Por isso foi utilizado um terceiro procedimento de acordo com a metodologia de Aldrich e Cullis 1993.

O material vegetal foi triturado com $N_{2(l)}$, ressuspendido em 700 μL de CTAB (brometo de hexadecil trimetil amônio catiônico 2%, $1,4 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl, 20 mmol.L^{-1} EDTA, 100 mM Tris-Cl pH 8, polivinilpirrolidona 1%, 2-mercaptoetanol 2%), incubado a 65°C por 1,0 hora, com agitação a cada 10 minutos. Foram realizadas duas extrações com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), invertendo o material por 5 minutos, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. A fase contendo DNA foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, seguido da adição de 500 μL de isopropanol 100% frio (-20°C), deixada a temperatura ambiente por 5,0 minutos e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com 500 μL de solução 76% de etanol em 10 mmol.L^{-1} de acetato de amônio e novamente centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi secado ao ar e ressuspendido em 300 μL de tampão TE (10 mmol.L^{-1} Tris-HCl pH 8,0 e 1 mmol.L^{-1} EDTA pH 8,0). Foram acrescentados 3,0 μL de RNase (10 mg/mL) e incubados por 30 min a 37°C . Para solubilizar o excesso de contaminantes e reprecipitar o DNA, foram adicionados 200 μL de NaCl 5 mol.L^{-1} , etanol 100% a frio, respectivamente, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. O produto final foi ressuspendido em 100 μL de água. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo gel red.

3.7.3. Quantificação do DNA

Após a extração do DNA total, cada amostra teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorbância em 230, 260 e 280 nm no espectrofotômetro Nanovue Plus Spectrofotometry. O DNA foi quantificado com base na absorção em 260 nm e expressa em $\text{ng}/\mu\text{L}$. A razão entre as leituras em 230, 260 e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do DNA obtido (Farrell, 2010).

3.7.4. Amplificação do gene de proteína dirigente

Os procedimentos descritos abaixo foram realizados de acordo com Davin *et al.*, 1997, Gang *et al.*, 1999, Ralph *et al.*, 2006, Koeduka *et al.*, 2006 e Wu *et al.*, 2009.

Para analisar a presença de proteína dirigente nas espécies de Lauraceae e Myristicaceae e Piperaceae, o DNA total do material vegetal foi extraído de acordo com o item 3.7.2. Primeiro, o DNA foi amplificado utilizando o rDNA 18S como controle e posteriormente foi utilizado o par de iniciadores degenerados descrito na tabela 3.1.

Tabela 3.2. Seqüências dos iniciadores para proteína dirigente

Iniciadores	Seqüências (5'-3')	Referências
DP _F direto	KGTGTTYGAYGAYCCYATTACYBTWGACAAC	(Davin and Lewis, 2000)
DP _R reverso	GAAATAAACATCTCCYTCAWATGMATCRGT	

A reação de PCR foi realizada utilizando 1,0 µL de DNA, 0,2 mmol.L⁻¹ de dNTPs, 2,5 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 1,0 µmol.L⁻¹ de cada iniciador e 1,5U de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Science) para um volume final de 10 µL. A reação de amplificação no termociclador foi realizada sob as seguintes condições: aquecimento inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 24 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 45 segundos e um ciclo final de extensão a 72°C por 2 minutos. Os produtos amplificados foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1% (3.7.2.), com 90 V, por 30 minutos. O gel foi visualizado em um aparelho transluminador com luz UV.

Para purificação foi utilizando o kit GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences)[®]. As reações de seqüenciamento foram preparadas com o kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador MegaBACETM 1000[®].

3.7.4.1. Árvore filogenética da proteína dirigente

Após o alinhamento das seqüências dos dados moleculares, foi realizada uma busca BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) a fim de encontrar seqüências similares àquela obtida das espécies de *Ocotea catharinensis* e *Ocotea macrophylla*. Foram encontradas cerca de 100 seqüências com valor de 75% que codifica para proteína dirigente (data de acesso 29/03/2011). Foram escolhidas 15 seqüências de proteínas dirigentes para uma análise filogenética entre diferentes gêneros e famílias na tentativa de identificar os grupos de genes de proteínas dirigentes. As espécies incluídas na árvore foram: *Fraxinus mandishurica* (AF210074), *Picea engelmannii* (DQ395245), *Picea sitchensis* (DQ395255), *Picea Glauca* (DQ395258), *Tsugaheterophylla* (AF210071), *Thuja plicata* (AF210068), *Medicago truncatula* (BT051492), *Quercus suber* (DQ023705), *Ricinus communis* (XM002509845), *Sesamum indicum* (AY560651), *Forsythia intermedia* (AF210061), *Zea mays* (EU9607278), *Populustricocarpa* (XM002297961), *Vitis vinifera* (XM002272108) e *Glicine Max* (BT091639). A seqüências de *O. catharinensis* e *Ocotea macrophylla* foram incluídas na matriz de dados moleculares com estas espécies. Nesta matriz, foram adicionados dados de espécies da família Piperaceae (*P. cubataonum*, *P. solmsianum*, *P. regnellii* e *P. cernuum*) previamente investigadas no LQPN-USP (item 4.5.1).

A análise filogenética empregando o método de máxima parcimônia foi realizada com o programa PAUP, versão 4.0 para Windows, utilizando busca heurística. A consistência dos cladogramas foi examinada por 1000 repetições de bootstrap (**item 4.5.2**).

3.7.5. Amplificação e seqüenciamento da região *ITS*

Para amplificar e seqüenciar a região *ITS* do DNA nuclear das espécies de Lauraceae e Myristicaceae foram utilizados os iniciadores descritos na tabela 3.2.

Tabela 3.3. Iniciadores utilizados na amplificação da região *ITS*

Iniciador	Sequencia (5'-3')	Referência
LAUR1 _F	ACCACCACCGGCGAACCA	Li <i>et al.</i> , 2004
ITSB _R	CTTTTCCTCCGCTTATTGATATG	Li <i>et al.</i> , 2004
ITSL _F	GCCMGCWGCCGCGGGSGC	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ITSL _R	GCSCCCGCGGCWGCKGGC	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ITS4 _R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Jaramillo e Manos 2001
ITS5 _F	GCAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	

A reação de PCR foi realizada utilizando 2,0 µL de DNA, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada iniciador e 1,0u de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Science[®]) para um volume final de 20 µL. A reação de amplificação no termociclador foi realizada sob as seguintes condições: aquecimento inicial desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos, e extensão a 78°C por 1

minuto e 15 segundos e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos (Kuzzoff, *et al.*, 1998). Os produtos amplificados foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1%, com 90 V, por 30 minutos. O gel foi visualizado em um aparelho transluminador com luz UV.

Para purificação dos produtos foi utilizando o kit Qiaquick gel extraction kits (QIAGEN®). As reações de seqüenciamento foram preparadas com o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing System, de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram enviadas para sequenciamento no seqüenciador MegaBACETM 1000®, disponível no IQ-USP.

3.7.5.1. Análise filogenética

Foram analisados o material vegetal de 31 espécies de Lauraceae e 4 espécies de Myristicaceae, coletados em diferentes estados brasileiros e na Colômbia (**Tabelas 3.4 e 3.5**). Para as análises das sequências e construção da matriz foram incluídas 69 espécies de Lauraceae obtidas do banco de dados GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Chanderbali *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004) e 4 espécies do material coletado, incluindo *O. catharinensis*, *O. macrophylla*, *Aniba parviflora* e *Licaria rodriguesii*, totalizando 76 espécies compondo a matriz de dados moleculares.

As espécies *Gomortega nitida*, *Hortonia floribunda* e *Palmeria scandens*, a primeira da família Gomortegaceae e as duas últimas da família Monimiaceae, foram inseridas na matriz como grupos externos. As famílias Gomortegaceae, Monimiaceae e Lauraceae pertencem à ordem das Laurales por isso têm sido consideradas famílias muito próximas em análises filogenéticas (Chanderbali *et al.*, 2001).

Tabela 3.4. Espécies da família Lauraceae coletadas para análise

Número de coleta	Data de Coleta	Espécie	Procedência
K-3522	27/09/2011	<i>Aiouea maguireana</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-843	27/09/2011	<i>Aniba férrea</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-1891	27/09/2011	<i>Aniba panurensis</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-1394 ^a	25/07/2011	<i>Aniba parviflora</i>	Santarém, PA
K-1388C	25/07/2011	<i>Aniba roseadora</i>	Santarém, PA
K-1392(1)	25/07/2011	<i>Aniba SP</i>	Santarém, PA
K-4691	27/09/2011	<i>Endlicheria pyriformis</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-2372	27/09/2011	<i>Licaria canella angustata</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-1754	27/09/2011	<i>Licaria cannella tenuicarpa</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-1264	27/09/2011	<i>Licaria rodriguesii</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-1258	27/09/2011	<i>Licaria subbullata</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-842	27/09/2011	<i>Mezilaurus duckei</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-845	27/09/2011	<i>Mezilaurus itauba</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
-	10/08/2011	<i>Ocotea catharinensis</i>	IB-USP, São Paulo, SP
K-852	27/09/2011	<i>Ocotea cernua</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-849	27/09/2011	<i>Ocotea cinérea</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-2543	27/09/2011	<i>Ocotea guianensis</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-1249	11/07/2011	<i>Ocotea macrophyla</i>	Bogotá, Colombia
K-839	27/09/2011	<i>Ocotea matogrossensis</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-1262	27/09/2011	<i>Ocotea nítida</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-862	27/09/2011	<i>Ocotea percurrens</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM

K-1518	25/07/2011	<i>Ocotea SP</i>	Chapada Diamantina, BA
K-1516B	25/07/2011	<i>Ocotea SP</i>	Chapada Diamantina, BA
K-15128	25/07/2011	<i>Ocotea SP</i>	Chapada Diamantina, BA
K-1353	27/09/2011	<i>Ocotea subterminalis</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-3193	27/09/2011	<i>Pleurotyrium vasquezii</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-848	27/09/2011	<i>Rhodostemonodaphne peneia</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM
K-844	27/09/2011	<i>Sextonia rubra</i>	Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM

Tabela 3.5. Espécies da família Myristicaceae coletadas para análise

Número de coleta	Data de Coleta	Espécie	Procedência
-	11/07/2011	<i>Virola gardneri</i>	IQUSP, São Paulo, SP
-	11/07/2011	<i>Virola oleifera</i>	IQUSP, São Paulo, SP
-	11/07/2011	<i>Virola sebifera</i>	IQUSP, São Paulo, SP

3.7.5.2. Alinhamento da matriz de dados

As seqüências obtidas das espécies amplificadas e das obtidas no GenBank NCBI, foram alinhadas utilizando o programa Mega 5.0[®] e modificadas através de inspeção visual. A partir do alinhamento dos dados foi obtida uma matriz final com 696 caracteres.

3.7.5.3. Máxima Parcimônia

As análises filogenéticas empregando o método de máxima parcimônia foram realizadas com o programa PAUP, versão 4.0 para Windows, utilizando análise heurística de 100.000 replicações aleatórias. A consistência dos clados foi examinada por 100.000 replicações de bootstrap. O tempo de análise foi de 20 minutos.

3.7.5.4. Análise Bayesiana

As análises filogenéticas empregando o método de análise bayesiana foram realizadas com o programa MrBayes, versão 3.1.2 para Windows. O modelo evolutivo foi determinado através do programa MrModeltest versão 2.3. O número de buscas realizadas foram 1.000.000, o número de corridas simultâneas independentes foi igual a 2 e o número de cadeias realizadas para cada corrida foi igual a 4.

3.7.6. Amplificação e seqüenciamento da região *matK*

Foram testados iniciadores para amplificar a região *matK* do DNA. A comparação de dados da região ITS com *matK* pode fornecer dados robustos à análise filogenética.

Foram desenhados iniciadores para as espécies de Lauraceae em estudo, a partir de seqüências obtidas no GenBank NCBI. Também foram testados iniciadores utilizados para amplificar outras espécies de Lauraceae (**Tabela 3.6**).

Tabela 3.6. Seqüências dos iniciadores utilizados na amplificação da região *matK*

Iniciadores	Seqüências (5'-3')	Referências
<i>MatkF</i>	TACGCGCTTGCTCATGGTCAT	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
<i>MatkR</i>	CGTTCTCTATGTGSCCTATGA	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
5200F	CCTTTCTTGAGCGAACAC	Li <i>et al.</i> , 2004
5200R	GTGTTGCTCAAGAAAGG	Li <i>et al.</i> , 2004

As reações de PCR foram preparadas com 2,0 µL de DNA, 2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada iniciador e 1,5 u de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Science[®]) para um volume final de 20 µL. A reação de amplificação no termociclador foi realizada com gradiente de temperaturas de anelamento, para testar os iniciadores sob as seguintes condições: 96°C por 8 minutos; 35 ciclos de 96°C por um minuto, 60,8-54,4 °C por um minuto, 72°C por um minuto e um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos (**Tabela 3.7**).

Tabela 3.7. Temperaturas de cada uma das linhas do termociclador.

Linhas	A	B	C	D	E	F	G	H
Temperaturas (°C)	55,1	54,7	53,4	51,7	49,7	48,3	47,2	42,7

Foram testadas três espécies para cada uma das temperaturas. Foi observado que ocorreu melhor amplificação na T = 53,4 °C. Abaixo estão representadas as temperaturas que ocorrem amplificação (**Figura 3.4**).

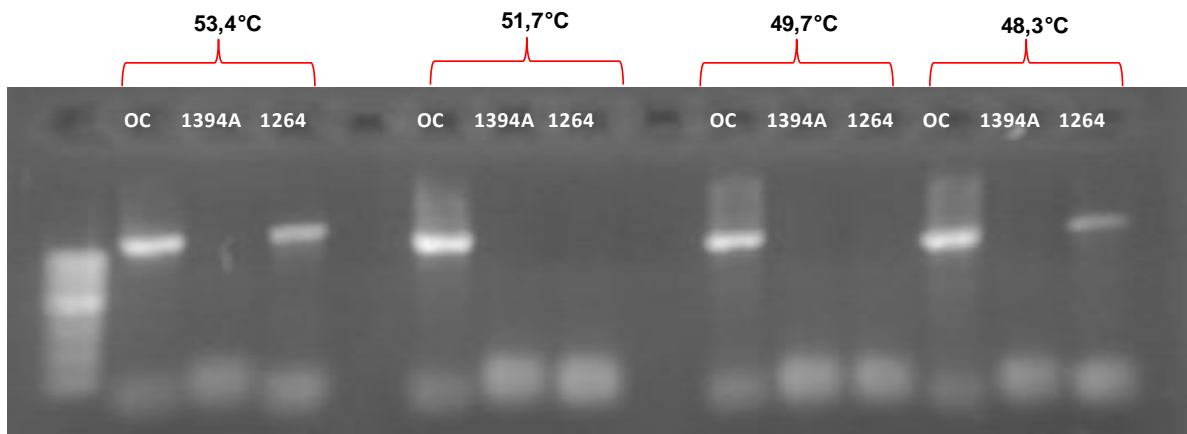


Figura 3.4 Reação de PCR com os iniciadores matKF e matR; Gel de agarose 1,0 %, 90 V, 30 min; (OC) *O. catharinensis*; (1394 A) *Aniba parviflora*; (1264) *Licaria rodriguesii*.

Foram testadas outras 28 espécies na melhor temperatura de anelamento ($T = 53,4^{\circ}\text{C}$), no entanto não foram observadas amplificações. As espécies enviadas para seqüenciamento não apresentaram boas resoluções para realizar análises filogenéticas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise dos extratos dos embriões somáticos de *O. catharinensis*

Como as neolignanas presentes nos embriões de *O. catharinensis* haviam sido previamente descritas (Funasaki *et al.*, 2009), foi realizada uma análise prévia dos extratos, objetivando confirmar a presença das mesmas neolignanas nos embriões cultivados *in vitro*. Essa seria uma condição inicial a ser cumprida para que o teste de incorporação de precursores marcados viesse a ser realizado.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 8.1, Apêndice B) e RMN de ^{13}C (Figura 8.3, Apêndice B) da fração em clorofórmio apresentaram sinais predominantemente de neolignanas di-hidrobenzofurânicas. Esta classe de substâncias como a 5'-metoxi-porosina (1) apresentam configurações relativas dos grupos arila/metila/alila em *cis/trans* e *trans/trans* na armenina B (2) que podem ser diferenciados por RMN de ^1H e de ^{13}C .

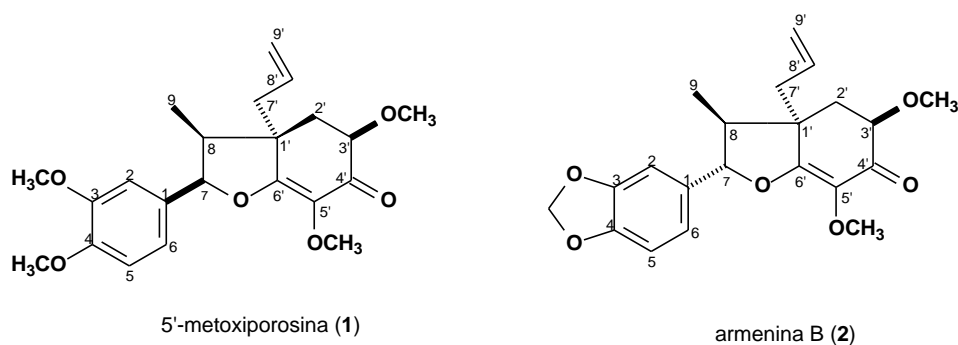


Figura 4.1. Neolignanas identificadas nos embriões de *O. catharinensis*

Analisando-se os espectros dos extratos brutos em clorofórmio, as diferenças entre a 5'-metoxiporosina e armenina-B foram devido os sinais em δ 5,88-5,90 (H-7), 1,83-2,84 (H-8, H2' e H7') e 0,51-0,55 (H-9) e pelos deslocamentos no RMN de ^{13}C

em δ 86,5 (C-7), 41,8 (C-8), 10,7 (C-9), 47,8 (C-1'), 31,8 (C-2') e 38,8 (C-7'). A armenina B (**2**) foi observada no extrato pelos sinais em δ 5,27-5,36 (H-7), 2,66 (H-8) e 1,17 (H-9) e confirmados pelos deslocamentos no RMN de ^{13}C em δ 91,9 (C-7), 44,5 (C-8), 17,6 (C-9), 47,1 (C-1'), 31,1 (C-2') e 41,8 (C-7') (**Figura 8.3, Apêndice B**) (Ishige *et al.*, 1991). O espectro de RMN de ^1H da fração hexânica indicou a presença de material graxo e sinais característicos de neolignanas dihidrobenzofurânicas (**Figura 8.4, Apêndice B**). Baseado nestes dados foi confirmado que os embriões estavam produzindo duas neolignanas majoritárias e, portanto, sinalizaram para a continuidade dos experimentos biossintéticos.

4.1.1. Isolamento e identificação das neolignanas

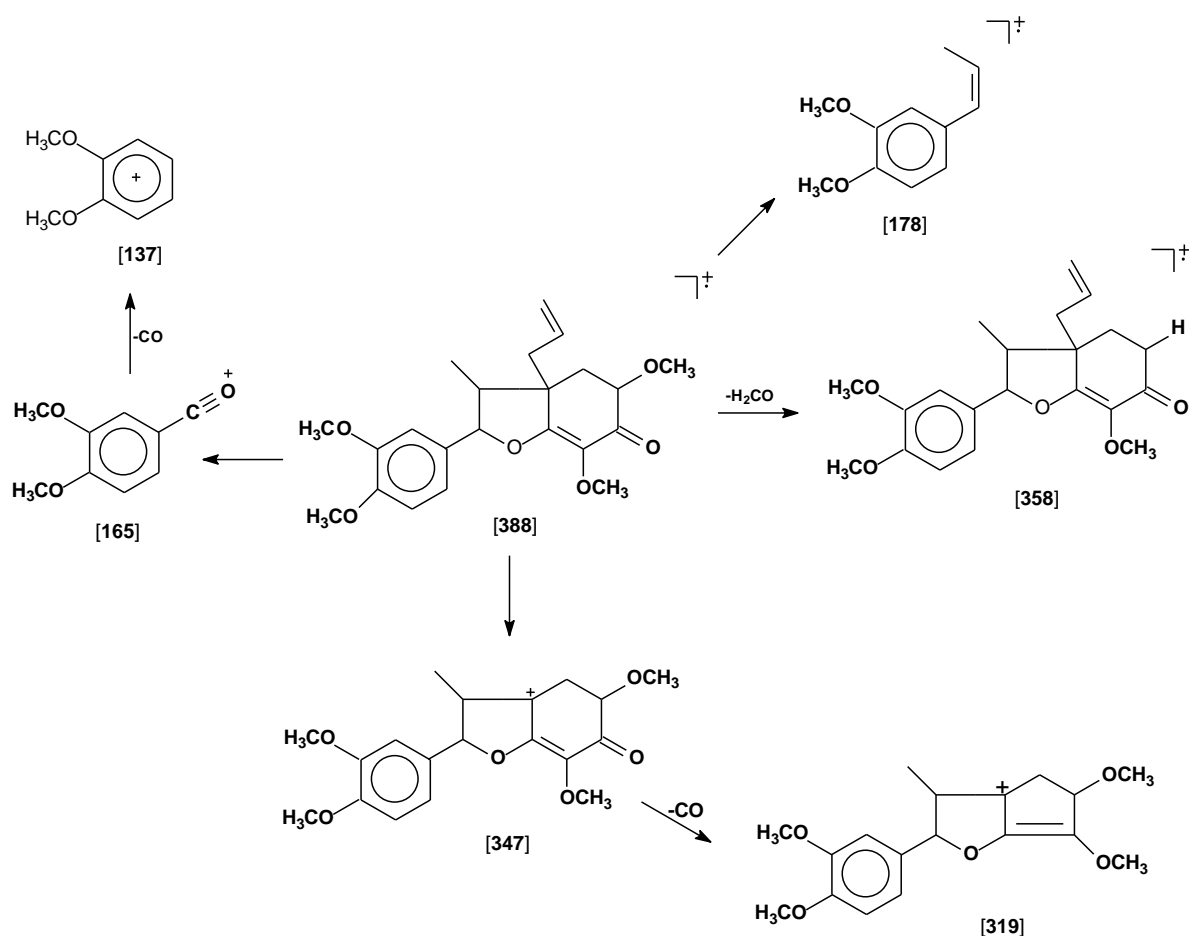
As neolignanas 5'-metoxiporosina (**1**) e armenina-B (**2**), previamente isoladas por Funasaki (Funasaki, 2006), foram novamente purificadas objetivando seu uso como padrão cromatográfico nos experimentos de incorporação dos precursores marcados com carbono treze. Essas duas neolignanas tiveram suas estruturas determinadas por comparação dos dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e fragmentações do espectro de massas (EM-IE) com aqueles descritos na literatura. A 5'-metoxiporosina foi obtida como cristais brancos e apresentou dados de RMN de ^1H (**Figura 8.5, Apêndice B**) e RMN de ^{13}C (**Figura 8.8, Apêndice B**) idênticos aos descritos (Ishige *et al.*, 1991) (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 5'-metoxiporosina.

Posição	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H lit}^b$	$^{13}\text{C lit}^b$
1	-	128,6	-	128,7
2	6,75 (1H, d, 1,5Hz)	109,8	6,74 (1H, d, 1,8 Hz)	109,0
3	-	148,8	-	149,1
4	-	149,1	-	148,8
5	6,90 (1H, d, 8,3 Hz)	111,2	6,88 (1H, d, 8,3 Hz)	111,2
6	6,84(1H, dd, 1,5 e 8,3 Hz)	118,1	6,82 (1H, dd, 1,8 e 8,3 Hz)	118,2
7	5,90 (1H, d, 5,3 Hz)	87,5	5,89 (1H, d, 5,4 Hz)	87,6
8	2,47-261 (1H, m)	42,8	2,58 (1H, qd, 5,4 e 7,4 Hz)	42,8
9	0,55 (3H, d, 7,5 Hz)	11,7	0,53 (3H, d, 7,4 Hz)	11,7
1'	-	48,8	-	48,8
2'	1,85 (1H, ddd, 0,9, 12,3 e 12,4 Hz, H-2' _{ax})	32,2	1,89 (1H, ddd, 1,1, 12,3 e 12,5 Hz, H-2' _{ax})	32,2
3'	2,30 (1H, dd, 5,3 e 12,4 Hz, H-2' _{eq})	77,3	2,27 (1H, dd, 5,1 e 12,5, H-2' _{eq})	77,4
4'	4,03 (1H, dd, 5,3 e 12,4 Hz)	77,3	4,00 (1H, dd, 5,1 e 12,3 Hz)	77,4
4'	-	192,5	-	192,5
5'	-	131,5	-	131,4
6'	-	169,9	-	169,9
7'	2,47-261 (1H, m)	39,8	2,51 (2H, dd, 7,8 e 14,7 Hz)	39,8
7'	2,69-276 (1H, m)	39,8		
8'	5,88-5,91 (1H, m)	132,8	5,86-5,98 (1H, m)	132,8
9'	5,31 (1H, dl, 5,3 Hz)	119,9	5,32 (1H, dd, 1,4 e 16,7 Hz)	119,9
9'	5,34 (1H, sl)	119,9	5,33 (1H, dd, 1,4 e 10,2 Hz)	119,9
3-OCH ₃	3,89	56,0	3,89	55,9
4-OCH ₃	3,88	56,0	3,88	55,9
3'-OCH ₃	3,62	59,2	3,63	59,2
5'-OCH ₃	3,80	60,5	3,80	60,4

^aCDCl₃, 300 e 75 MHz; ^bCDCl₃, 400 e 100 MHz (Ishige *et al.*, 1991)

Os espectro de massas obtido por EM-IE da neolignana 5'-metoxi-porosina (Figura 8.9, Apêndice B) apresentou picos de acordo com a proposta de fragmentação descrita (Esquema 4.1) e comparação com os dados publicados (Ishige *et al.*, 1991). No espectro, foi observado um pico em m/z 388 Da correspondente a $[M]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{22}H_{28}O_6$ e o íon em m/z 347 gerado pela perda de um grupo propenila a partir do íon molecular.



Esquema 4.1. Proposta de fragmentações da neolignana 5'-metoxiporosina.

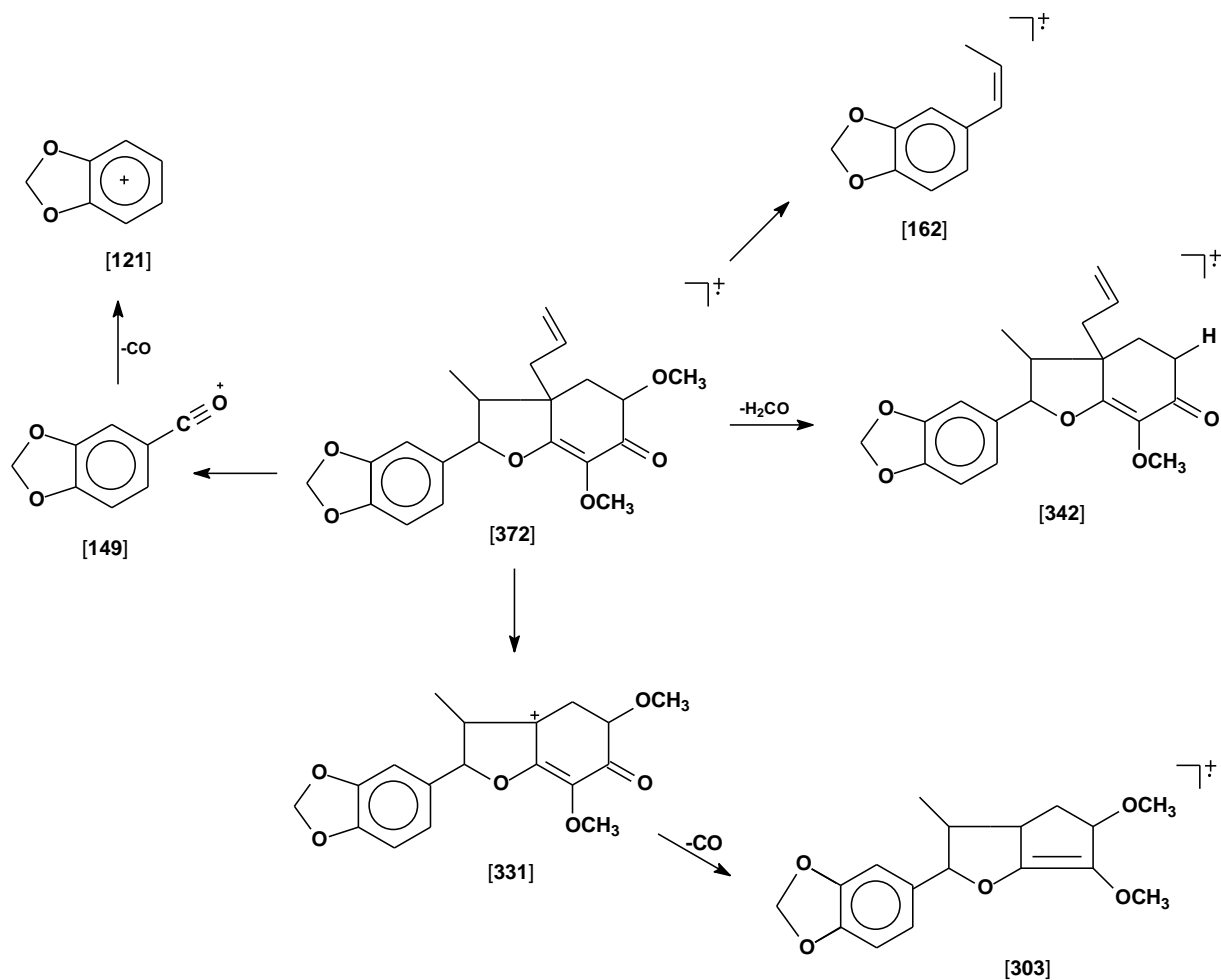
A armenina B, obtida como cristais amarelados, havia sido isolada pela primeira vez de *Licaria armeniaca* (Aiba *et al.*, 1978) e foi identificada por comparação dos dados de RMN de 1H (Figura 8.10, Apêndice B) e RMN de ^{13}C (Figura 8.13, Apêndice B) com os dados disponíveis na literatura (Aiba *et al.*, 1978, Felício *et al.*, 1986, Ishige *et al.*, 1991) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da armenina B.

Posição	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H lit}^b$	$^{13}\text{C lit}^b$
1	-	132,2	-	132,3
2	6,74-6,84 (1H, m)	104,8	6,74-6,85 (1H, m)	104,9
3	-	148,1	-	148,2
4	-	147,0	-	147,1
5	6,78-6,84 (1H, m)	108,3	6,74-6,85 (1H, m)	108,4
6	6,78-6,84 (1H, m)	117,2	6,74-6,85 (1H, m)	117,3
7	5,26 (1H, dl, 1,8	92,9	5,26 (1H, d, 1,9)	92,6
8	2,66 (1H, dd, 1,8 e 7,4 Hz	44,6	2,66 (qd, 1,8 e 7,4)	44,7
9	1,19 (3H, d, 7,4 Hz)	17,5	1,19 (3H, d, 7,4)	17,5
1'	-	47,3	-	47,3
2'	1,83 (1H, td, 12,3 e 12,3 Hz)	31,7	1,83 (1H, td, 12,3 e 12,3 Hz), H2' ^{-ax}	31,8
3'	2,16-2,27 (2H, m)		2,45 (1H, dd, 5,1 e 12,3 Hz) H2' ^{eq}	
3'	3,91 (1H, dd, 5,3 e 12,3 Hz)	77,2	3,92 (1H, dd, 5,1 e 12,2 Hz)	77,4
4'	-	192,4	-	192,4
5'	-	133,8	-	132,7
6'	-	170,6	-	170,5
7'	2,16-2,27 (2H, m)	41,5	2,18 (1H, dd, 7,5 e 14,5 Hz) 2,26 (1H, dd, 7,5 e 14,5 Hz)	41,6
8'	5,61-5,70 (1H, m)	134,4	5,66 (1H, dddd, 7,5, 7,5, 10,1 e 16,9 Hz)	134,5
9'	4,81 (1H, dd, 1,8 e 16,8 Hz)	120,0	4,82 (1H, dd, 1,0 e 16,9 Hz)	120,0
	5,12 (1H, dl, 10,5 Hz)		5,12 (1H, dd, 1,0 e 10,1 Hz)	
CH ₂ O ₂	5,99 (2H, sl)	101,3	5,99 (2H, s)	101,3
3-OCH ₃	-	-	-	-
4-OCH ₃	-	-	-	-
3'-OCH ₃	3,82 (3H, s)	59,2	3,61 (3H,s)	59,2
5'-OCH ₃	3,62 (3H, s)	60,6	3,81 (3H,s)	60,5

^aCDCl₃, 300 e 75 MHz; ^bCDCl₃, 400 e 100 MHz (Ishige *et al.*, 1991)

Para a armenina B foi observado (**Figura 8.13, Apêndice B**) o pico correspondente a $[M]^{+}$ em m/z 372 Da, sendo que o fragmento gerado pela perda do grupo propenila a partir do íon molecular, foi identificado pela presença do pico em m/z 331 Da (**Esquema 4.2**). A fórmula molecular proposta foi $C_{21}H_{24}O_6$, compatível com a literatura (Aiba *et al.*, 1978).



Esquema 4.2. Proposta de fragmentação da armenina B.

4.1.2. Perfil cromatográfico do extrato dos embriões

As substâncias isoladas **1** e **2** e as depositadas no banco de padrões do LQPN-USP foram utilizadas como referências para a identificação das substâncias presentes no extrato em clorofórmio dos embriões somáticos de *O. catharinensis*, numa condição pré-estabelecida em CLAE. De acordo com as análises realizadas por CLAE, a 5'-metoxi-porosina (**1**) e a armenina B (**2**) foram os compostos majoritários encontrados no extrato bruto dos embriões de *O. catharinensis* (**Figura 4.2**).

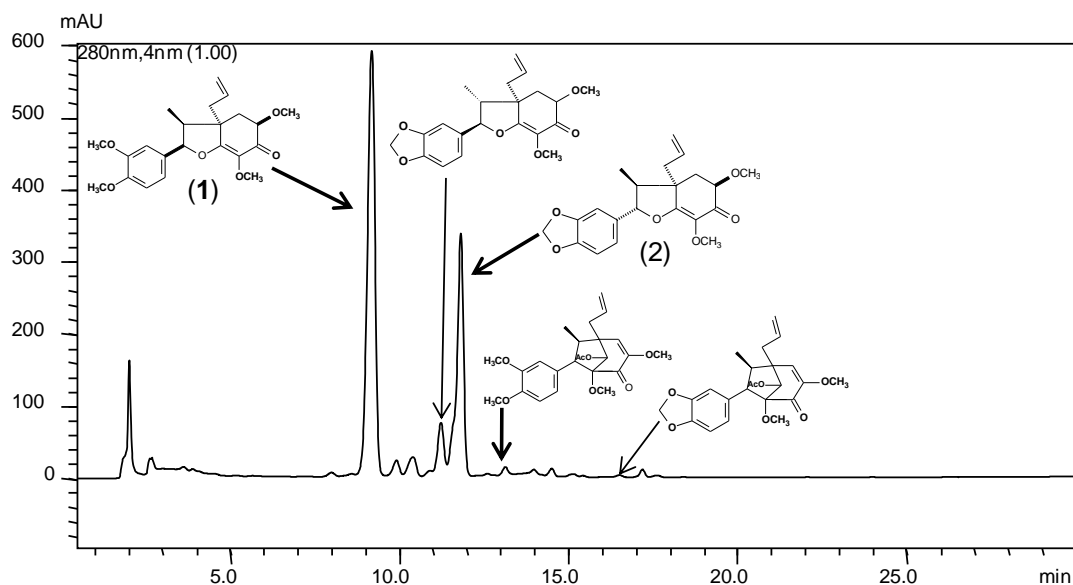
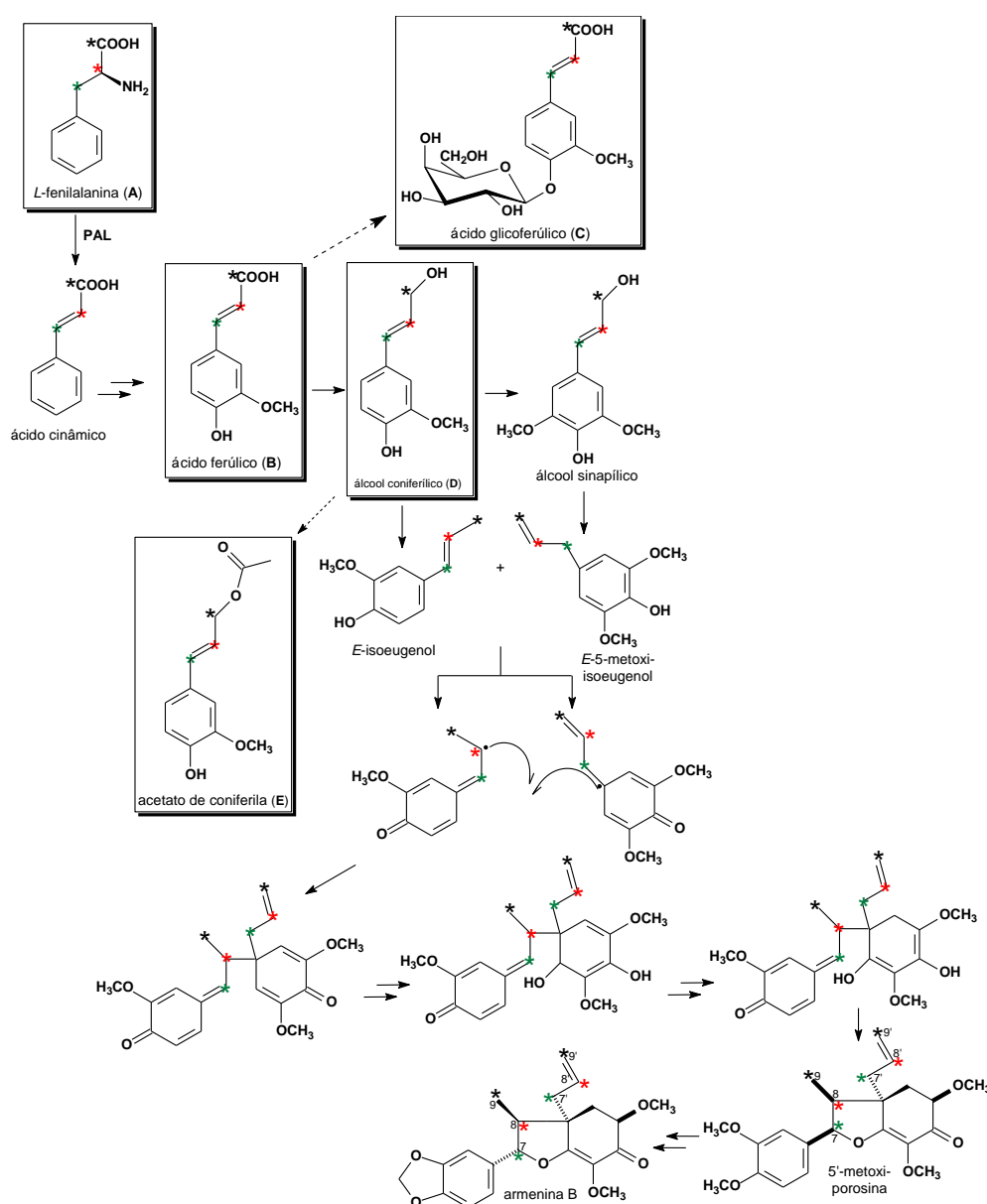


Figura 4.2. Perfil cromatográfico por CLAE do extrato de CHCl_3 dos embriões somáticos de *O. catharinensis*.

4.2. Biossíntese de neolignan benzofurânicas e estudo de incorporação dos precursores enriquecidos com carbono treze

A biossíntese das neolignanas nos embriões somáticos de *O. catharinensis* foram avaliados através do uso de precursores enriquecidos com carbono treze em determinadas posições (**Esquema 4.3**). A estratégia envolveu a preparação do maior número possível de intermediários objetivando delinear um maior número de etapas.



Esquema 4.3. Via fenilpropanoídica com os precursores marcados com ^{13}C . Os precursores destacados foram os incubados nos embriões de *O. catharinensis*; (A) *L -[1- ^{13}C], *L -[2- ^{13}C] e *L -[3- ^{13}C]-fenilalanina; (B) * ácido[8- ^{13}C]-ferúlico; (C) * ácido[8- ^{13}C]-glicoferúlico; (D) * álcool coniferílico; (E) * acetato-[8- ^{13}C] de coniferila

4.2.1. Análise das incorporações de L-[1-¹³C], L-[2-¹³C] e L-[3-¹³C]-fenilalanina

Experimentos conforme descrito no item 3.5 com isotopômeros de L-fenilalanina, foram realizados para estimar o intervalo de tempo em que ocorreria a incorporação máxima nas neolignanas 5'-metoxi-porosina (M = 388 u.m.a) e armenina B (M = 372 u.m.a). A porcentagem de incorporação de carbono treze nas neolignanas foi determinada por meio de análises de CLAE/EM (ESI), dos extratos brutos dos embriões de *O. catharinensis* enriquecidos, juntamente com o controle (apenas o extrato dos embriões). Para verificar quais seriam as posições de incorporação da L-fenilalanina, foi sugerida uma hipótese para a via de formação das neolignanas partindo-se da via fenilpropanoídica em que, cada uma das diferentes marcações da L-fenilalanina resultariam em diferentes posições de incorporação na estrutura das neolignanas (**Esquema 4.3**).

No espectro de massas da 5'-metoxiporosina não marcada (**Figura 8.15-A, Apêndice B**) os picos em 389,0, 390,0 e 391,0 indicaram fragmentações esperadas para esta neolignana. No caso na armenina B não marcada, os picos esperados foram observados 373,0, 374,0 e 375 (**Figura 8.16-A, Apêndice B**). A massa molecular de 390,0 ou 374,0 ($[M+H+1]^+$) foi atribuída às neolignanas enriquecidas com um átomo carbono treze enquanto as massas moleculares de 391 ou 375 ($[M+H+2]^+$) atribuídas às neolignanas contendo dois átomos de carbono treze.

Considerando a abundância natural de carbono treze nas neolignanas, os cálculos para se obter a porcentagem de carbono treze incorporado foram realizados através da comparação das áreas relativas da massa molecular ($[M+H]^+$), ($[M+H+1]^+$) e ($[M+H+2]^+$) das neolignanas não marcadas com as análogas das neolignanas enriquecidas seguida da subtração da porcentagem de carbono treze das amostras incubadas com os controles. Segundo os resultados expressos

graficamente (Figuras 4.3 e 4.4), foi verificado que ocorreu maior incorporação dos respectivos isotopômeros de *L*-fenilalanina em $t = 72$ horas.

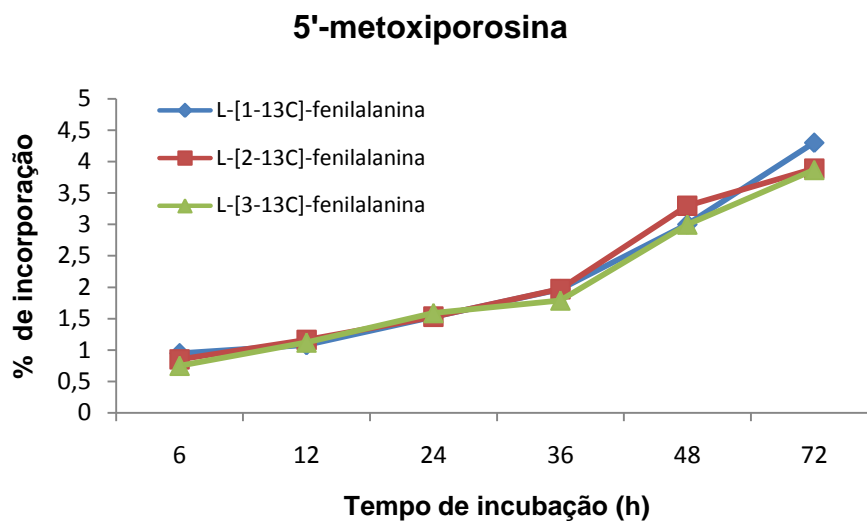


Figura 4.3. Incorporação da 5'-metoxiporosina enriquecida com isotopômeros de *L*-fenilalanina.

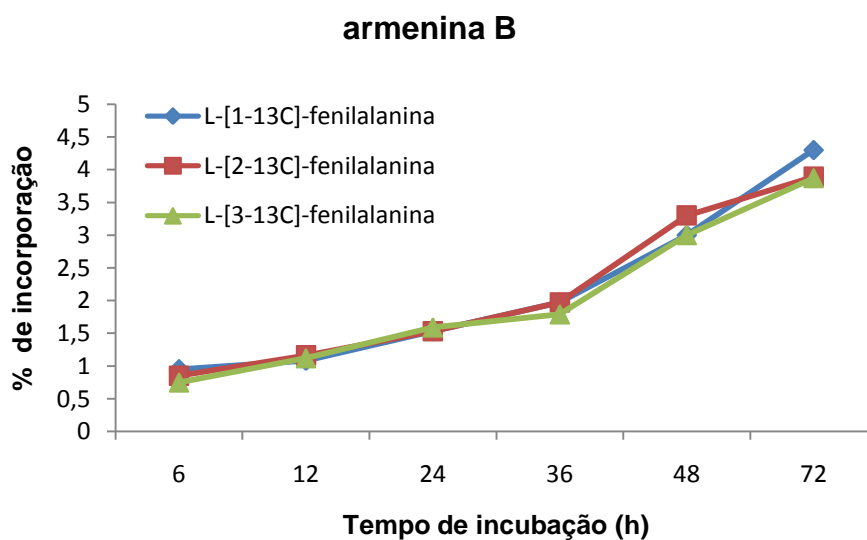


Figura 4.4. Incorporação da armenina B enriquecida com isotopômeros de *L*-fenilalanina.

As análises realizadas por CLAE/EM confirmaram que ocorreu enriquecimento de carbono treze, proveniente da L -[1- ^{13}C]-fenilalanina (**Figura 8.15-B, Apêndice B**), L -[2- ^{13}C]-fenilalanina (**Figura 8.15-C, Apêndice B**) e L -[3- ^{13}C]-fenilalanina (**Figura 8.15-D, Apêndice B**) na neolignana 5'-metoxiporosina. Na armenina B também foram observados a incorporação da L -[1- ^{13}C]-fenilalanina (**Figura 8.16-B, Apêndice B**), L -[2- ^{13}C]-fenilalanina (**Figura 8.16-C, Apêndice B**) e L -[3- ^{13}C]-fenilalanina (**Figura 8.17-D, Apêndice B**) na sua estrutura química (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3. Incorporação de isotopômeros de L -fenilalanina nas neolignanas 1 e 2
 L -[1- ^{13}C]-fenilalanina

Picos	5'-metoxiporosina (1)			armenina B (2)		
	[M+H] ⁺ 389	[M+H+1] ⁺ 390	[M+H+2] ⁺ 391	[M+H] ⁺ 373	[M+H+1] ⁺ 374	[M+H+2] ⁺ 375
Incorporação (%)	100	9,0	2,2	100	7,2	1,2
L-[2-^{13}C]-fenilalanina						
Picos	5'-metoxiporosina			armenina B		
	[M+H] ⁺ 389	[M+H+1] ⁺ 390	[M+H+2] ⁺ 391	[M+H] ⁺ 373	[M+H+1] ⁺ 374	[M+H+2] ⁺ 375
Incorporação (%)	100	8,6	1,98	100	6,6	1,1
L-[3-^{13}C]-fenilalanina						
Picos	5'-metoxiporosina			armenina B		
	[M+H] ⁺ 389	[M+H+1] ⁺ 390	[M+H+2] ⁺ 391	[M+H] ⁺ 373	[M+H+1] ⁺ 374	[M+H+2] ⁺ 375
Incorporação (%)	100	8,8	2,0	100	6,8	1,4

As neolignanas foram isoladas dos extratos obtidos após o período de incubação de $t = 72$ horas e submetidas à análise de RMN de ^{13}C possibilitando a observação da posição exata do enriquecimento de carbono treze com os isotopômeros de L -fenilalanina nas estruturas da 5'-metoxiporosina (**Figura 8.17-8.19, Apêndice B**) e armenina B (**Figura 8.20-8.22, Apêndice B**).

A comparação do espectro de RMN de ^{13}C da 5'-metoxiporosina não marcada (6,0 mg) (controle), com o espectro da marcada (6,0 mg) com L -[1- ^{13}C]-fenilalanina, mostrou o aumento da intensidade dos picos correspondentes aos carbonos C-9 (δ 11,7 ppm) e C-9' (δ 119,9 ppm). Da mesma forma, a administração da L -[2- ^{13}C]-fenilalanina resultou num produto com sinais em RMN de ^{13}C enriquecidos nas posições C-8 (δ 42,7 ppm) e C-8' (δ 132,7 ppm). No espectro da neolignana incubada com L -[3- ^{13}C]-fenilalanina foi observado a marcação nas posições C7 (δ 87,5 ppm) e C7' (δ 39,8 ppm) (**Figura 4.5**).

A análise de RMN de ^{13}C para a armenina B (5,0 mg) mostrou sinais de deslocamentos químicos análogos ao da primeira, sendo que na incubação com L -[1- ^{13}C]-fenilalanina foi observado o aumento da intensidade dos picos enriquecidos com carbono treze em C9 (δ 17,5 ppm) e C9' (δ 120,0 ppm). Enquanto que a enriquecida com L -[2- ^{13}C]-fenilalanina apresentou aumento de intensidade dos sinais no C8 (44,6 ppm) e C8' (132,5 ppm). A administração de L -[3- ^{13}C]-fenilalanina apresentou sinais enriquecidos nas posições C-7 (δ 93,8) e C-7' (δ 40,8) (**Figura 4.6**).

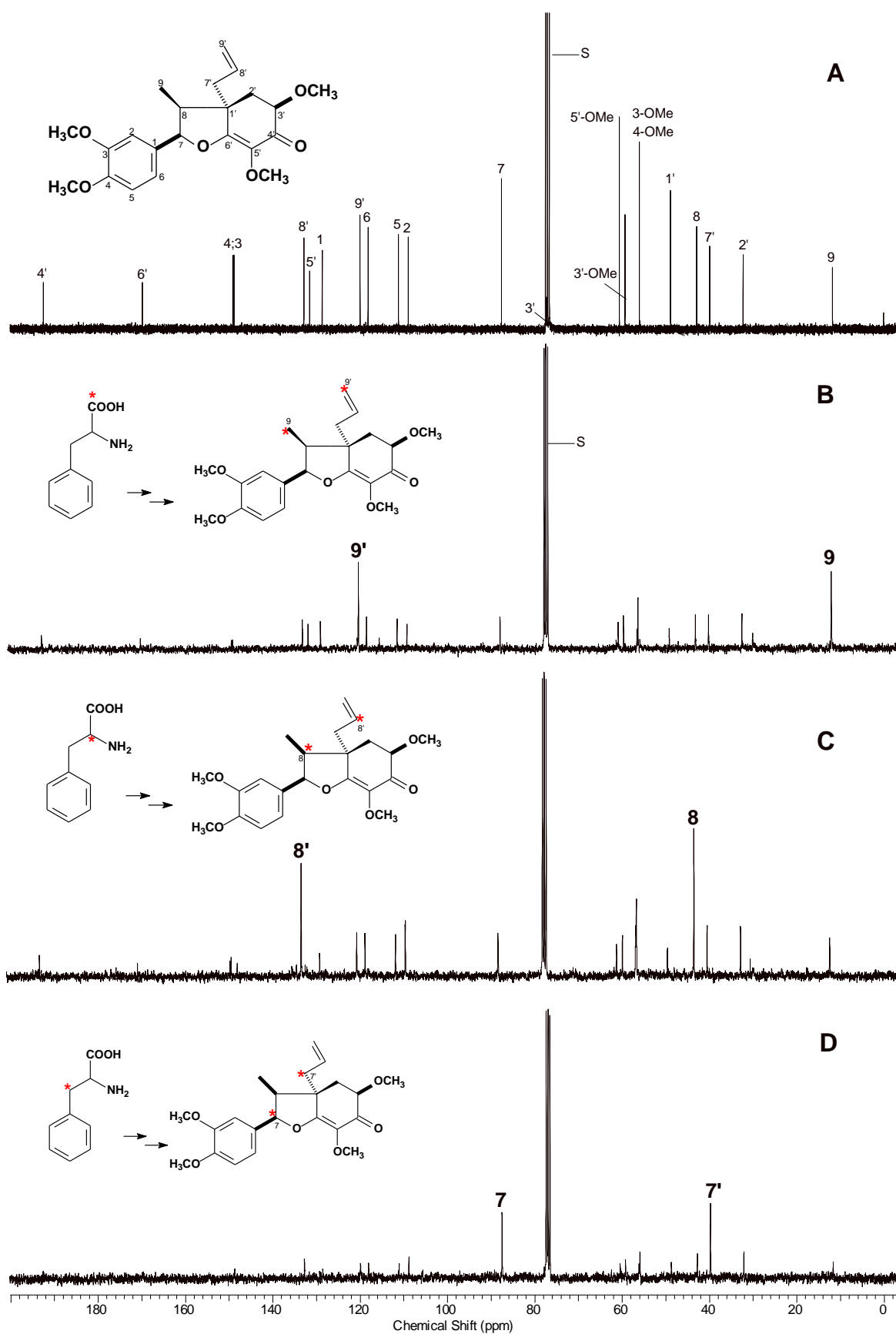


Figura 4.5. RMN de ^{13}C da 5-metoxi-porsina com abundância natural (A); (B) Incorporação com L -[1- ^{13}C]-fenilalanina; (C) Incorporação com L -[2- ^{13}C]-fenilalanina e (D) Incorporação com L -[3- ^{13}C]-fenilalanina.

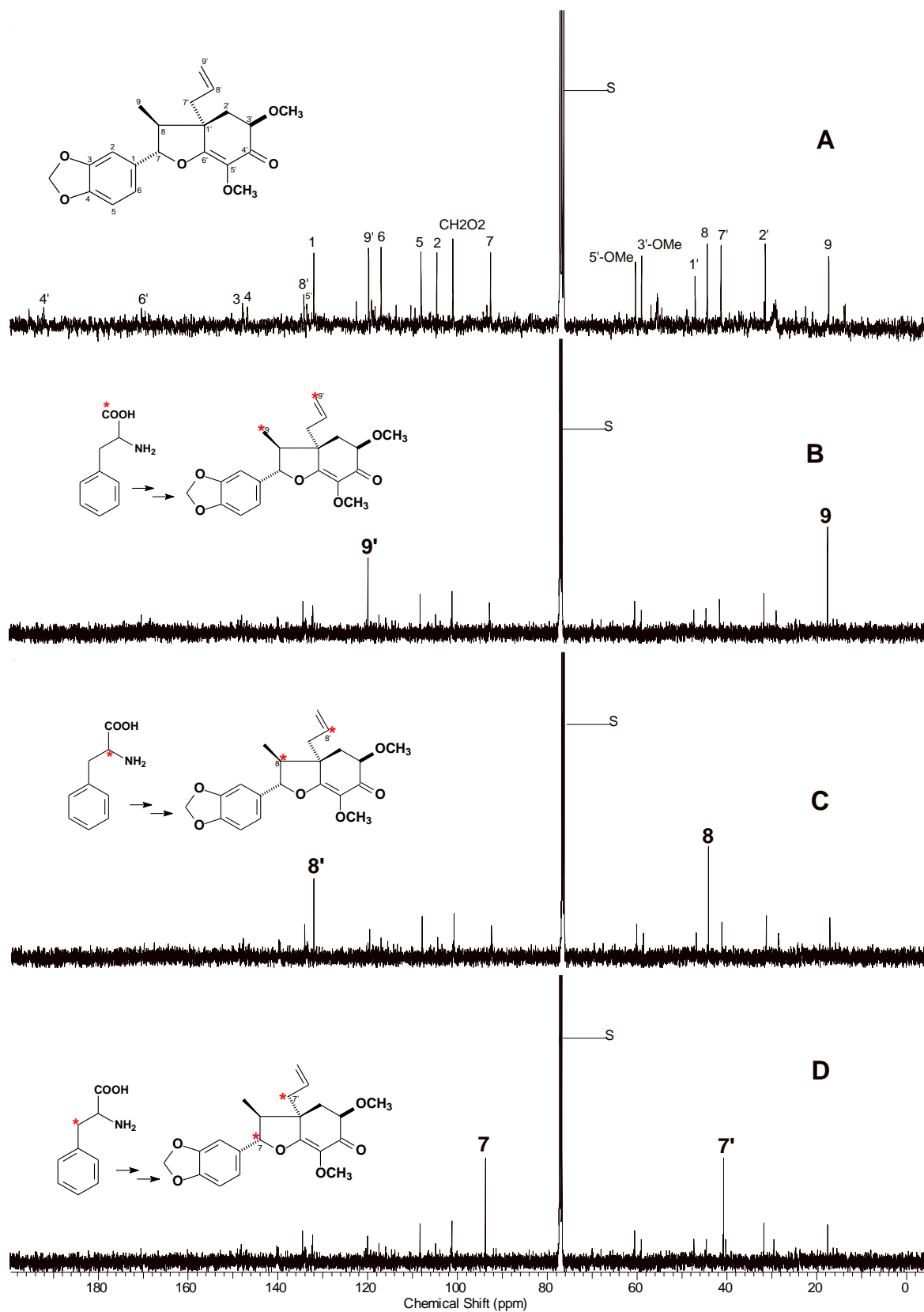
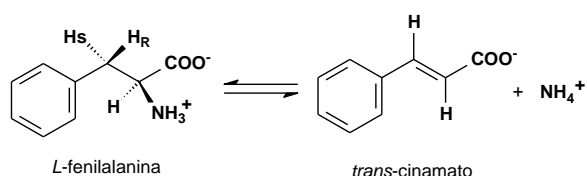


Figura 4.6. RMN de ^{13}C da armenina B com abundância natural (A); (B) Incorporação com L-[1- ^{13}C]-fenilalanina; (C) Incorporação com L-[2- ^{13}C]-fenilalanina e (D) Incorporação com L-[3- ^{13}C]-fenilalanina.

Os primeiros estudos de marcação isotópica mostraram que a incubação de *Pimpinella anisum* com *L*-fenilalanina marcada com ^{14}C resultou na incorporação de toda a cadeia lateral do aminoácido no anetol (Manito *et al.*, 1974). Nesta reação, ocorre desaminação catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL) e eliminação *anti* de amônia. O hidrogênio pró 3S é retirado do aminoácido dando origem ao ácido *trans*-cinâmico (**Esquema 4.4**) (Hanson, 1972).



Esquema 4.4. Reação de desaminação da *L*-fenilalanina em *trans*-cinamato

As análises de CLAE-EM mostraram a incorporação dos isotopômeros de *L*-fenilalanina na estrutura das neolignanas. Os espectros de RMN de ^{13}C confirmaram que o padrão de incorporação de carbono treze com *L*-[1- ^{13}C], *L*-[2- ^{13}C] e *L*-[3- ^{13}C]-fenilalanina, está consistente com a proposta de formação das neolignanas pela via fenilpropanoídica (**Esquema 4.3**), devido à incorporação intacta de duas moléculas de *L*-fenilalanina na estrutura das neolignanas, sem descarboxilação ou degradação da cadeia lateral do aminoácido.

4.2.2. Análises da incorporação do ácido [8-¹³C]-ferúlico

As análises por CLAE/EM (ESI) dos extratos brutos dos embriões somáticos de *O. catharinensis* incubados com ácido [8-¹³C]-ferúlico juntamente com o controle, não mostraram incorporação do precursor às neolignanas (**Figuras 8.23 e 8.24**). Foram preparados extratos dos embriões após 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Os embriões foram incubados com ácido [8-¹³C]-ferúlico por 48 h, pois neste intervalo de tempo os embriões encontravam-se menos oxidados (**item 3.5.2**). As neolignanas 5'-metoxiporosina (5,0 mg) e armenina B (5,0 mg) puras, foram submetidas à análise RMN de ¹H e RMN de ¹³C. No caso da incorporação com ácido [8-¹³C]-ferúlico, supostamente o enriquecimento com carbono treze seria nas posições do C8 e do C8' das respectivas neolignanas (**Esquema 4.3**).

Os espectros de RMN de ¹³C das amostras controle, da 5'-metoxiporosina (**Figura 4.7**) e da armenina B (**Figura 4.8**) foram comparados com aquelas resultantes das incubações e não foi observado nenhum aumento de intensidade dos picos correspondentes aos carbonos C8 e C8' em nenhuma das neolignanas.

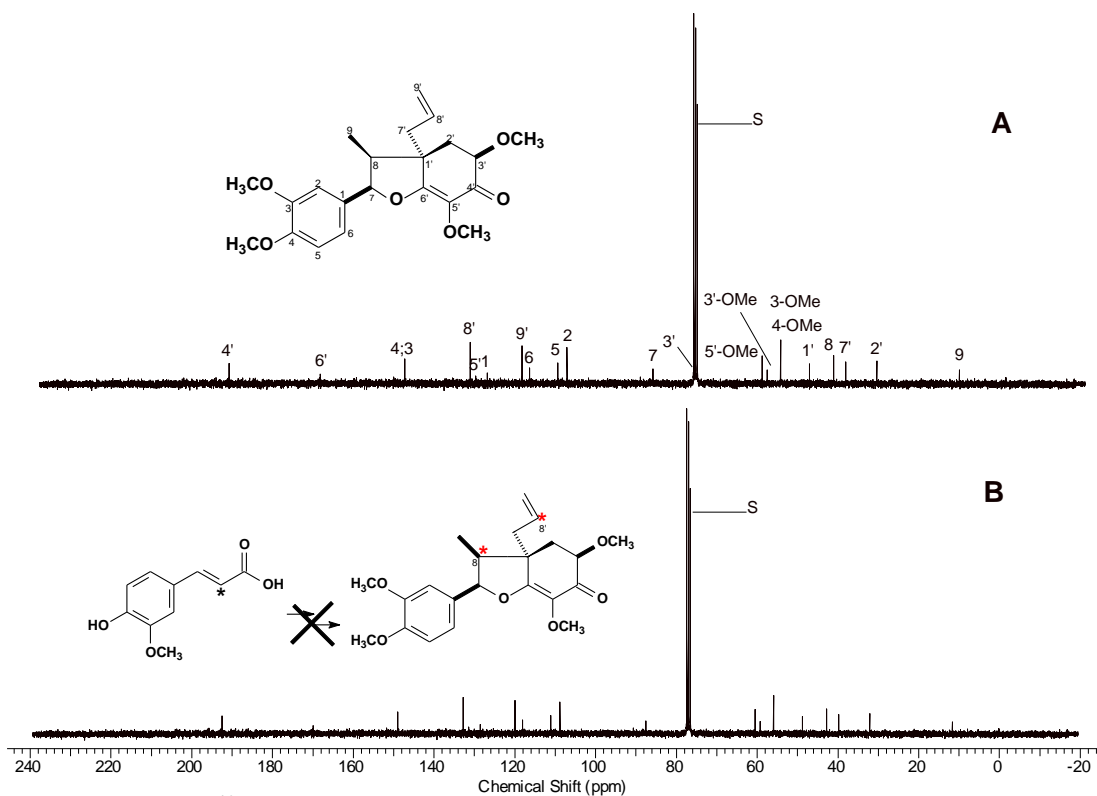


Figura 4.7. RMN de ^{13}C da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) 5'-metoxiporosina após incubação com ácido [8- ^{13}C]-ferúlico.

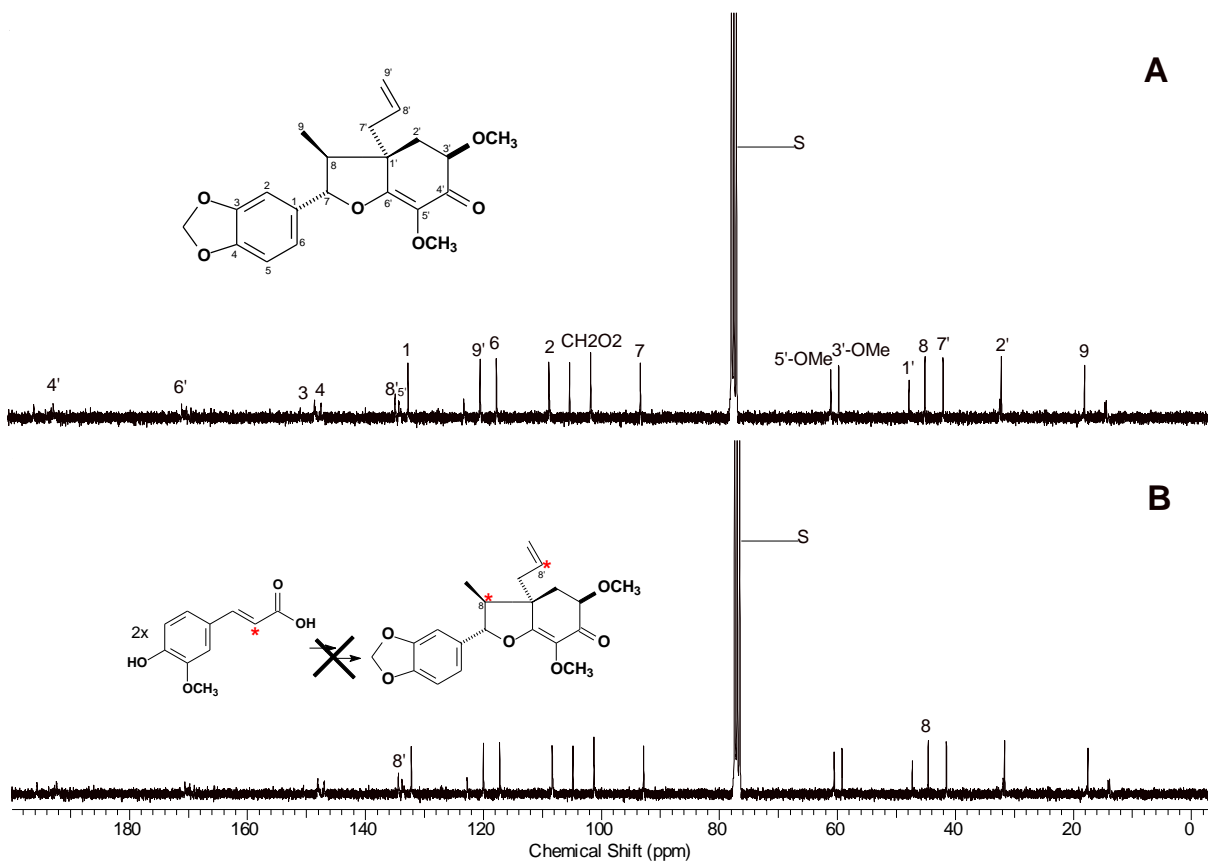


Figura 4.8. RMN de ^{13}C da armenina B com abundância natural (A); (B) armenina B após incubação com ácido [8- ^{13}C]-ferúlico

Estudos biossintéticos têm demonstrado a incorporação de 0,053% do ácido [8-¹⁴C]-ferúlico na lignana podofilotoxina, isolada de plantas jovens (2 a 3 anos) de *Podophyllum hexandrum* (Jackson e Dewick, 1984). No entanto, o metilchavicol, isolado de folhas de *Ocimum basilicum* após incubação com o ácido *p*-[8-¹⁴C]-cumárico, análogo ao ácido ferúlico, não apresentou qualquer taxa de incorporação na sua estrutura (Vassão *et al.*, 2006).

Supostamente, esses resultados podem ser consequência da natureza tóxica do precursor à planta no caso, aos embriões de *O. catharinensis* pois, após *t* = 48 h os embriões encontraram-se totalmente oxidados. A baixa solubilidade do ácido ferúlico em solução aquosa pode ter ainda causado dificuldades no seu transporte para o(s) sítio(s) da biossíntese (Davin *et al.*, 2003; Vassão *et al.*, 2006).

4.3.3. Análise da incorporação do ácido [8-¹³C]-glicoferúlico

Stockigt e Klischies, 1977, incorporaram ácido ferúlico, álcool coniferílico e coniferilaldeído glicosilados, marcados com ³H e ¹⁴C, na estrutura das lignanas arctina e filirina isoladas de brotos de *Forsythia suspensa*. A glicosilação da hidroxila fenólica contribuiria para minimizar a oxidação do ácido, facilitar a solubilidade do substrato e, conseqüentemente, melhorar sua absorção na planta. Partindo-se deste princípio, o ácido [8-¹³C]-glicoferúlico foi administrado nos embriões somáticos de *O. catharinensis*, em diferentes intervalos de tempo e concentrações distintas (**item 3.5.3**) a fim de identificar condições ideais para a incorporação nas neolignanas (**Esquema 4.3**).

Para verificar o enriquecimento de carbono treze nas neolignanas, os extratos com abundância natural e os incubados com ácido [8-¹³C]-glicoferúlico foram analisados por espectrometria de massas (EI). Pela proposta de fragmentação da 5'-

metoxiporosina, foi observado que os picos em m/z em 178, 319 e 358 da amostra controle, deveriam mostrar os picos enriquecidos com carbono treze em m/z em 179, 320 e 360, respectivamente (**Esquema 4.1**). Não foram observadas tais distinções entre os fragmentos.

Os espectrômetros de massas separam facilmente os isótopos dos isótopos mais abundantes. Tanto o carbono como o hidrogênio têm isótopos com uma unidade a mais de massa atômica, presentes apenas em pequena quantidade resulta em picos com uma unidade a mais junto dos picos principais de moléculas e íons fragmentários (Dass 2007). No entanto, não foi observada qualquer porcentagem de incorporação nas duas neolignanas (**Figura 4.9**).

Os embriões apresentaram melhor aparência e maior tempo de incubação no $t = 72$ h e, por isso, a partir desses experimentos, foram obtidos extratos que foram submetidos à separação das neolignanas por CCDP. Segundo a hipótese sugerida para a via de formação das neolignanas (**Esquema 4.3**), deveria ocorrer incorporação nas posições do C8 e do C8', oriundas do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico. No entanto, a comparação das análises de RMN de ^{13}C das neolignanas com abundância natural com as incubadas com ácido [8- ^{13}C]-glicoferúlico não apresentaram qualquer aumento de intensidade nas posições dos C8 e C8' (**Figuras 4.10 e 4.11**).

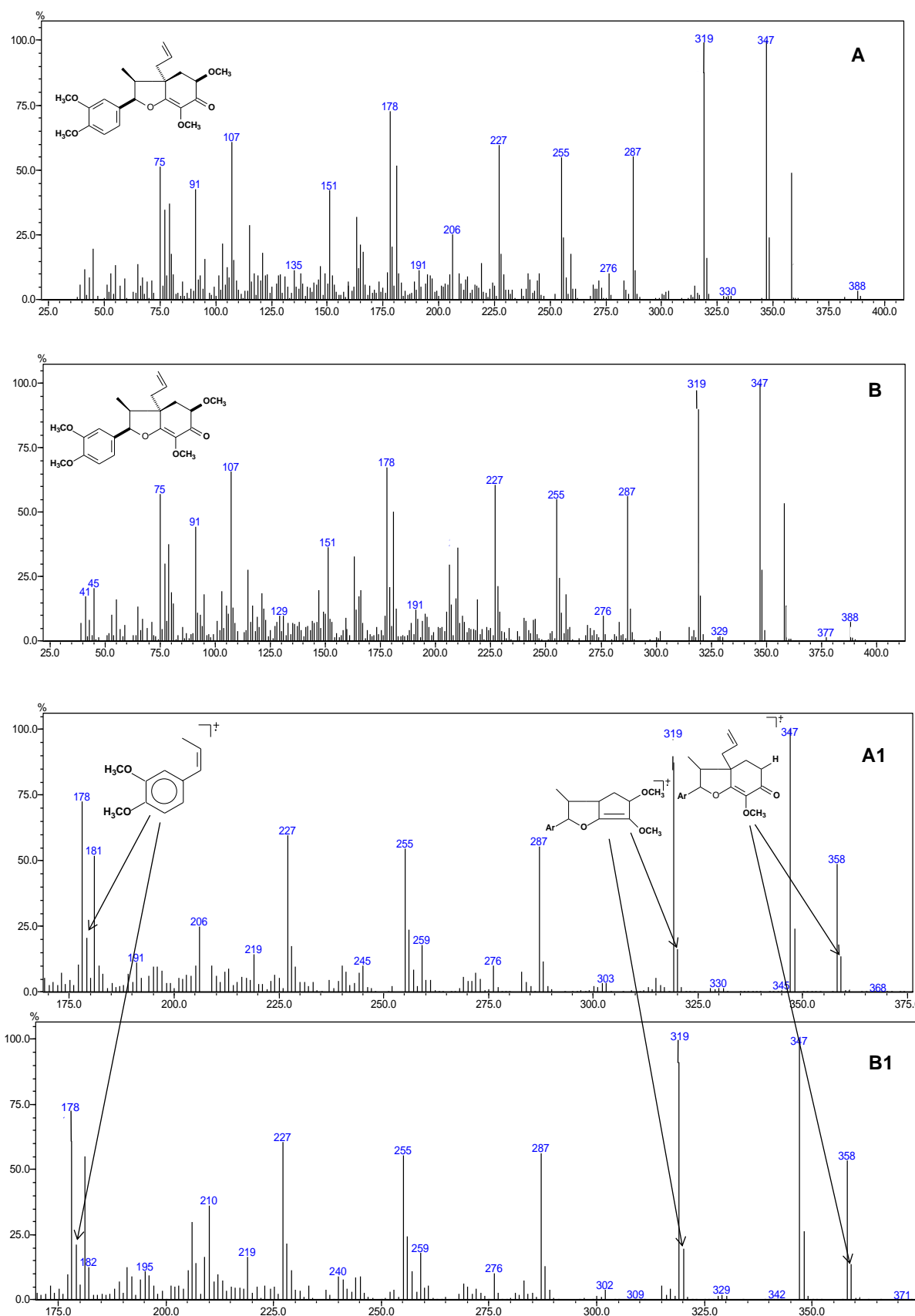


Figura 4.9. Espectro de massas (IE) da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) Incorporação do ácido-[8-¹³C]-glicoferúlico; (A1) Ampliação de (A); (B1) Ampliação de (B)

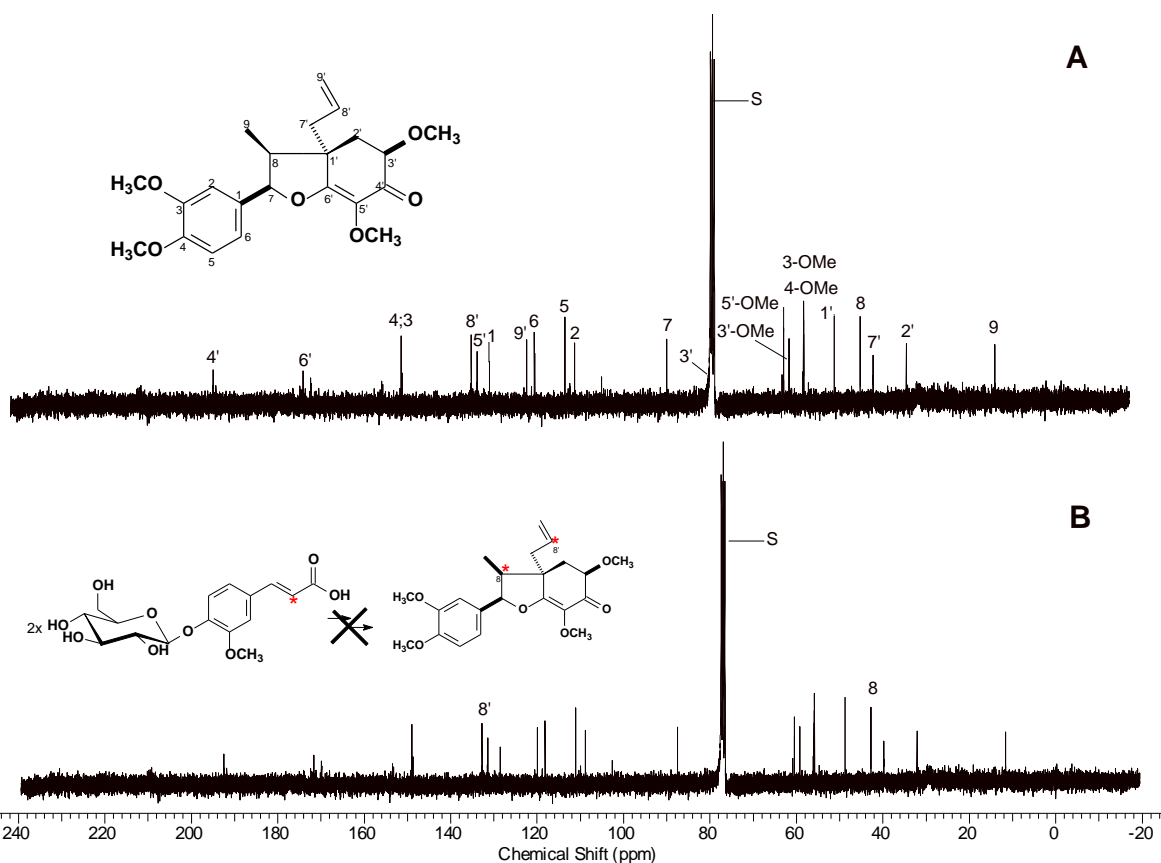


Figura 4.10. RMN de ^{13}C da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) 5'-metoxiporosina após incubação com ácido $[8-^{13}\text{C}]$ -glicoferúico

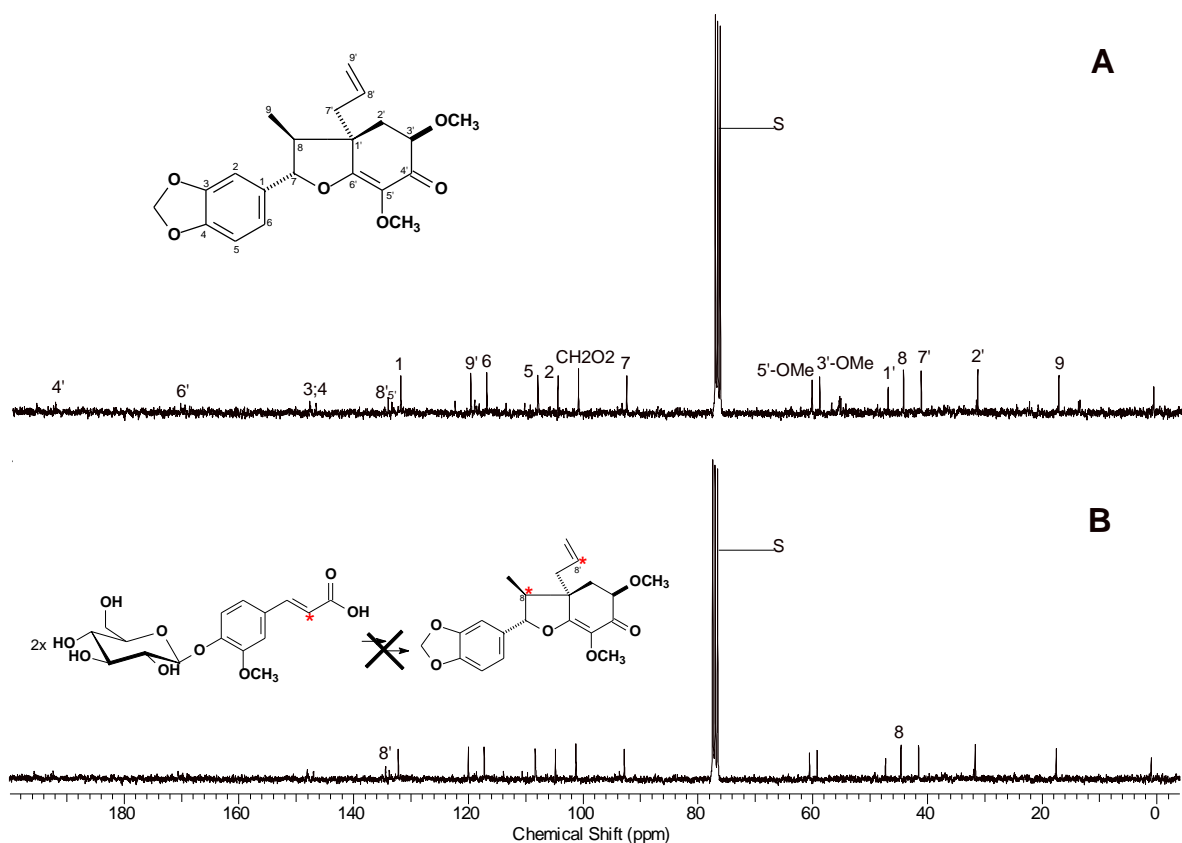


Figura 4.11. RMN de ^{13}C da armenina B com abundância natural (A); (B) armenina B após incubação com ácido $[8-^{13}\text{C}]$ -glicoferúico

Ralph e colaboradores (2012) realizaram experimentos com álcoois coniferílicos e sinapílicos, com a hidroxila em *para* metilada ou livre. Ao incubar os substratos com 4-OH metilada com peroxidases não foi observada a polimerização dos monolignóis *in vitro*. No caso da incubação de compostos contendo a posição 4-OH desprotegida com peroxidases foi possível observar reações de polimerização, o que é compatível com o fato de que monolignóis devam estar com tal posição livre para geração de radicais fenólicos que levariam a subsequente acoplamento.

No caso da incubação com o ácido [8-¹³C]-glicoferúlico, é proposto que o precursor e o substrato deveriam permanecer mais tempo incubados, para que ocorresse a possível hidrólise do glicosídeo seguida de incorporação. Os embriões são bastante sensíveis e após 72 h estavam completamente oxidados.

4.3.4. Análises da incorporação do álcool [8-¹³C]-coniferílico

Administrações *in vitro* do álcool [8-¹³C]-coniferílico nos embriões de *O. catharinensis* foram realizadas em diferentes concentrações, intervalos de tempo (12, 24, 48, 72 e 96 horas) e, na ausência e presença de luz, a fim de identificar condições satisfatórias para a absorção e metabolismo nas neolignanas **1** e **2**.

A comparação dos espectros de CLAE/EM (ESI) dos extratos brutos dos embriões somáticos de *O. catharinensis* incubados com álcool [8-¹³C]-coniferílico com as amostras controle, mostraram que este substrato não foi incorporado às neolignanas 5'-metoxiporosina (**Figura 8.25, Apêndice B**) e armenina B (**Figura 8.26, Apêndice B**).

De acordo com a proposta biossintética para a formação das neolignanas, esperava-se obter a incorporação de uma molécula do álcool na posição do C-8 e a

outra no C-8' na estrutura das neolignananas **1** e **2** (**Esquema 4.3**). Devido à acurácia da análise por RMN de ^{13}C , mesmo não sendo observada qualquer porcentagem de incorporação nas substâncias por CLAE/EM (ESI), as neolignananas foram isoladas do extrato bruto dos embriões incubados com álcool $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferílico no $t = 48$ h, pois neste intervalo de tempo os embriões não se encontravam totalmente oxidados e, submetidas à análise de RMN de ^1H e de ^{13}C . O espectro de RMN de ^{13}C da 5'-metoxiporosina (6,0 mg), também não apresentou qualquer aumento na intensidade dos carbonos nas posições C-8 e C-8' quando comparado com o espectro de RMN de ^{13}C da amostra controle (**Figura 4.12**). Devido a pouca quantidade obtida da armenina B (1,0 mg), não foi possível realizar a análise por RMN de ^{13}C .

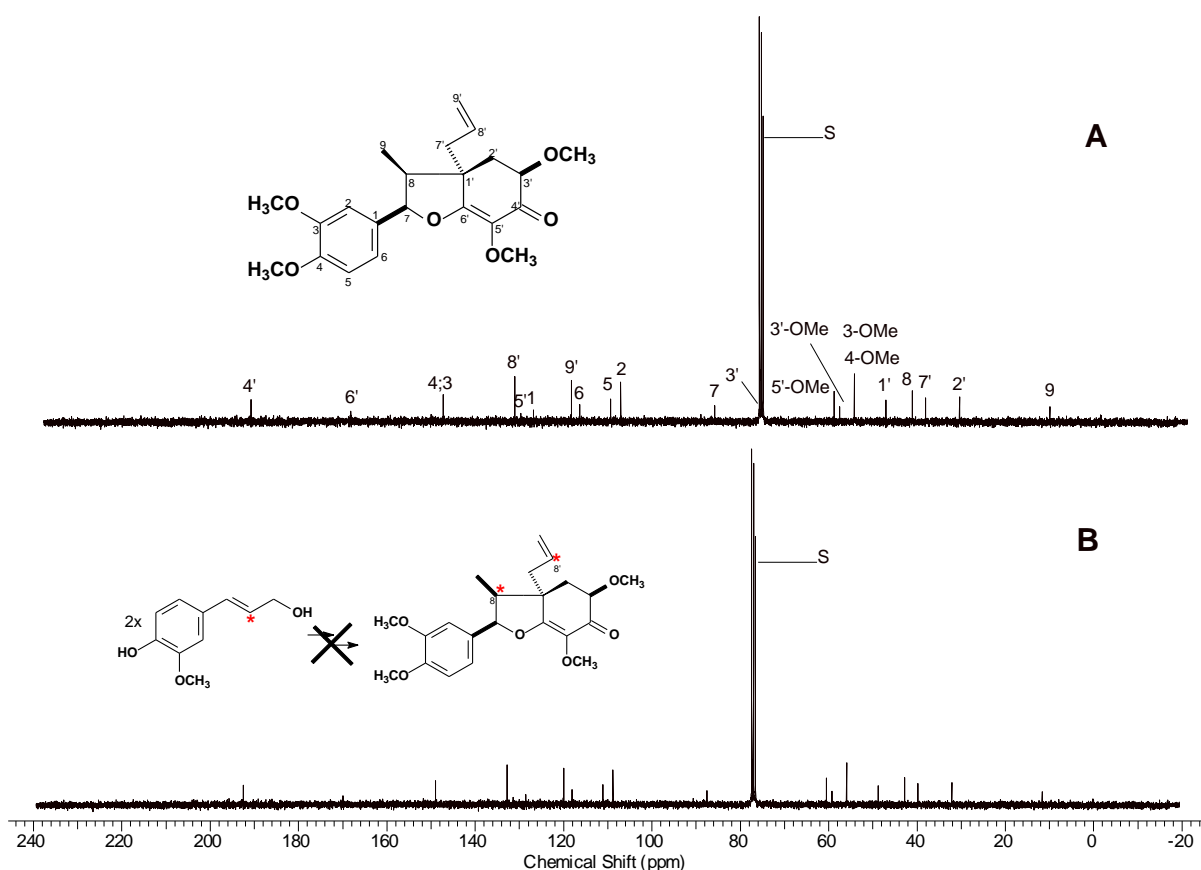


Figura 4.12. RMN de ^{13}C da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) 5'-metoxi porosina após incubação com álcool $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferílico

Supõem-se que a rápida degradação do álcool coniferílico anteriormente ao seu ingresso na via biossintética, aliada à sua baixa solubilidade em meio aquoso não resultou no enriquecimento com carbono treze das correspondentes neolignanas **1** e **2**, como esperado.

Ensaio de biconversão utilizando frações enzimáticas obtidas a partir de brotos de *Forsythia intermedia*, demonstraram que o álcool [9-²H₂, -OC²H₃]-coniferílico incubado na presença de NADPH e H₂O₂ foi interconvertido na lignana, enantiomericamente pura, (-)-secoisolariciresinol (Katayama *et al.*, 1992).

4.3.5. Análise da incorporação do acetato de [8-¹³C]-coniferila

O acetato de [8-¹³C]-coniferila foi escolhido por apresentar um bom grupo abandonador, cuja saída é realizada por eliminação redutiva (**item 1.3**). Este precursor fenilpropanoídico foi recentemente descrito como importante intermediário biossintético (**Esquema 4.3**) (Vassão *et al.*, 2006; Ferrer *et al.*, 2008; Koeduka *et al.*, 2013).

Semelhante aos precursores anteriores foi testada a incubação do acetato de [8-¹³C]-coniferila nos embriões de *O. catharinensis* nos t = 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Foram realizadas análises por espectrometria de massas (EI) do extrato bruto das frações incorporadas e controle, para quantificação da porcentagem de incorporação de carbono treze nas neolignanas. A incorporação do substrato ocorreu após 72 horas de incubação.

Foi verificado através dos espectros de massas que os picos referentes aos isótopos de carbono, fragmentos em m/z 179 e 320 apresentaram aumento de intensidade (**Figura 4.13-B1**) quando comparados com os respectivos fragmentos

da amostra controle (**Figura 4.13-A1**). Foram obtidas incorporações de 5,48% e 5,77%, respectivamente, enquanto que no fragmento m/z 358 (**Figura 4.13-B1**), foram observadas incorporações de carbono treze nos isótopos $[M+1]^+ = 359$ com 3,20% de incorporação e no $[M+2]^+ = 360$ com 2,12%. Diante destes resultados, foi confirmada a incorporação de duas moléculas de acetato de $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferila na 5'-metoxiporosina. A armenina B, não foi identificada nos espectros de massas do extrato bruto enriquecido e da amostra controle.

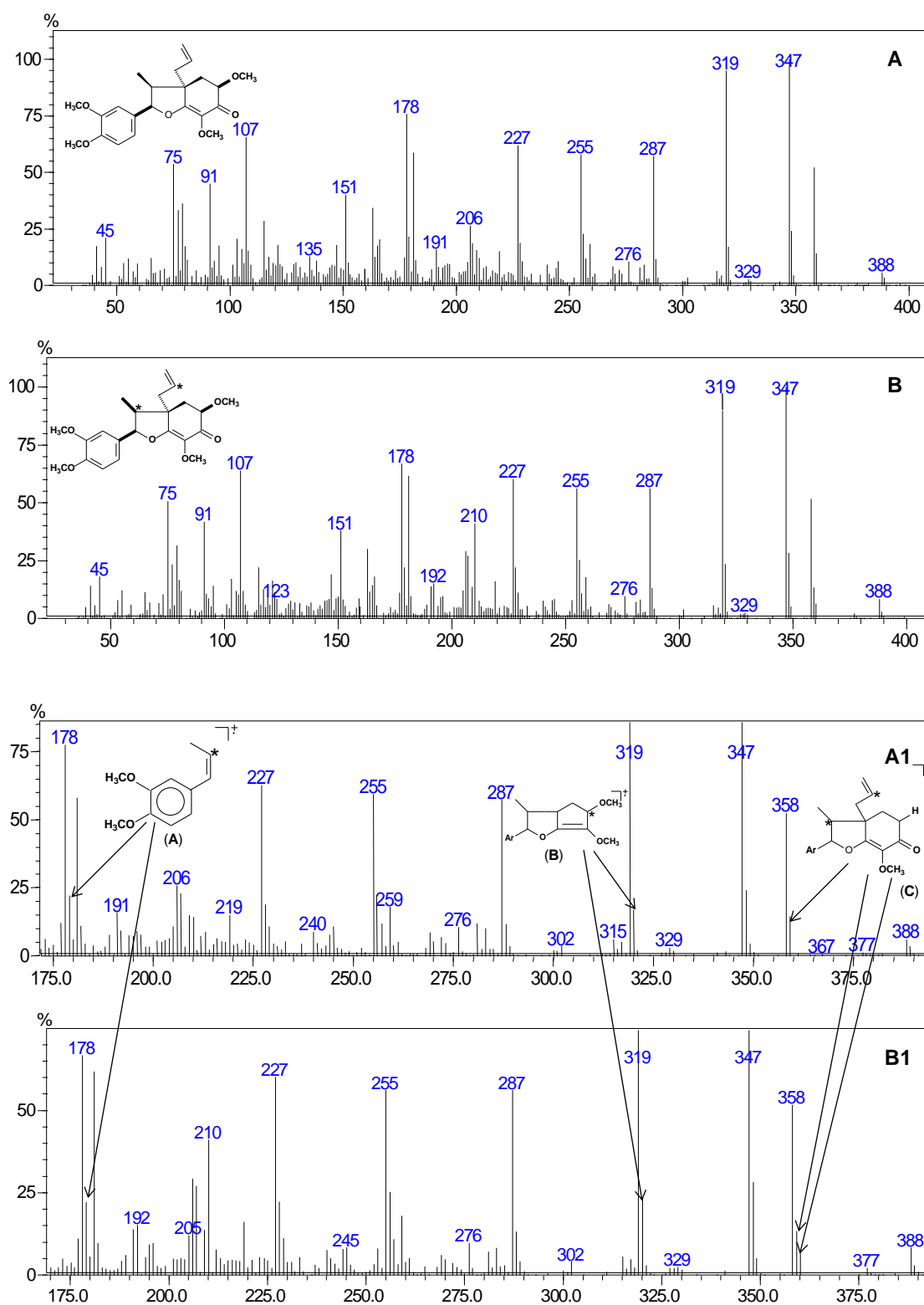


Figura 4.13. Espectro de massas (IE) da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) Incorporação do acetato de [8-¹³C]-coniferila; (A1) Ampliação de (A); (B1) Ampliação de (B).

Segundo a proposta biossintética para a formação das neolignan, no caso da incorporação com o acetato de [8-¹³C]-coniferila, supostamente o enriquecimento com carbono treze também seria nas posições do C8 e do C8' das neolignanas (**Esquema 4.3**). A comparação entre os espectros de RMN de ¹³C da amostra controle da 5'-metoxiporosina em relação à incubada (**Figura 4.14**), mostrou um aumento na intensidade do C8' (132,7 ppm) e no C8 (42,8 ppm). A armenina B, foi obtida em quantidade muito pequena e não foi possível obter o espectro de RMN de ¹³C.

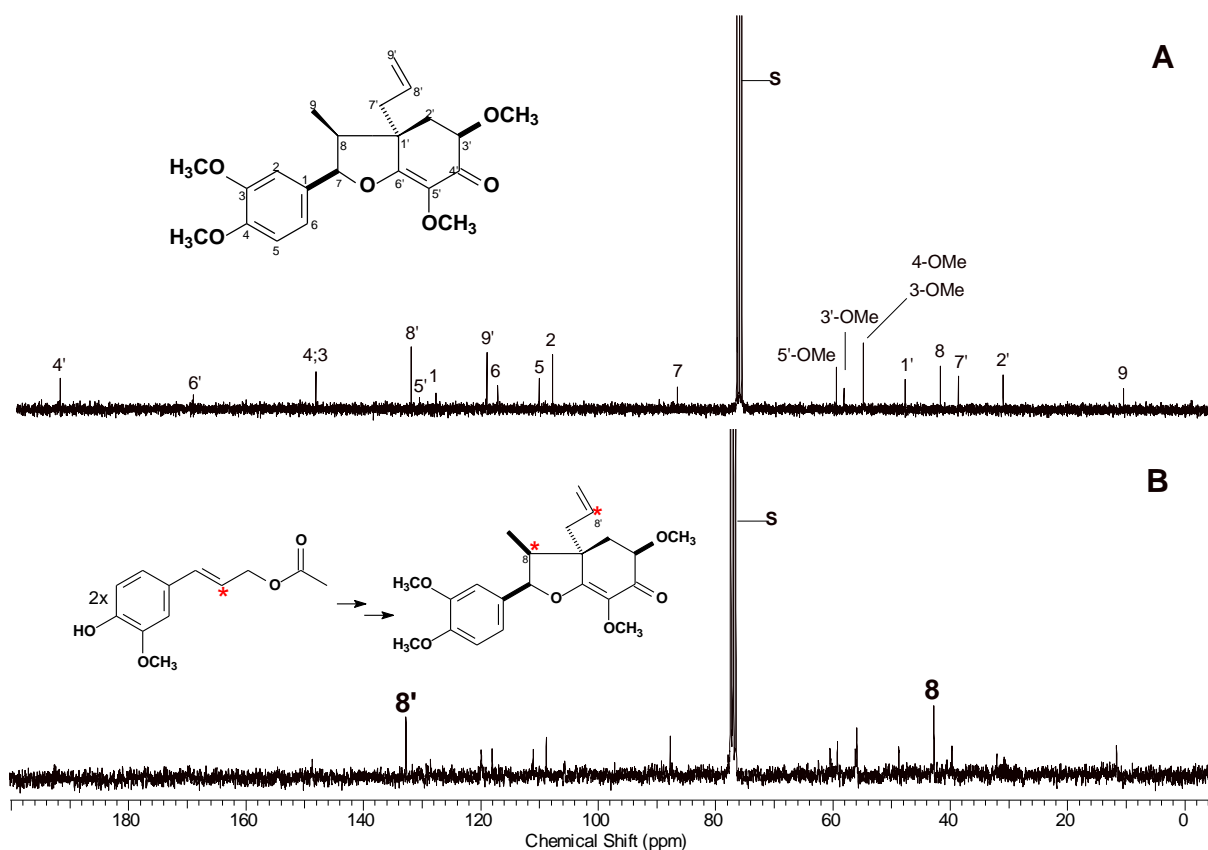


Figura 4.14. RMN de ¹³C da 5'-metoxiporosina com abundância natural (A); (B) 5'-metoxiporosina após incubação com acetato de [8-¹³C]-coniferila.

As posições dos hidrogênios diretamente ligados aos carbonos enriquecidos com carbono treze foram confirmadas através do espectro de HSQC (**Figura 8.27**, **Apêndice B**) (**Tabela 4.4**), no qual foi possível observar as correlações do

hidrogênio em δ 2,56 (H-8), com δ 42,8 (C-8), assim como os hidrogênios δ 5,95 (H-8'), com δ 132,8 (C-8'). Através do mapa de contorno HMBC (**Tabela 4.4**), também foi possível observar a correlação de δ 2,56 (H-8) com 11,7 (C-9), 39,8 (C-7') e 169,9 (C-6'). Enquanto os hidrogênios em δ 5,95 (H-8') ligados diretamente ao C-8' se correlacionam com δ 39,8 (C-7') assim como com 48,8 (C1') (**Figura 8.28, Apêndice B**).

Tabela 4.4. Dados dos mapas de contorno HSQC (H-C, 1J) e HMBC (C-H, nJ) (H 500 MHz, C 125 MHz, $CDCl_3$).

Posição	δ_H	(H-C, 1J)	(H-C, nJ)
1	-	-	-
2	6,75	109,8	87,5 (C-7), 118,1 (C-6) e 148,8 (C-3)
3	-	-	-
4	-	-	-
5	6,90	111,2	128,7 (C-1) e 148,5 (C-4)
6	6,84	118,1	87,5 (C-7), 108,9 (C-2) e 149,1 (C-4)
7	5,90	87,5	11,7 (C-9), 109,8 (C-2), 118,1 (C-6) e 128,7 (C-1)
8	2,56	42,8	11,7 (C-9), 39,8 (C-7') e 169,9 (C-6')
9	0,55	11,7	42,8 (C-8), 87,5 (C-7), 48,6 (C-1')
1'	-	-	-
2'	1,88 2,30	32,2	39,8 (C-7'), 48,8 (C-1') e 77,3 (C3') 48,8 (C-1'), 77,3 (C3'), 169,9 (C6') e 192,5 (C4')
3'	4,03	77,3	32,2 (C-2'), 59,3 (3-OCH ₃), 192,5 (C-4')
4'	-	-	-
5'	-	-	-
6'	-	-	-
7'	2,47 276	39,8	39,8 (C-7'), 48,8 (C-1'), 42,6 (C8), 119,9 (C9') e 132,8 (C8') 32,2 (C-2'), 48,8 (C-1'), 132,8 (C8') e 119,9 (C-9')
8'	5,95	132,8	39,8 (C-7') e 128,7 (C-1')
9'	5,33	119,9	39,8 (C-7')
3-OCH ₃	3,89	56,0	148,8 (C-3)
4-OCH ₃	3,88	56,0	149,1 (C-4)
3'-OCH ₃	3,62	59,2	77,3 (C-3')
5'-OCH ₃	3,80	60,5	131,5 (C-5')

J em Hertz; δ em ppm;

Os resultados obtidos dos espectros de massas (EI), RMN de ^{13}C , mapas de contorno HSQC e HMBC, confirmaram que o esqueleto inteiro da 5'-metoxiporosina foi formado pela condensação de duas moléculas do acetato de [8- ^{13}C]-coniferila.

4.4. Conversão enzimática

4.4.1. Conversão enzimática utilizando como substrato o acetato de coniferila

As frações enzimáticas foram analisadas por CLAE para verificar a capacidade de conversão do acetato de coniferila em eugenol ou *E*-isoeugenol. Também foram analisados o precursor acetato de coniferila (**Figura 4.15**) e os possíveis produtos da reação: eugenol (**Figura 4.16**) e o *E*-isoeugenol (**Figura 4.17**).

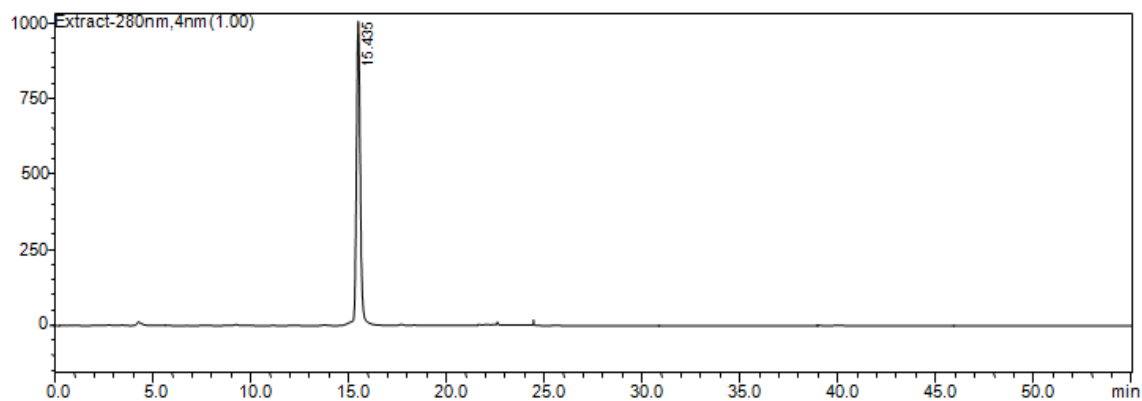


Figura 4.15. Análise por CLAE do acetato de coniferila.

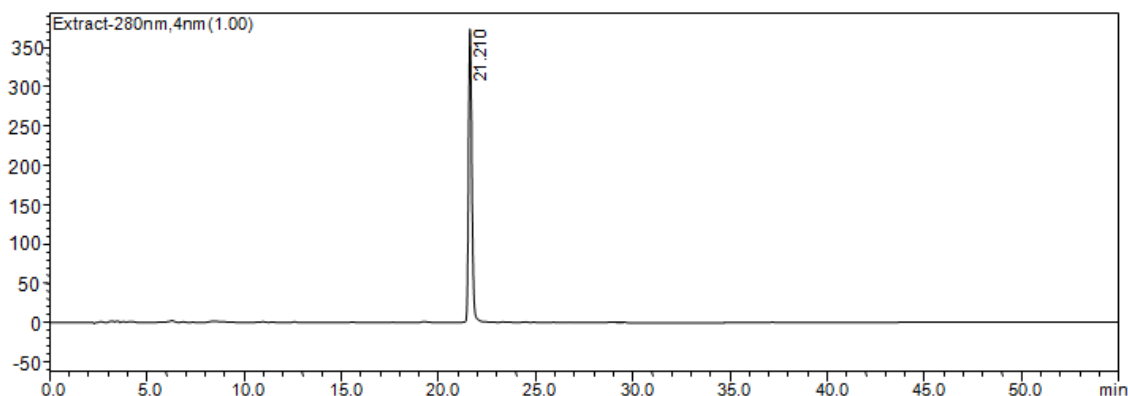


Figura 4.16. Análise por CLAE do eugenol

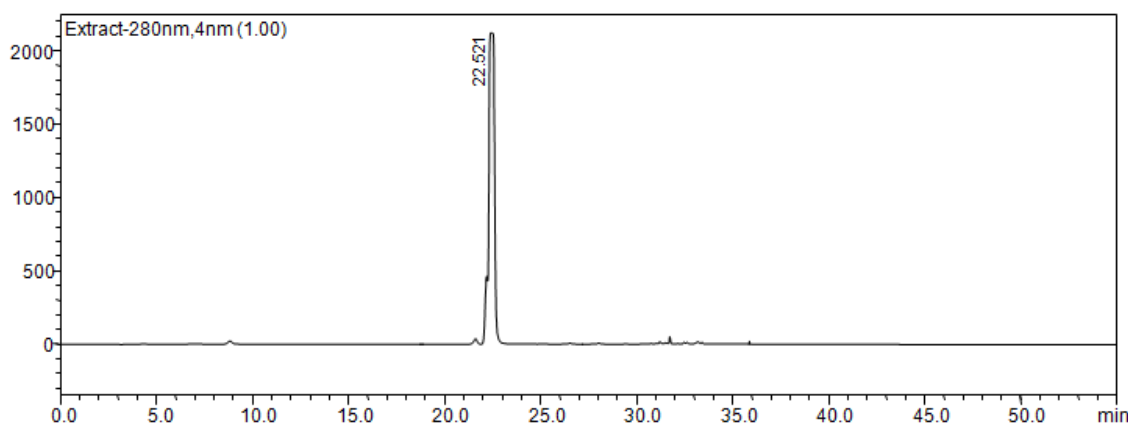


Figura 4.17. Análise por CLAE do *E*-isoeugenol.

A comparação das análises por CLAE do controle (extrato enzimático e tampão MES) (Figura 4.18), com as frações enzimáticas e os respectivos padrões, permitiu identificar a conversão do acetato de coniferila em *E*-isoeugenol como produto da conversão enzimática (Figura 4.19).

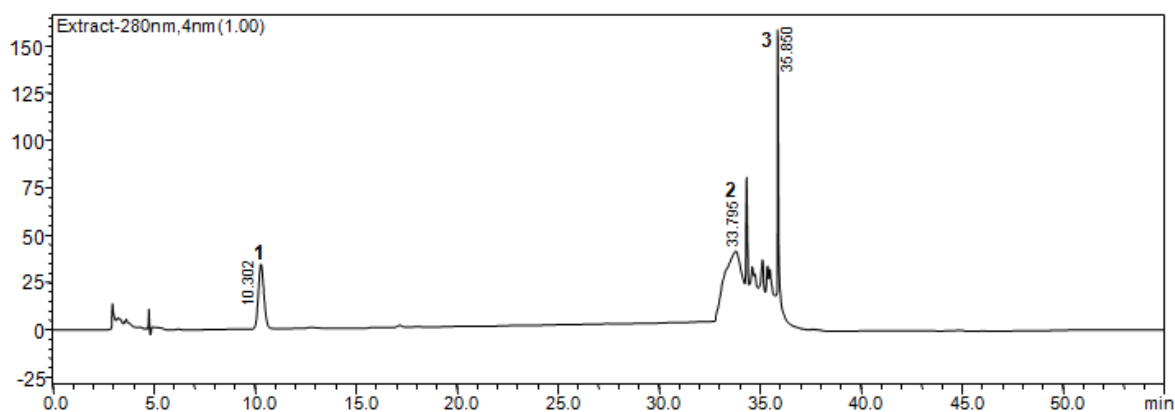


Figura 4.18. Análise por CLAE da fração enzimática dos embriões de *O. catharinensis* em tampão MES. (1); (2) e (3) substâncias presentes na fração enzimática.

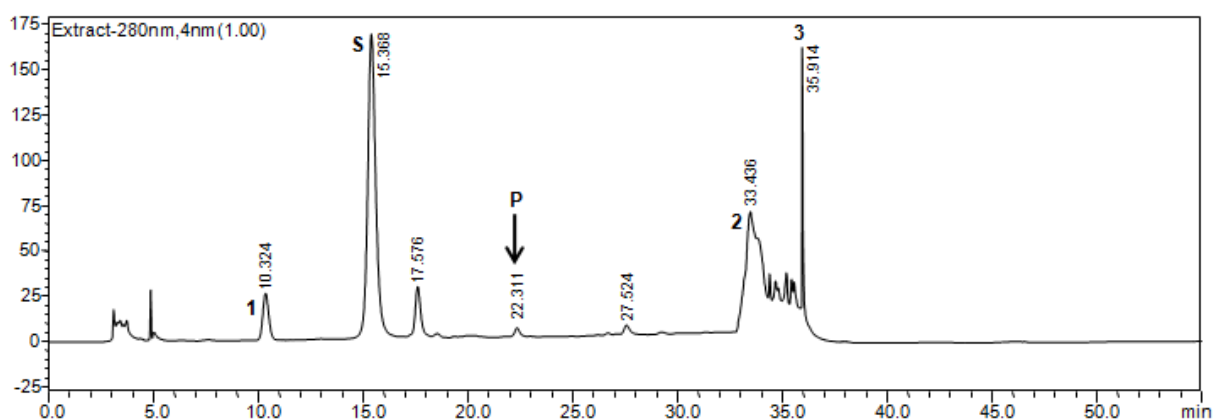
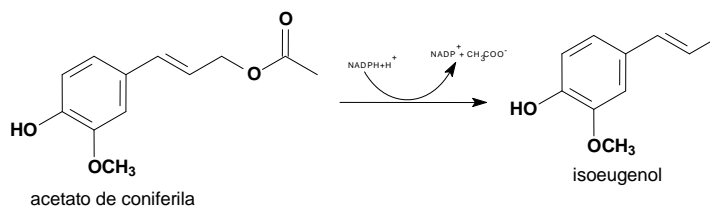


Figura 4.19. Análise por CLAE da conversão do acetato de coniferila em *E*-isoeugenol. (1); (2) e (3) substâncias presentes na fração enzimática; (S) substrato: acetato de coniferila; (P) produto: *E*-isoeugenol.

Para a eliminação do grupo acetato e formação do *E*-isoeugenol foi demonstrado que se o ataque nucleofílico do hidreto, oriundo do NADPH, ocorrer no carbono C-9 da cadeia lateral do acetato de coniferila, levaria à formação do propenilfenol. Caso o ataque do hidreto ocorra no C-7, levaria à formação do eugenol (**Esquema 4.4**) (Koeduka *et al.*, 2006; Vassão *et al.*, 2006; Koeduka *et al.*, 2008).



Esquema 4.4. Proposta da conversão enzimática do acetato de coniferila em *E*-isoeugenol.

Estes resultados, aliados à incorporação de duas moléculas do acetato de [8-¹³C]-coniferila à neolignana 5'-metoxiporosina (**item 3.4.5**), corroboram para a proposta de que esta seja a via para a formação das neolignanas 5'-metoxiporosina e armenina B pois, o *E*-isoeugenol é considerado precursor hipotético para a formação das neolignanas di-hidrobenzofurânicas.

4.4.2. Conversão enzimática utilizando o *E*-isoeugenol e o 5-metoxi-eugenol

Foram testadas diversas frações enzimáticas no intuito de observar a possível dimerização estereo e/ou regioseletiva *in vitro* do *E*-isoeugenol e 5-metoxi-eugenol na 5'-metoxiporosina e/ou na armenina B. Segundo o esquema de biossíntese proposto, o substrato sofre acoplamento oxidativo por ação de enzimas (proteína dirigente) levando à produção das neolignanas di-hidrobenzofurânicas (**Esquema 4.3**).

Para analisar a reação de conversão enzimática, primeiro foram analisados por CLAE, os precursores *E*-isoeugenol (**Figura 4.20**) e 5-metoxi-eugenol (**Figura 4.21**) e a neolignana 5'-metoxiporosina como possível produto da reação (**Figura 4.22**).

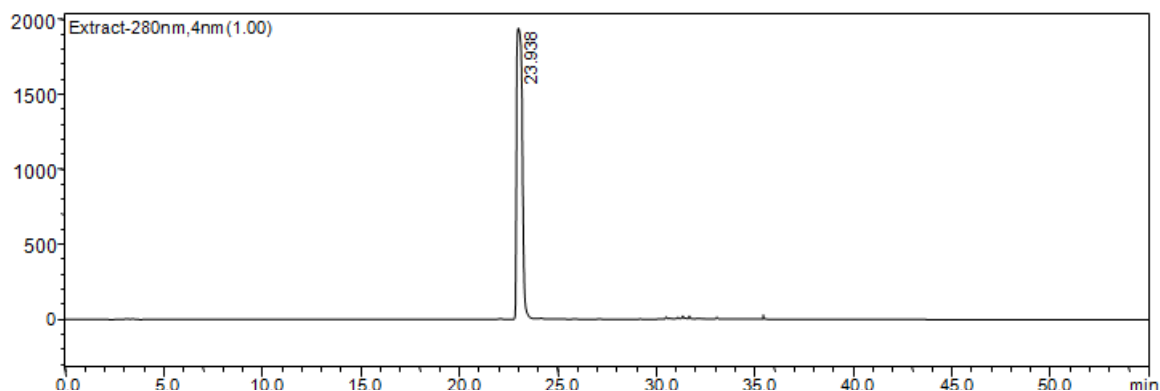


Figura 4.20. Análise por CLAE do *E*-isoeugenol.

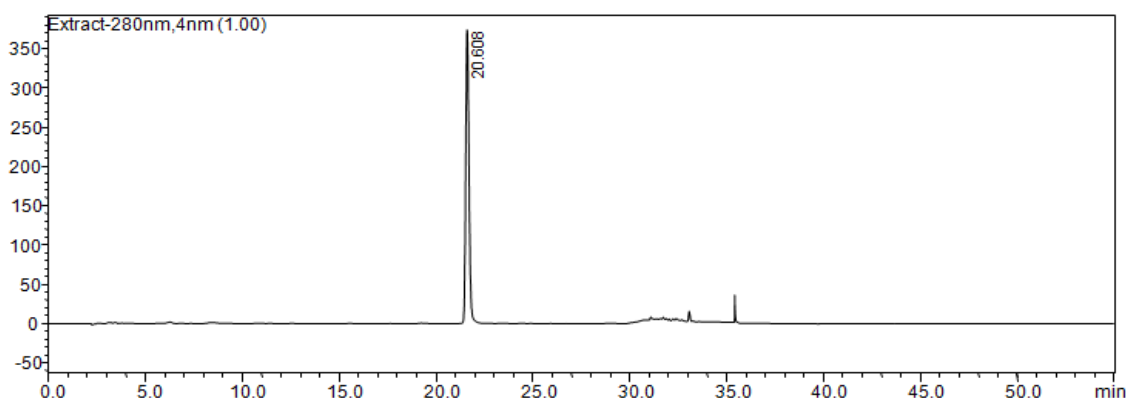


Figura 4.21. Análise por CLAE do 5-metoxi eugenol.

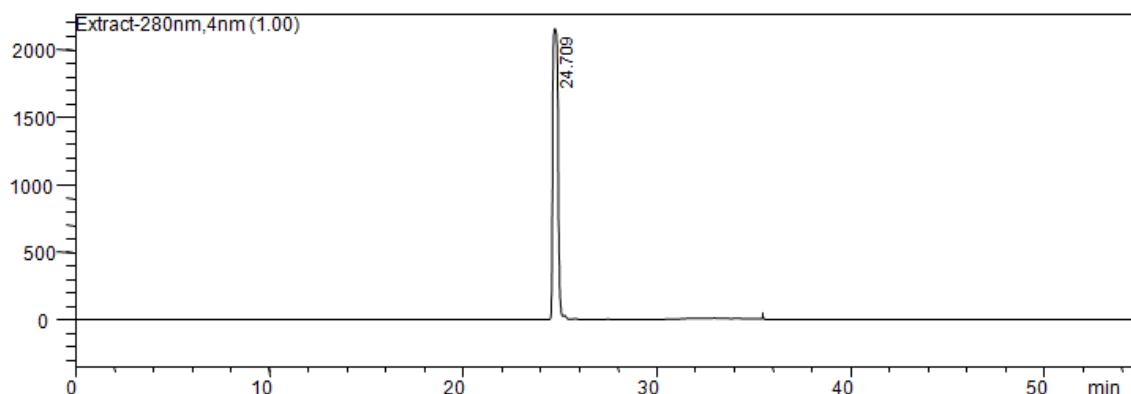


Figura 4.22. Análise por CLAE da 5'-metoxiporosina.

A comparação das análises por CLAE entre as amostras controle (extrato enzimático e tampão MES) (Figura 4.23) com as frações enzimáticas, não mostraram o acoplamento do *E*-isoeugenol e do 5-metoxi-eugenol nas neolignanas di-hidrobenzofurânicas. Foram observados apenas os sinais referentes aos compostos da fração enzimática e dos precursores (Figura 4.24).

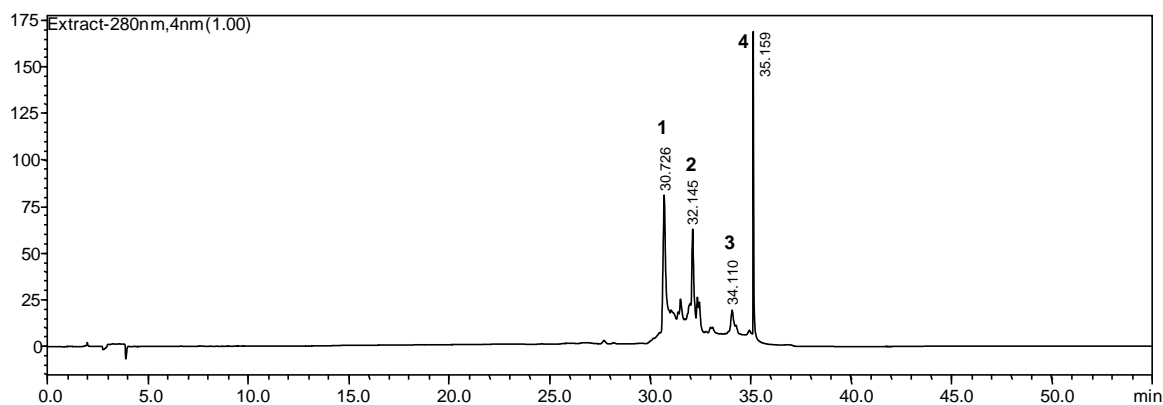


Figura 4.23. Análise por CLAE da amostra controle (extrato enzimático e tampão MES). (1); (2); (3) e (4) substâncias presentes na fração enzimática.

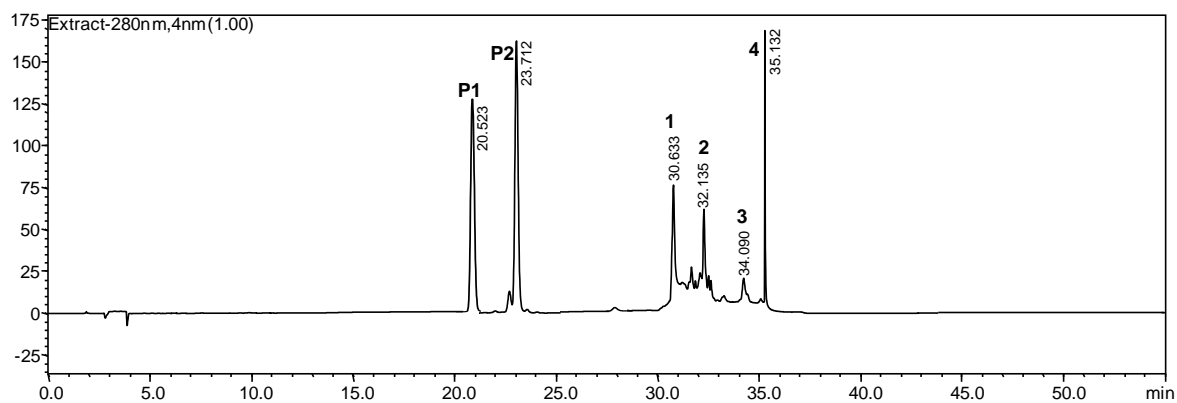


Figura 4.24. Análise por CLAE da reação de bioconversão do *E*-isoeugenol e do 5-metoxi-eugenol. (1); (2); (3) e (4) substâncias presente na fração enzimática; (P1) Precursor 1: 5-metoxi-eugenol; (P2) Precursor 2: *E*-isoeugenol.

4.5 Amplificação e seqüenciamento do gene de proteína dirigente

Objetivando um estudo das relações filogenéticas entre espécies que produzem lignanas ou neolignanas, foi escolhido um marcador envolvido na etapa de dimerização. Nesse caso, a escolha recaiu sobre a Proteína Dirigente, cuja sequência foi descrita a partir de estudos biossintéticos de lignanas que ocorrem em espécies de *Forsythia* (Davin *et al.*, 1997).

4.5.1. Quantificação do DNA

As amostras de DNA total extraídas foram quantificadas (**Tabela 4.5, Figura 4.25**) e submetidas a reações de amplificação em termociclador para a região de proteína dirigente do DNA nuclear, empregando-se os iniciadores descritos no item 3.7.1.

Tabela 4.5 Quantificação do DNA de *O. catharinensis* e *O. macrophylla*

Amostra	Concentração (ng/ μ L)
<i>O. catharinensis</i> 1 (OC 1)	877,0
<i>O. macrophylla</i> 1 (OM 1)	740,0
<i>O. macrophylla</i> 2 (OM 2)	683,0

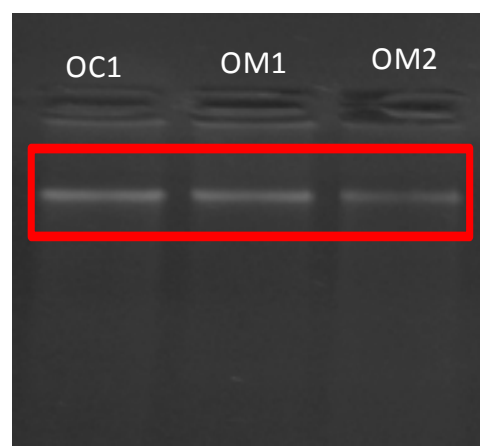


Figura 4.25 Quantificação do DNA total em gel de agarose 1%

Para amplificação do gene da proteína dirigente foi utilizado como controle negativo (C-) o mix de reação (**item 3.7.2**) sem a amostra de DNA e como controle positivo (C+) o DNA das folhas da espécie de *Piper solmsianum* (K-487), previamente amplificada e seqüenciada para o mesmo gene. Pela análise do gel de

agarose no transluminador, foi observada a amplificação da banda referente ao gene de proteína dirigente em *O. catharinensis* e *O. macrophylla* (**Figura 4.26**).

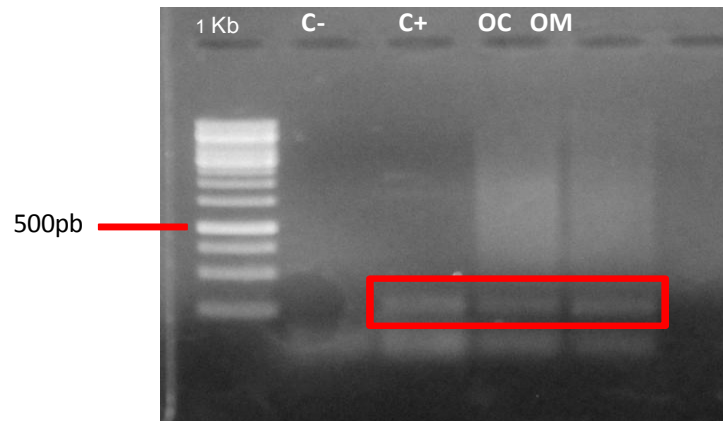


Figura 4.26. Amplificação da região do DNA com iniciador de proteína dirigente. Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder; controle negativo (C-); controle positivo (C+); *O. catharinensis* (OC); *O. macrophylla* (OM).

Para a análise das seqüências e construção da matriz foram incluídas 4 seqüências de *Piper*, 15 seqüências de proteína dirigente obtidas do genBank e uma seqüência de *O. catharinensis* e outra de *O. macrophylla*, totalizando 21 espécies. As seqüências foram alinhadas utilizando MEGA[®] versão 5.05 e modificadas através de inspeção visual (**Figura 4.27**).



Figura 4.27. Matriz alinhada através do programa MEGA[®] versão 5.05.

4.5.2. Filogenia baseada em proteína dirigente

A reconstrução dos caracteres moleculares foi realizada sobre a árvore obtida pelo método da máxima parcimônia, para testar afinidades evolutivas (**Figura 4.28**).

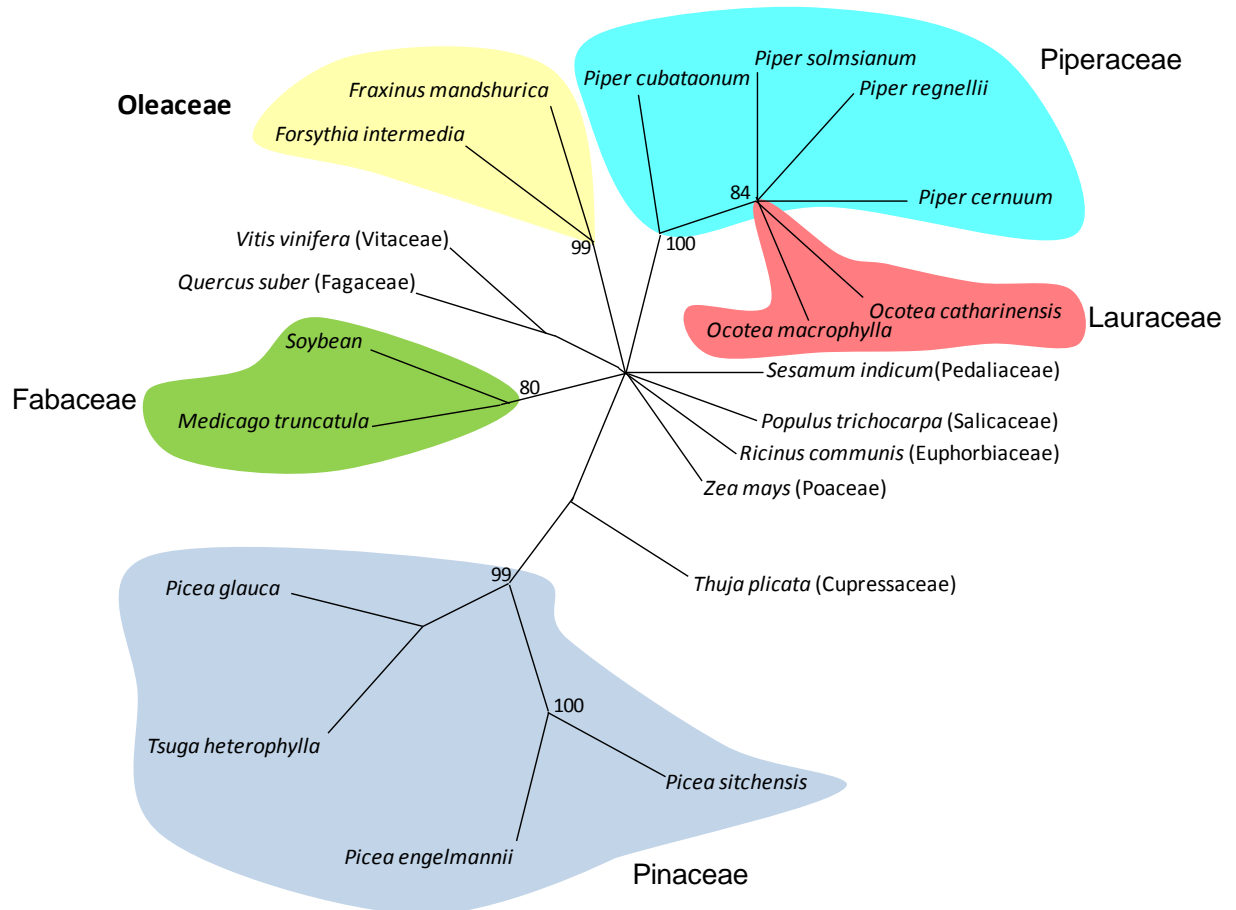


Figura 4.28 Árvore filogenética não enraizada baseada nas seqüências de nucleotídeos do gene de proteína dirigente. Análise por Máxima Parcimônia. Busca heurística; bootstrap:1000; comprimento da árvore: 582 passos; índice de consistência (CI): 0.5241; índice de homoplasia (HI): 0.4759; índice de retenção (RI):0.6326; número de caracteres informativos: 292. As famílias dos táxons analisados estão representadas por cores.

Analisando-se a relação evolutiva entre as espécies que apresentam genes de proteínas dirigentes, foi observado que as espécies da família Piperaceae compartilham um ancestral comum com as espécies de *O. catharinensis* e *O. macrophylla* (Lauraceae) formando assim, um grupo monofilético. Esta observação

foi confirmada pelo elevado valor de bootstrap (84%), indicando que existe um alto grau de conservação da região que codifica proteínas dirigentes em tais espécies. As hipóteses filogenéticas indicam que a presença de tais proteínas pode ter sido uma tendência adquirada durante o processo evolutivo. A habilidade de produzir os mesmos genes que codificam proteína dirigente pode ter sido originada independentemente em duas ou mais plantas que não pertencem ao mesmo clado (Felsenstein, 1998; Pichersky e Gang, 2000; Ralph *et al.*, 2007) como neste caso das espécies de *Piper* e *Ocotea*. Na família Pinaceae também foi observado grupo monofilético entre *P. sitchensis* e *P. engelmannii* com valor de bootstrap de 100%.

Ainda sob o aspecto evolutivo, as proteínas dirigentes estariam envolvidas desde o processo de adaptação das plantas do meio aquático para o terrestre, uma vez que o sucesso desta adaptação evolutiva foi alcançado devido a formação de compostos fenólicos derivados da via fenilpropanoídica (e tais proteínas estariam envolvidas no acoplamento oxidativo entre unidades C₆C₃ oriundas desta via) que ao contrário das outras vias biossintéticas que atuam tanto em plantas aquáticas quanto terrestres, esta via precursora das ligninas, se manifesta apenas em plantas terrestres. As ligninas são responsáveis pela flexibilidade e resistência mecânica da parede celular (Davin e Lewis, 2000; Pichersky e Gang, 2000; Wu *et al.*, 2009).

As espécies *O. catharinensis* e *O. macrophylla* produzem neolignanas dihidrobenzofurânicas (Haraguchi *et al.*, 1983; Lordello *et al.*, 1997; Coy-Barrera *et al.*, 2009; Funasaki *et al.*, 2009; Coy-Barrera e Cuca-Suaréz, 2011) e, portanto, estes dados dão suporte para a proposta de que estas, seriam formadas pelo acoplamento oxidativo cruzado entre unidades de propenil- e alilfenóis, mediados por tais proteínas.

4.6. Amplificação e seqüenciamento da região ITS

4.6.1 Alinhamento da matriz e análise filogenética da região ITS

Para a construção da matriz foram incluídas quatro seqüências da região de ITS descritas pela primeira vez, das seguintes espécies: *O. catharinensis*, *Ocotea macrophylla*, *Aniba parviflora* e *Licaria rodriguesii*, 69 seqüências de espécies de Lauracea e obtidas do GenBank e três seqüências inseridas como grupo externo, totalizando 76 espécies. As seqüências foram alinhadas utilizando o programa MEGA[®], versão 5.05 e modificadas através de inspeção visual (**Figura 4.29**).





Figura 4.29. Matriz alinhada através do programa MEGA[®] versão 5.05

Após o alinhamento da matriz, chamou atenção a presença de grandes regiões de inserções e deleções (**Figura 4.29**) referentes às regiões ITS1 e ITS2 que evoluem rapidamente, por isso são muito usadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (White *et al.*, 1990). Também se pode observar a subunidade 5,8S, inserida entre as regiões ITS, cuja área é altamente conservada evolutivamente (Baldwin *et al.*, 1995).

A sistemática de Lauraceae não é bem definida. Classificações de táxons desta família baseados em dados morfológicos ainda precisam ser exploradas, assim como a utilização efetiva dos resultados na construção da taxonomia (Chanderbali *et al.*, 2001; Wheeler, 2004).

O gênero *Ocotea* tem surgido das análises filogenéticas de Chanderbali *et al.* (2001) como um clado complexo. Esse gênero é composto por cerca de 350 espécies e apesar do acúmulo de dados filogenéticos, a ligação entre filogenia e taxonomia, que resultaria numa classificação filogenética das espécies deste gênero, ainda não foi estabelecida (Chanderbali *et al.*, 2001). Como se pode observar as espécies deste táxon ainda não formam um grupo monofilético bem resolvido (**Figura 4.30**).

Analisando-se a relação evolutiva entre as espécies desse gênero foi verificado a formação de grupos monofiléticos entre espécies de *Ocotea*, como no caso das espécies de *O. catharinensis* e *O. macrophylla* que estão agrupadas juntamente com outras espécies do gênero que pode ser confirmado pelos consistentes valores de bootstrap em 81% (**Figura 4.30**). Além disso, pode-se observar que estas duas espécies produzem essencialmente lignanas e neolignanas (Haraguchi *et al.*, 1983; Lordello *et al.*, 1997; Coy-Barrera *et al.*, 2009; Funasaki *et al.*, 2009; Coy-Barrera e Cuca-Suaréz, 2011). *Licaria rodriguesii*, também foi distribuída em um clado previamente determinado suportado pelo alto valor de bootstrap (99%).

A combinação dos dados moleculares da região ITS do DNA nuclear com os de outras regiões do DNA, como a região *matK*, por exemplo, juntamente com dados químicos, tornou-se uma ferramenta poderosa para resolver espécies e gerar hipóteses sobre divergências ancestrais e evolutivas. Além disso, também têm aumentado o número de informações na pesquisa de produtos naturais, pois pode ser utilizada como um guia para a detecção e o isolamento novas variantes de substâncias com potencial bioativo (Engene *et al.*, 2011).

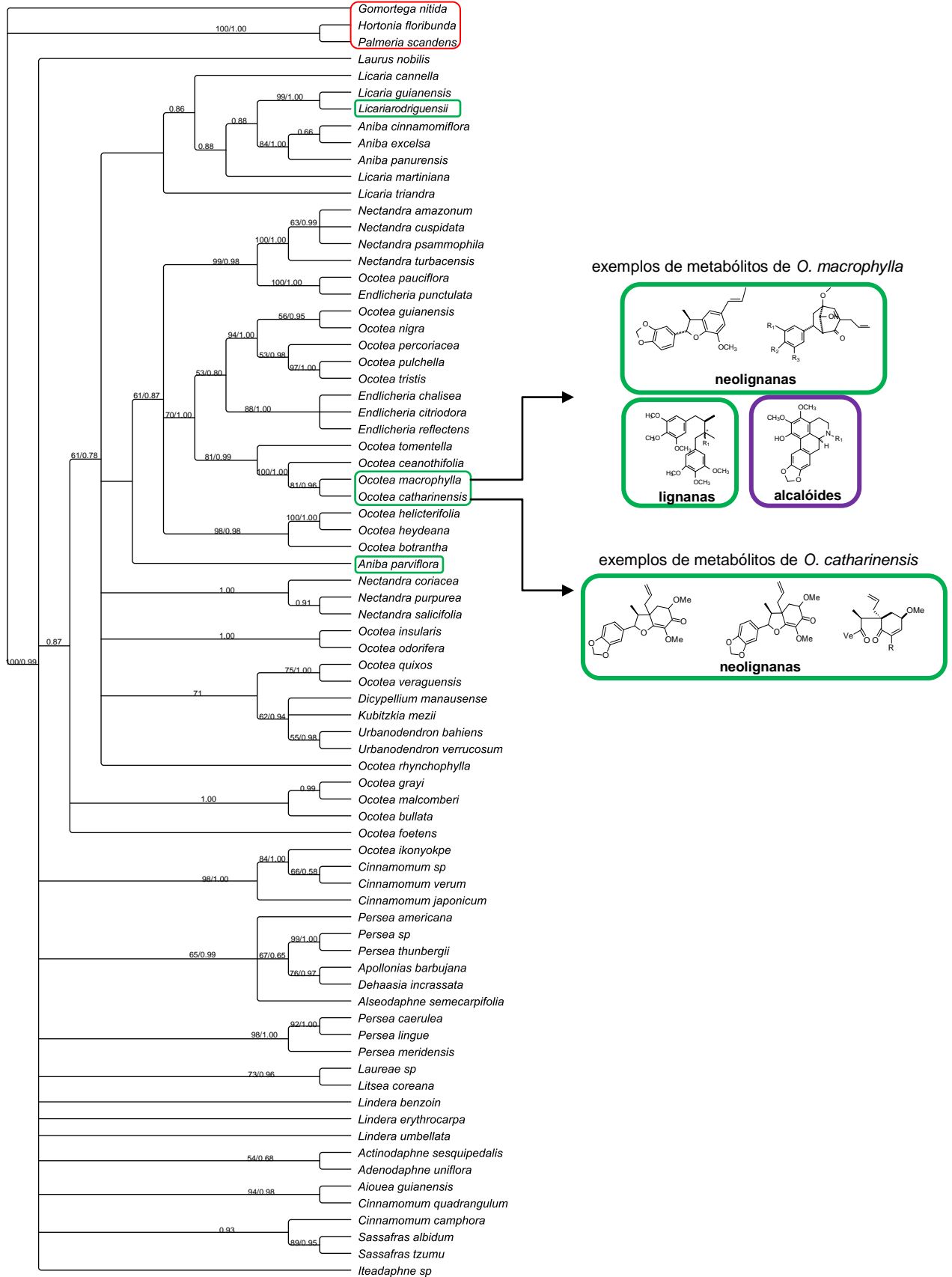


Figura 4.30. Árvore mais parcimoniosa baseada em sequências de ITS de espécies de Lauraceae. Gomortega, Hordonia e Palmeria foram usadas como grupos externos (em vermelho). Dígitos acima dos ramos: valores de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia/valores de probabilidades posteriores da análise Bayesiana. Número total de caracteres da matriz: 693, dos quais 65 foram eliminados. Análise por Máxima Parcimônia: Busca heurística; *bootstrap*= 1000; comprimento da árvore = 1199 passos; índice de consistência (CI) = 0,5179; índice de homoplasia (HI) = 0,4821; índice de retenção (RI) = 0,6560; algoritmo branch-swapping: tree-bisection-reconnection (TBR); número de caracteres informativos: 245; 250 caracteres constantes. *Score* das melhores árvores encontradas: 1199. Análise Bayesiana: busca MCMC; modelo evolutivo: General Time Reversible + Proportionin variant + Gamma (GTR+I+G); Burn in= 89000. Em verde, destacam-se as novas espécies com ITS amplificado.

5. CONCLUSÕES

Análises por espectrometria de massas detectaram o enriquecimento com carbono treze com os isotopômeros de *L*-fenilalaninas neolignanas 5'-metoxiporosina e armenina B. Análises por RMN de ^{13}C confirmaram a posição exata do carbono enriquecido com ^{13}C na estrutura das neolignanas. Estes resultados mostraram que ocorreu incorporação intacta de duas moléculas de fenilalanina, nas respectivas neolignanas sem descarboxilação ou degradação da cadeia lateral do aminoácido, confirmando a proposta de Gottlieb 1972, de que neolignanas seriam provenientes da via fenilpropanoídica.

A investigação biossintética envolvendo um precursor de caráter mais especializado na via, mostrou a incorporação de duas moléculas do acetato de [8- ^{13}C]-coniferila na neolignana 5'-metoxiporosina. Este resultado foi novamente confirmado nos ensaios de conversão enzimática, quando o acetato de coniferila foi convertido em *E*-isoeugenol o qual é considerado precursor intermediário para a formação de neolignanas di-hidrobenzofurânicas.

A análise filogenética de diversas espécies de Lauraceae indicou que espécies do gênero *Ocotea*, produzem essencialmente lignanas e neolignanas. Essas análises são promissoras para o rastreamento de metabólitos secundários na descoberta de novas substâncias bioativas.

O estudo dos genes responsáveis pelas enzimas envolvidas na biossíntese de neolignanas di-hidrobenzofurânicas nos embriões de *O. catharinensis*, conduziu às primeiras informações sobre a presença de proteína dirigente em *O. catharinensis* e *O. macrophylla*. A análise filogenética comparando-se as seqüências de proteína dirigente de *Ocotea* e de diferentes gêneros de plantas indicaram um clado distinto formado por espécies de *Ocotea*, mostrando que as proteínas dirigentes que

ocorrem nas espécies de *Ocotea* diferenciam-se das proteínas das outras espécies estudadas. Estes resultados fornecem subsídios que apóiam a proposta de que neolignanas di-hidrobenzofurânicas seriam oriundas do acoplamento oxidativo entre unidades radicalares de *E*-isoeugenol e 5-metóxi-eugenol, cuja proteína seria responsável pela regio- e estereoespecificidade da reação de acoplamento.

Com base neste estudo, foi possível propor algumas etapas envolvidas na biossíntese de neolignanas que antes eram apenas hipóteses (**Figura 5.1**).

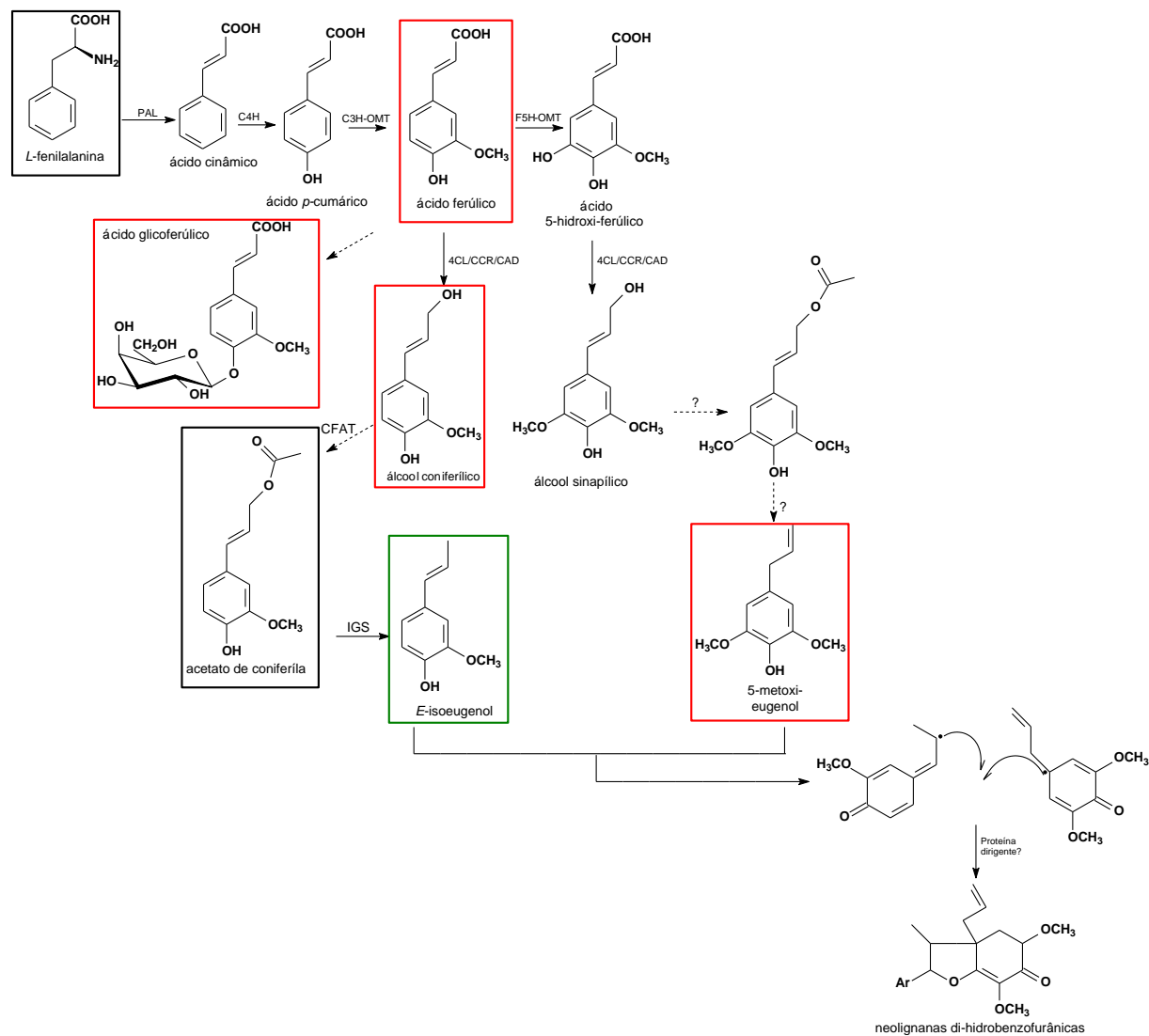


Figura 5.1. Proposta biossintética de neolignanas di-hidrobenzofurânicas em culturas de embriogênicas de *O. catharinensis*. Precursores testados e incorporados (preto). Precursores testados (vermelho). Produto observado (verde).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiba C.J., Gottlieb O.R., Maia J.G.S., Pagliosa F.M., Yoshida M. (1978) Chemistry of Brazilian Lauraceae .52. Benzofuranoid neolignans from *Licaria-armeniaca*. *Phytochemistry* 17:2038-2039.
- Aiba C.J., Gottlieb O.R., Pagliosa F.M., Yoshida M., Magalhaes M.T. (1977) Chemistry Brazilian Lauraceae .37. Neolignans from *Nectandra-miranda*. *Phytochemistry* 16:745-748.
- Aldrich, J., Cullis, C. A. (1993) RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaq 1 DNA polymerase, chelex 100, and gel purification of genomic DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 11:128-141.
- Alvarenga, M. A.; Castro, O.; Gottlieb, O. R. (1977) Bicyclo[3,2,1]octanoid neolignans from *Aniba simulans*. *Phytochemistry*, 16, 1801-1804.
- Anterola, M.A.; Lewis, N.G. (2002) Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry*, 61, 221-294.
- Baldwin B. G. S., M. J. , Porter, J. M. , Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. , Donoghue, M. J. . (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82:247-277.
- Barkman T.J. (2001) Character coding of secondary chemical variation for use in phylogenetic analyses. *Biochemical Systematics and Ecology* 29:1-20.
- Bastos E.L. (2004) Mecanismos e aplicações de quimiluminescência de peróxidos cíclicos, Instituto de Química, USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 60-61.
- Bastos E.L., Ciscato, L. F. M. L. , Baader, W. J. . (2005) Microwave-Assisted Protection of Phenols as tert-Butyldimethylsilyl (TBDMS) Ethers Under Solvent-Free Conditions. *Synthetic Communications* 35:1501–1509.
- Birch A.J. (1973) Biosynthetic pathways in chemical phylogeny. Research School of Chemistry, Australian National University, Canberra:17-38.
- Boschi, D.; Tron, G. C.; Lazaratto, K. (2006) NO-Donor phenols: a new class of products endowed with antioxidant and vasodilatador properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 2886-2897.
- Chanderbali, A. S., H. V. D. Werff, et al. (2001). "Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes." *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 104-134.
- Dasilva W.D., Brazfilho R., Gottlieb O.R. (1989) The chemistry of Brazilian Lauraceae .88. Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea-costulatum*. *Phytochemistry* 28:661-662.
- Dass C. (2007) Fundamentals of contemporary mass spectrometry. A John Wiley & Sons, inc., publication 1:542-545.
- David J.M., Yoshida I.M., Gottlieb O.R. (1994a) The chemistry of Brazilian Lauraceae .103. Phenylpropanoid-catechins from bark of *Ocotea-porosa*. *Phytochemistry* 35:545-546.
- David J.M., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1994b) Neolignans from bark and leaves of *Ocotea-porosa*. *Phytochemistry* 36:491-499.
- Davies T.J., Barraclough T.G., Chase M.W., Soltis P.S., Soltis D.E., Savolainen V. (2004) Darwin's abominable mystery: Insights from a supertree of the angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Davin, L. B.; Wang, C. Z.; Helms, G. L.; Lewis, N. G. (2003) [¹³C]-Specific labeling of 8-2' linked (-)-cis-blechnic, (-)-trans-blechnic and (-)-brainic acids in the fern *Blechnum spicant*. *Phytochemistry*, 62, 501-511.
- Davin, L.B.; Lewis, N.G. (2000) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignin and lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, 123, 453-461.

- Davin, L.B.; Lewis, N.G. (2005) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignin and lignin biosynthesis. *Current Opinion Biotechnology*, 16, 407-415.
- Davin, L.B.; Wang, H.B.; Crowel A.L.; Bedgar, D.L.; Martins, D.M.; Sarkanen, S.; Lewis, N.G. (1997) Stereoselective biomolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science*, 275, 362-366
- Decarvalho M.G., Yoshida M., Gottlieb O.R., Gottlieb H.E. (1988) The chemistry of brazilian lauraceae .86. Bicyclooctanoid, carinatone and megaphone type neolignans from *Ocotea-porosa*. *Phytochemistry* 27:2319-2323
- Dewick, P.M. 2001. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Chichester: 2ª ed. John Wiley & Sons, Ltda, 135-136p.
- Dias D.A., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1986) The chemistry of brazilian lauraceae .80. Further neolignans from *Ocotea-porosa*. *Phytochemistry* 25:2613-2616.
- Dixon, R. A., Sumner, L. W., Mendes, P. (2003) Plant metabolomics: large scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62, 817-836.
- Dixon, R. A.; Chen F.; Guo, D.; Parvathi, K. (2001) The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry*, 57, 1069-1084.
- Dixon, R. A.; Reddy, M. S. S. (2003) Biosynthesis of monolignols. *Genomic and reverse genetic approaches. Phytochemistry Reviews*, 2, 289–306.
- Doyle J.A., Endress, P. K. (2000) Morphological phylogenetic analysis of basal angiosperms: comparison and combination with molecular data. *International Journal of Plant Sciences* 161:121–153.
- Elsalam K.A., Alin, I. N., Abdel-Satar, M. A., Verret, J. A. (2003) PCR Identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data *African Journal of Biotechnology* 2:82-85.
- Engene N., Choi H., Esquenazi E., Byrum T., Villa F.A., Cao Z., Murray T.F., Dorrestein P.C., Gerwick L., Gerwick W.H. (2011) Phylogeny-guided isolation of ethyl tumonoate A from the marine cyanobacterium cf. *Oscillatoria margaritifera*. *Journal of Natural Products* 74:1737-1743.
- Farrell, R. E. J. (2010). RNA methodologies - A laboratory guide for isolation and characterization. San Diego, USA, Elsevier.
- Felicio J.D., Motidome M., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1986) The chemistry of brazilian Lauraceae .77. Further neolignans from *Ocotea-aciphylla*. *Phytochemistry* 25:1707-1710.
- Ferreira M.G., Grattapaglia D. (1996) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen, Brasília
- Ferrer J.L., Austin, M.B., Stewart, C. J., Noel, J.P. (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:356-370.
- Franca N.C., Giesbrecht A.M., Gottlieb O.R., Magalhaes A.F., Magalhaes E.G., Maia J.G.S. (1975) Chemistry of Brazilian Lauraceae .32. Benzylisoquinolines from *Ocotea* species. *Phytochemistry* 14:1671-1672.
- Funasaki M. (2006) Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundário de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae), Instituto de Química, USP., Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Funasaki M., Lordello A.L.L., Viana A.M., Santa-Catarina C., Floh E.I.S., Yoshida M., Kato M.J. (2009) Neolignans and Sesquiterpenes from Leaves and Embryogenic Cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20:853-859.
- Gamez M.J., Jimenez J., Navarro C., Zarzuelo A. (1990) Study of the essential oil of *Lavandula-dentata* L. *Pharmazie* 45:69-70.
- Gang, D. R., M. A. Costa, et al. (1999). Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chemistry & Biology* 6(3): 143-151.

- Gomes M., Yoshida M., Gottlieb O.R., Martinez J.C., Gottlieb H.E. (1983) The chemistry of brazilian Lauraceae .66. Bicyclo(3.2.1)octane neolignans from an *Ocotea* species. *Phytochemistry* 22:269-273.
- Gottlieb O.R. (1989) The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. *Phytochemistry* 28:2545-2558.
- Gottlieb O.R., Maia J.G.S., Mourao J.C. (1976) Chemistry of brazilian Lauraceae.36. Neolignans from a *Licarias* species. *Phytochemistry* 15:1289-1291.
- Gottlieb, O.R. (1972) Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry* 11, 1537-1570.
- Gottlieb, O.R. (1978). Neolignans. In: *Progress In Chemistry of Organic Natural Products* 35, 1-72.
- Gottlieb, O.R.; Yoshida, M. (1984) Lignóides com atenção à química das neolignanas. *Química Nova*, 7, 250-273.
- Hanson K.R., Wightman, R. H., Staunton, J., Battersby, A. R. (1972) Studies of enzyme mediated reactions. Part 1.I Syntheses of deuterium or tritium-labelled (3S)- and (3R)-phenylalanines: Stereochemical course of the elimination catalysed by L-phenylalanine ammonia-lyase. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1:2355-2364.
- Haraguchi M., Motidome M., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1983) The chemistry of brazilian Lauraceae .69. Neolignans from *Ocotea-catharinensis*. *Phytochemistry* 22:561-563.
- Haworth, R. D. (1942) The chemistry of the lignan group of natural products. *Journal of Chemical Society*, 12, 448-456.
- Herdewijn P., Kiotasakürek M.V. (2007) On Chemistry Leading to Life's Origin. *Chemistry & Biodiversity* 4:539-540.
- Herebian D., Zuhlke S., Lamshoft M., Spiteller M. (2009) Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. *Journal of Separation Science* 32:939-948.
- Ishige M., Motidome M., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1991) The chemistry of brazilian Lauraceae .94. Neolignans from *Ocotea-catharinensis*. *Phytochemistry* 30:4121-4128.
- Jackson D.E., Dewick, P. M. . (1984) Biosynthesis of *Podophyllum* lignans I.Cinnamic acid precursors of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum*. *Phytochemistry* 23:1029-1035.
- Jaramillo, A.; Manos, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* 88, 706-716, 2001.
- Johnson, L. A.; Soltis, D.E.. Plant taxonomists *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in *Saxifragaceae*. *Systematic Botany* 19, 143-156, 1994.
- Katayama, T.; Davin, L. B.; Lewis, N. G. (1992) An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. *Phytochemistry*, 31, 3875-3881.
- Kato M.J., Chu A., Davin L.B., Lewis N.G. (1998) Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. *Phytochemistry* 47:583-591.
- Kelman L.M., Kelman Z. (2003) Archaea: an archetype for replication initiation studies? *Molecular Microbiology* 48:605-615.
- Koeduka T., Fridman E., Gang D.R., Vassão D.G., Jackson B.L., Kish C.M., Orlova I., Spassova S.M., Lewis N.G., Noel J.P., Baiga T.J., Dudareva N., Pichersky E. (2006) Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:10128-10133.
- Koeduka T., Louie G.V., Orlova I., Kish C.M., Ibdah M., Wilkerson C.G., Bowman M.E., Baiga T.J., Noel J.P., Dudareva N., Pichersky E. (2008) The multiple phenylpropene synthases in both *Clarkia breweri* and *Petunia hybrida* represent two distinct protein lineages. *The Plant Journal* 54:362-374.
- Koeduka T., Suzuki, S., Iijima, Y., Ohnishi, T., Suzuki, H., Watanabe, B., Shibata, D., Umezawa, T., Pichersky, E., Hiratake, J. . (2013) Enhancement of production of

- eugenol and its glycosides in transgenic aspen plants via genetic engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436:73-78.
- Kuzoff R.K., Sweere, J. A., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Zimmer, E. A. (1998) The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Molecular Biology and Evolution* 15:251-263.
- Li J., Christophel, D. C. , Conran, J. G., Li, H. W. (2004) Phylogenetic relationships within the 'core' Laureae (Litsea complex, Lauraceae) inferred from sequences of the chloroplast gene matK and nuclear ribosomal DNA ITS regions. *Plant Systematics and Evolution* 246:19–34.
- Lordello A.L.L., Yoshida M. (1997) Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry* 46:741-744.
- Manitto P., Monti, D., Gramatica, P. (1974) Biosynthesis of anethole in *Pimpinella anisum* L. *Tetrahedron Letters* 17:1567 - 1568.
- Marchand P.A., Zajicek J., Lewis N.G. (1997) Oxygen insertion in *Sesamum indicum* furanofuran lignans. Diastereoselective syntheses of enzyme substrate analogues. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 75:840-849.
- Marques M.O.M., Gomes M., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1992) The chemistry of brazilian Lauraceae .98. Bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from *Ocotea-porosa*. *Phytochemistry* 31:275-277.
- Martinez J.C., Maia J.G.S., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1980) Chemistry of brazilian Lauraceae .55. Neolignans from an *Aniba* species. *Phytochemistry* 19:474-476.
- Martins R.C.C. (2002) Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae), Instituto de Química, USP., Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mohri, K.; Yoshida, Y.; Satoh, M.; Isobe, K.; Tsuda, Y. (2003) Synthesis of glycosylcuruminoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51, 1268-1272.
- Moran N.A., McCutcheon J.P., Nakabachi A. (2008) Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics* 42:165-190.
- Moricca S., Ragazzi, A., Kasuga, T., Mitchelson, K. R. . (1998) Detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in cotton tissue by polymerase chain reaction. *Plant Pathology* 47:486-494.
- Moss, G.P. (2000) Nomenclature of lignans and neolignans: (IUPAC recommendations) *Pure and Applied Chemistry*, 72, 1493–1523.
- Moura-Costa P.H., Viana, A. M., Mantell, S. H. (1993) In vitro plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis* an endangered Brazilian hardwood forest. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35:279-286.
- Moussebois C., Dale, J. (1966) A Method of cis,trans-isomerisation of non-conjugated olefins without double-bond migration. *Journal of the Chemical Society* 260-264.
- Nehme, C. J., de Moraes, P. L. R., Tininis, A. G., Cavalheiro, A. J., 2008. *Biochemical Systematics and Ecology* 36:602-611.
- Pichersky, E.; Gang, D. R. (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Science*, 5, 439-445.
- Pleasant L.G. (1982) The voyager mission and the origin of life - selected references. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 12:321-329.
- Ralph J., Lu, F., Morreel, K.C., Messens, E., Boerjanc, W. (2004) Preparation and relevance of a cross-coupling product between sinapyl alcohol and sinapyl p-hydroxybenzoate. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2:2888-2890.
- Ralph J., Zhang, K., Bhuiya, M. W., Pazo, J. R., Miao, Y., Kim, H., Liua, C. J. (2012) An Engineered Monolignol 4-O-Methyltransferase Depresses Lignin Biosynthesis and Confers Novel Metabolic Capability in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24:3135–3152.
- Ralph S.G., Jancsik S., Bohlmann J. (2007) Dirigent proteins in conifer defense II: Extended gene discovery, phylogeny, and constitutive and stress-induced gene expression in spruce (*Picea* spp.). *Phytochemistry* 68:1975-1991.
- Ralph, S.; Park, J. Y.; Bohlmann, J.; Mansfield, S. D. (2006). Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced

- expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp.). *Plant Molecular Biology*, 60, 21-40.
- Reynolds T. (2007) The evolution of chemosystematics. *Phytochemistry* 68:2887-2895.
- Rodrigues D.C., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1992) The chemistry of brazilian Lauraceae .95. Neolignans from *Aniba-ferrea*. *Phytochemistry* 31:271-273.
- Romoff P., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1984) The chemistry of brazilian Lauraceae .76. Neolignans from *Ocotea-aciphylla*. *Phytochemistry* 23:2101-2104.
- Rossi M.H., Yoshida M., Maia J.G.S. (1997) Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. *Phytochemistry* 45:1263-1269.
- Sartorelli, P.; Benevides, P. J. C.; Ellensohn, R. E.; Rocha, M. V. A.; Moreno, F.; Kato, M. J. (2001) Enantioselective conversion of *p*-hydroxypropenylbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. *Plant Science*, 161, 1083-1088.
- Schiaffo, C. E.; Dussault, P. H. (2008) Ozonolysis in solvent/water mixtures: direct conversion of alkenes to aldehydes and ketones. *Journal of Organic Chemistry*, 73, 4688–4690.
- Smit A.J. (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology* 16:245-262.
- Soltis D. E., Mort, M. E., Soltis, P. S., Hibsich-Jetter, C. Zimmer, E. A., Morgan, D. (1999) Phylogenetic relationships of the enzymatic angiosperm family Podostemaceae inferred from 18S rDNA and *rbcl* sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11, 261-272.
- Soltis, P.S., Soltis D. E., Chase, M. W., Mark E., Mort, M. E., Albach, D.C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W., Hoot, S.B., Fay, F.F., Axtell, M., Swensen, S.M., Prince, L.M., Kress, W.J., Nixon, K. C. and Farris, J. S. (2000) Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcl*, and *atpB* sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 133, 381-461.
- Stöckigt J.e.K., M. (1977) Biosynthesis of Lignans Part I . Biosynthesis of Arctiin (3) and Phillyrin (5). *Holzforschung* 31:41-44.
- Suh M.C., Kim M.J., Hur C.G., Bae J.M., Park Y.I., Chung C.H., Kang C.W., Ohlrogge J.B. (2003) Comparative analysis of expressed sequence tags from *Sesamum indicum* and *Arabidopsis thaliana* developing seeds. *Plant Molecular Biology* 52:1107-1123.
- Trevisan L.M.V., Yoshida M., Gottlieb O.R. (1984) The chemistry of brazilian lauraceae .75. Hexahydrobenzofuranoid neolignans from an *Aniba* species. *Phytochemistry* 23:661-665.
- Umezawa, T. (2003) Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2, 371-390.
- Vassão, D. G., D. R. Gang, et al. (2006). "Chavicol formation in sweet basil (*Ocimum basilicum*): cleavage of an esterified C9 hydroxyl group with NAD(P)H-dependent reduction." *Organic & Biomolecular Chemistry* 4(14): 2733-2744.
- Wächtershäuser G. (2007) On the Chemistry and Evolution of the Pioneer Organism. *Chemistry & Biodiversity* 4:584-602.
- Wanke S., Samain M.S., Vanderschaeve L., Mathieu G., Goetghebeur P., Neinhuis C. (2006) Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the *trnK/matK* region (cpDNA). *Plant Biology* 8:93-102.
- Wanke, S., Jaramillo, M. A., Borsch, T., Samain, M. S., Quandt, D., Neinhuis, C., E. F. (2007a) Evolution of Piperales – *matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42, 477-497.
- Wanke, S., Vanderschaeve, G., Mathieu, G., Neinhuis, P., Goetfhebeur, P., Samain, M. S. (2007b) From forgotten taxon to missing link? The position of the genus *Verhuellia* (Piperaceae) revealed by molecules. *Annals of Botany* 99, 1231–1238.
- Wheeler Q.D. (2004) Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 359:571-583.
- White T.J., Bruns T., Lee, S., Taylor, T. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand, David H., Sninsky,

- John J., White, Thomas J. (ed.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, CA. :315-322.
- Wink, M. (2003). "Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective." *Phytochemistry* 64(1): 3-19.
- Wu, R. H.; Wang, L.; Wang, Z.; Shang, H.; Liu, Y.; Zhu, Y.; Qi, D.; Deng, X. (2009) Cloning and expression analysis of a dirigent protein gene from the resurrection plant *Boea hygrometrica*. *Progress in Natural Science*, 19, 347-352.

7. Apêndice A: Espectros dos precursores sintetizados

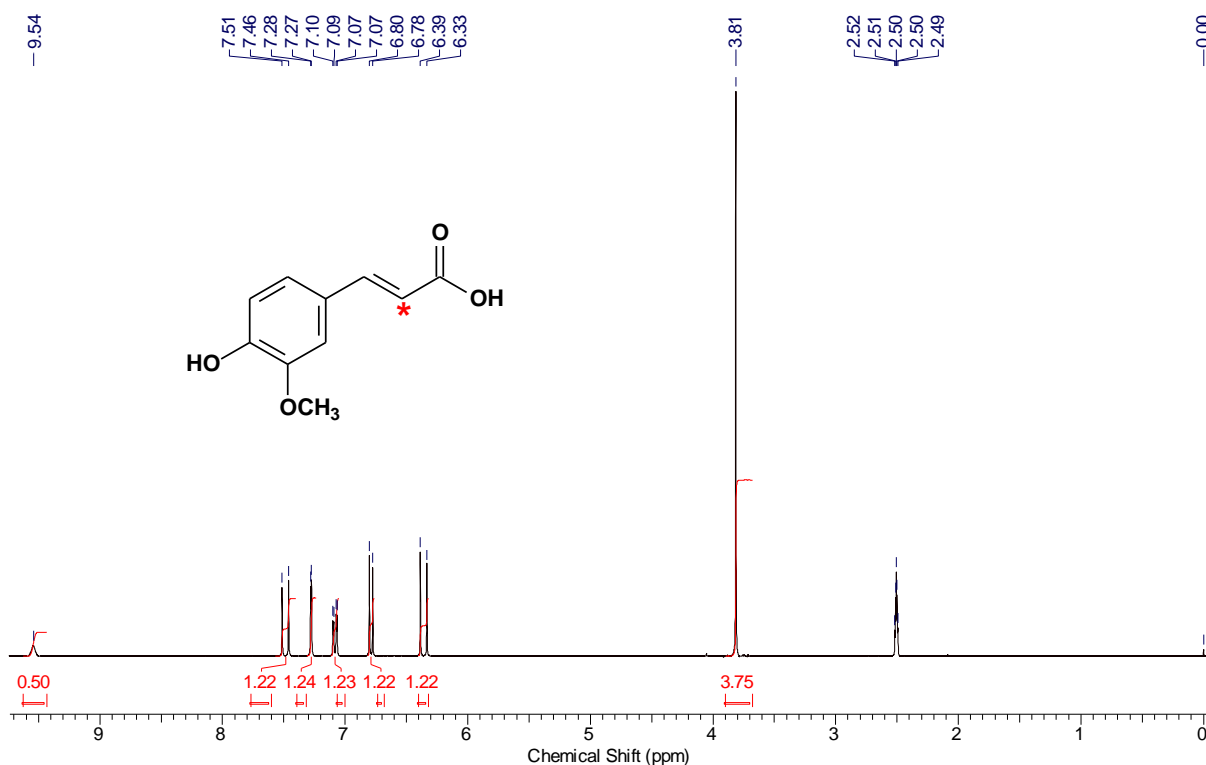


Figura 7.1 Espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) do ácido [8-¹³C]-ferúlico

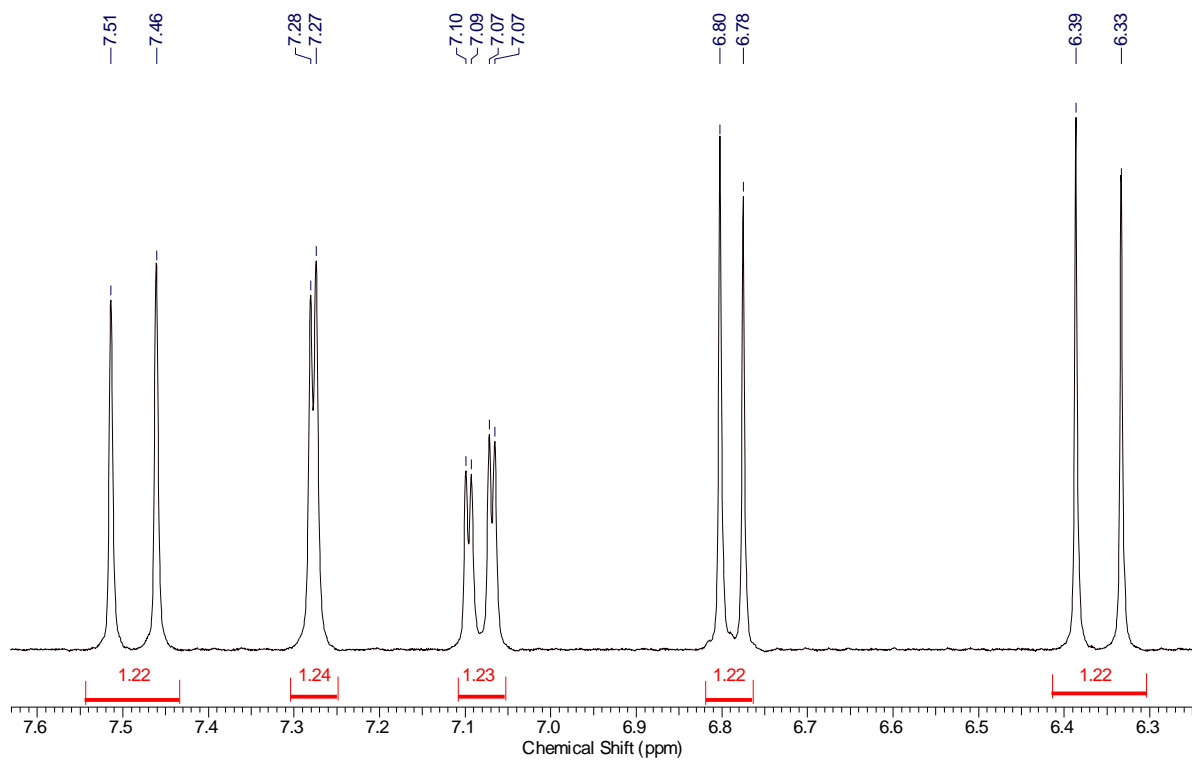


Figura 7.2 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) do ácido [8-¹³C]-ferúlico

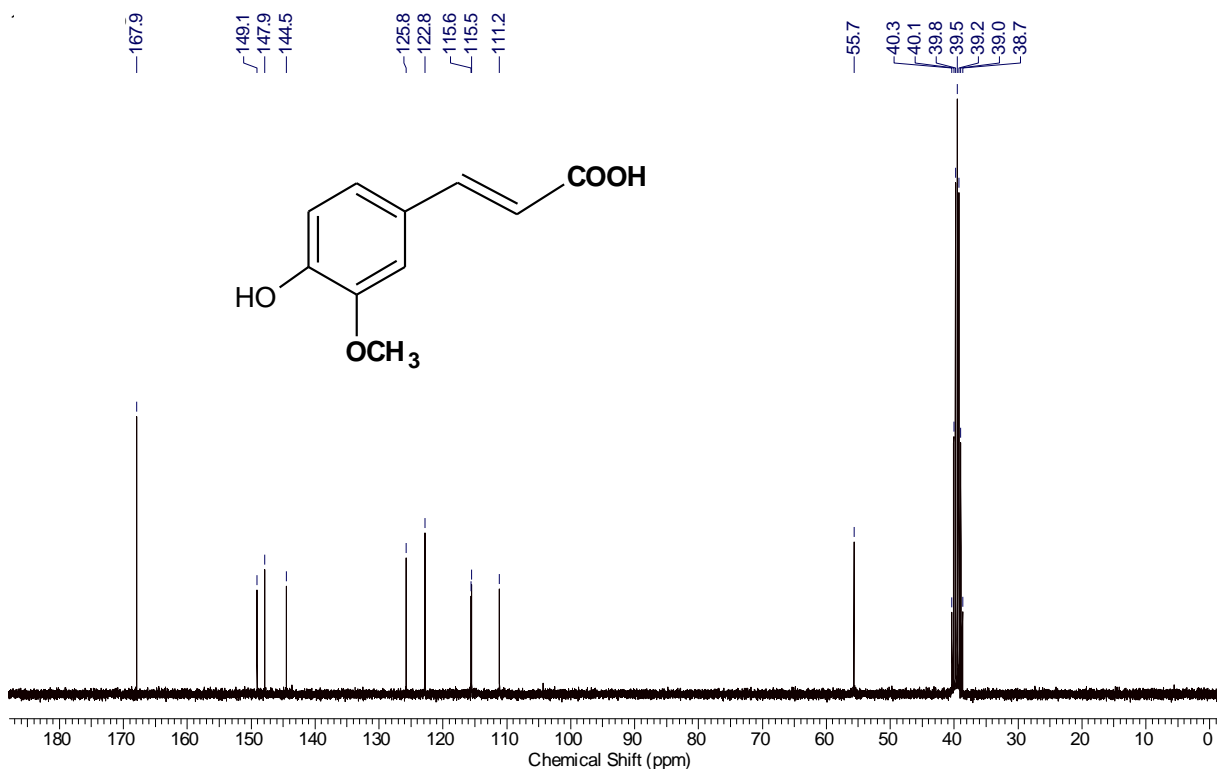


Figura 7.3 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) do ácido ferúlico em abundância natural

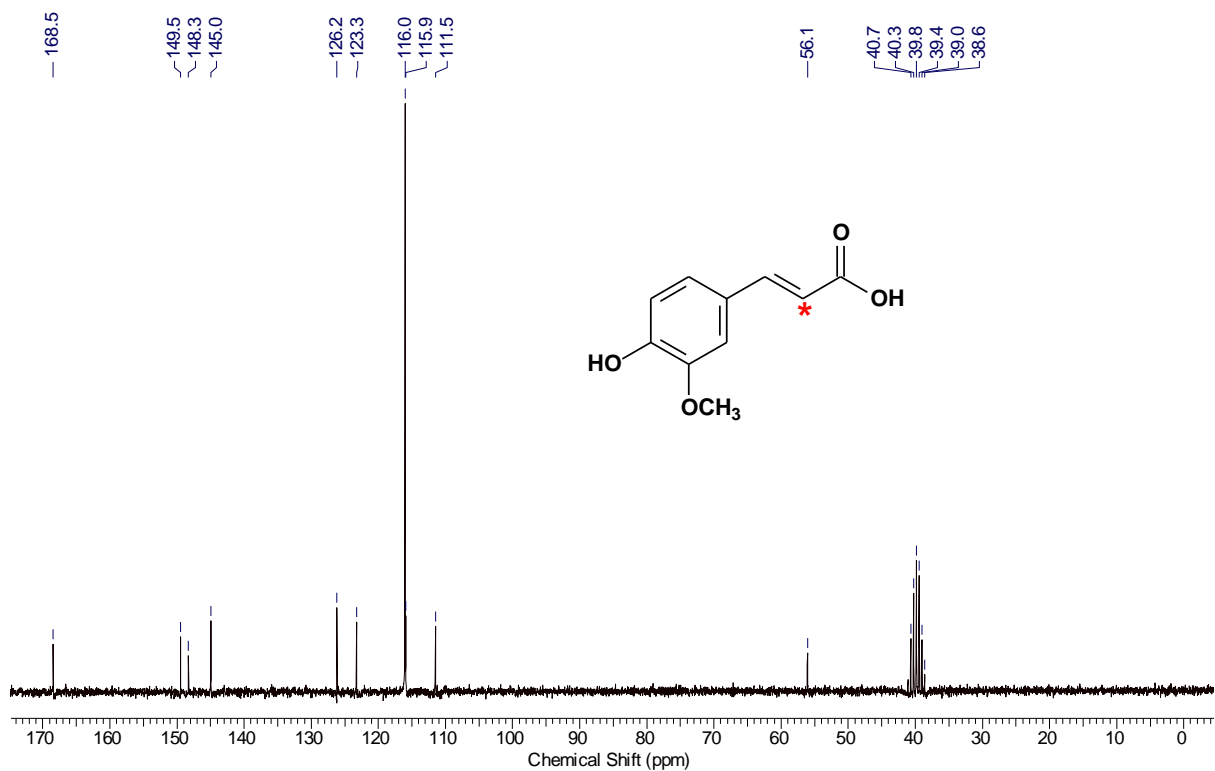


Figura 7.4 Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) do ácido [8- ^{13}C]-ferúlico

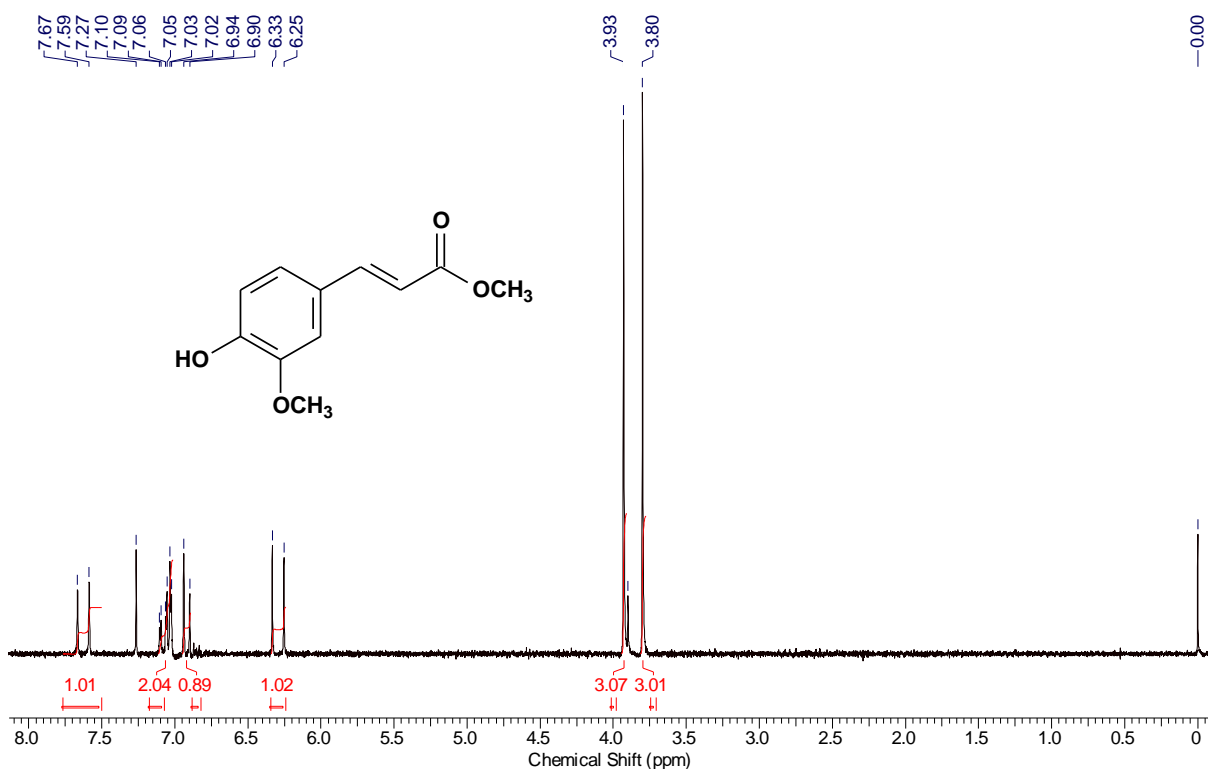


Figura 7.5 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila em abundância natural

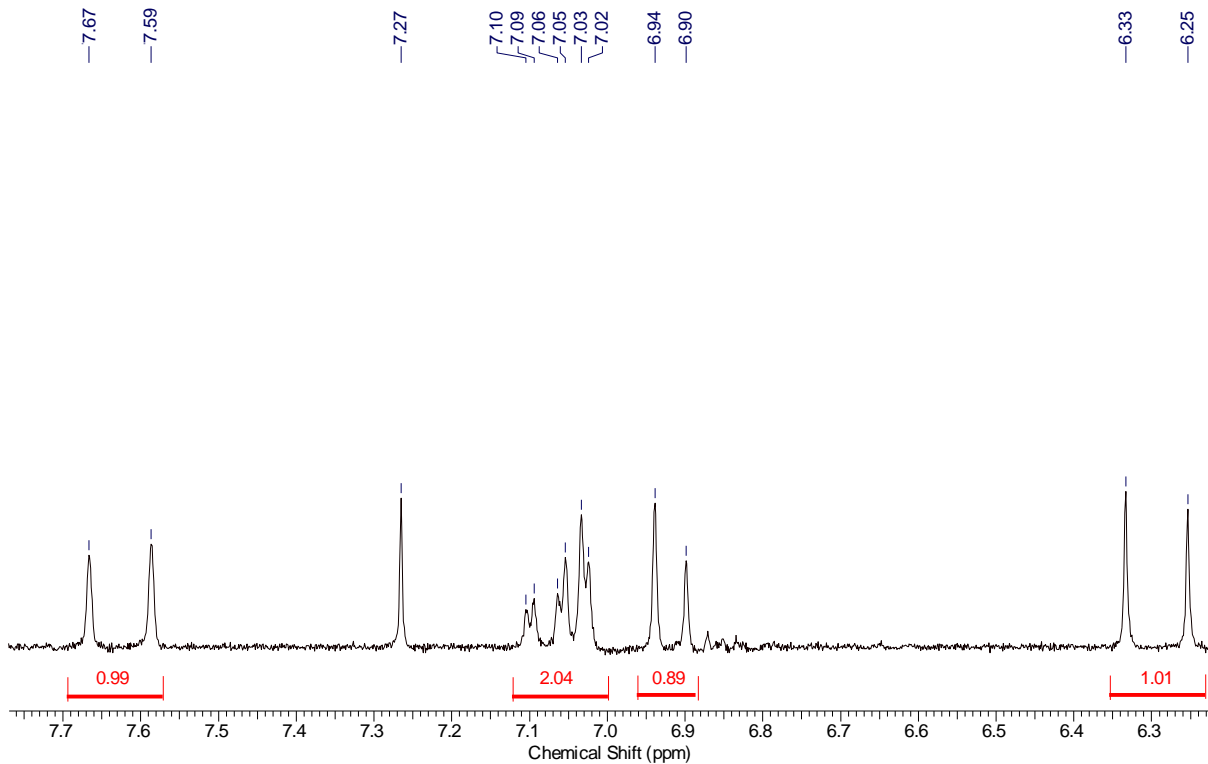


Figura 7.6 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila em abundância natural

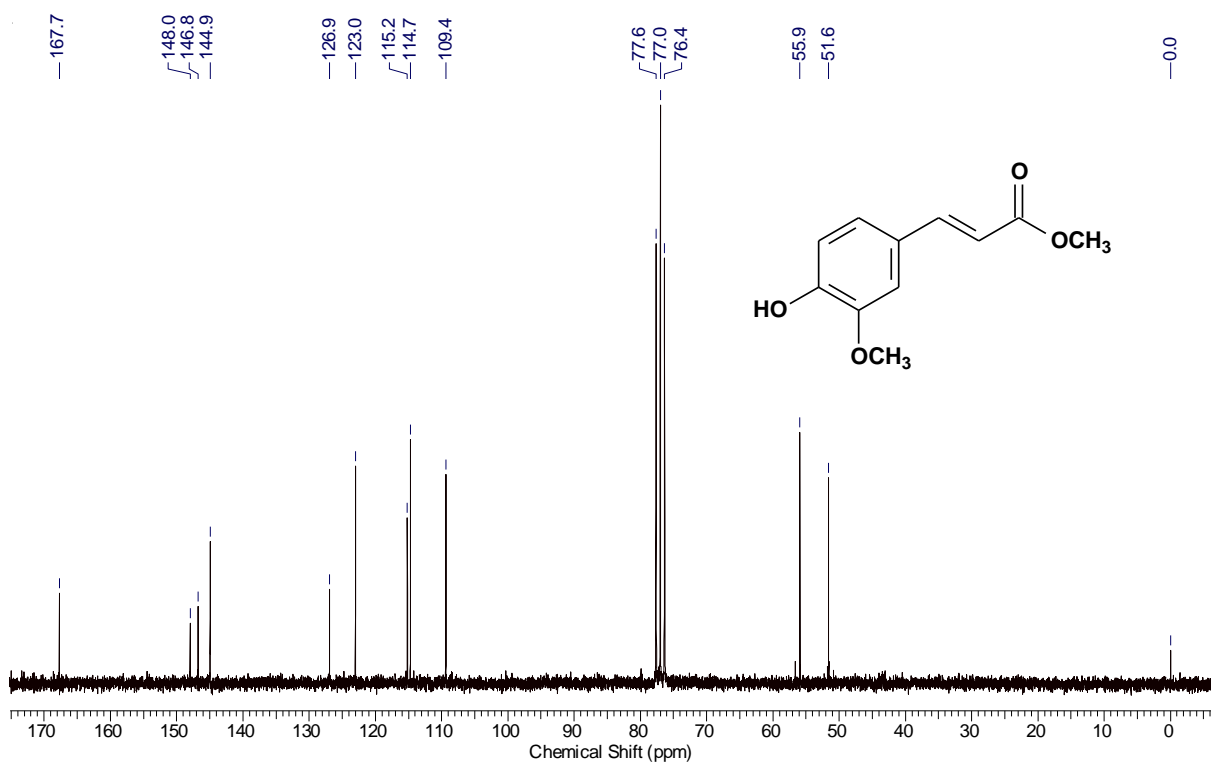


Figura 7.7 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila em abundância natural

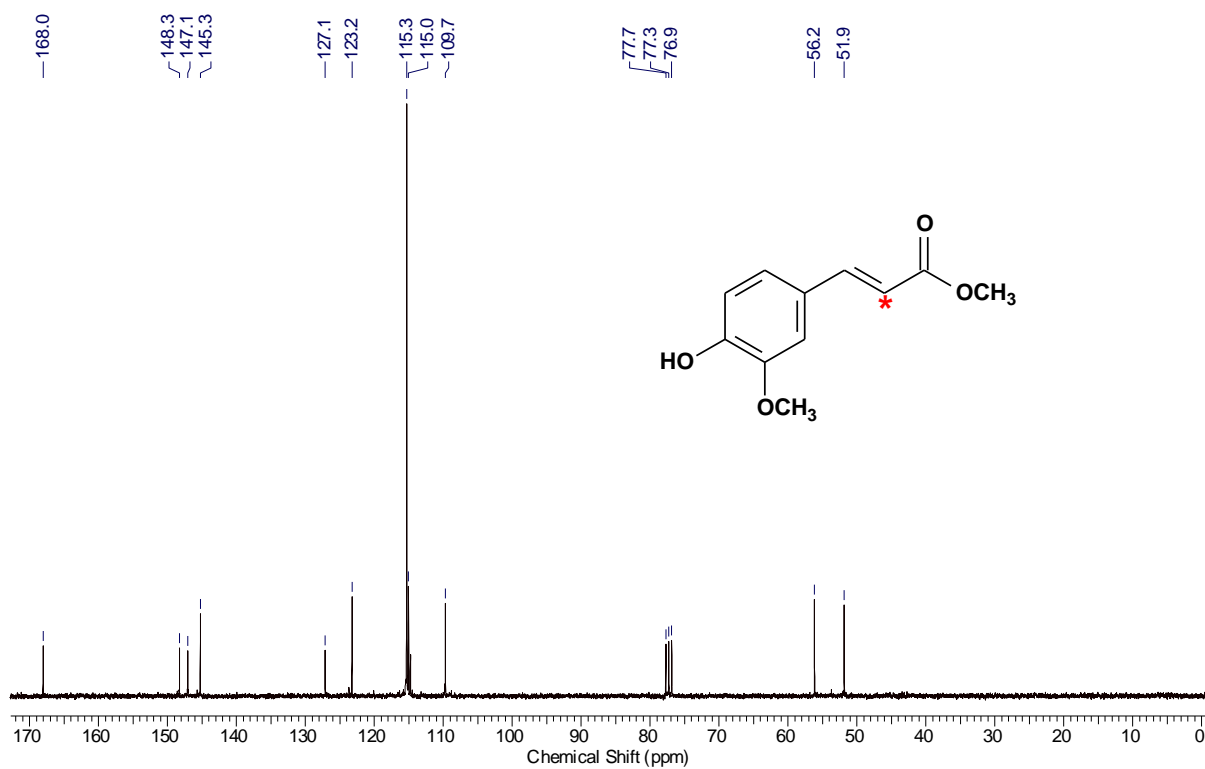


Figura 7.8 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do [8- ^{13}C]-ferulato de metila.

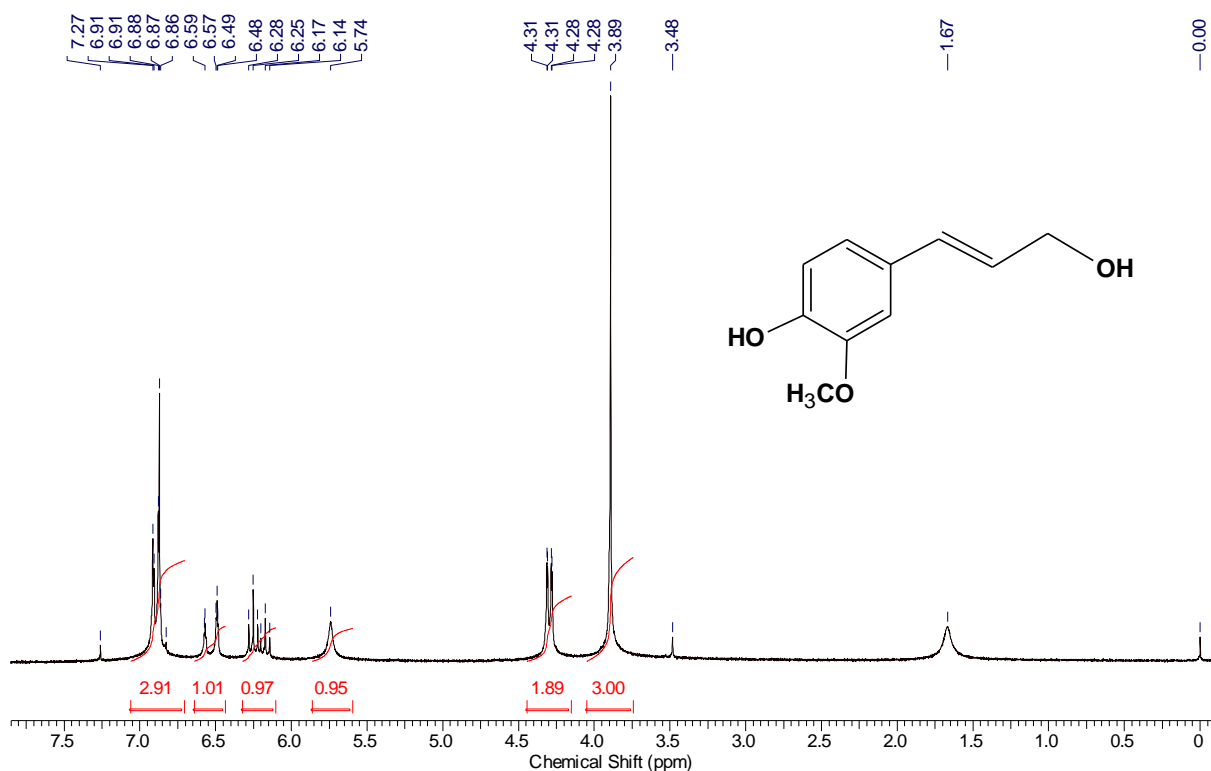


Figura 7.9 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do álcool coniferílico em abundância natural

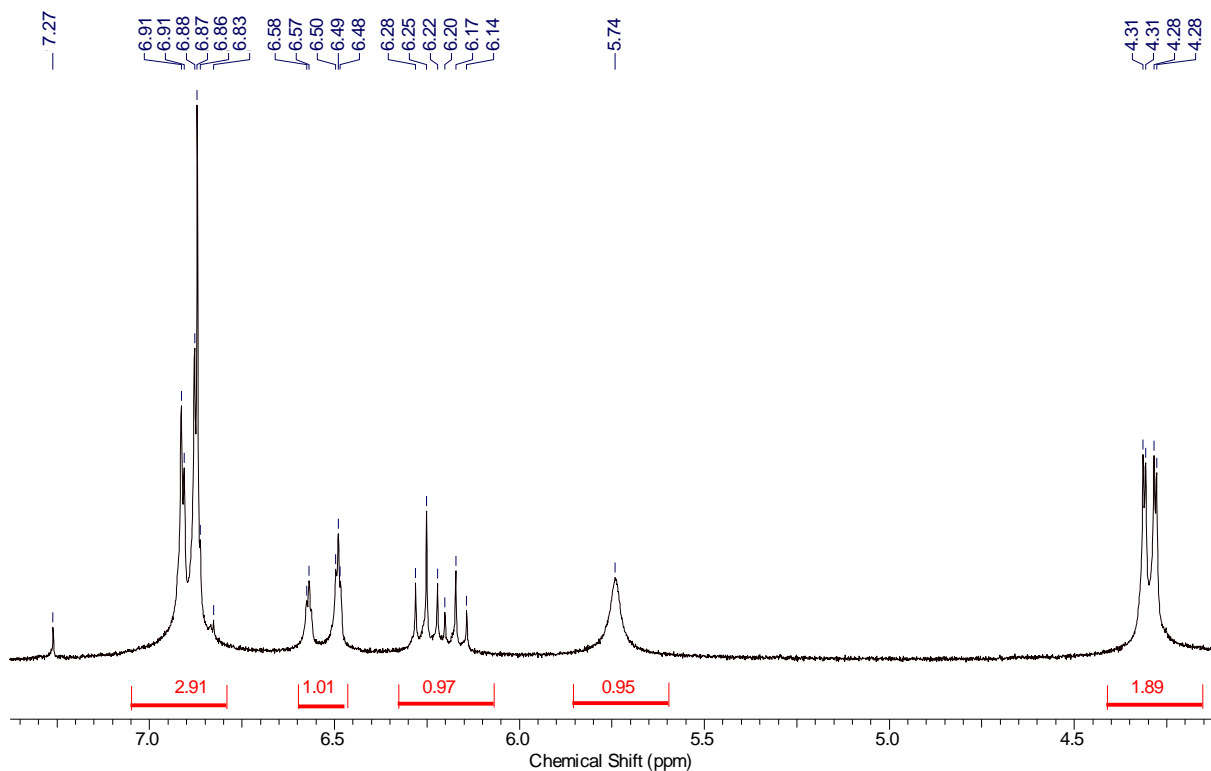


Figura 7.10 Ampliação do Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do álcool coniferílico em abundância natural.

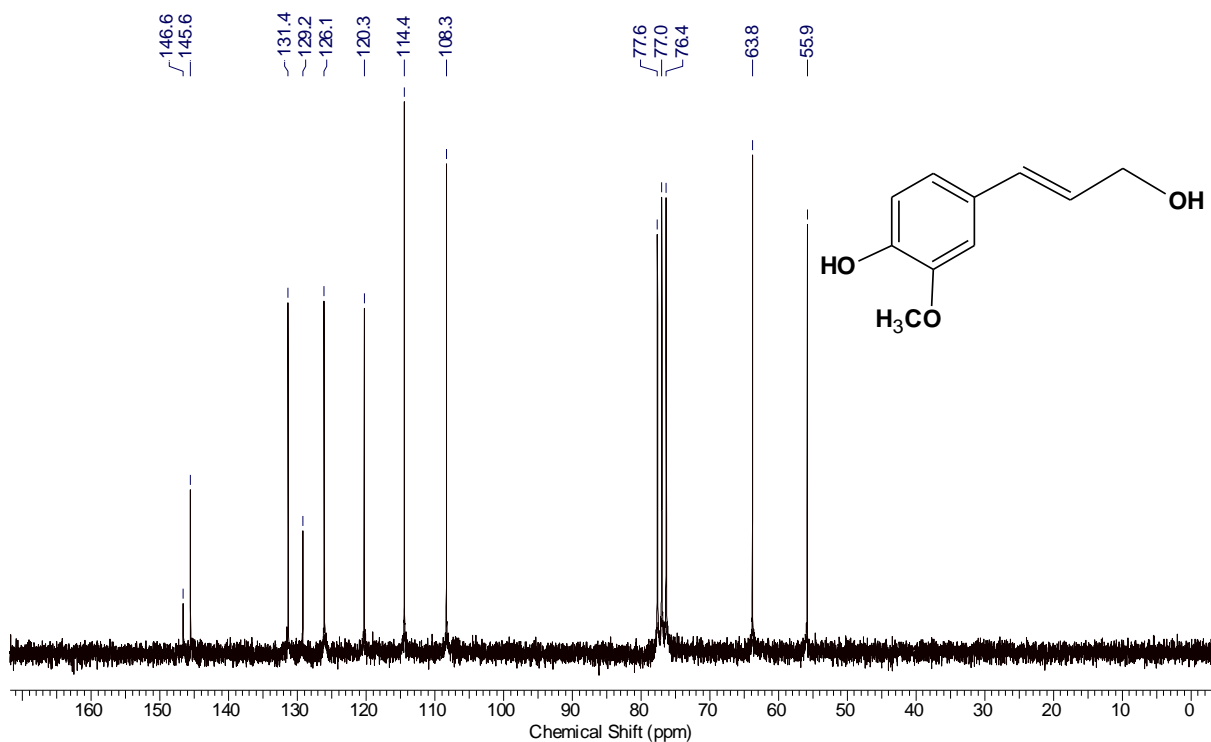


Figura 7.11 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 200 MHz) do álcool coniferílico em abundância natural.

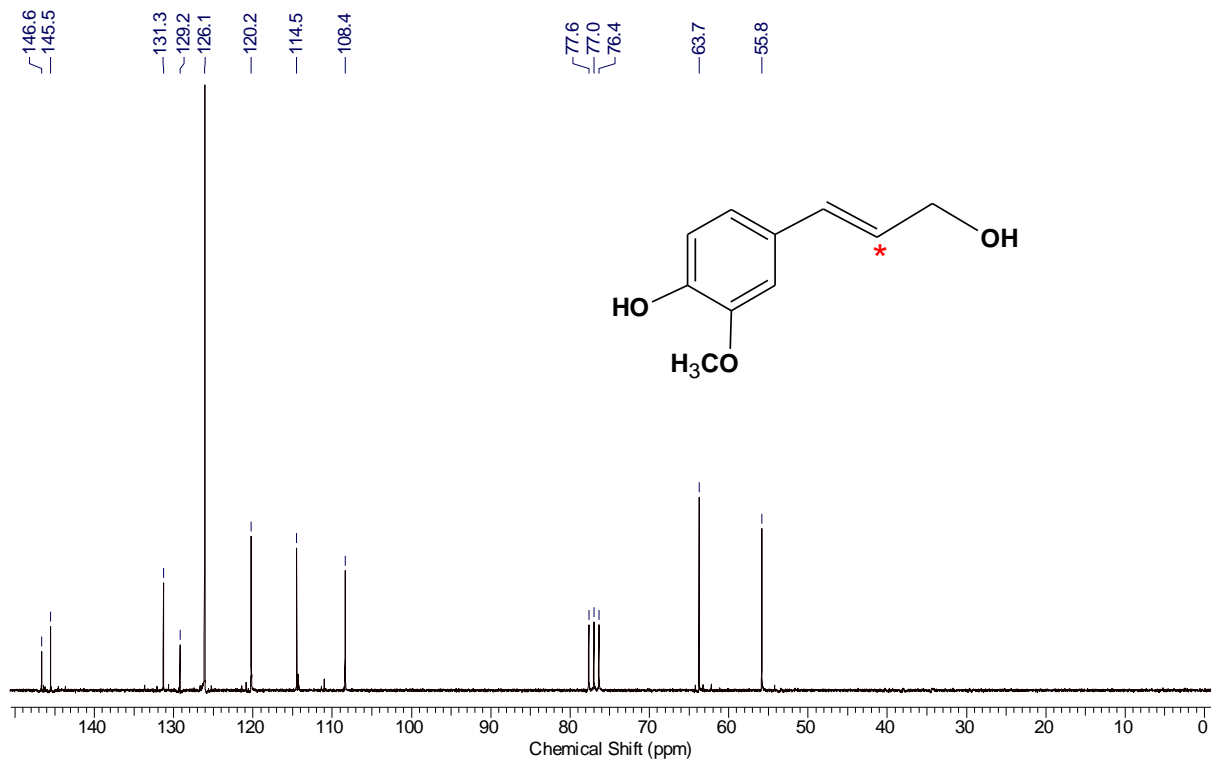


Figura 7.12 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 200 MHz) do álcool [8-¹³C]-coniferílico.

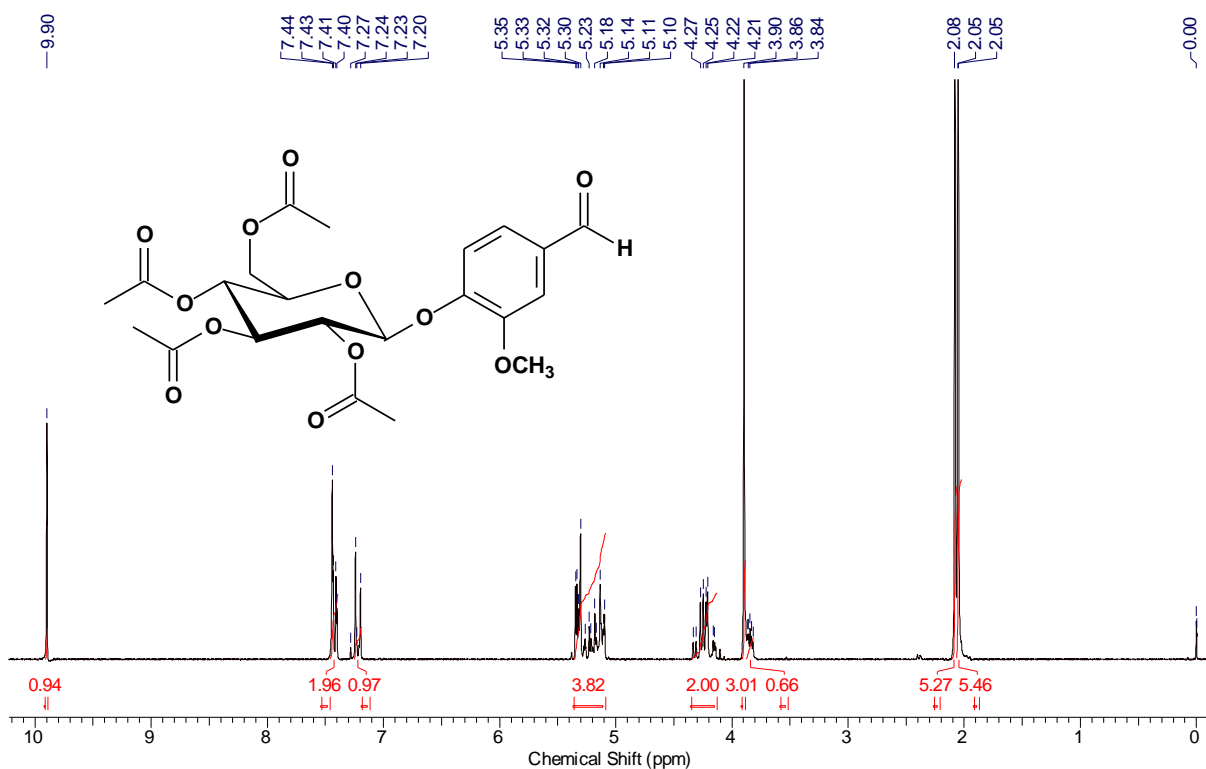


Figura 7.13 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da vanilina glicoacetilada.

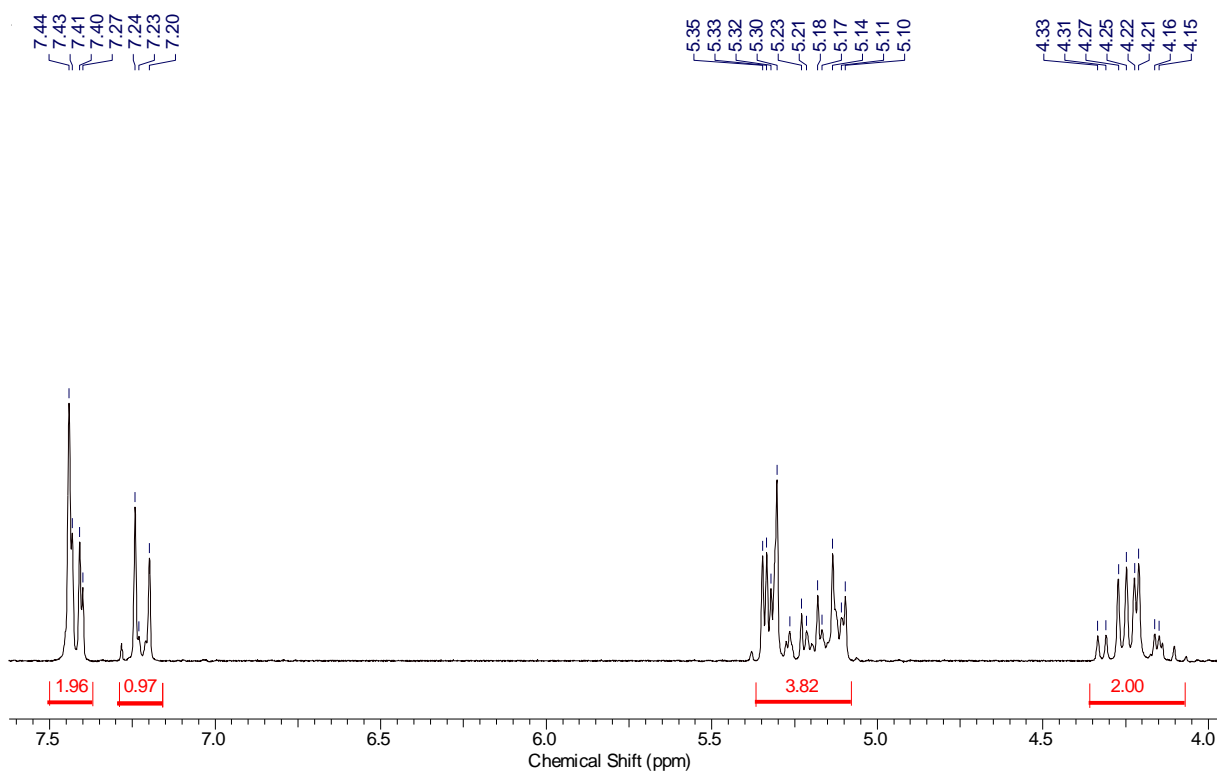


Figura 7.14 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da vanilina glicoacetilada.

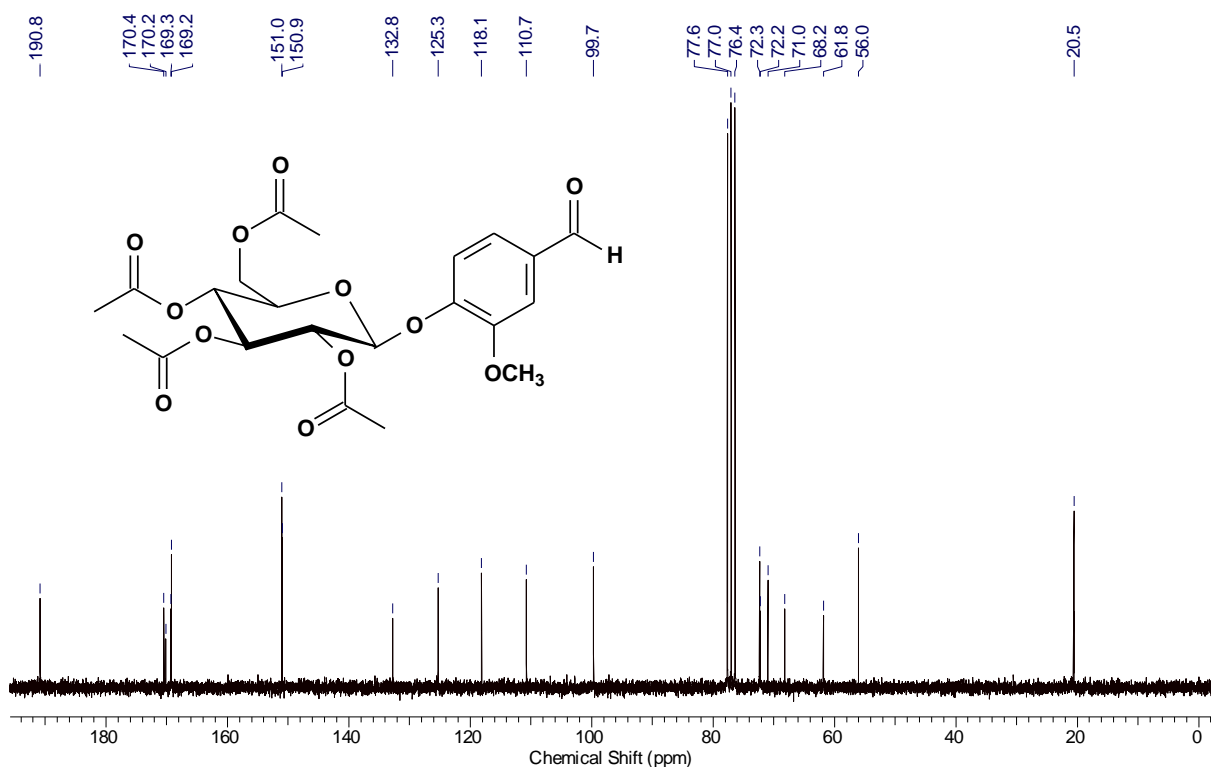


Figura 7.15 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 200 MHz) da vanilina glicacetilada.

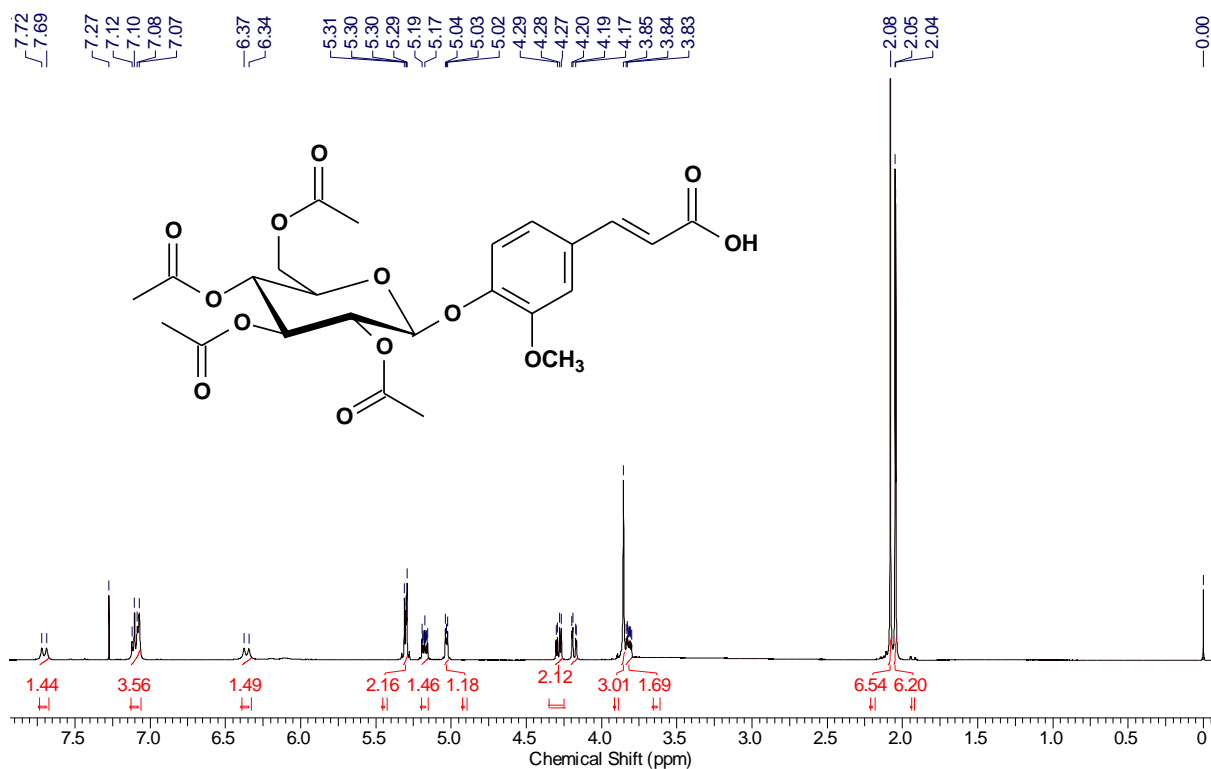


Figura 7.16 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) do ácido ferúlico glicacetilado em abundância natural.

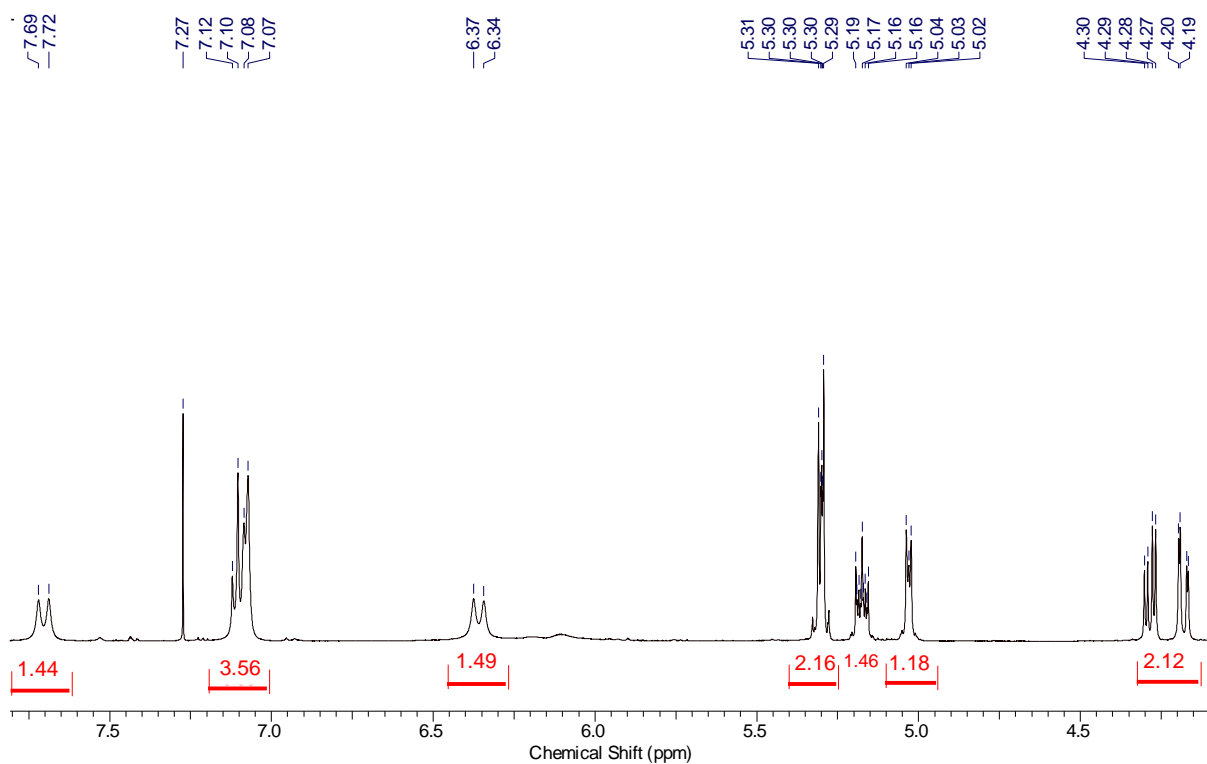


Figura 7.17 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) ácido ferúlico glicoacetilado em abundância natural.

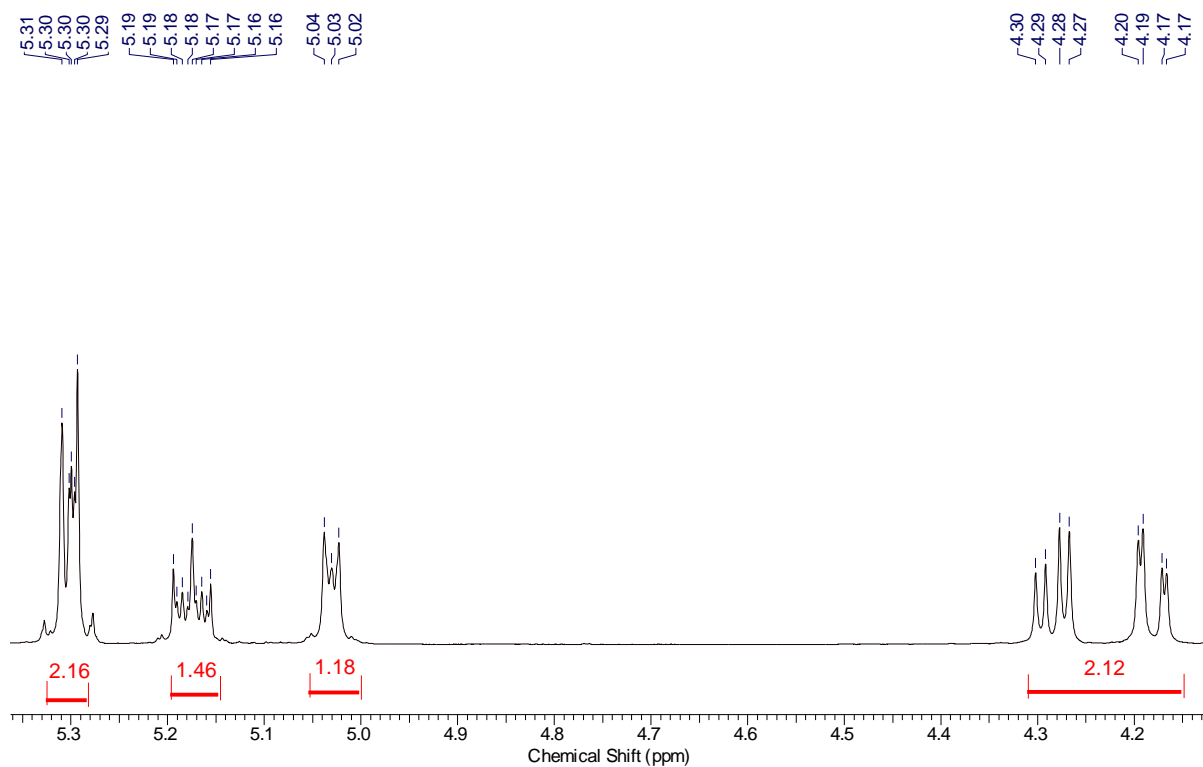


Figura 7.18 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) ácido ferúlico glicoacetilado em abundância natural.

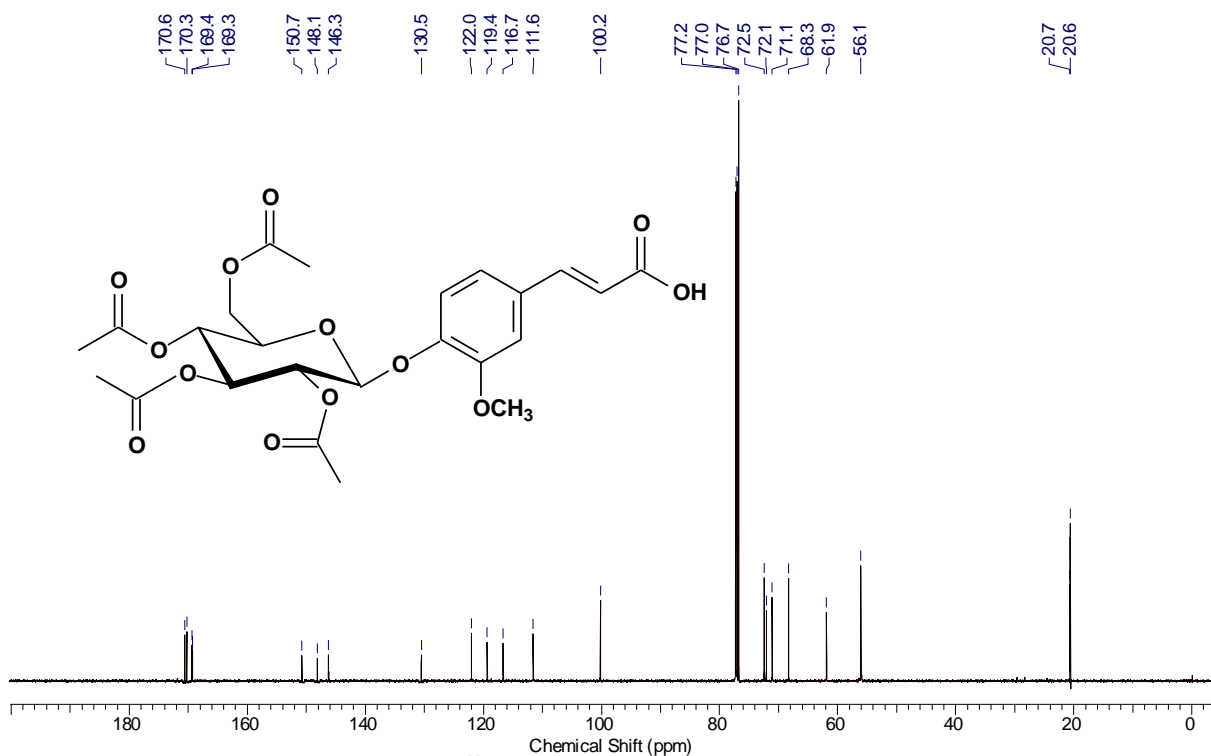


Figura 7.19 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do ácido ferúlico glicoacetilado em abundância natural.

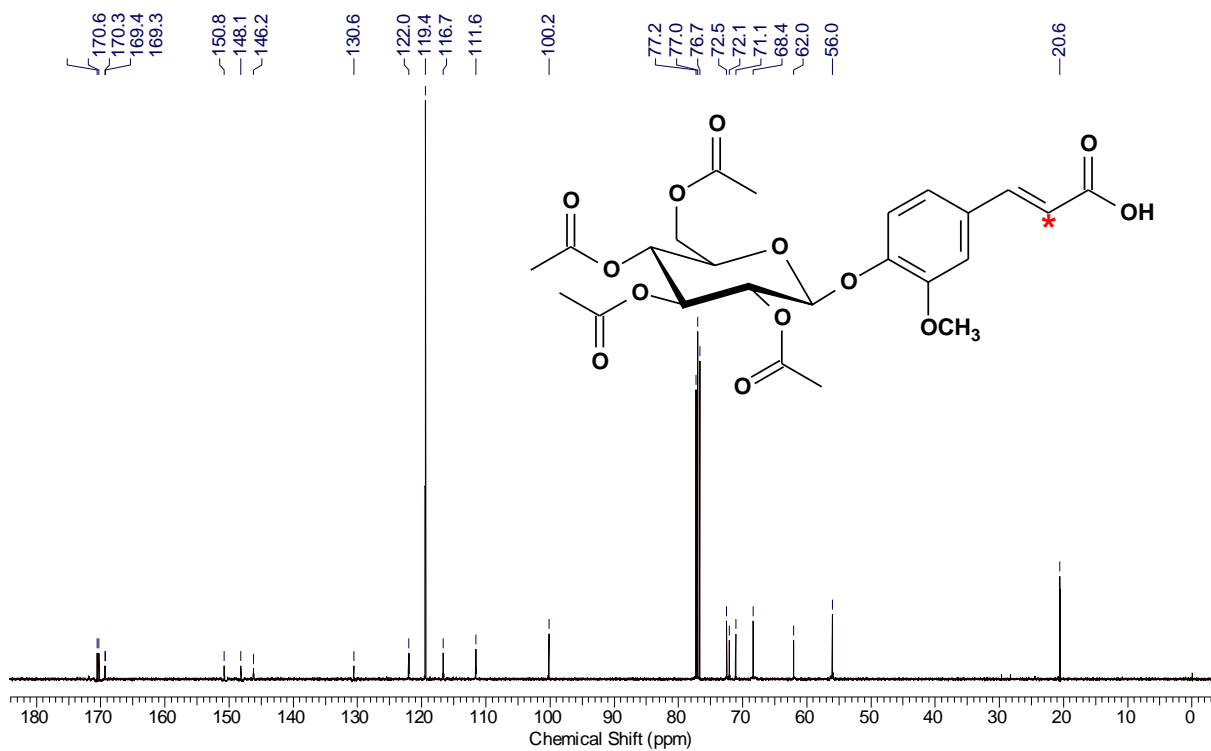


Figura 7.20 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do ácido [8- ^{13}C]-glicoacetilado.

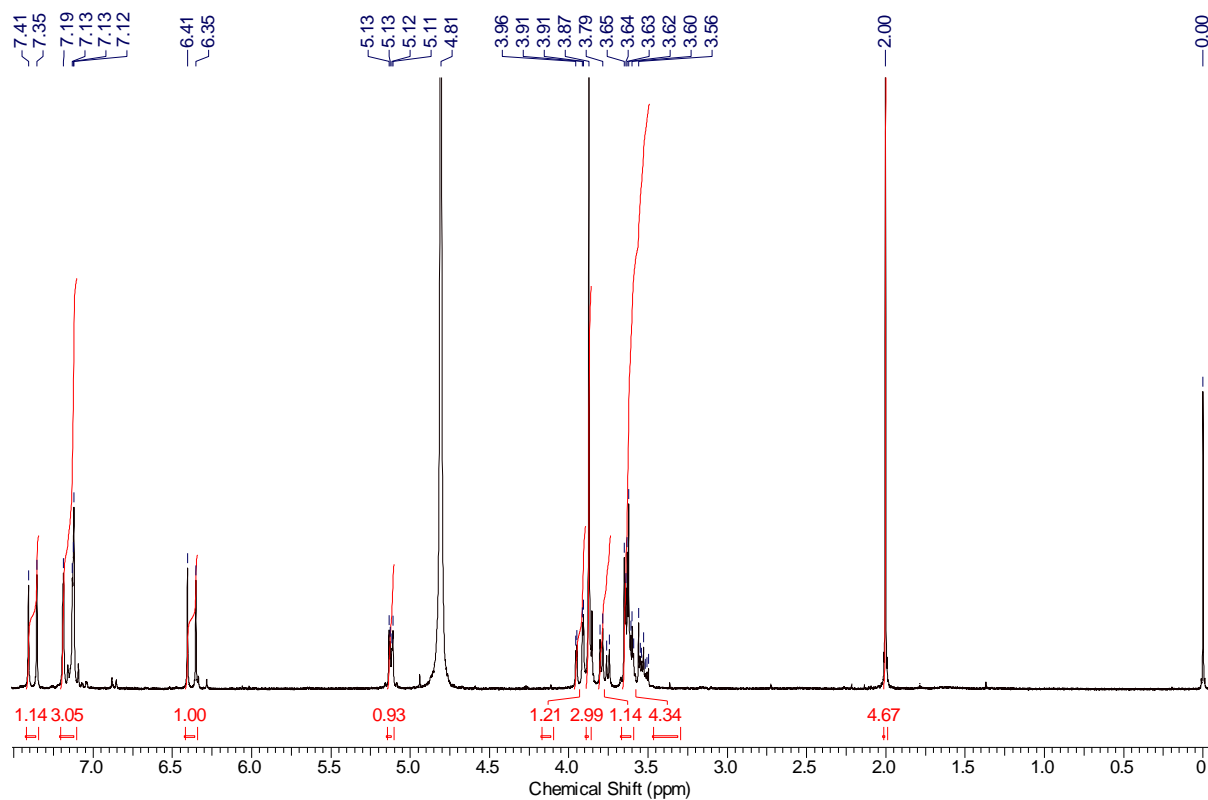


Figura 7.21 Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 200 MHz) do ácido glicoferúlico em abundância natural.

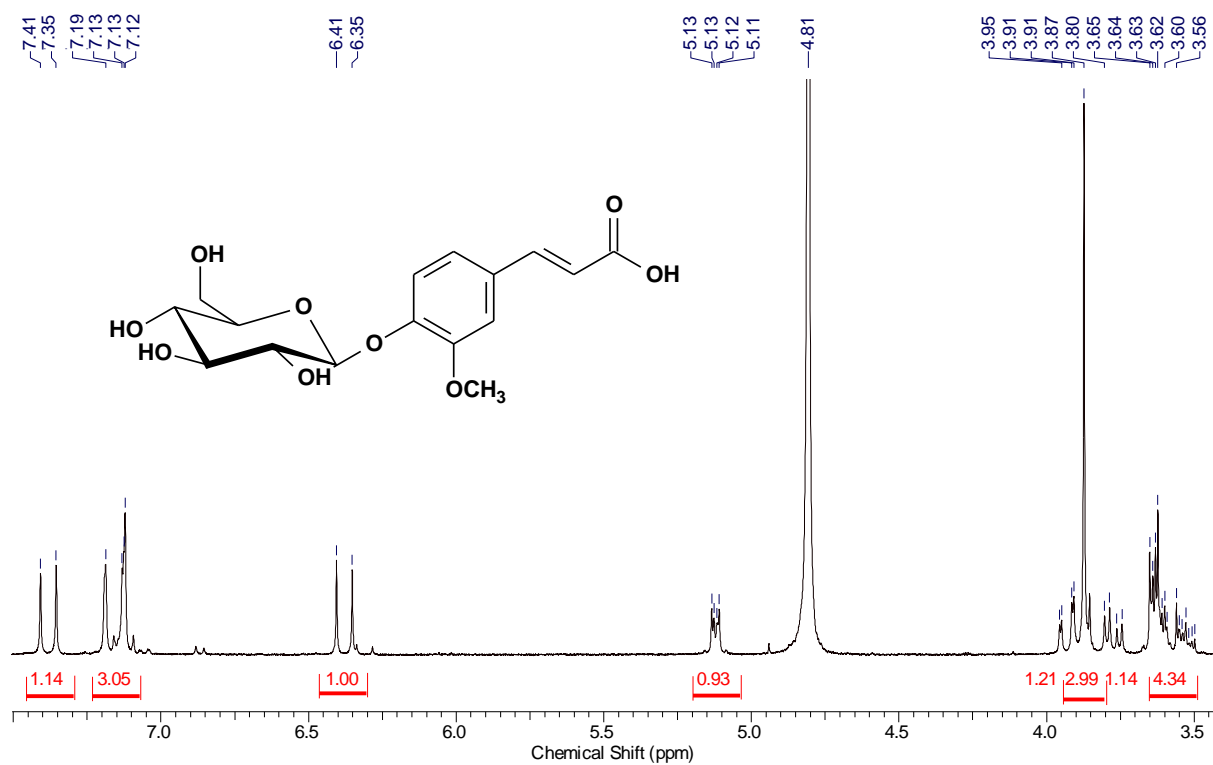


Figura 7.22 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 200 MHz) do ácido glicoferúlico em abundância natural.

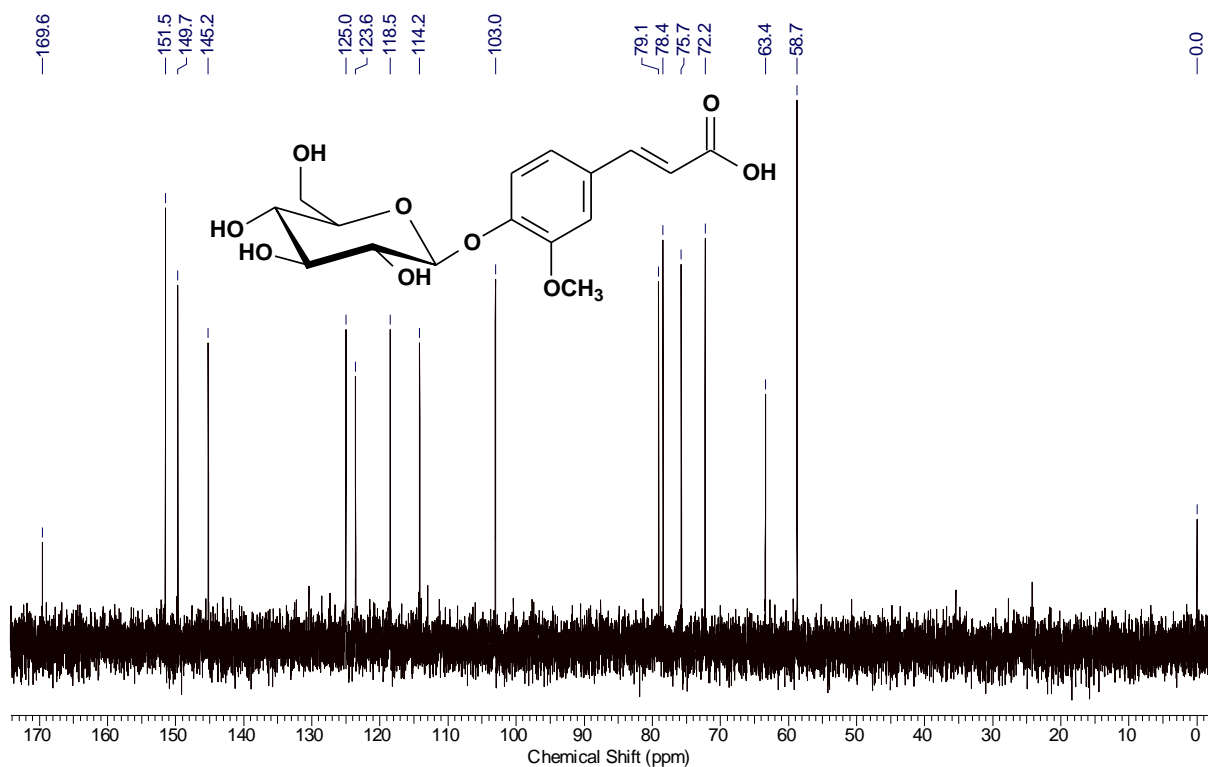


Figura 7.23 Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 50 MHz) do ácido glicoferúico em abundância natural.

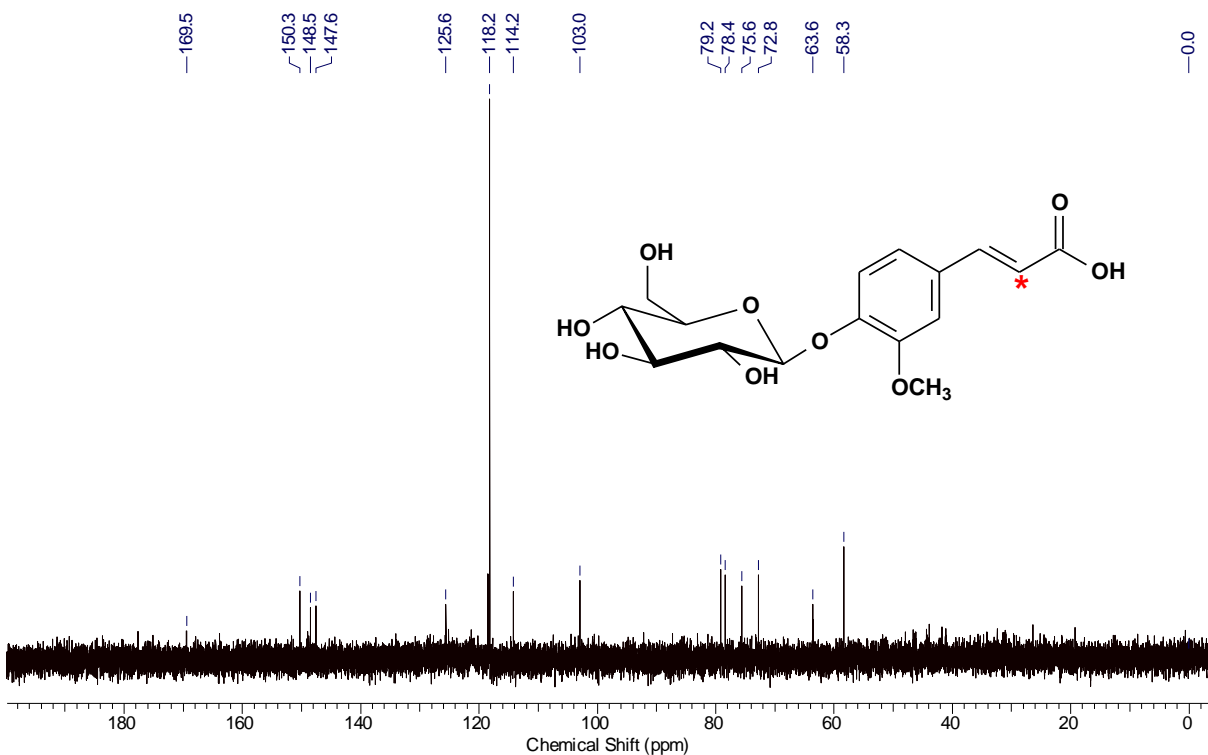


Figura 7.24 Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 50 MHz) ácido $[8-^{13}\text{C}]$ -glicoferúico.

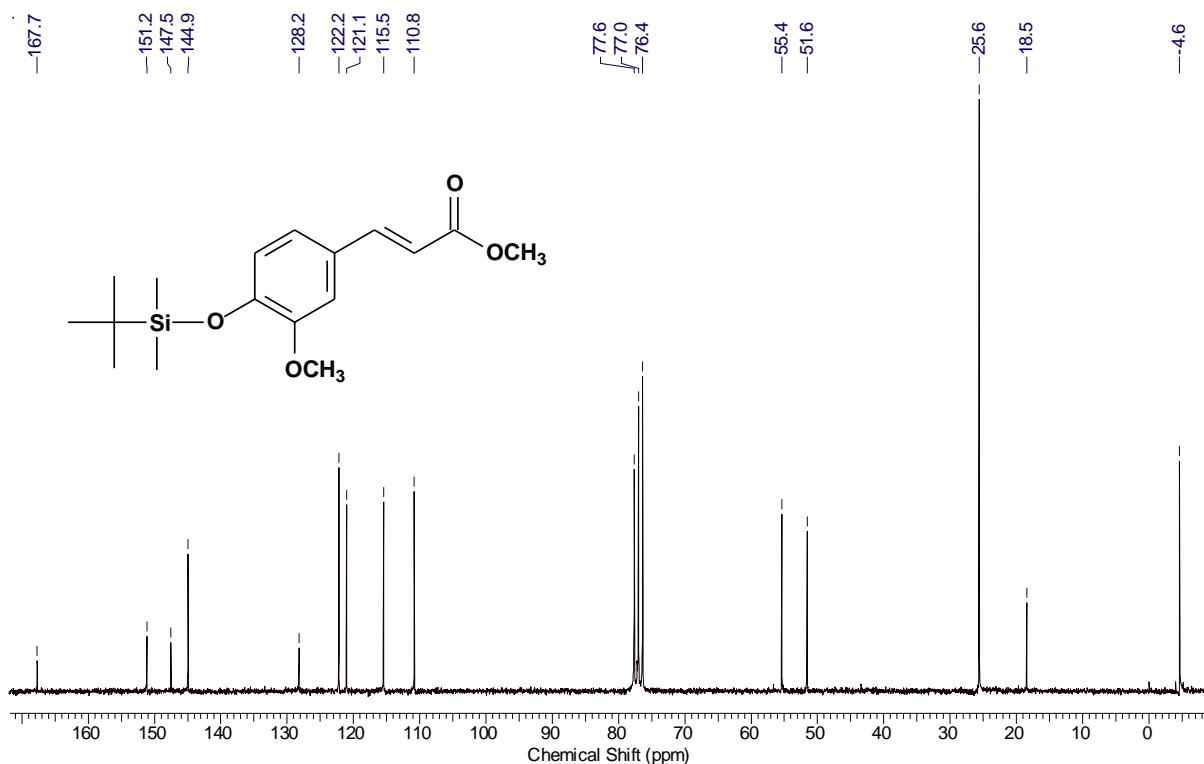


Figura 7.25 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila protegido com TBS em abundância natural.

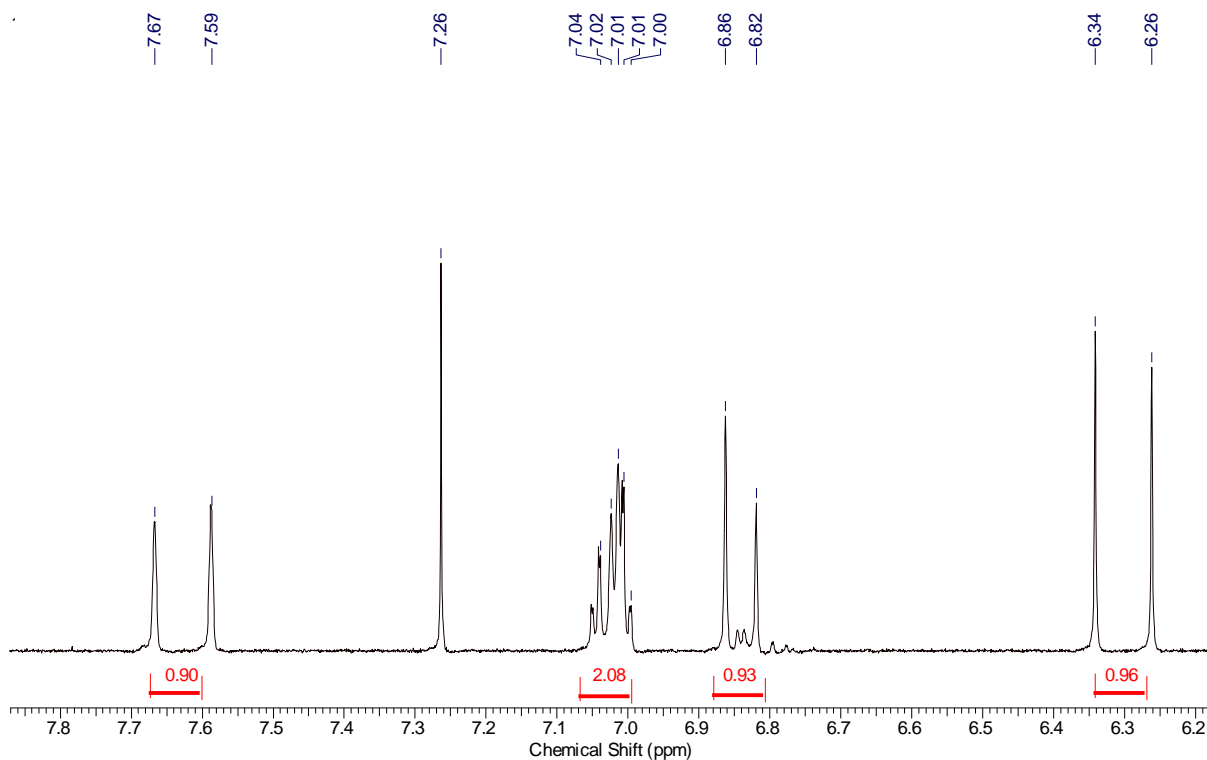


Figura 7.26 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ferulato de metila protegido com TBS em abundância natural.

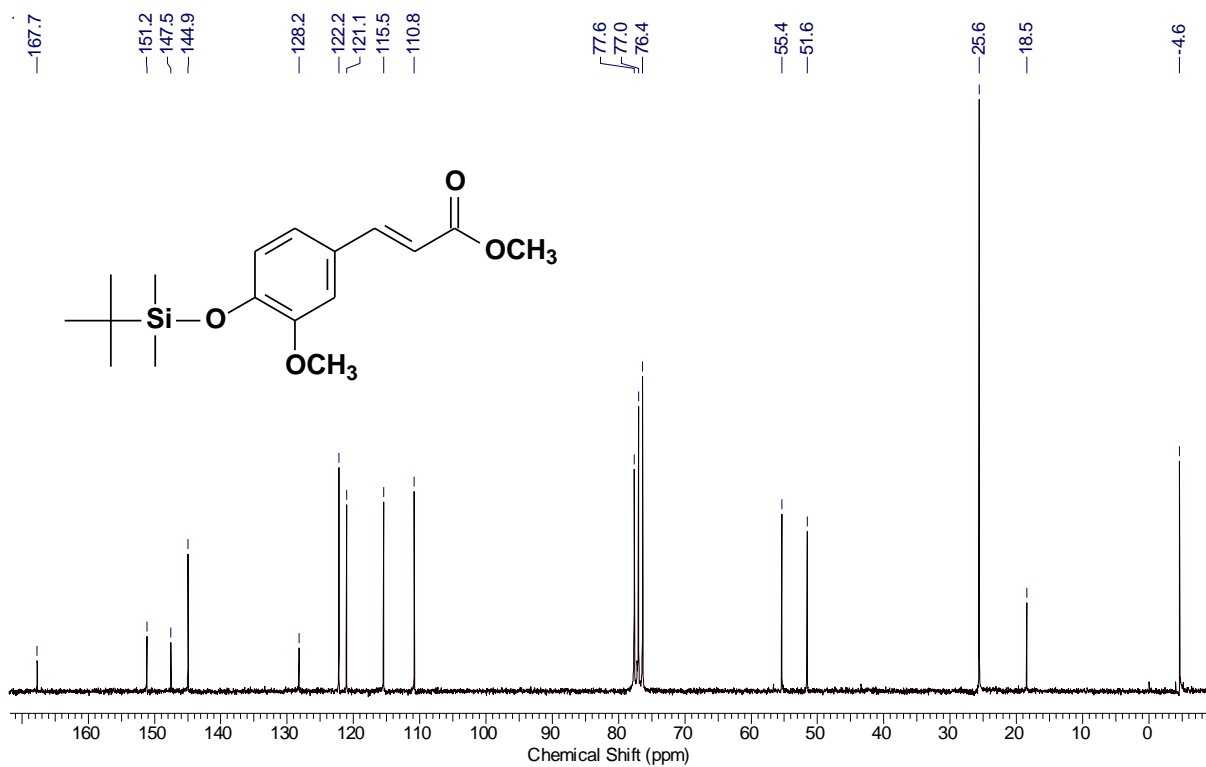


Figura 7.27 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) do ferulato de metila protegido com TBS em abundância natural.

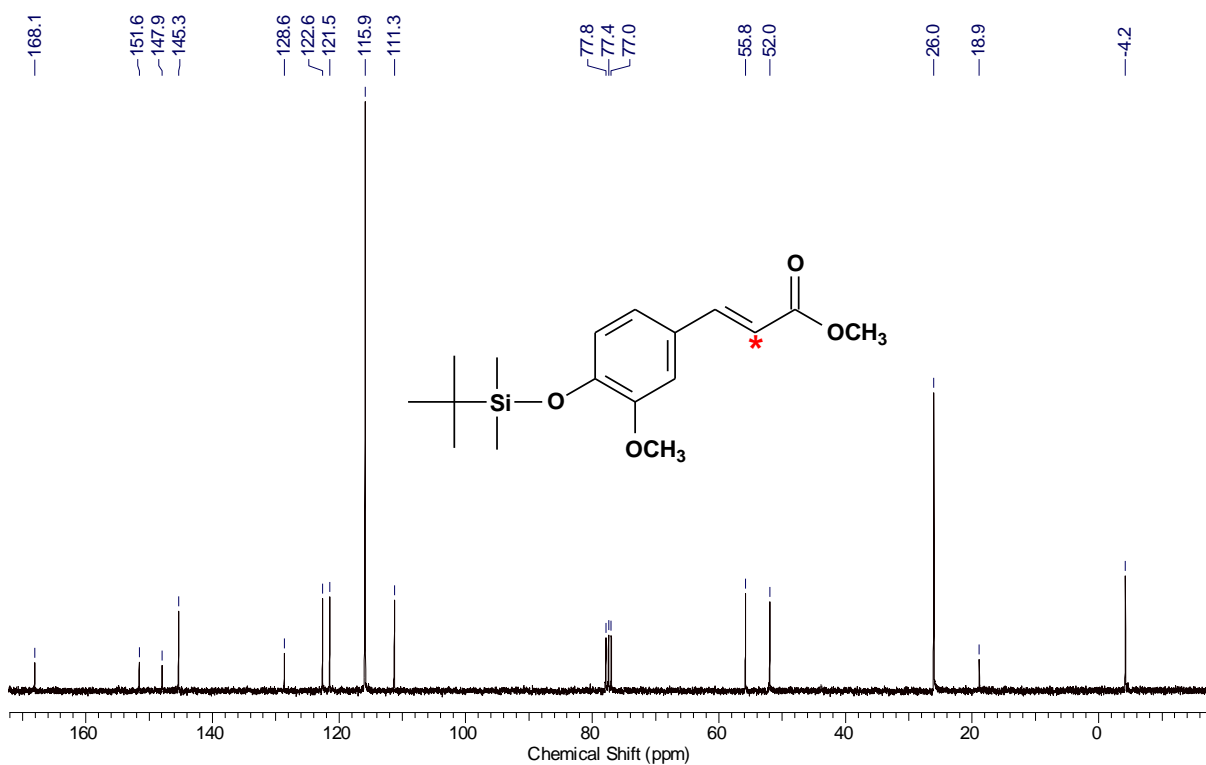


Figura 7.28 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) do [8-¹³C]-ferulato de metila protegido com TBS

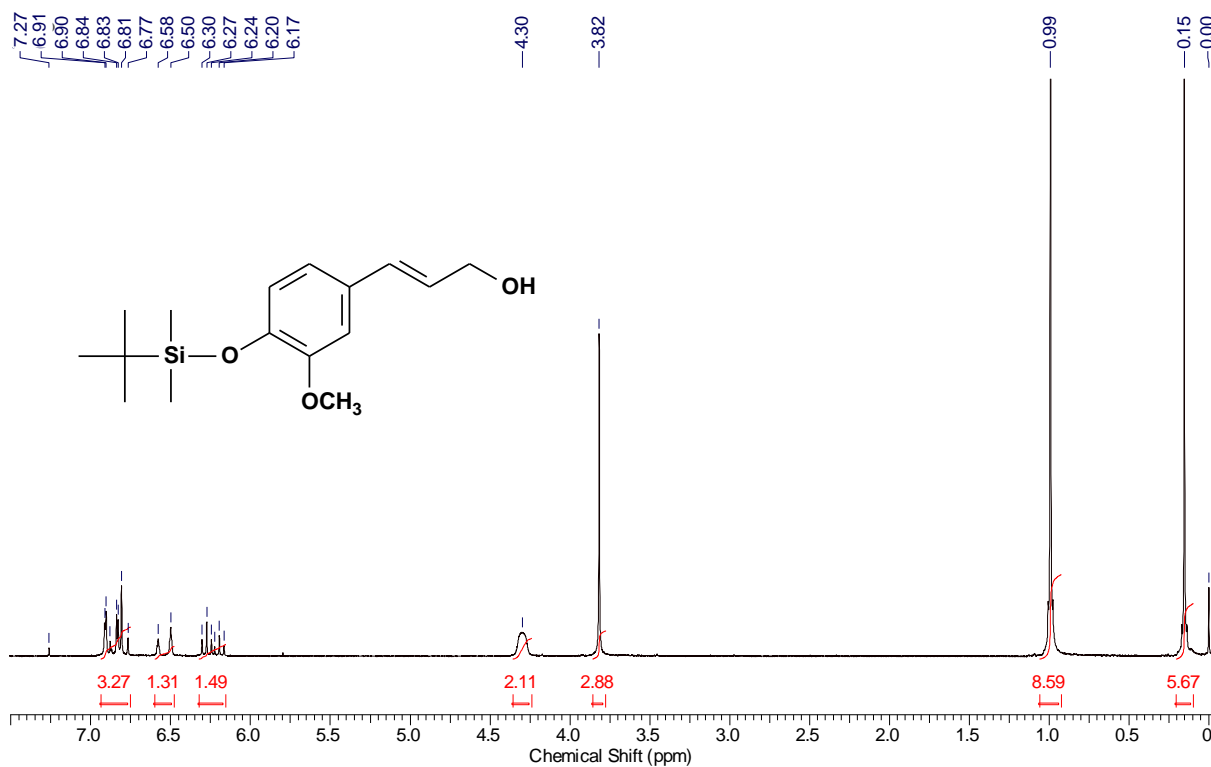


Figura 7.29 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) álcool coniferílico em abundância natural protegido com TBS.

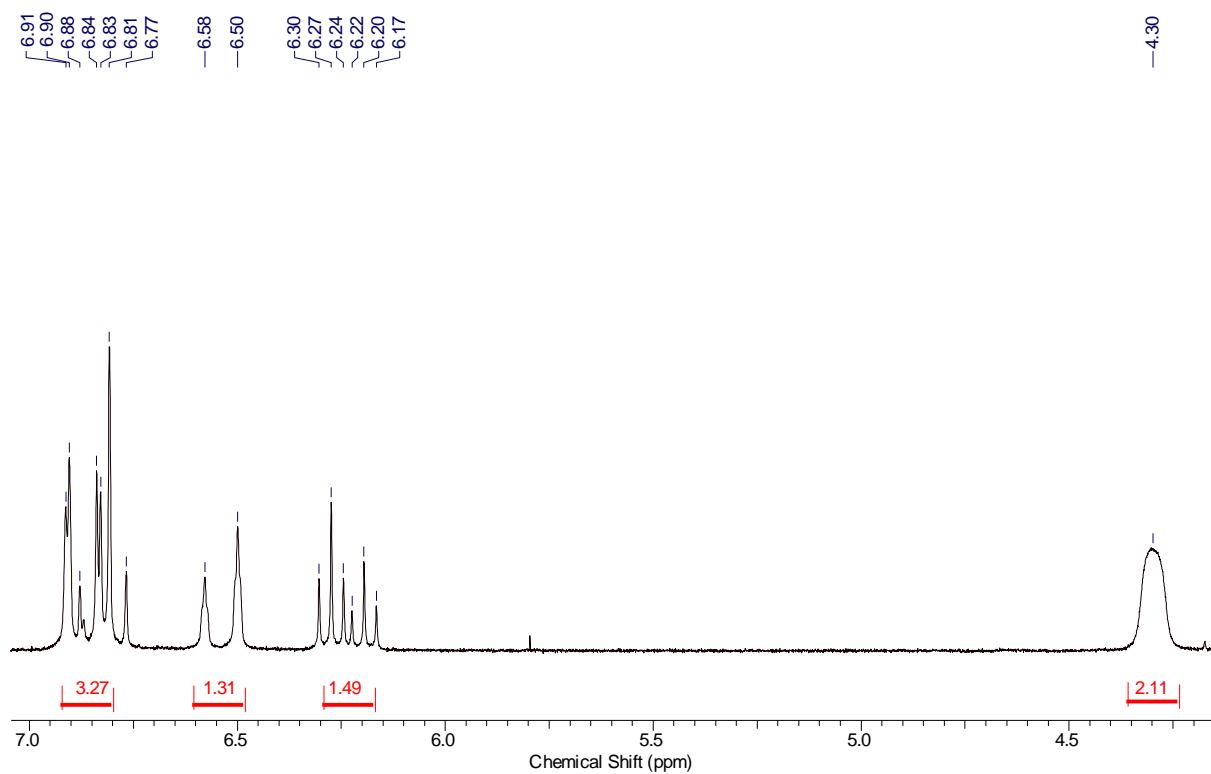


Figura 7.30 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do álcool coniferílico em abundância natural protegido com TBS.

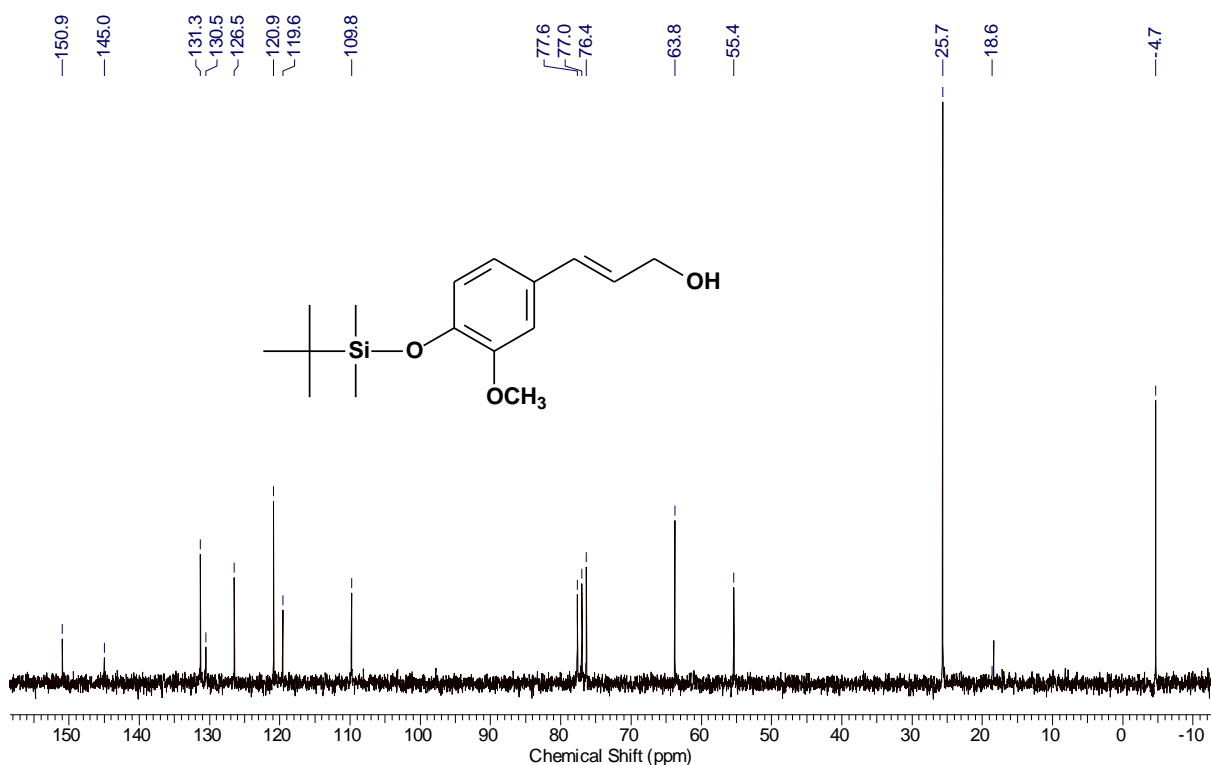


Figura 7.31 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do álcool coniferílico em abundância natural protegido com TBS.

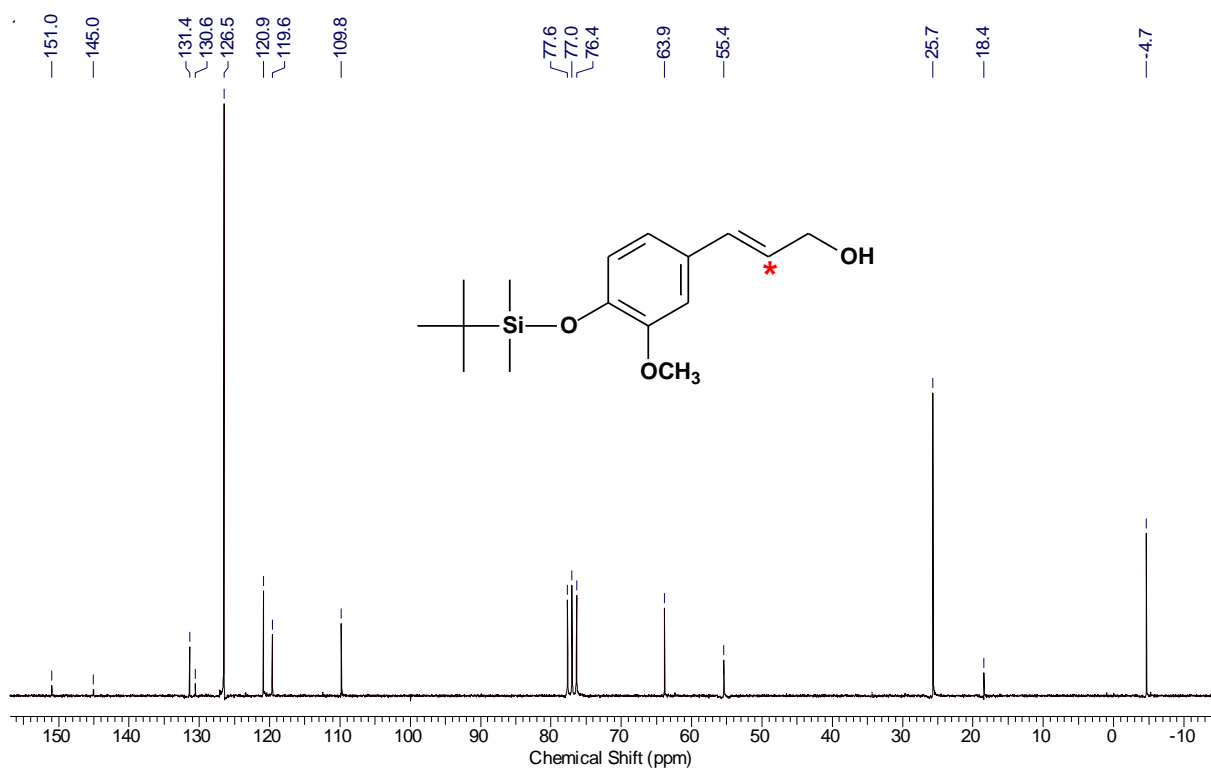


Figura 7.32 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do álcool [8- ^{13}C]-coniferílico protegido com TBS.

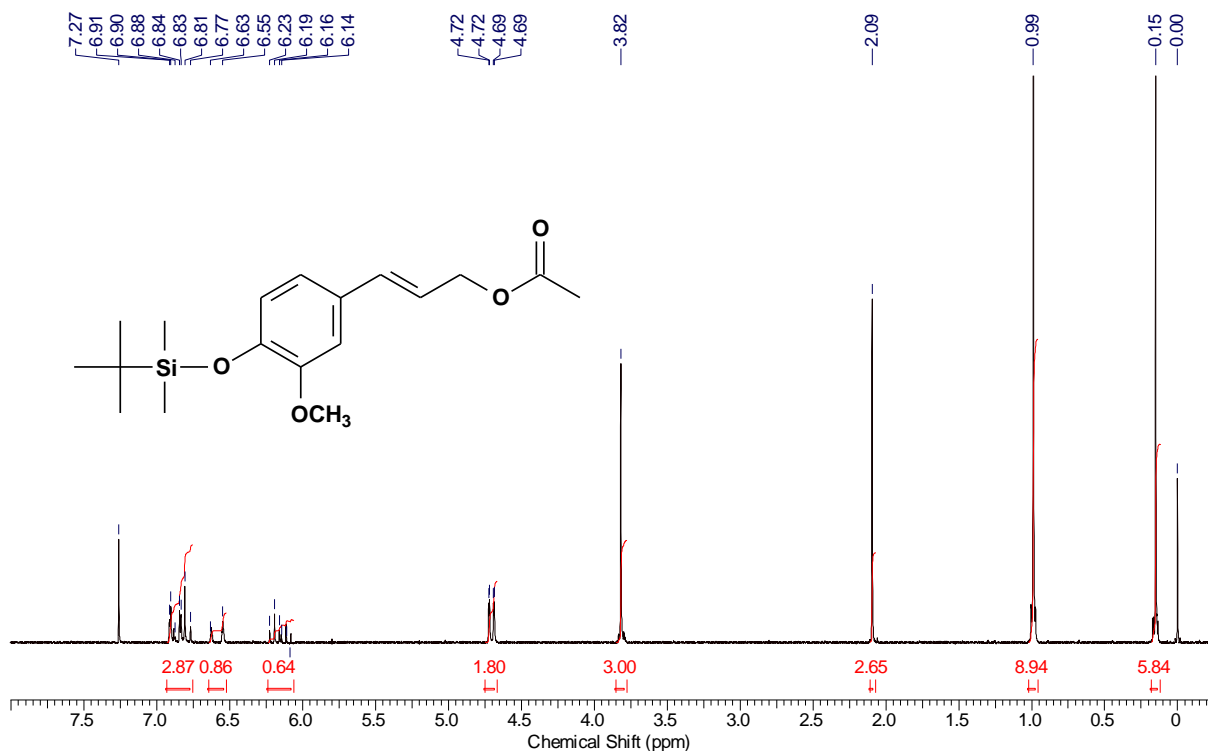


Figura 7.33 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de coniferila em abundância natural protegido com TBS

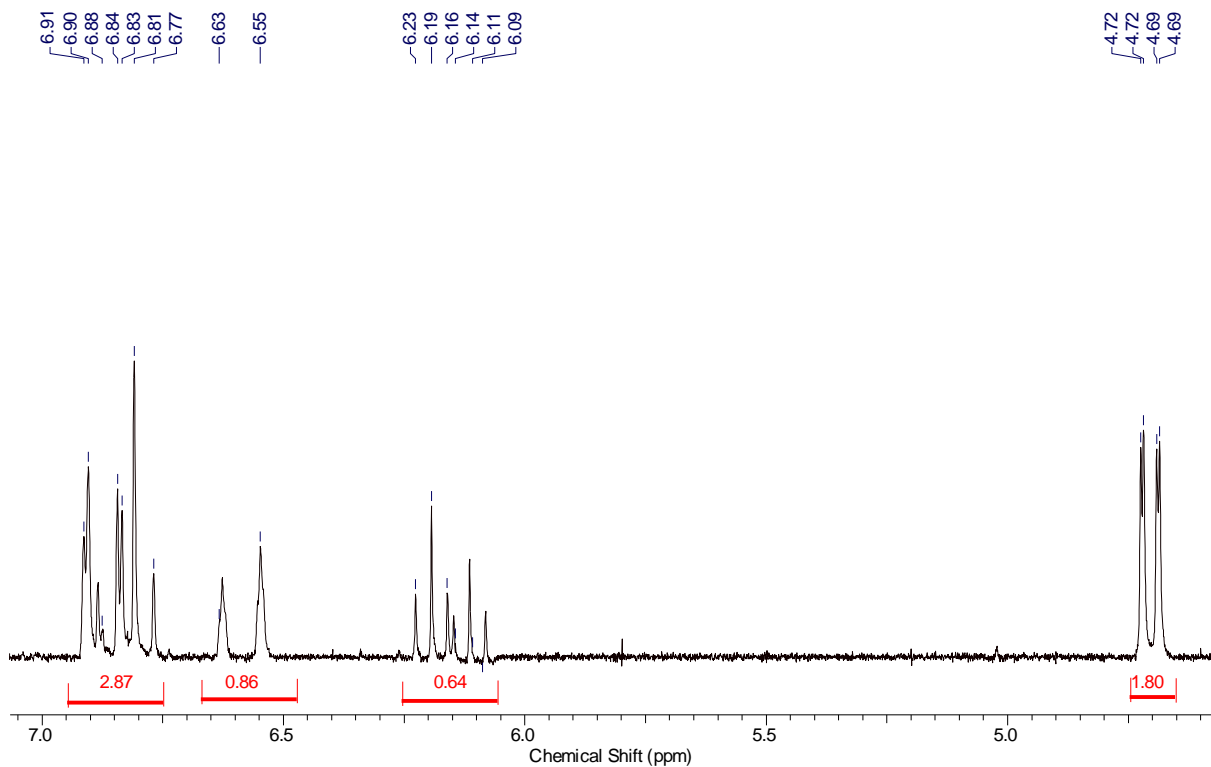


Figura 7.34 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de coniferila em abundância natural protegido com TBS.

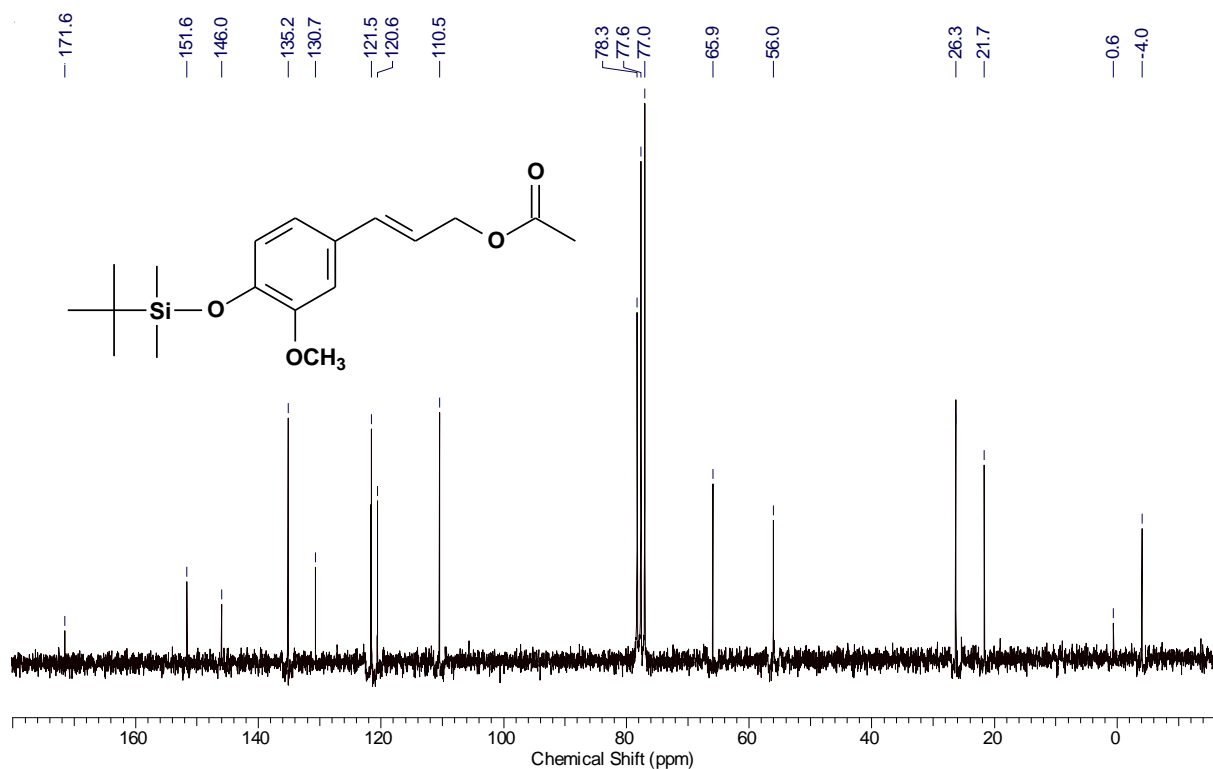


Figura 7.35 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) acetato de coniferila em abundância natural protegido com TBS.

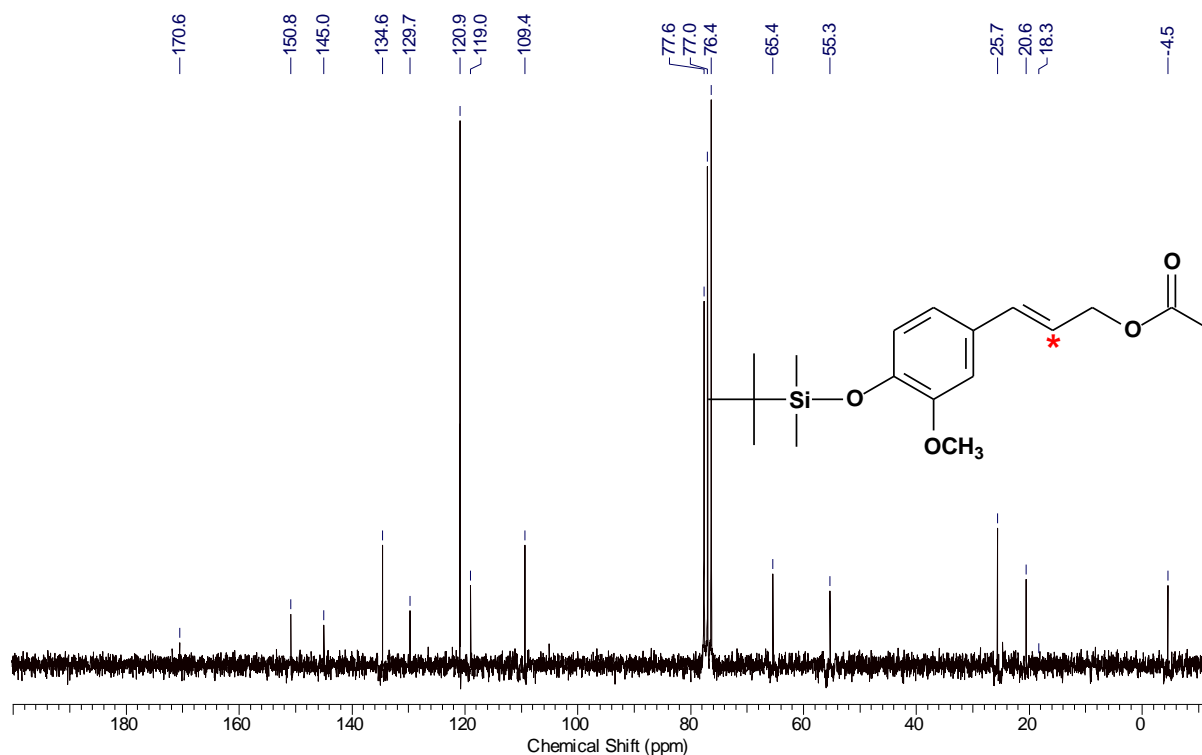


Figura 7.36 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferila protegido com TBS.

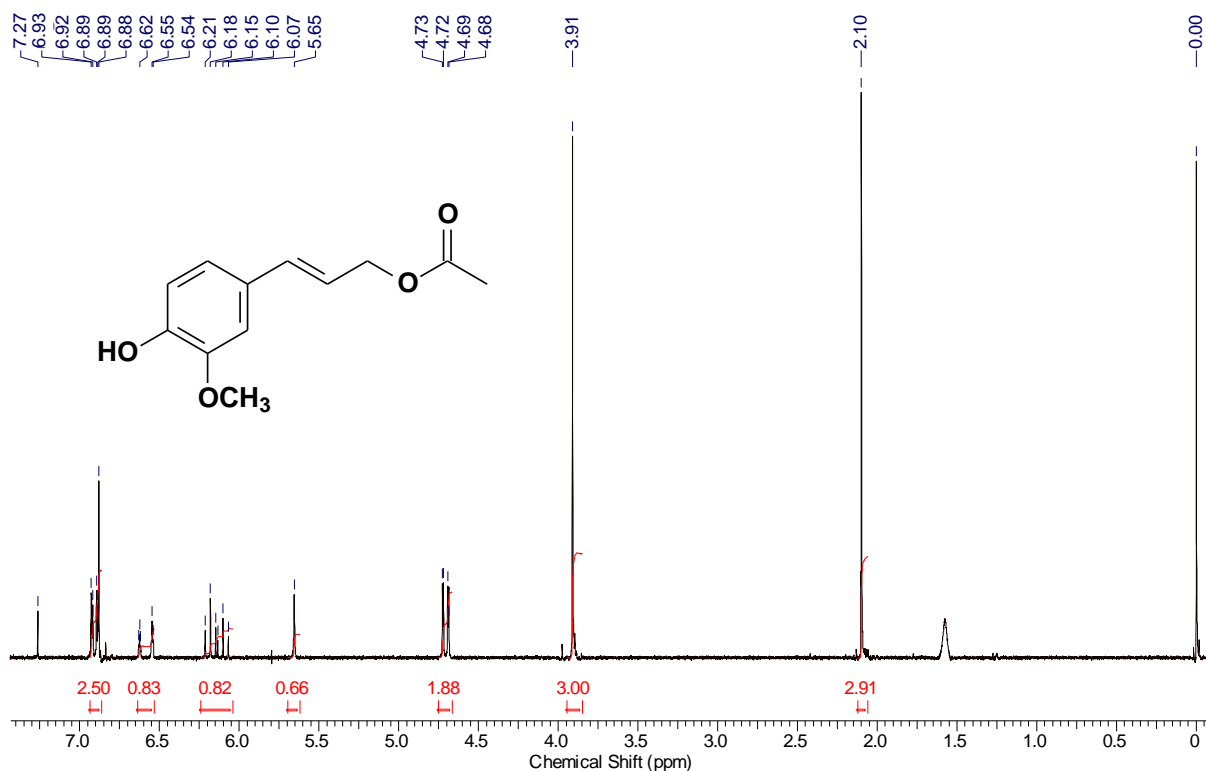


Figura 7.37 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de coniferila com abundância natural.

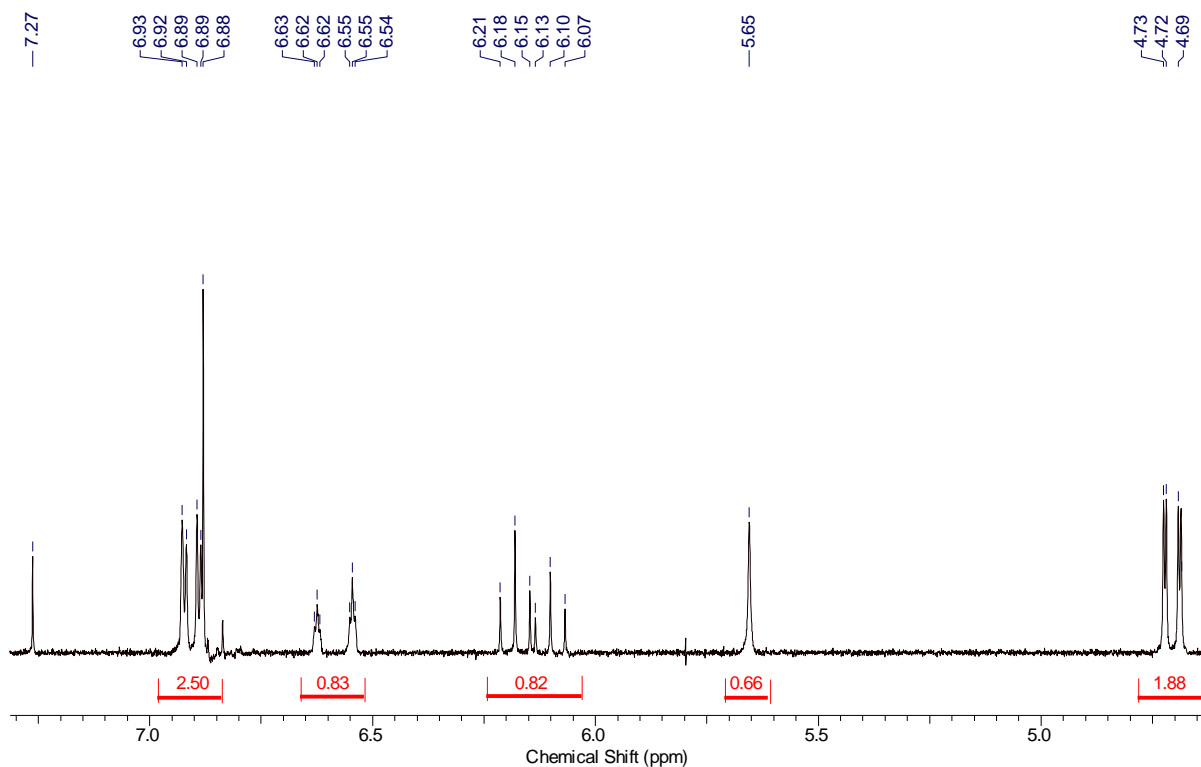


Figura 7.38 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de coniferila com abundância natural.

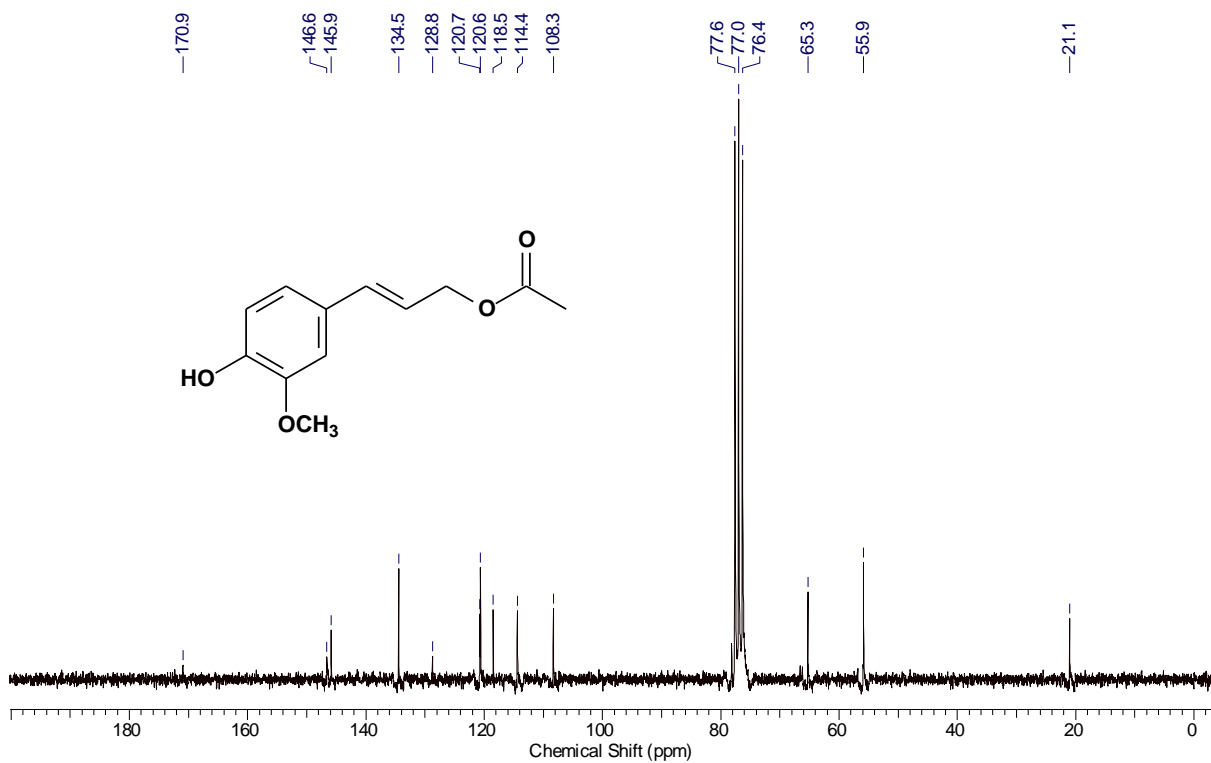


Figura 7.39 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de coniferila com abundância natural.

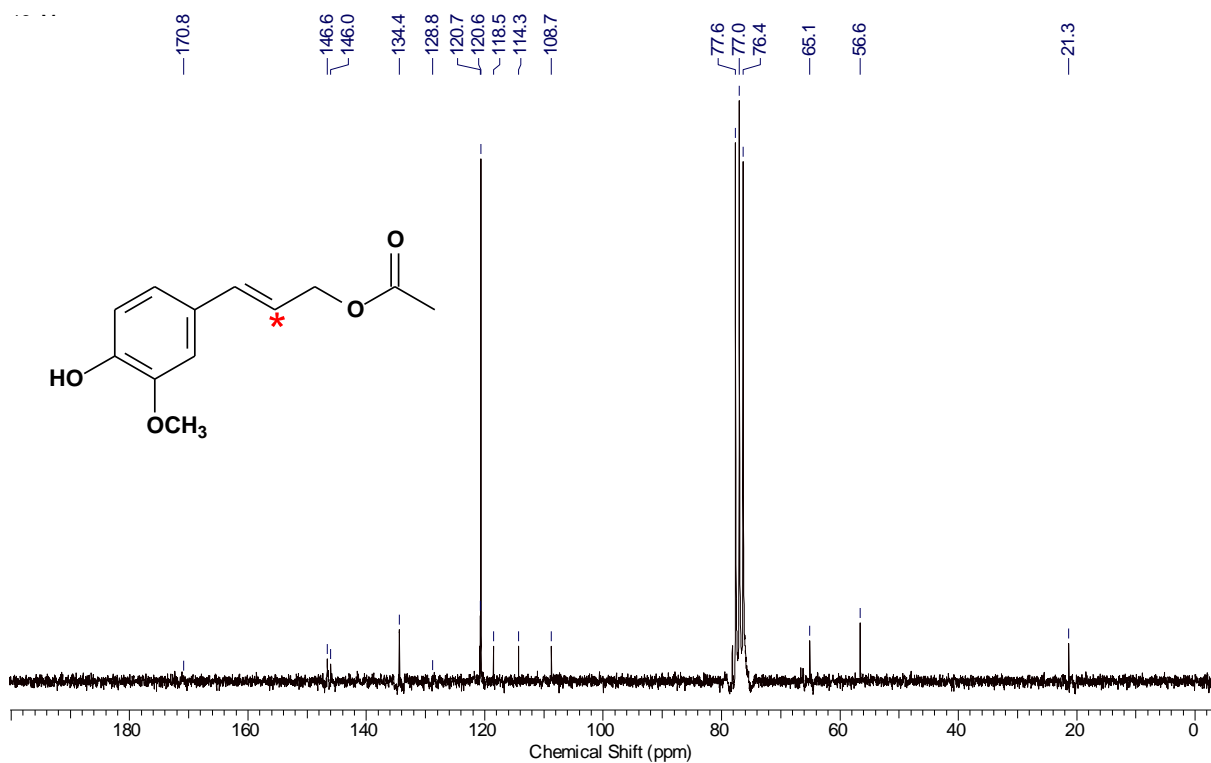


Figura 7.40 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de [8- ^{13}C]-coniferila.

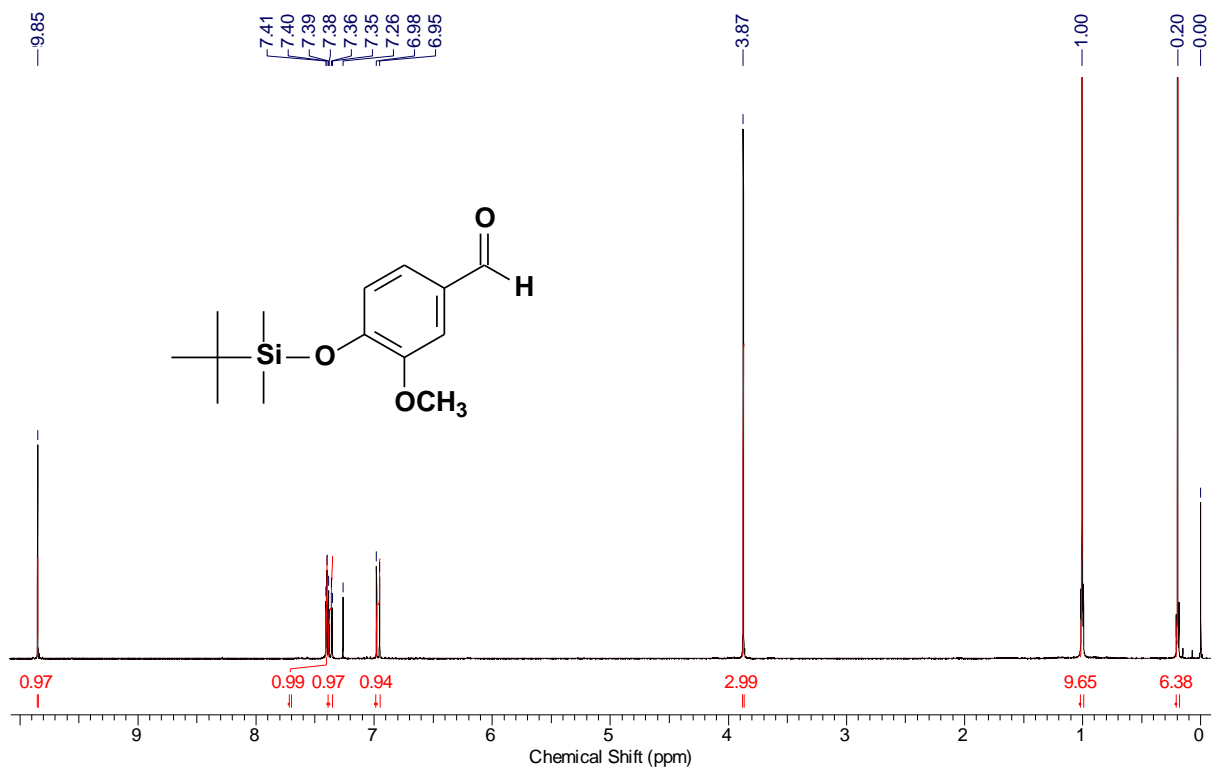


Figura 7.41 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da vanilina com a hidroxila fenólica protegida com TBS.

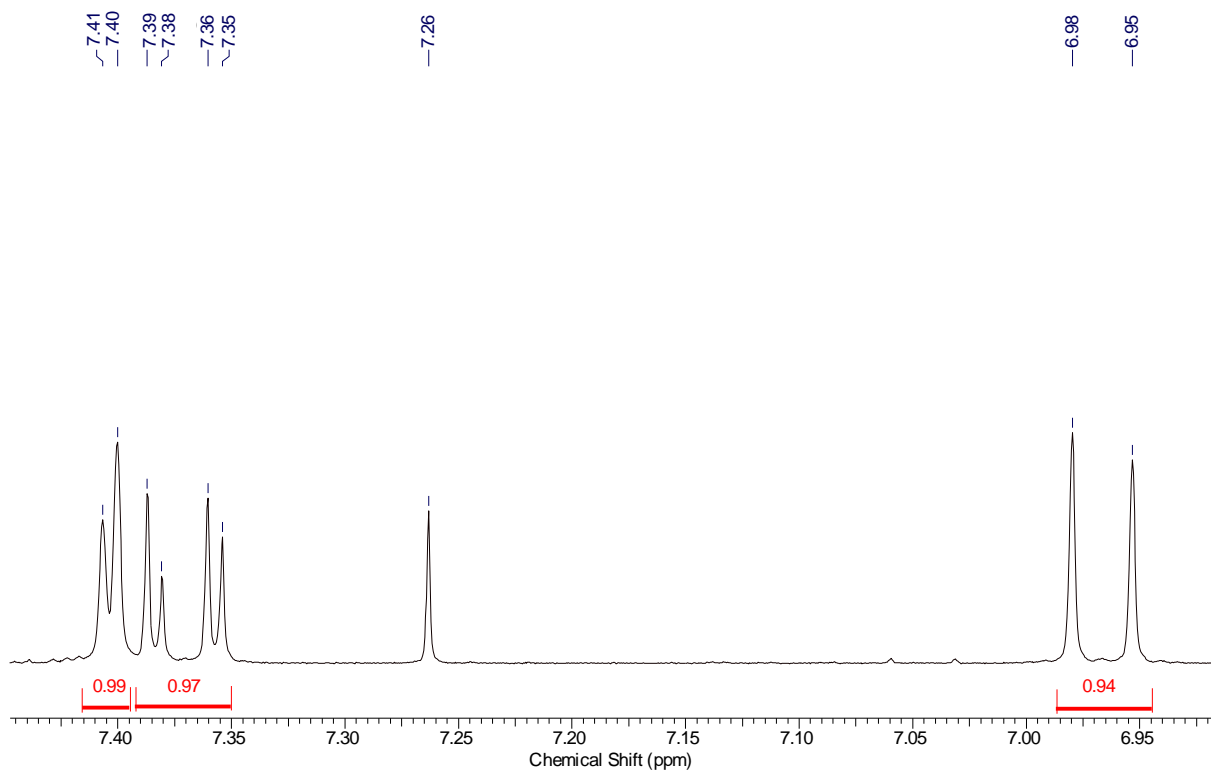


Figura 7.42 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da vanilina com a hidroxila fenólica protegida com TBS.

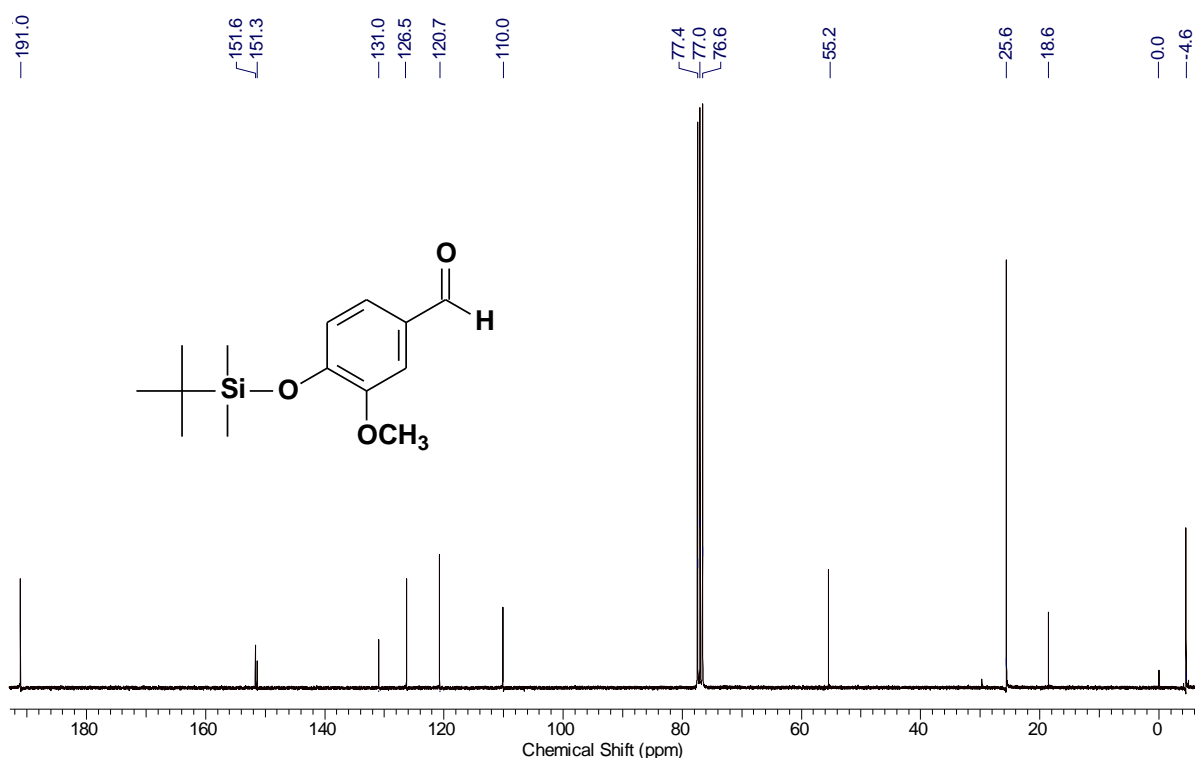


Figura 7.43 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 200 MHz) da vanilina com a hidroxila fenólica protegida com TBS.

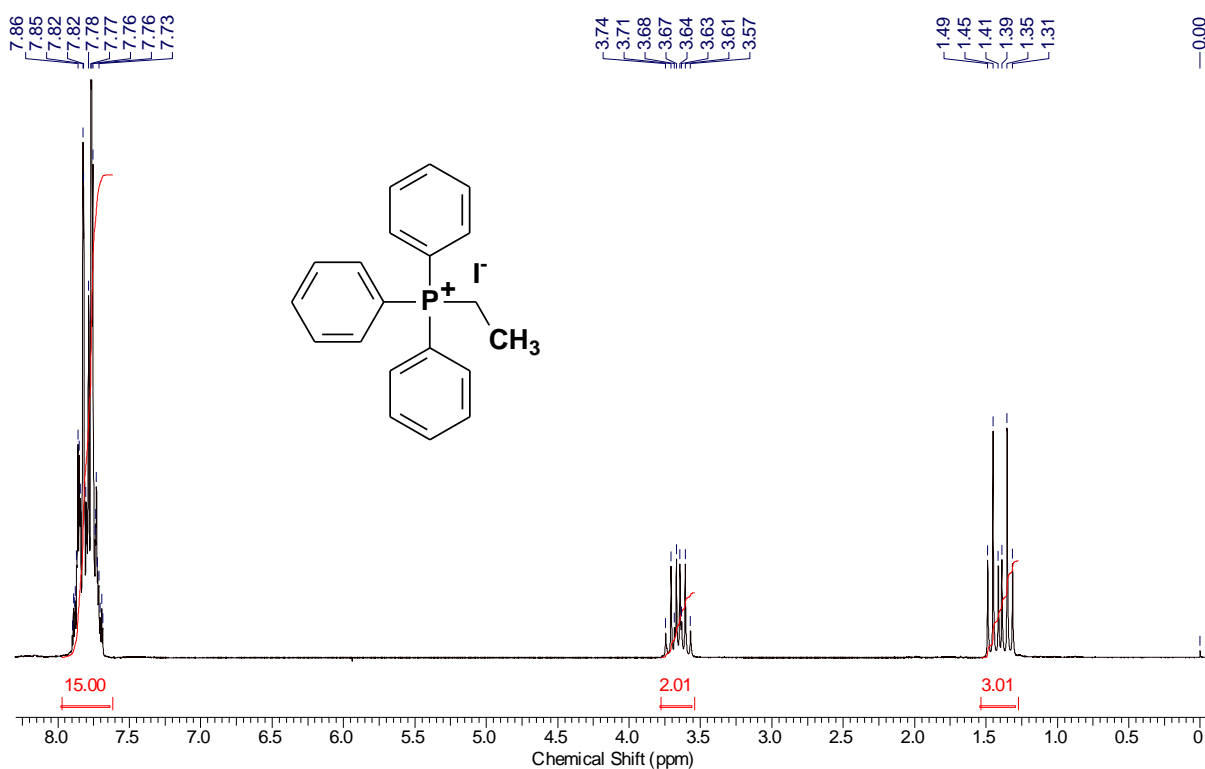


Figura 7.44 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) do iodeto de etil trifenilfosfônio.

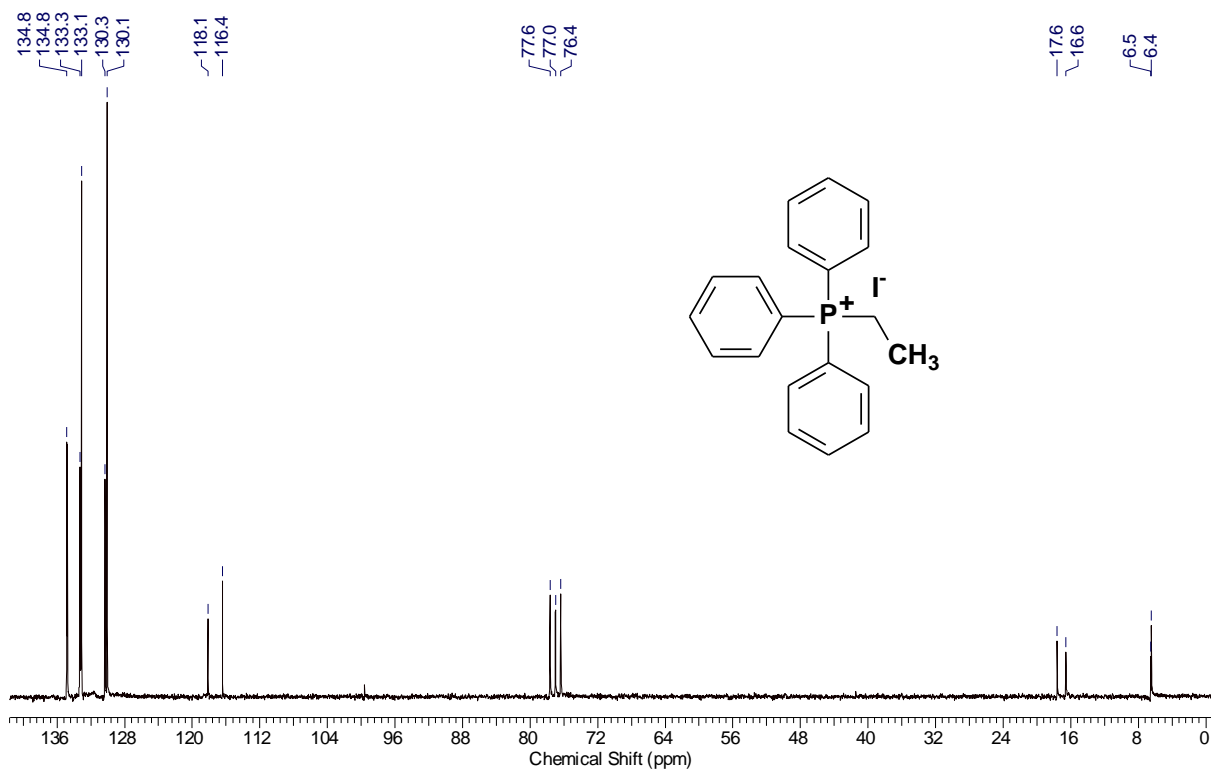


Figura 7.45 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do iodeto de etil trifenilfosfônio.

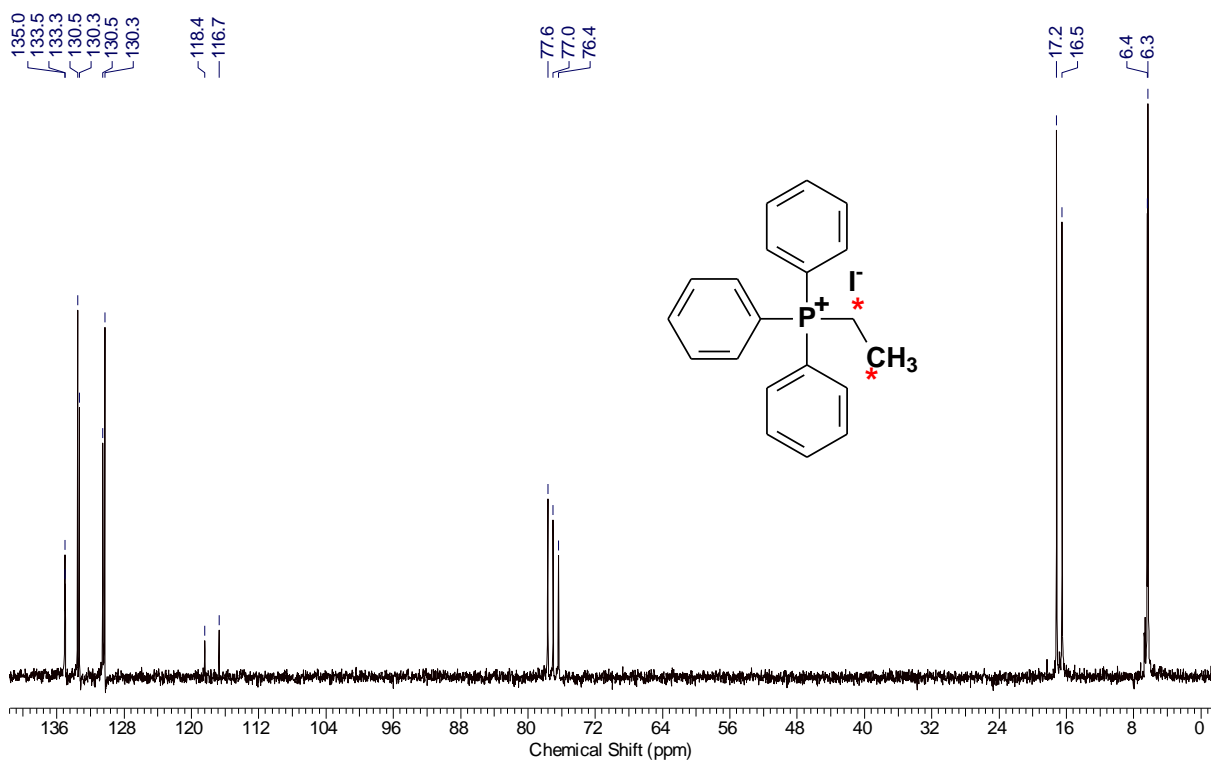


Figura 7.46 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do iodeto de [1,2- ^{13}C]-etil trifenilfosfônio.

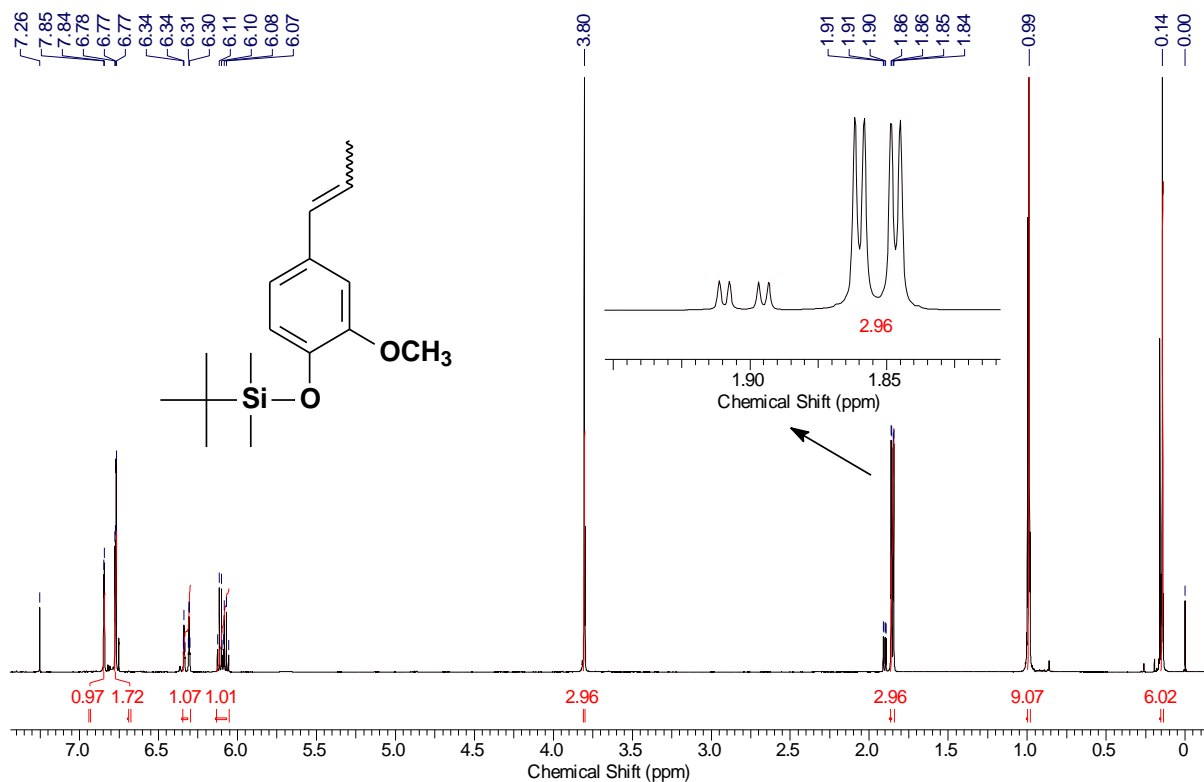


Figura 7.47 Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 200 MHz) do *Z*- e *E*-isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS.

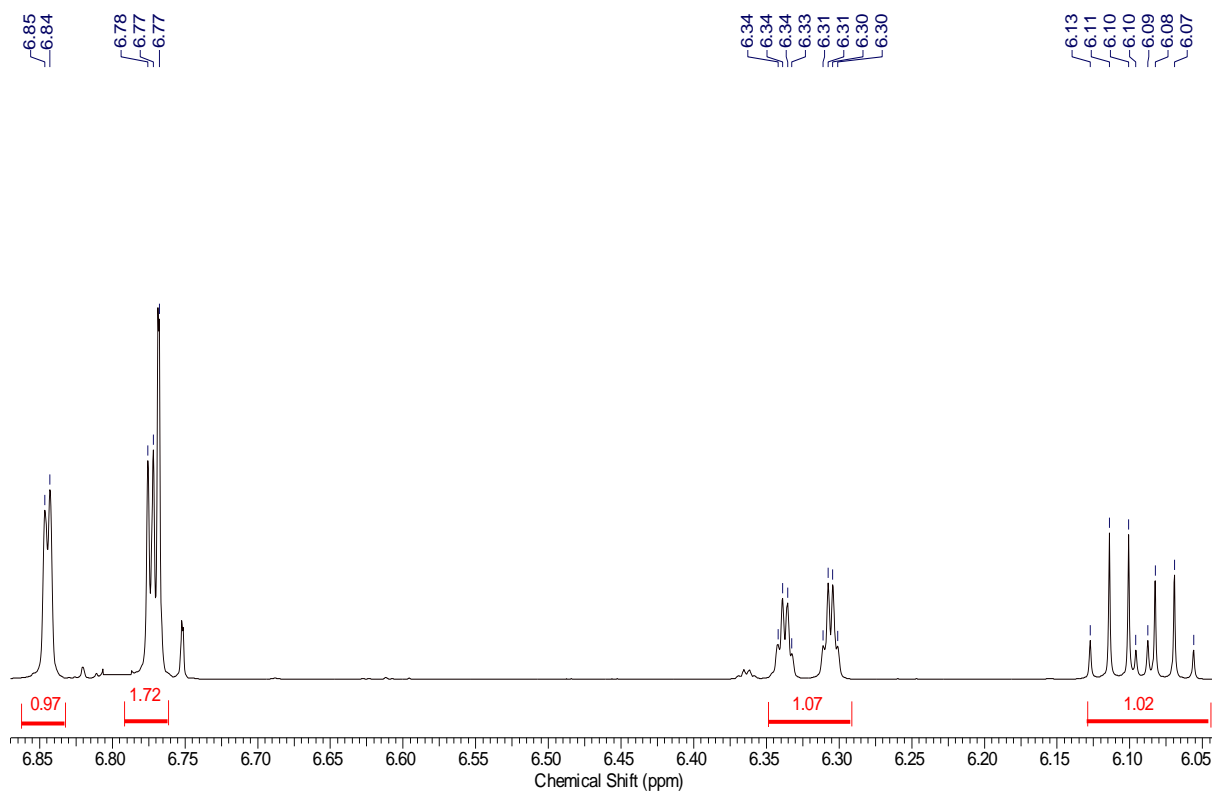


Figura 7.48 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 200 MHz) do *Z*- e *E*-isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS.

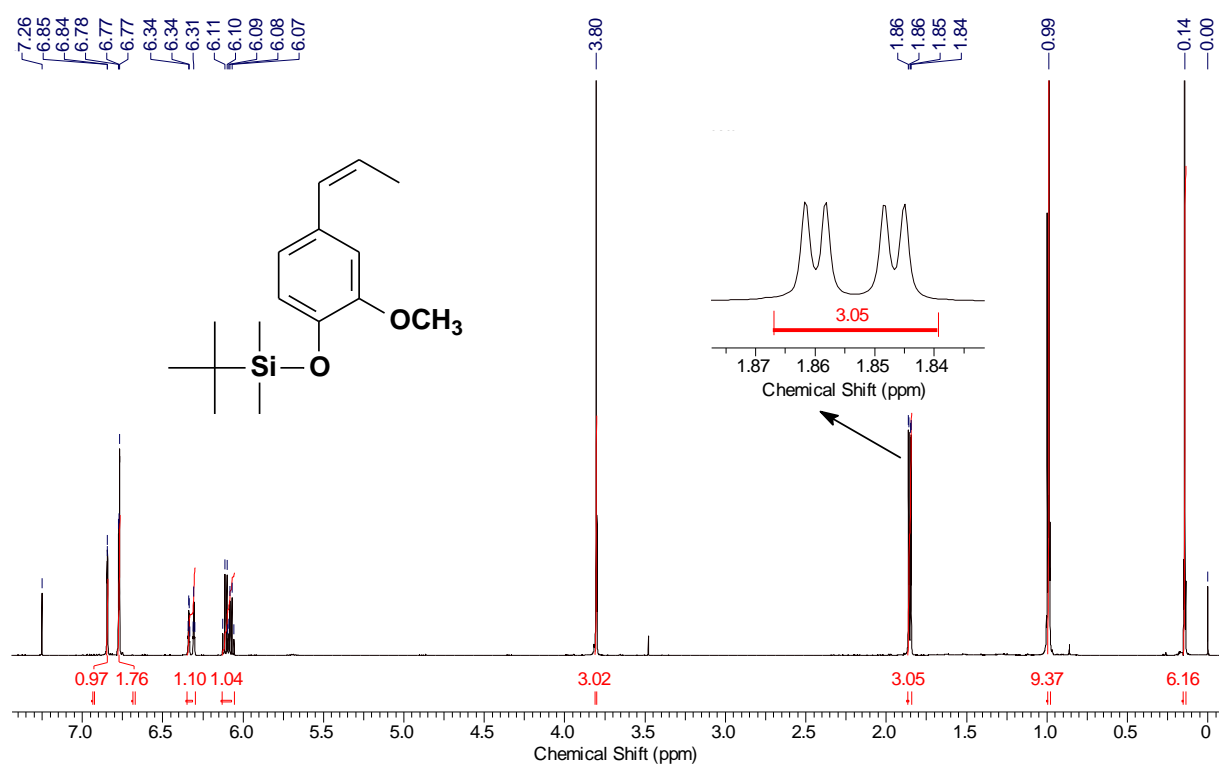


Figura 7.49 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do *E*-isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS após reação de fotoisomerização.

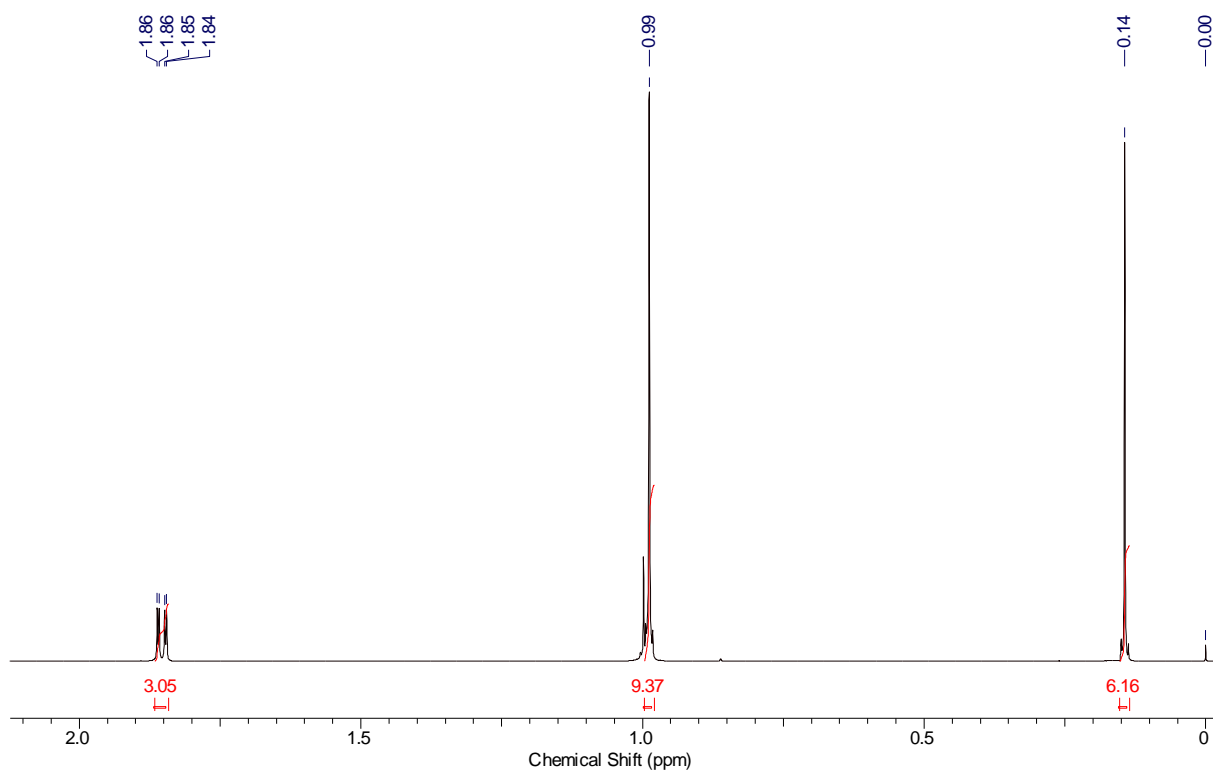


Figura 7.50 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do *E*-isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS após reação de fotoisomerização.

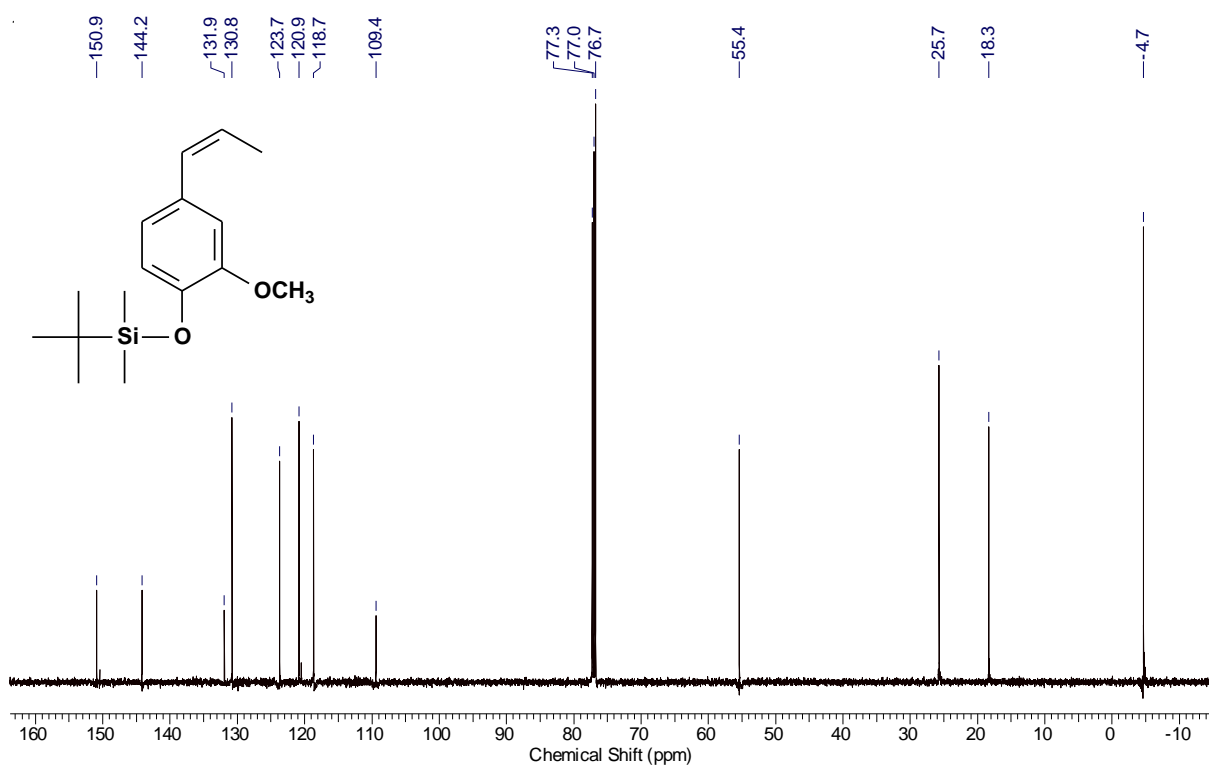


Figura 7.51 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) do *E*-isoeugenol com a hidroxila fenólica protegida com TBS.

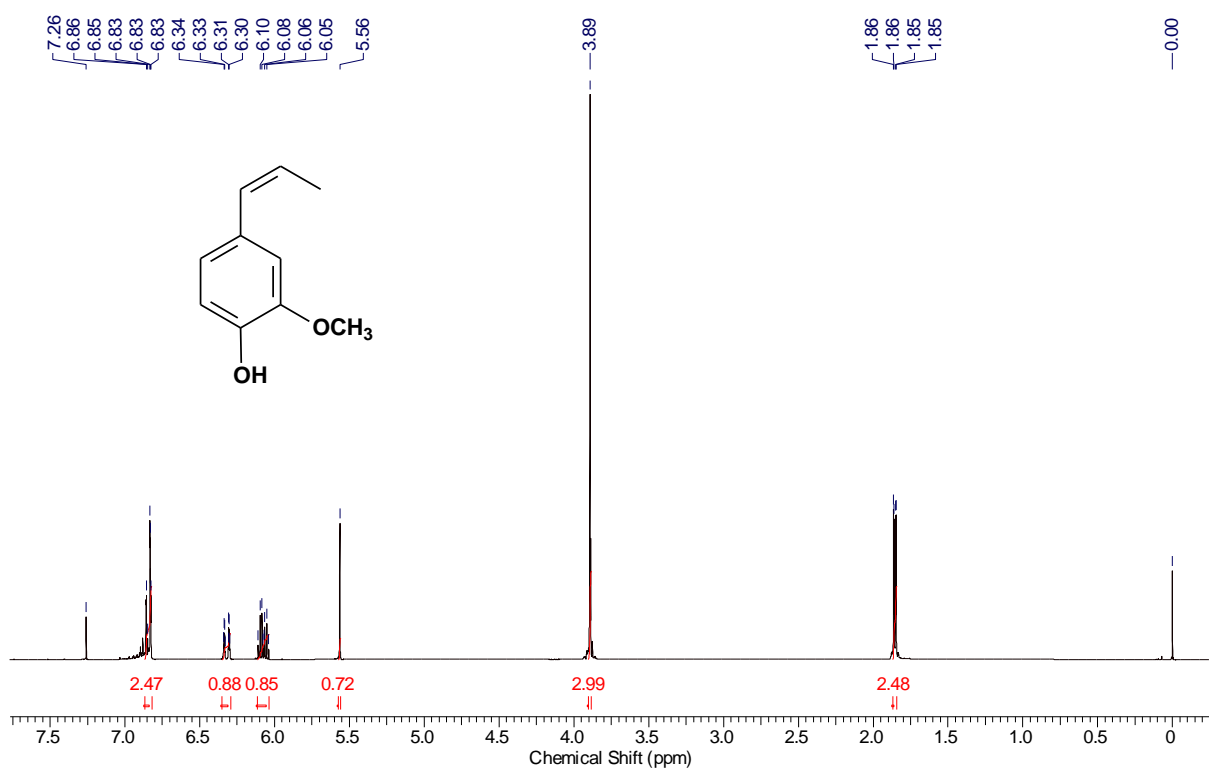


Figura 7.52 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) do *E*-isoeugenol.

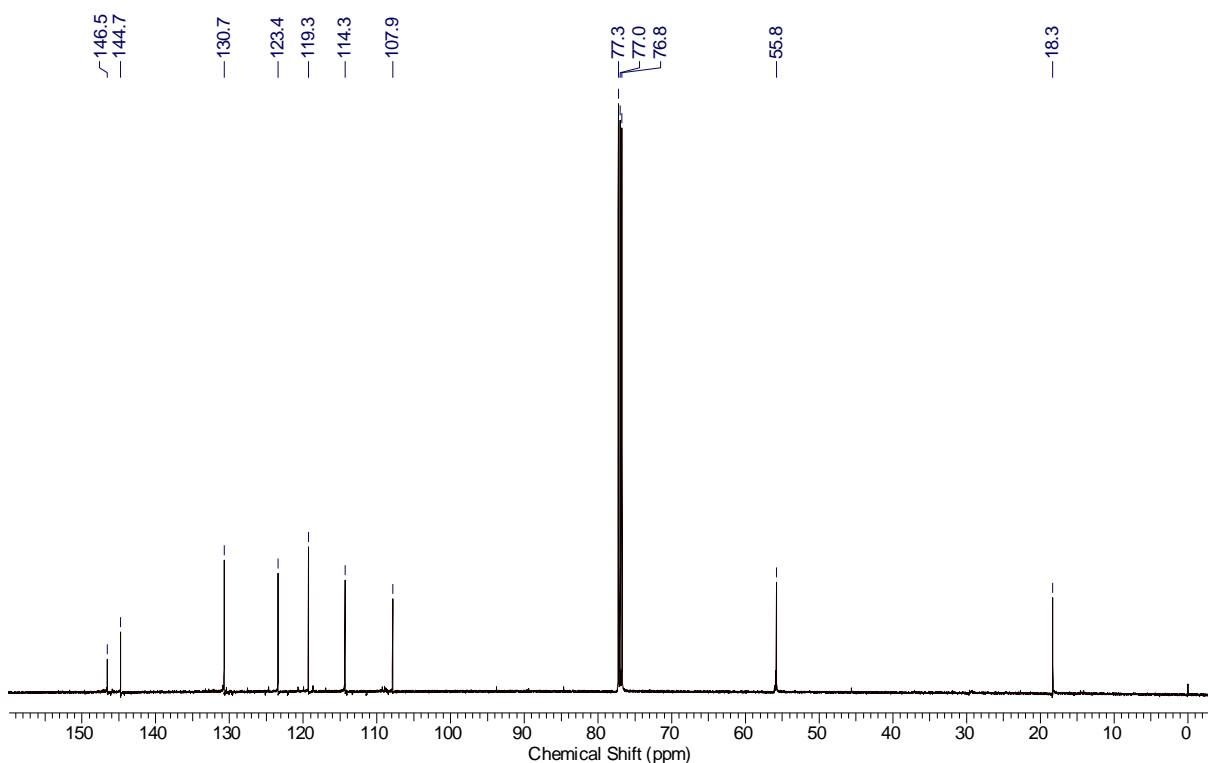


Figura 7.53 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do *E*-isoeugenol.

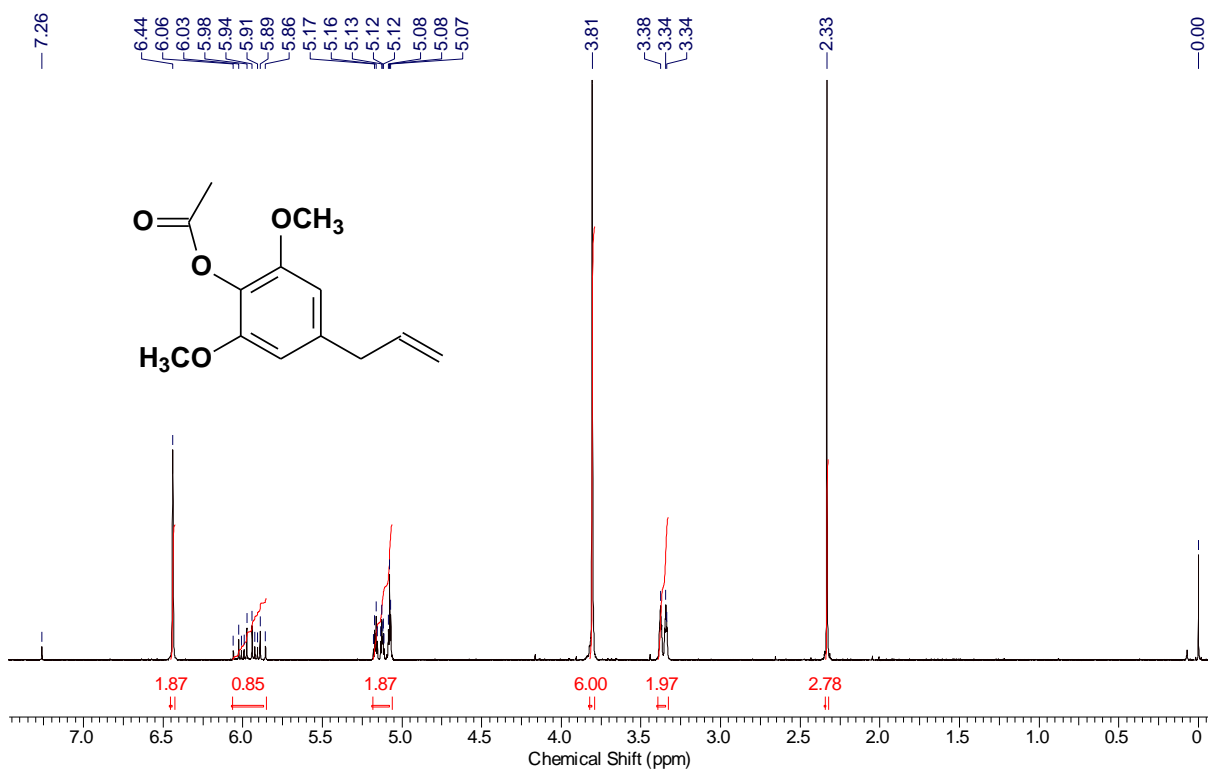


Figura 7.54 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do acetato de 4-alil-2,6-dimetoxifenila.

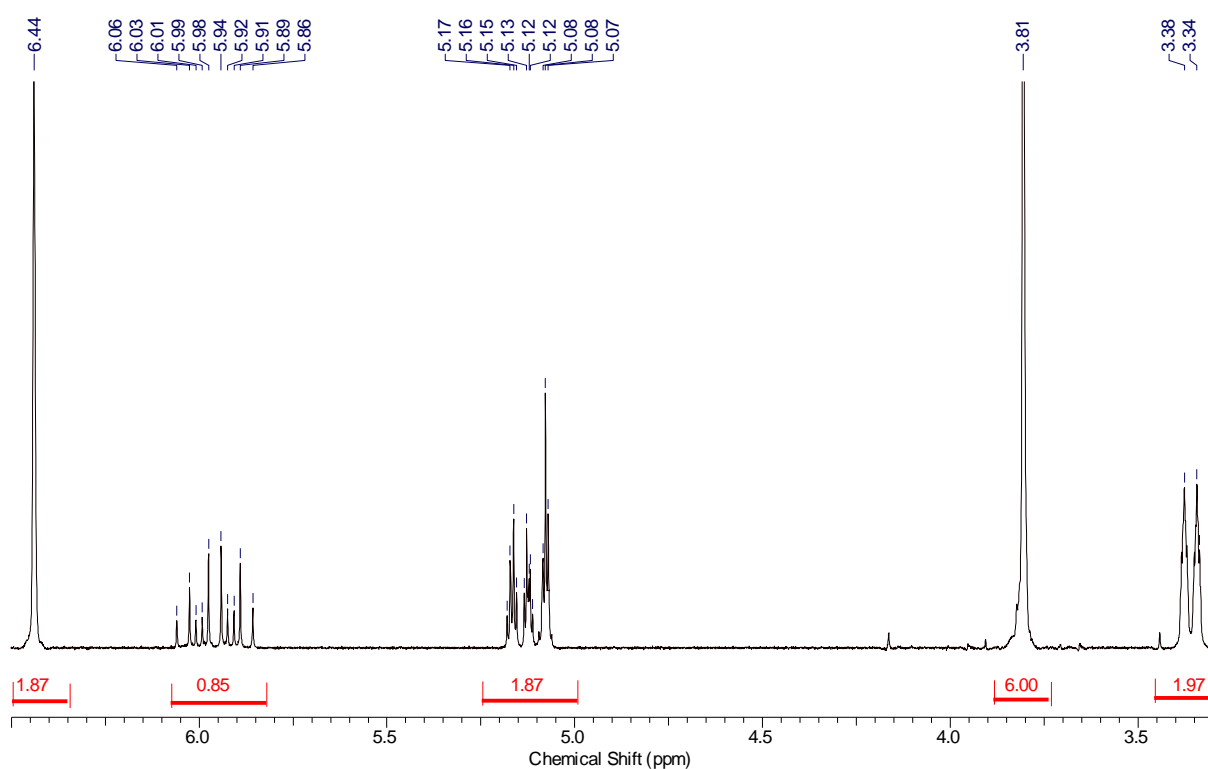


Figura 7.55 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de 4-aliil-2,6-dimetoxifenila.

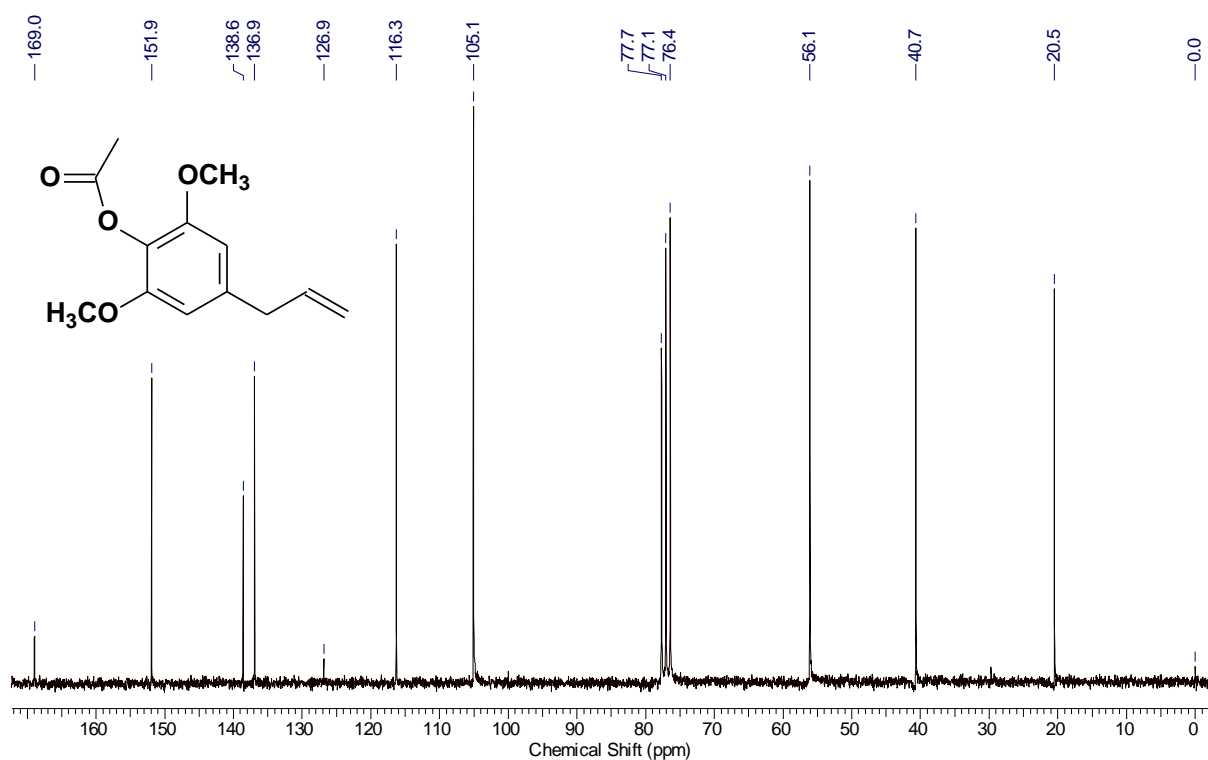


Figura 7.56 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do acetato de 4-aliil-2,6-dimetoxifenila.

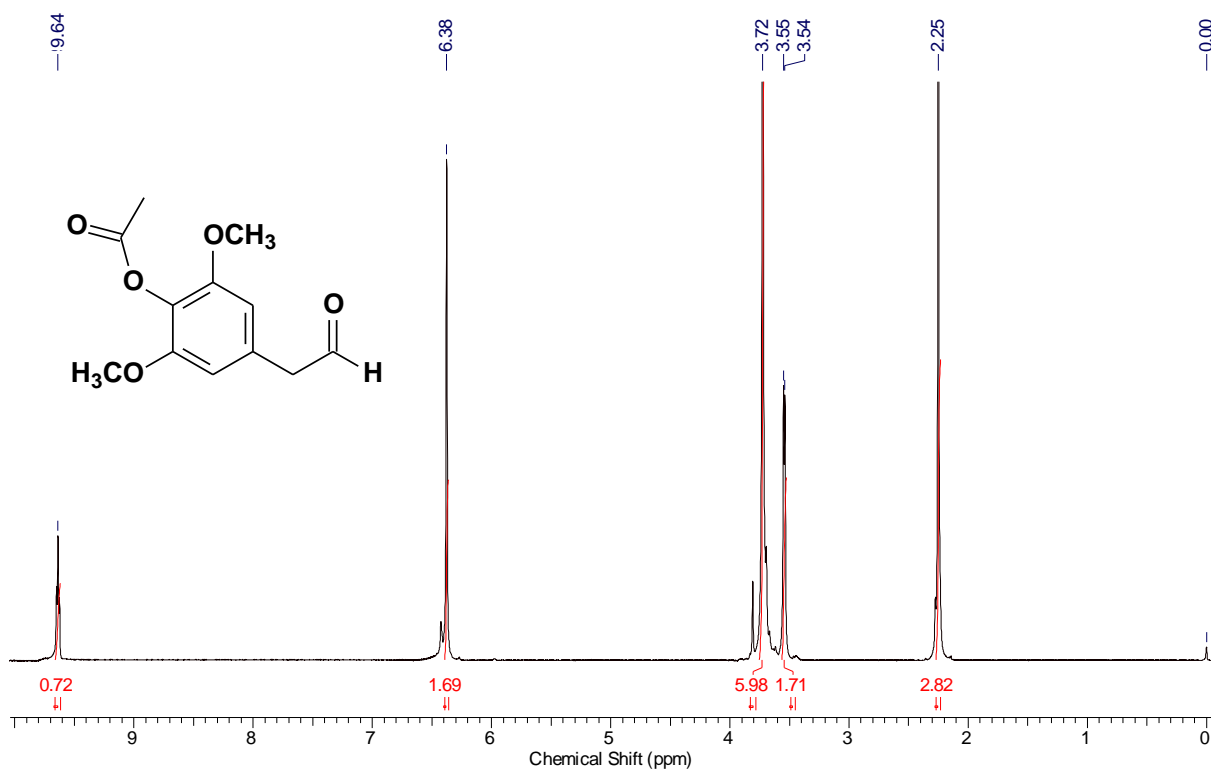


Figura 7.57 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) do fenilacetaldéido acetilado.

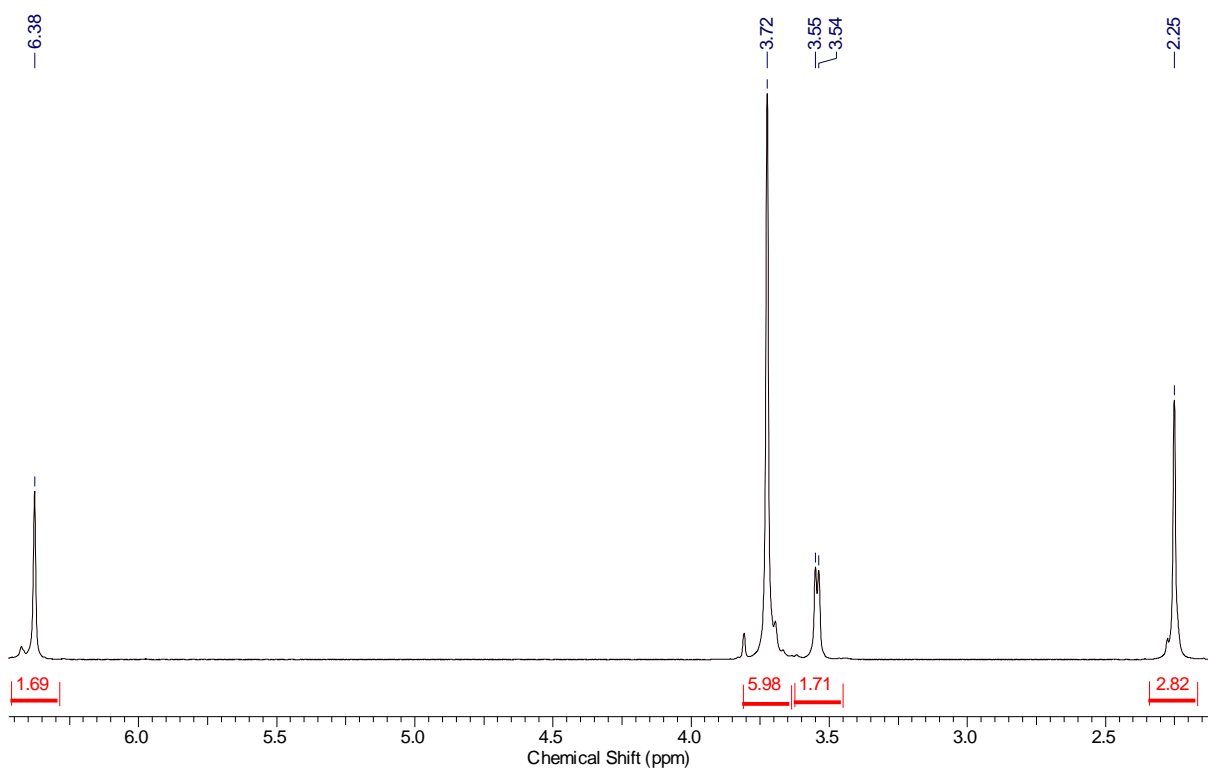


Figura 7.58 Ampliação do espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) do fenilacetaldéido acetilado.

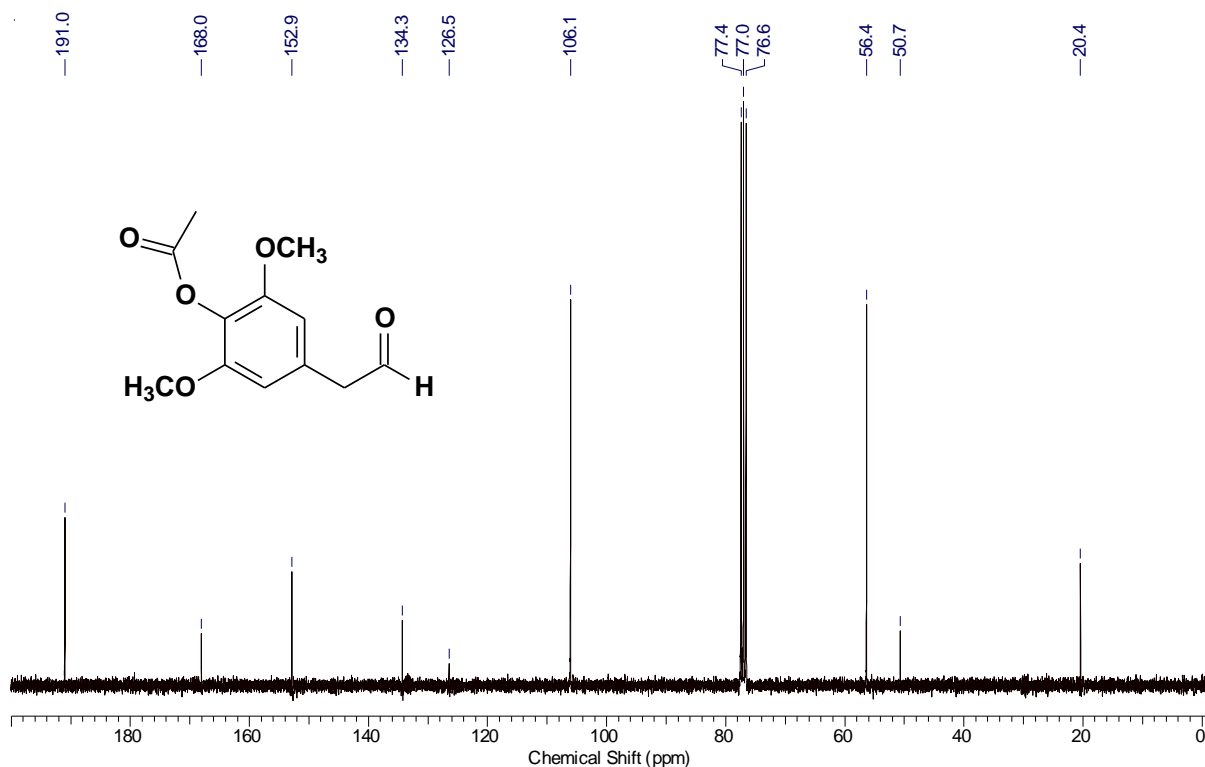


Figura 7.59 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do fenilacetaldéido acetilado.

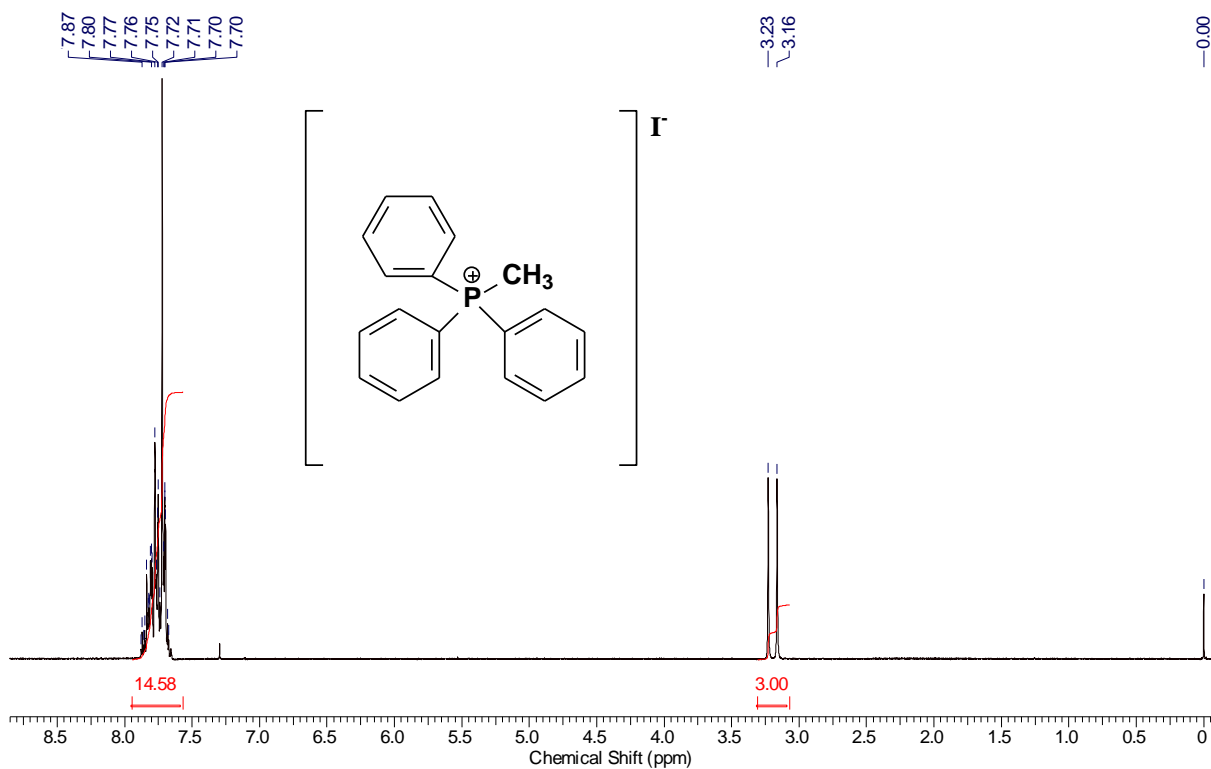


Figura 7.60 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do iodeto de metil trifenilfosfônio.

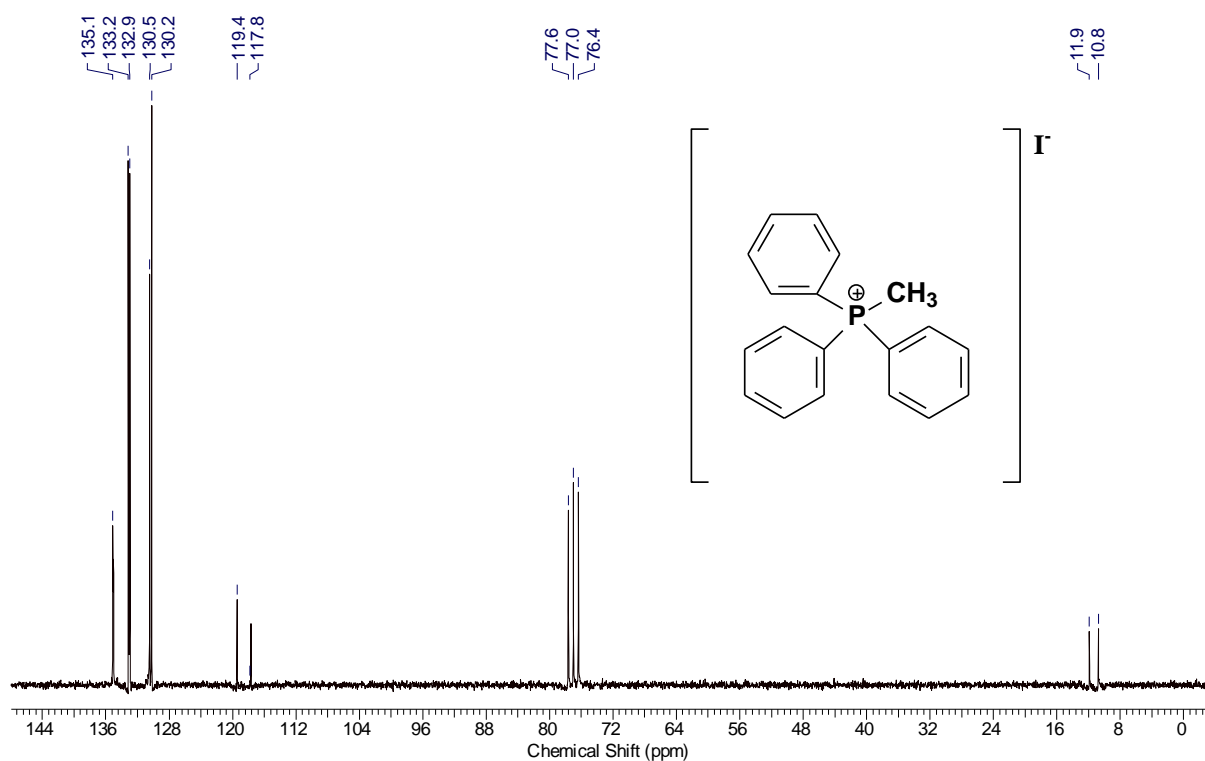


Figura 7.61 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do iodeto de metil trifenilfosfônio.

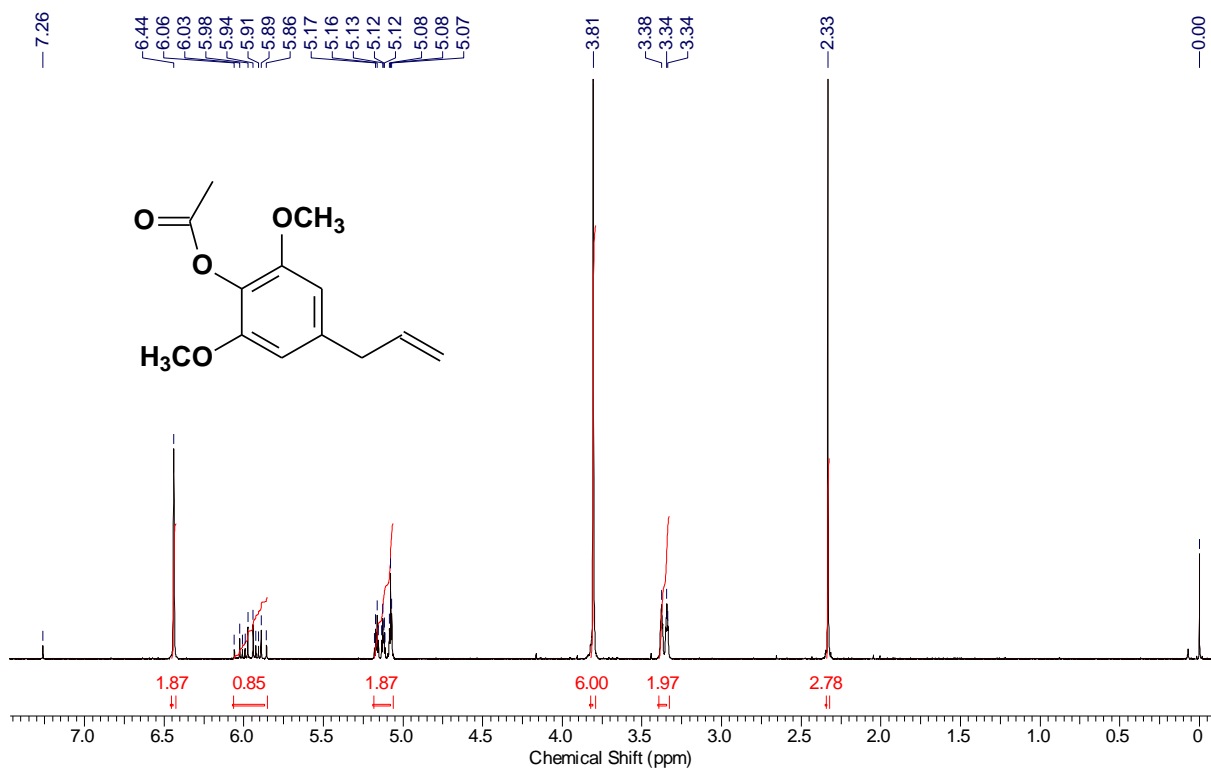


Figura 7.62 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) acetato de 4-aliil-2,6-dimetoxifenila.

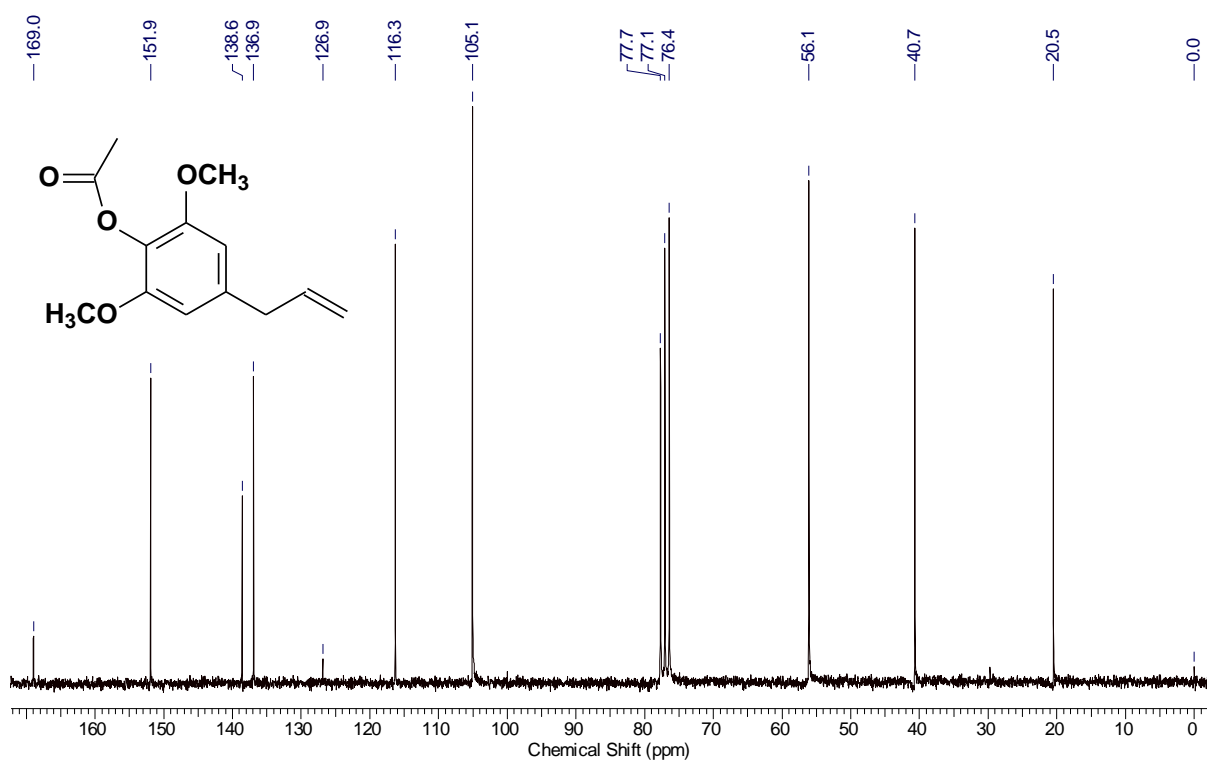


Figura 7.63 Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) do acetato de 4-aliil-2,6-dimetoxifenila.

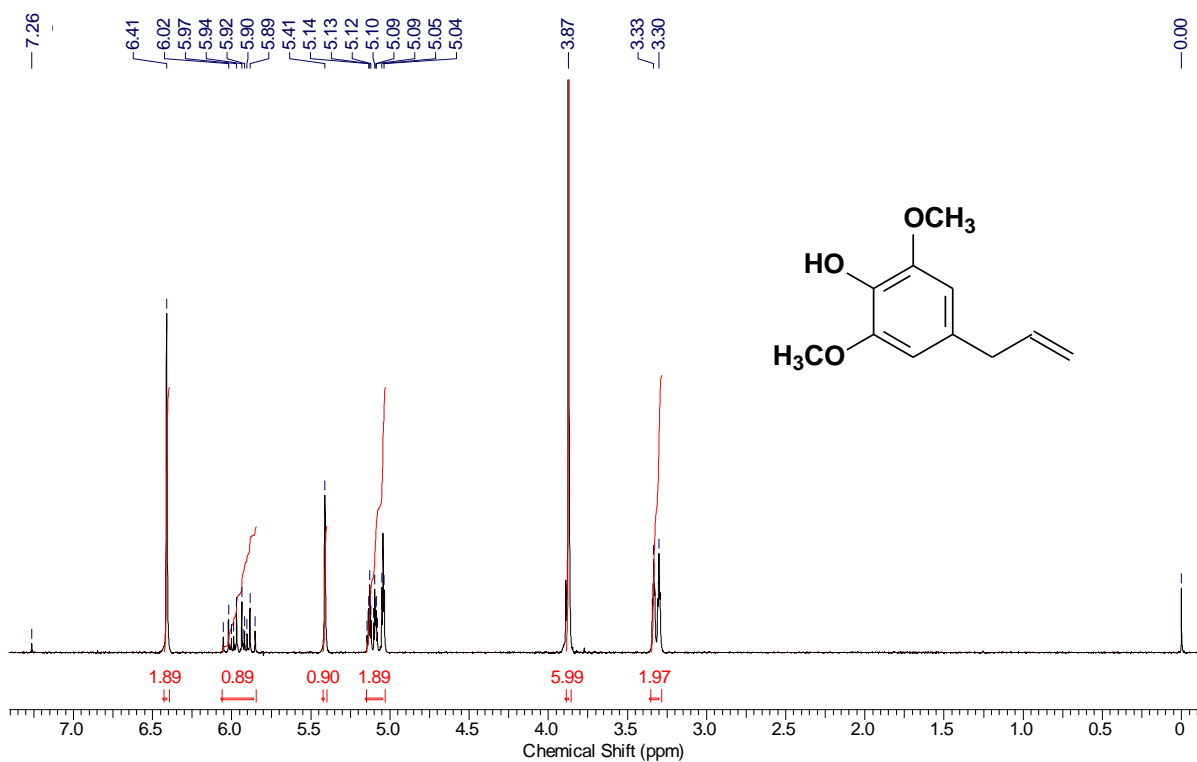


Figura 7.64 Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) do 5-metoxi eugenol.

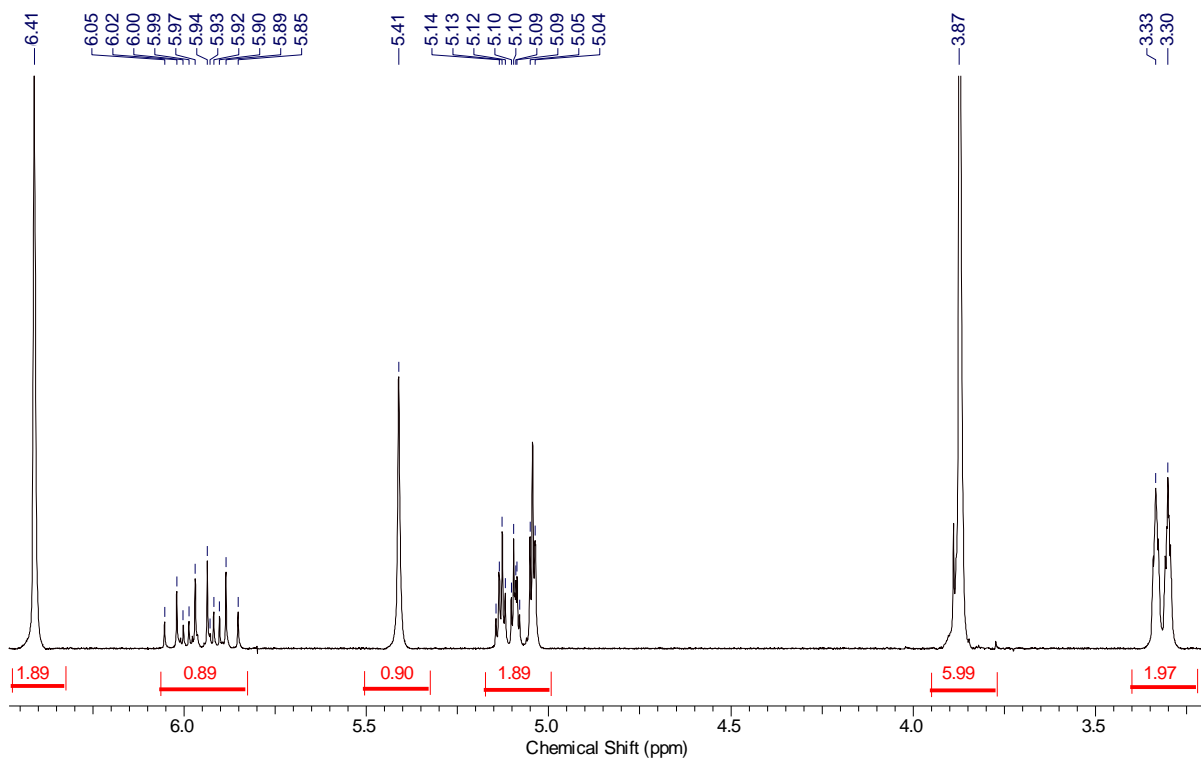


Figura 7.65 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do 5-metoxi eugenol.

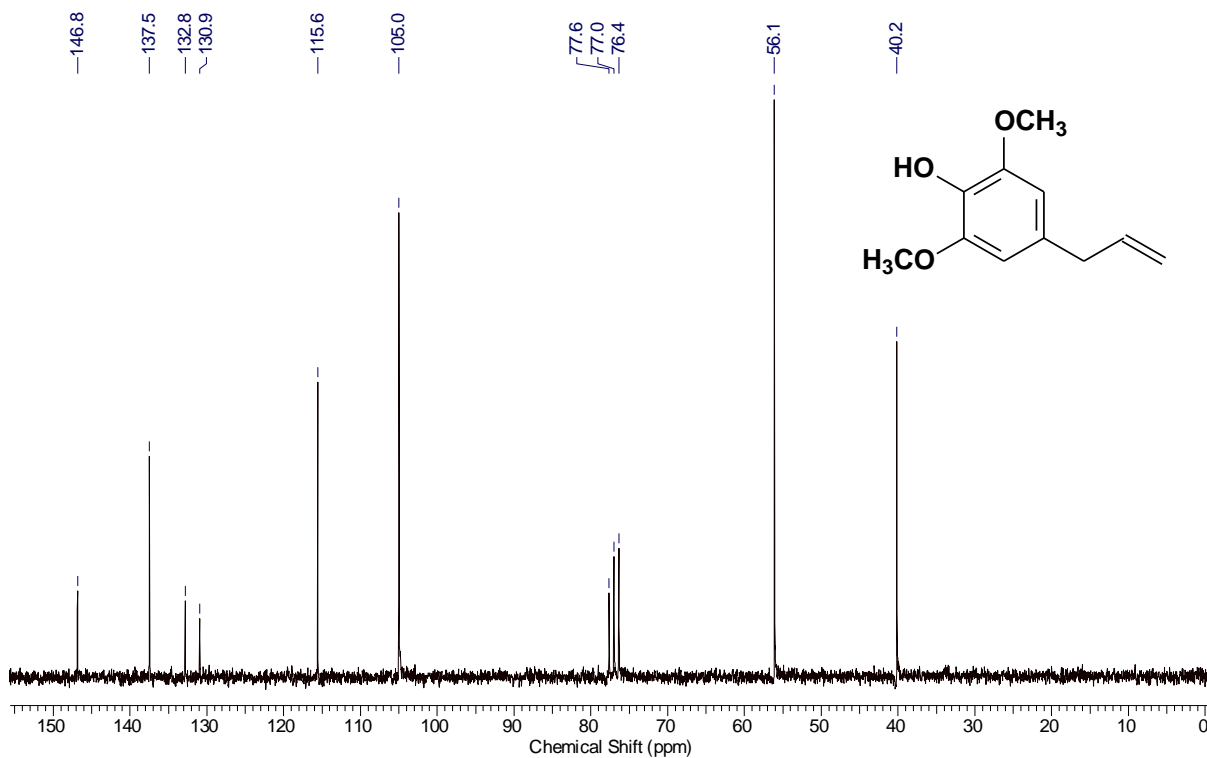


Figura 7.66 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do 5-metoxi eugenol.

8. APÊNDICE B: ESPECTROS DOS PRODUTOS NATURAIS

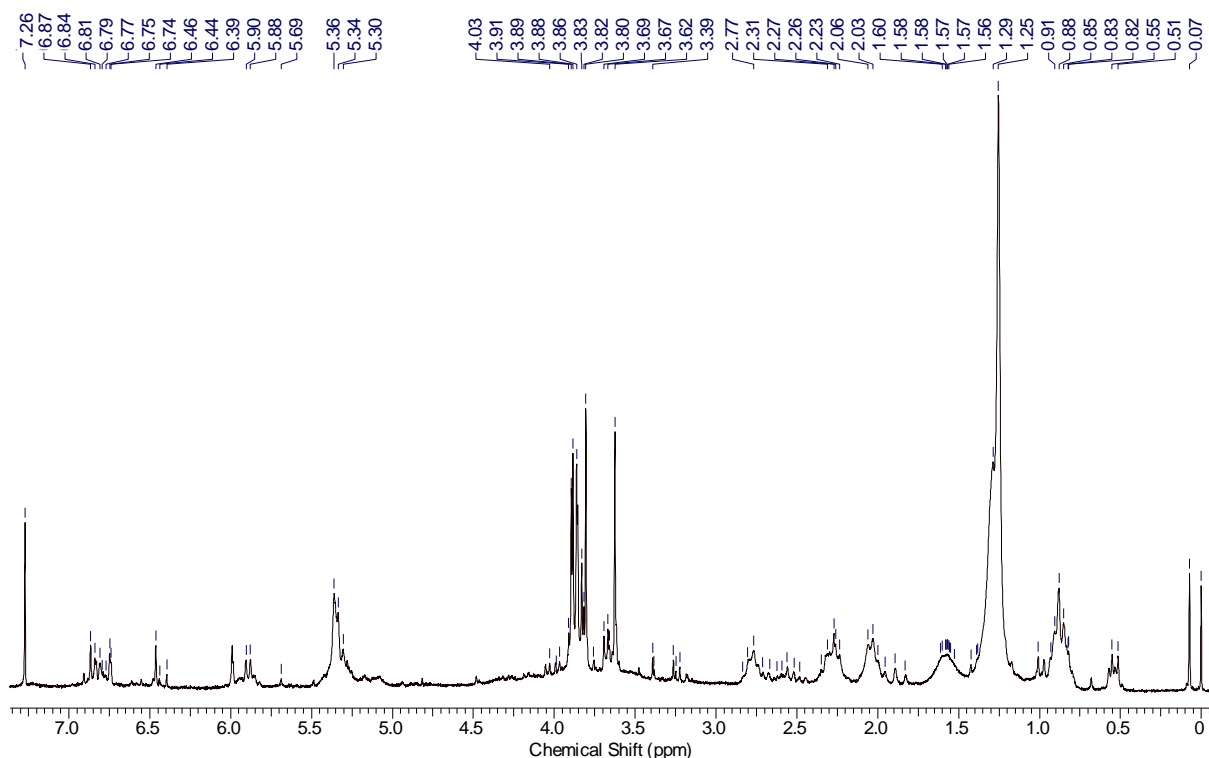


Figura 8.1. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do extrato de clorofórmio dos embriões.

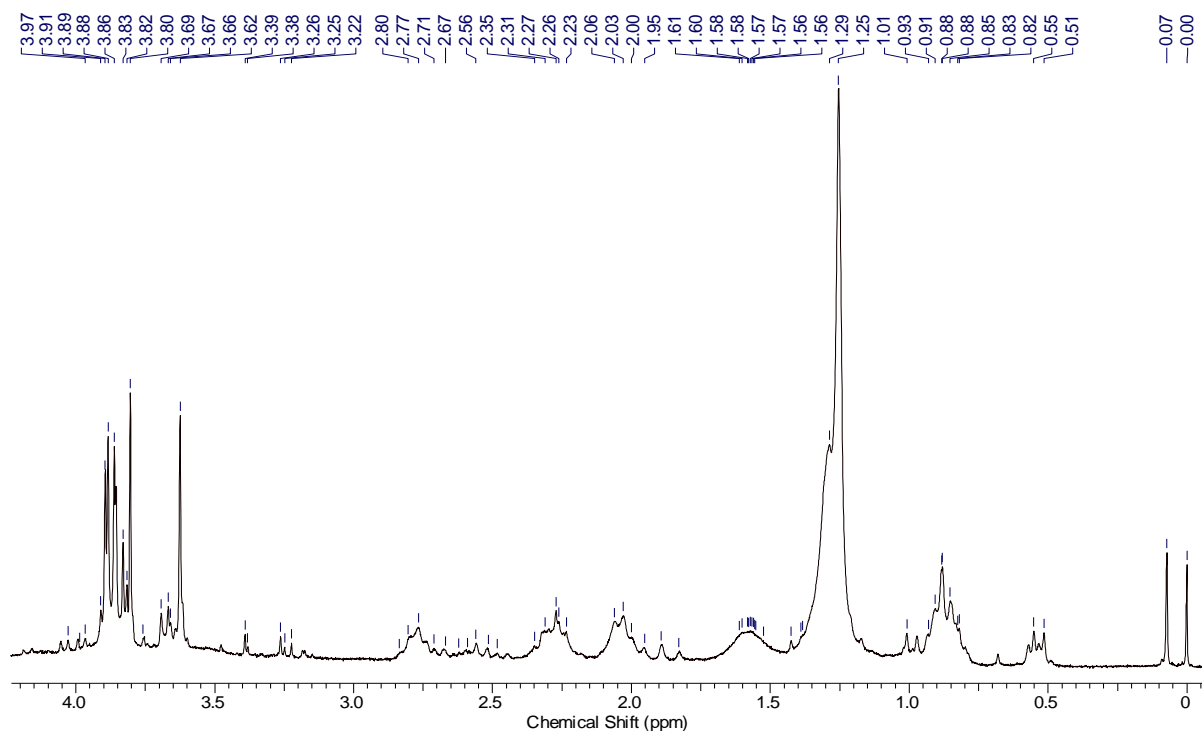


Figura 8.2 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do ext. de CHCl_3 dos embriões

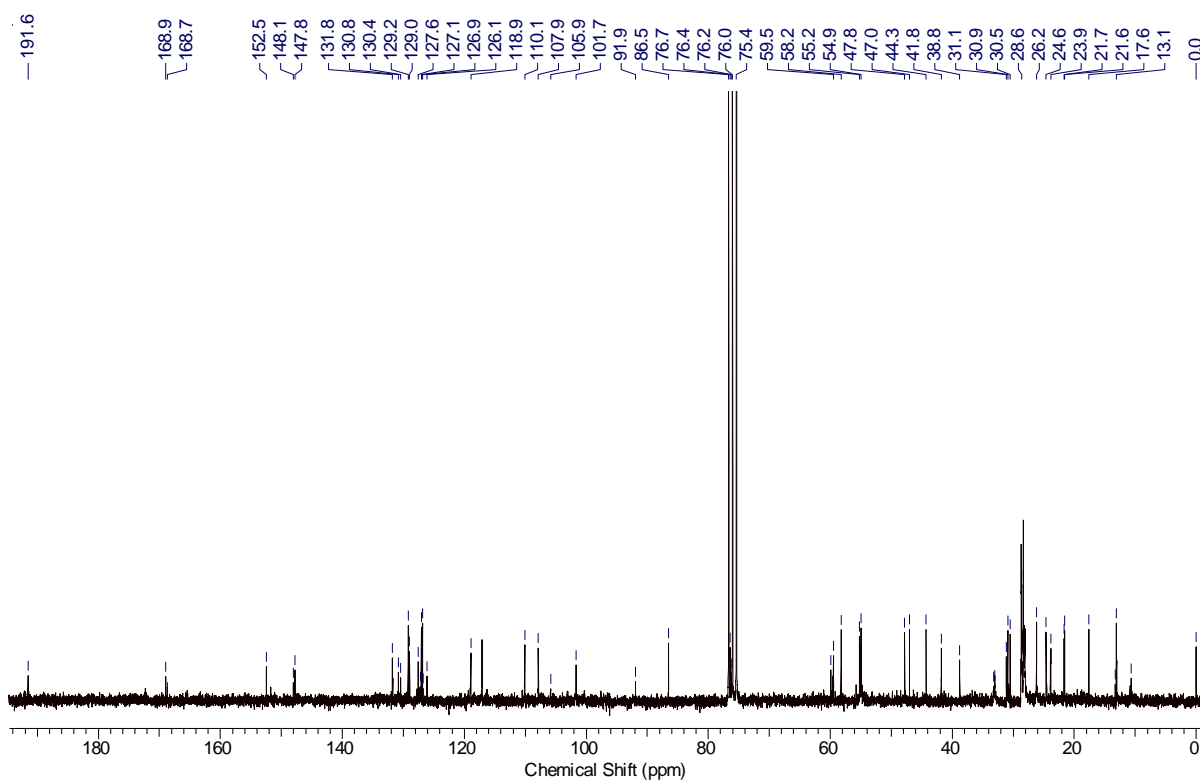


Figura 8.3. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) do extrato de clorofórmio dos embriões.

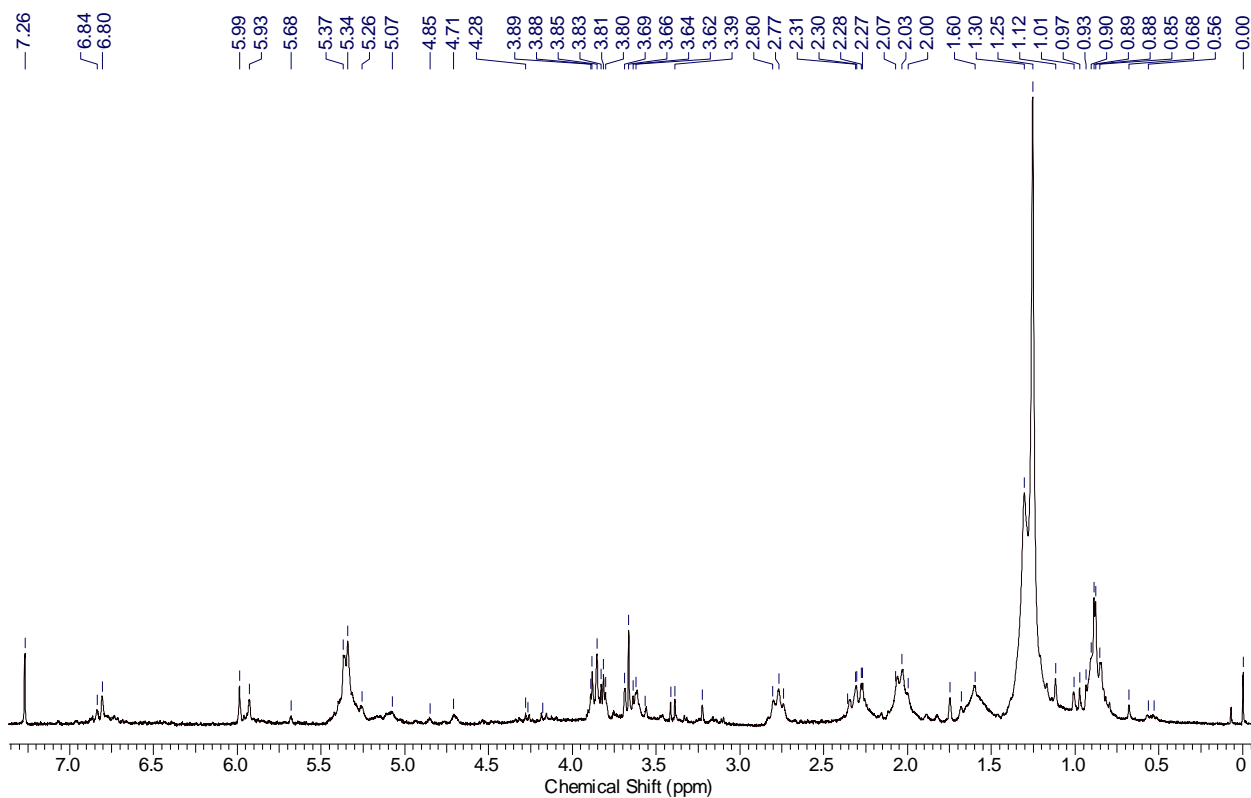


Figura 8.4. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do extrato de hexano dos embriões.

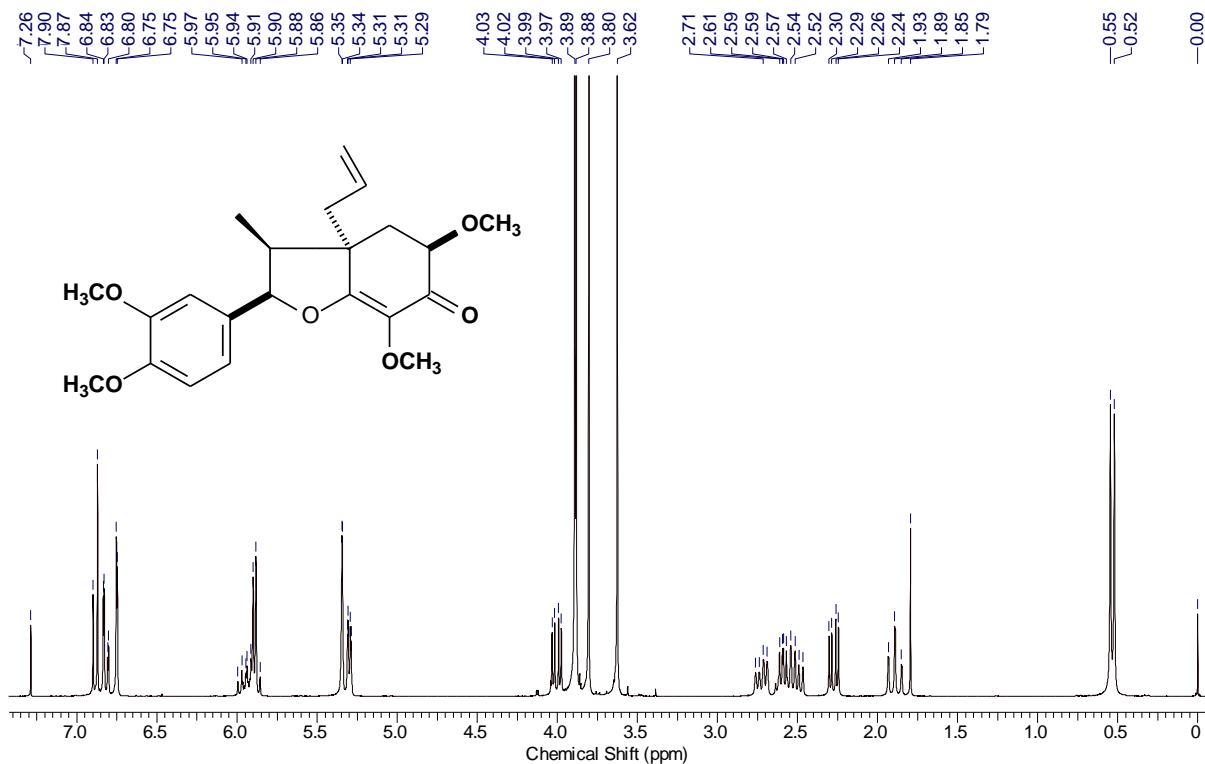


Figura 8.5. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da 5'-metoxiporosina.

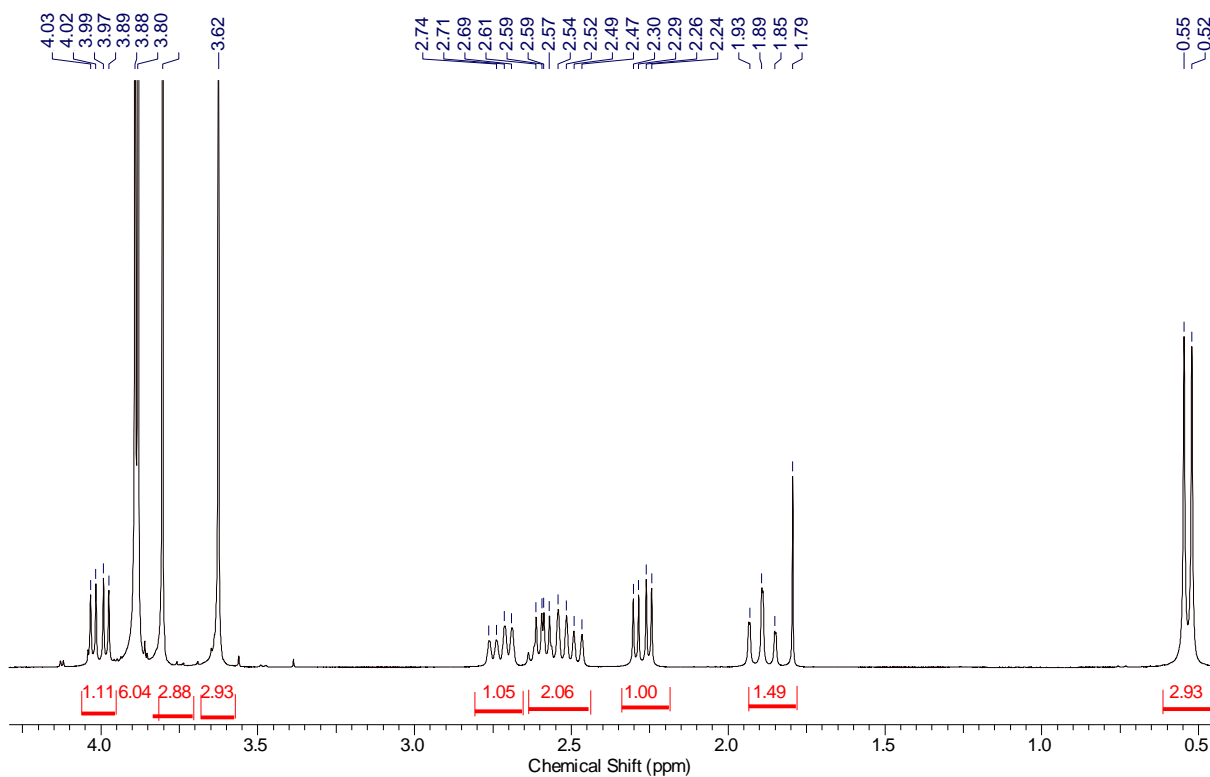


Figura 8.6. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da 5'-metoxiporosina em abundância natural.

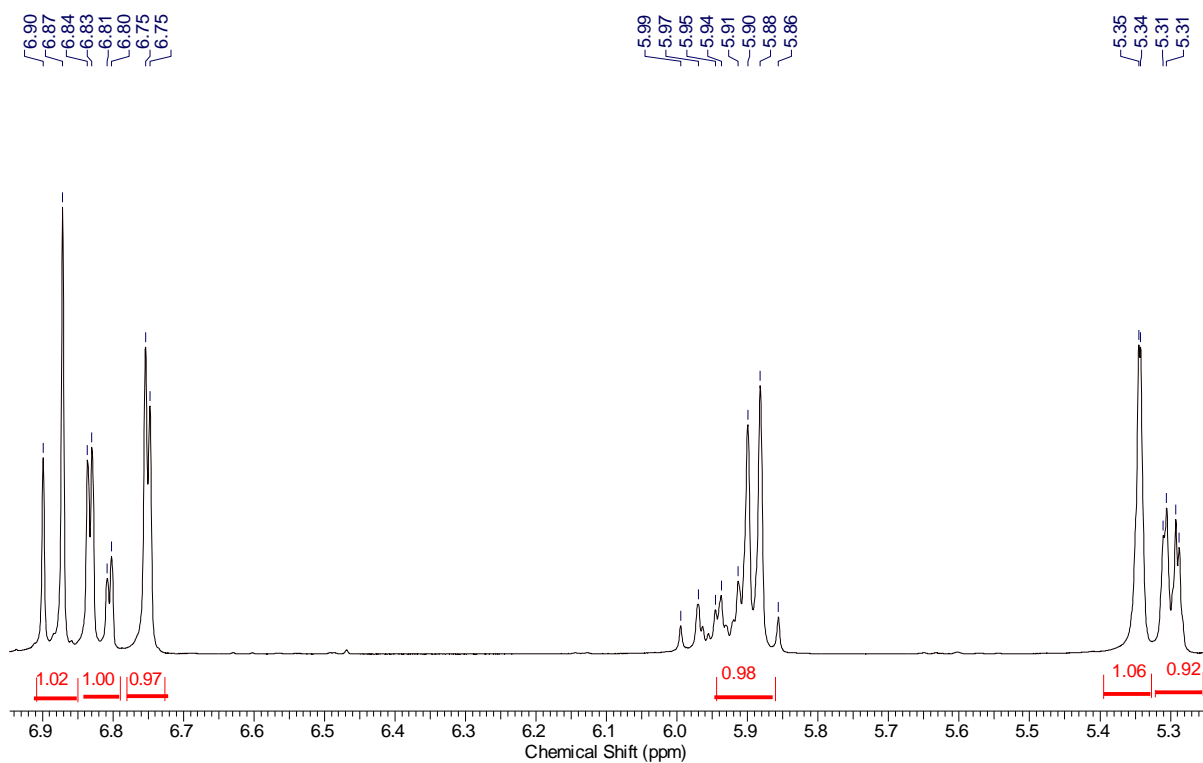


Figura 8.7. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da 5'-metoxiporosina

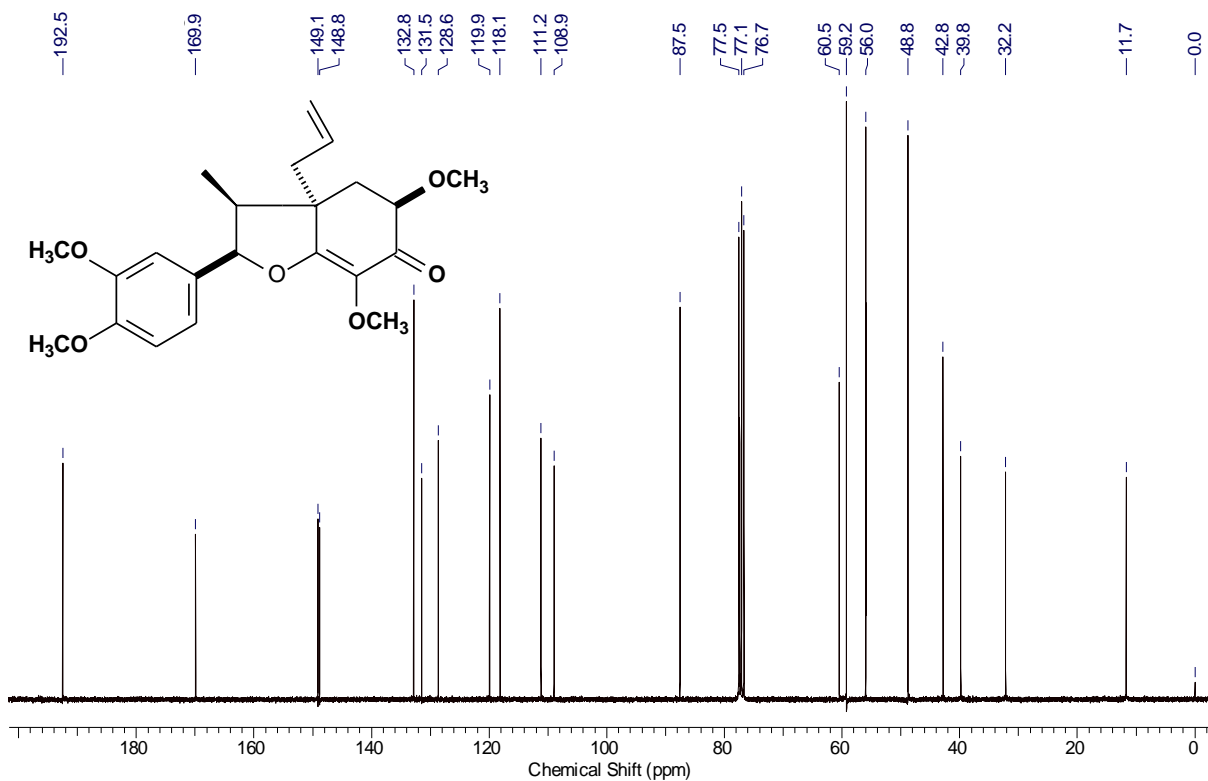


Figura 8.8 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de abundância natural da 5'-metoxiporosina

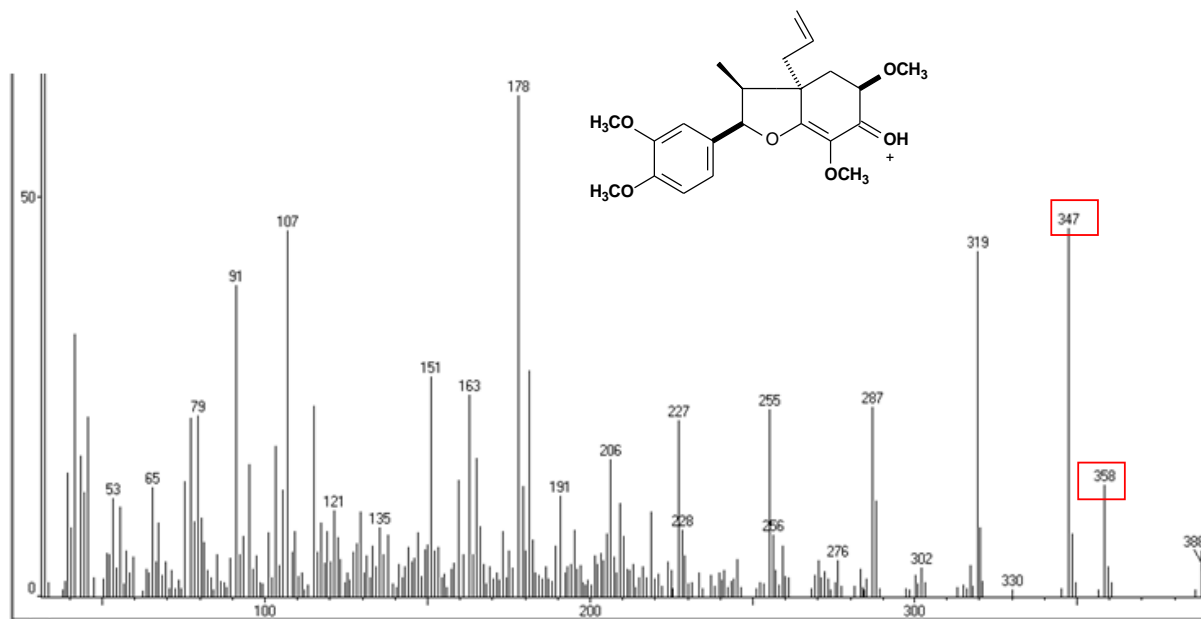


Figura 8.9 Espectro de massas (EI) da 5'-metoxiporosina

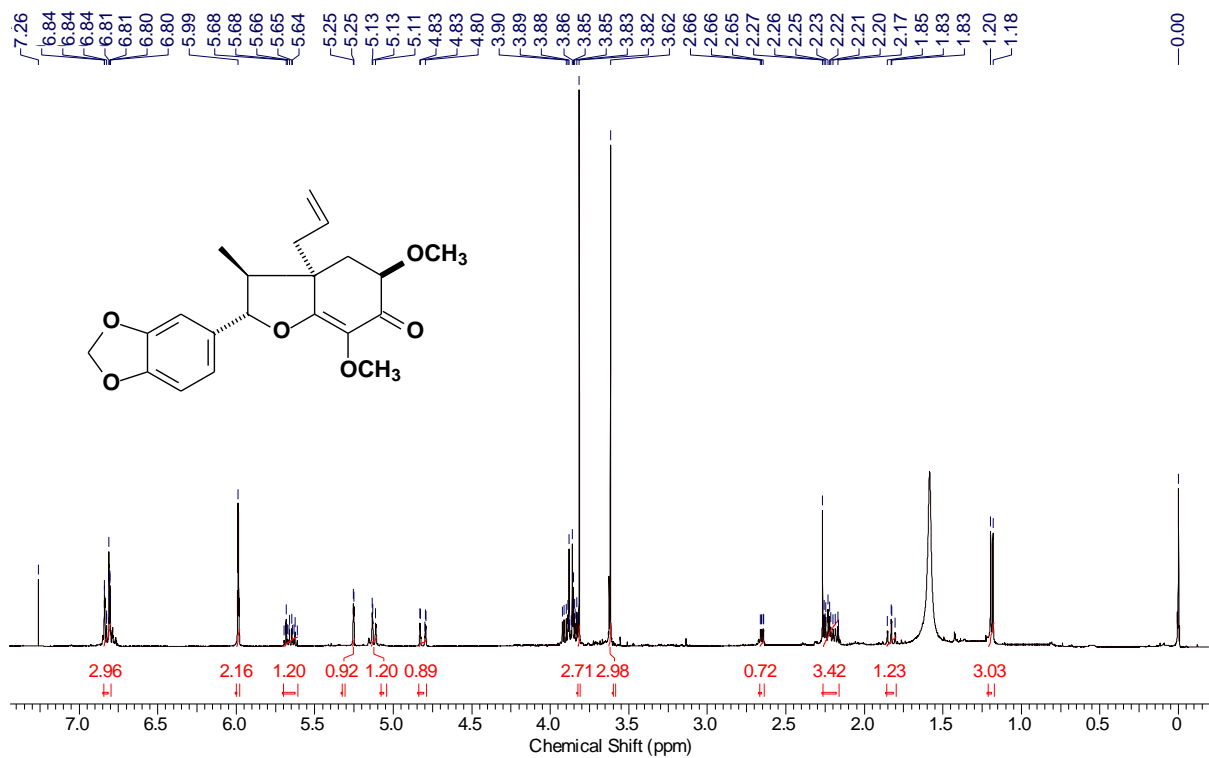


Figura 8.10 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da armenina B

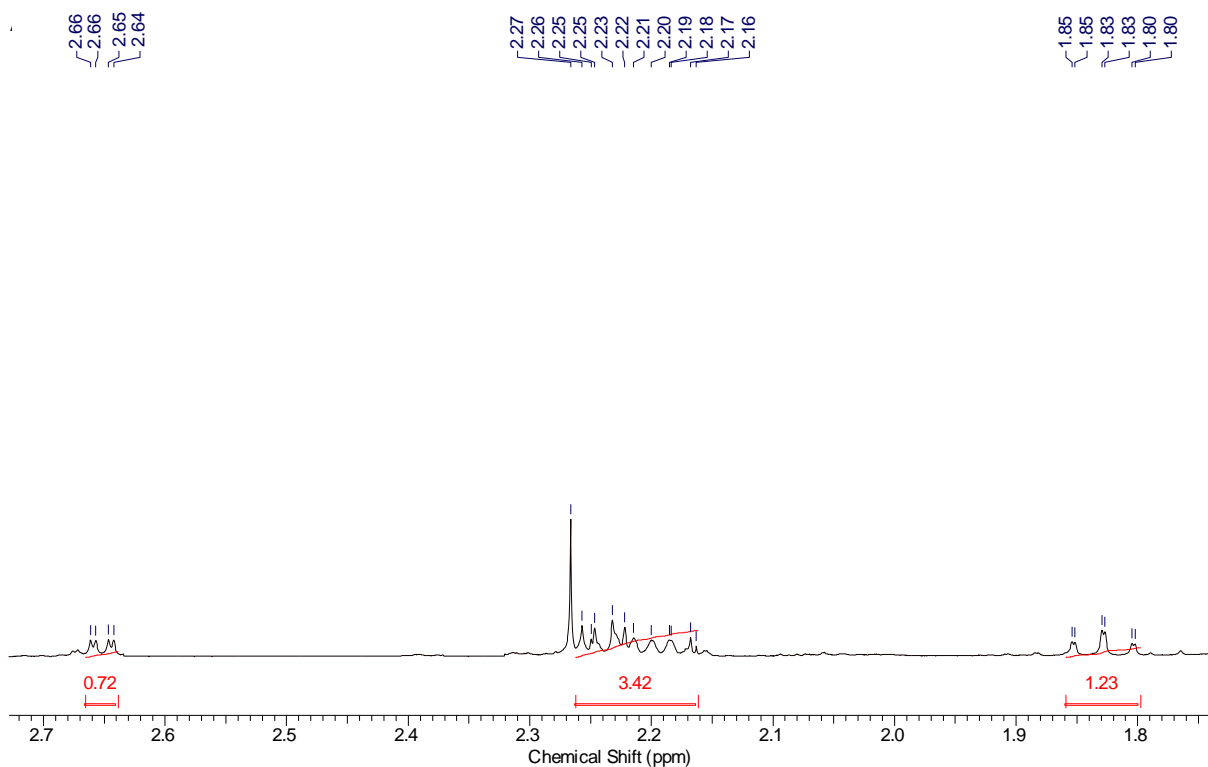


Figura 8.11 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da armenina B

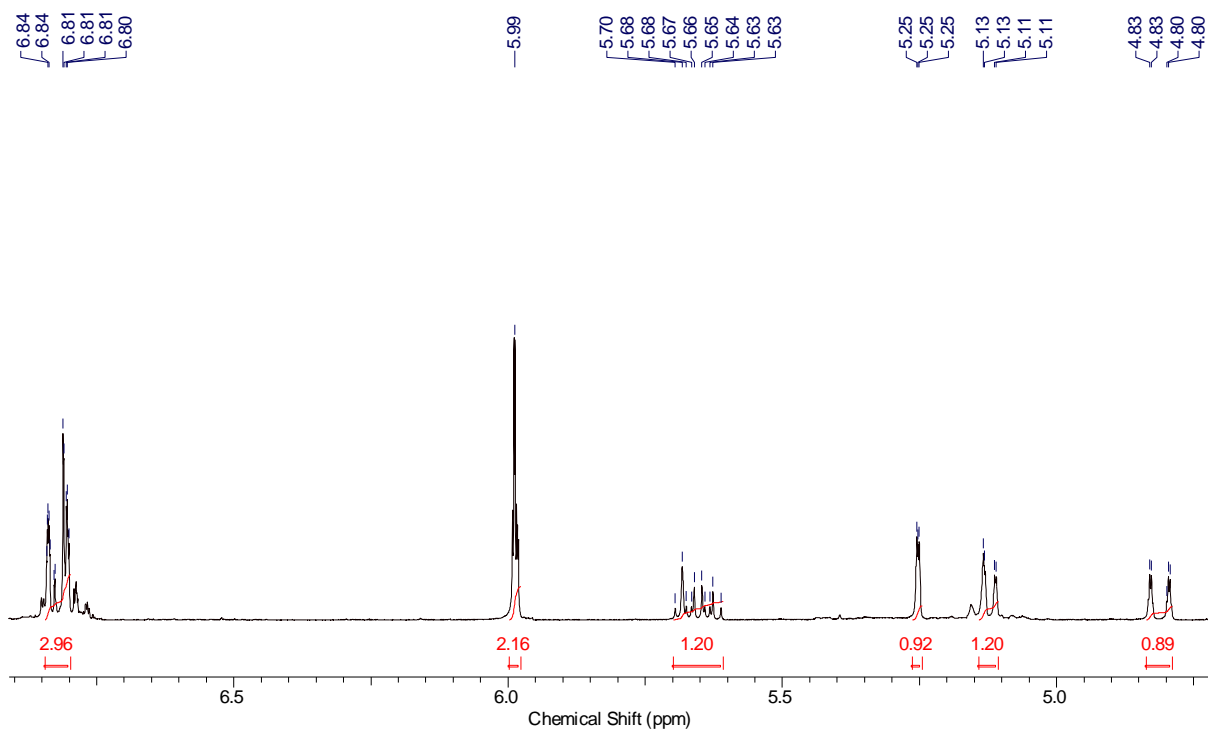


Figura 8.12 Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da armenina B

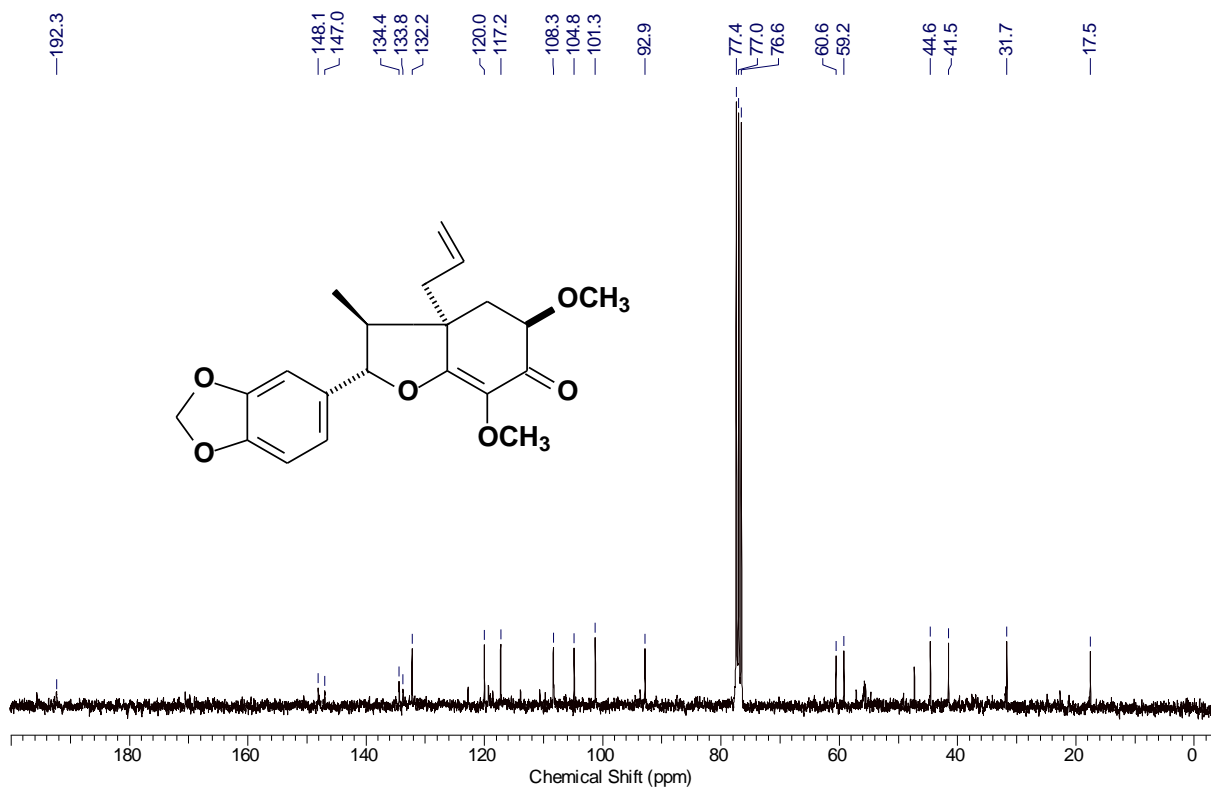


Figura 8.13 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) de abundância natural da armenina B

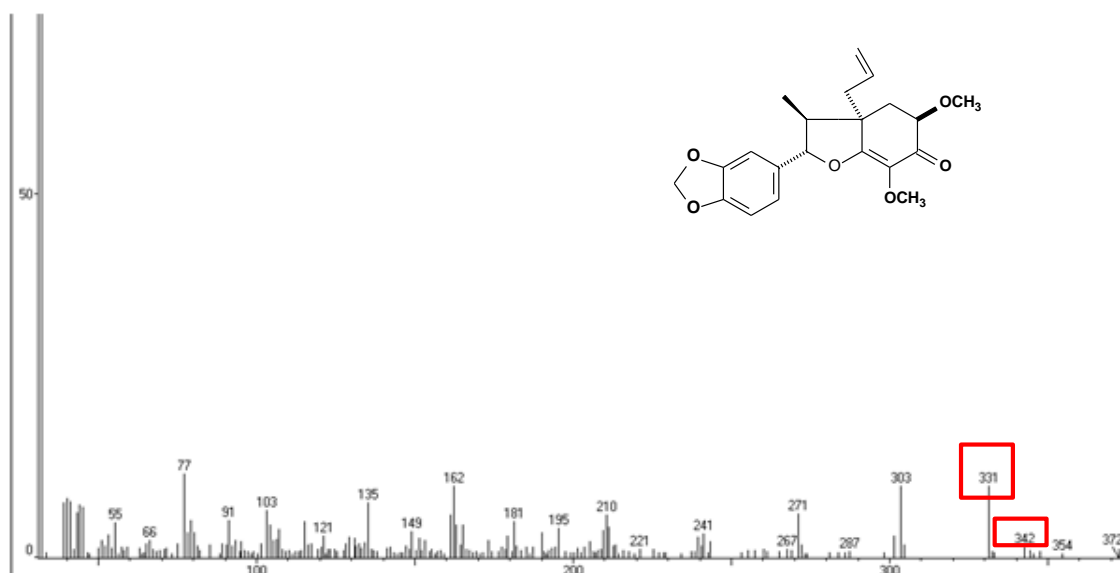


Figura 8.14 Espectro de massas (EI) da armenina B

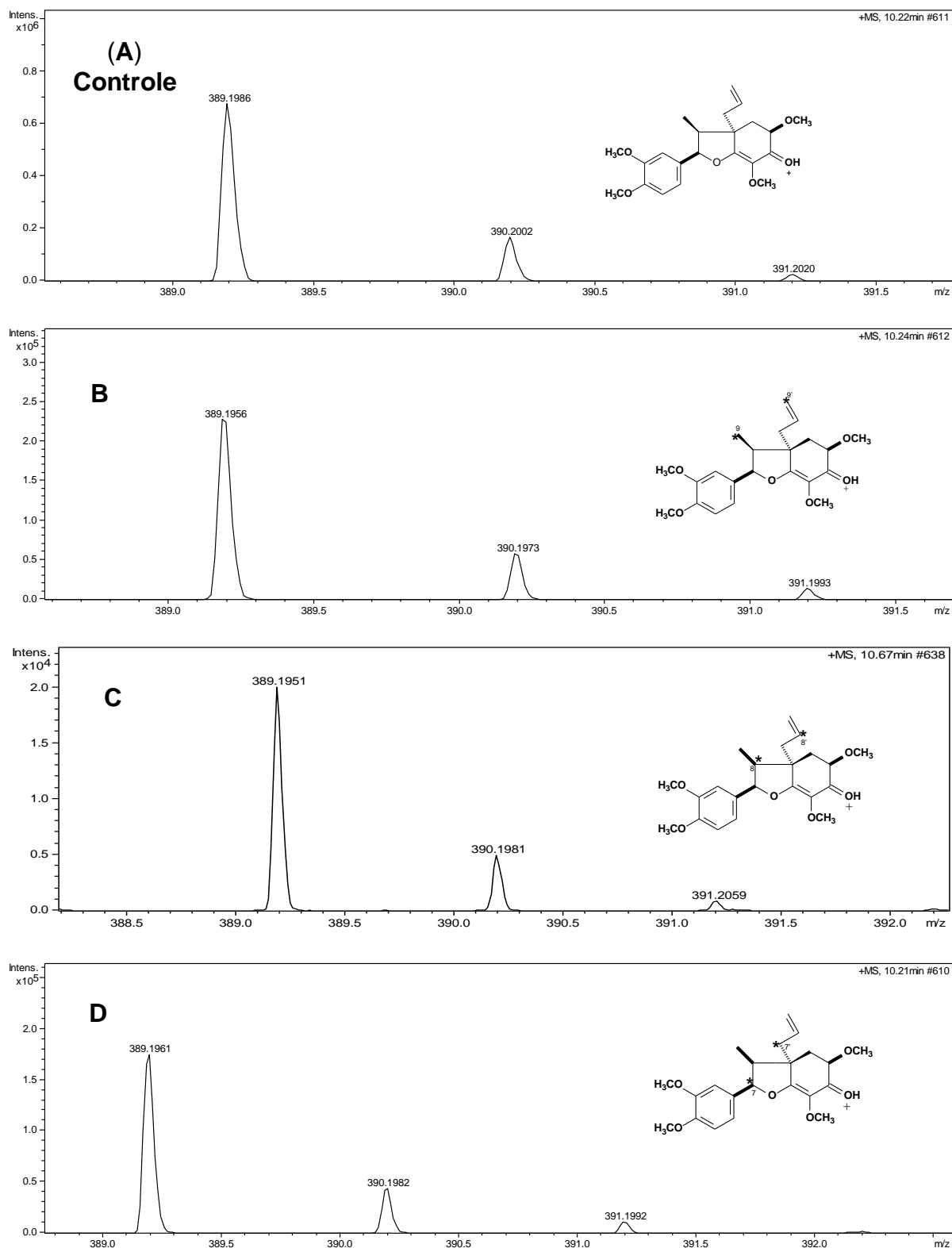


Figura 8.15 Espectro de massas (ESI) de incorporação de ^{13}C na 5'-metoxi porosina. (A) Controle; (B)– (D) 5'-metoxiporosina incorporada com L-[1- ^{13}C], L-[2- ^{13}C] e L-[3- ^{13}C]-fenilalanina, respectivamente.

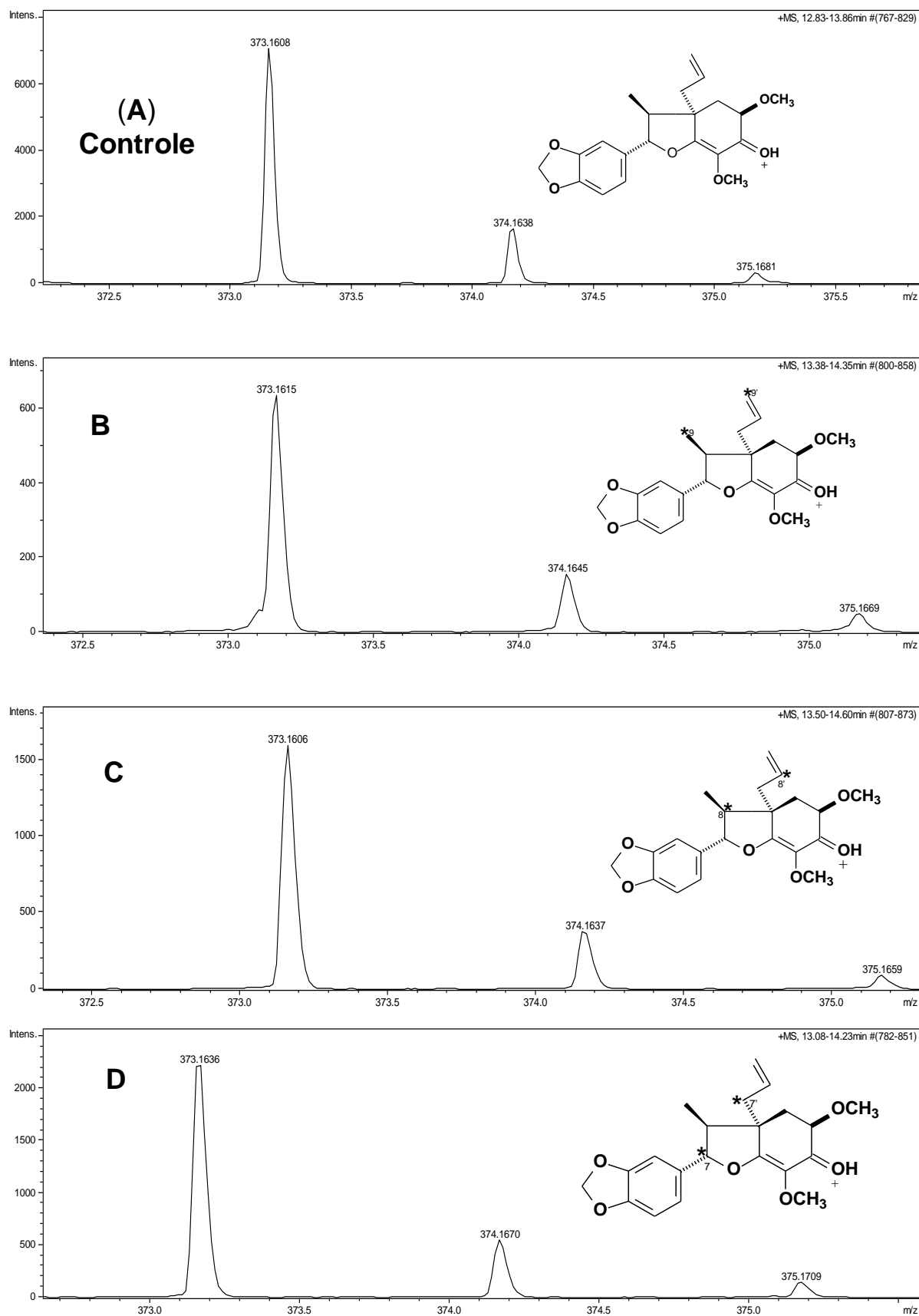


Figura 8.16 Espectro de massas (ESI) de incorporação de ^{13}C na armenina B. **(A)** Controle; **(B) – (D)** armenina B incorporada com L-[1- ^{13}C], L-[2- ^{13}C] e L-[3- ^{13}C]-fenilalanina, respectivamente.

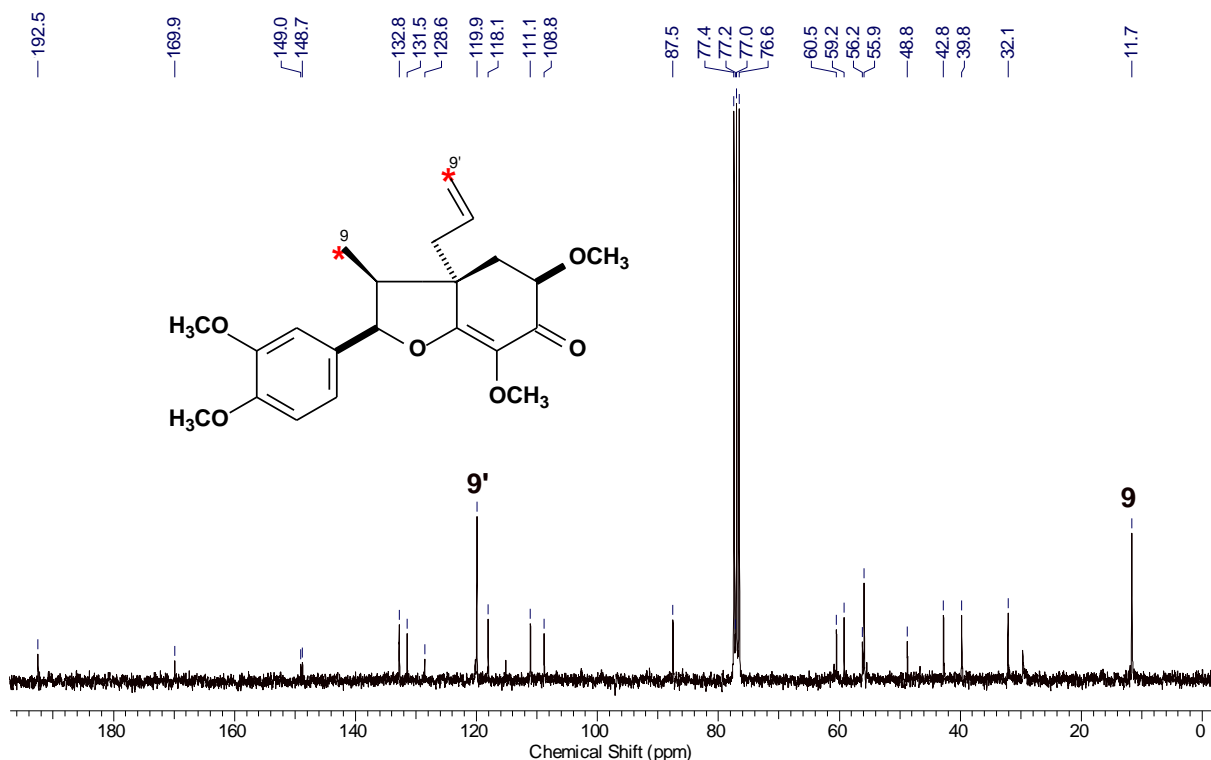


Figura 8.17 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina enriquecida com L-[1- ^{13}C]-fenilalanina

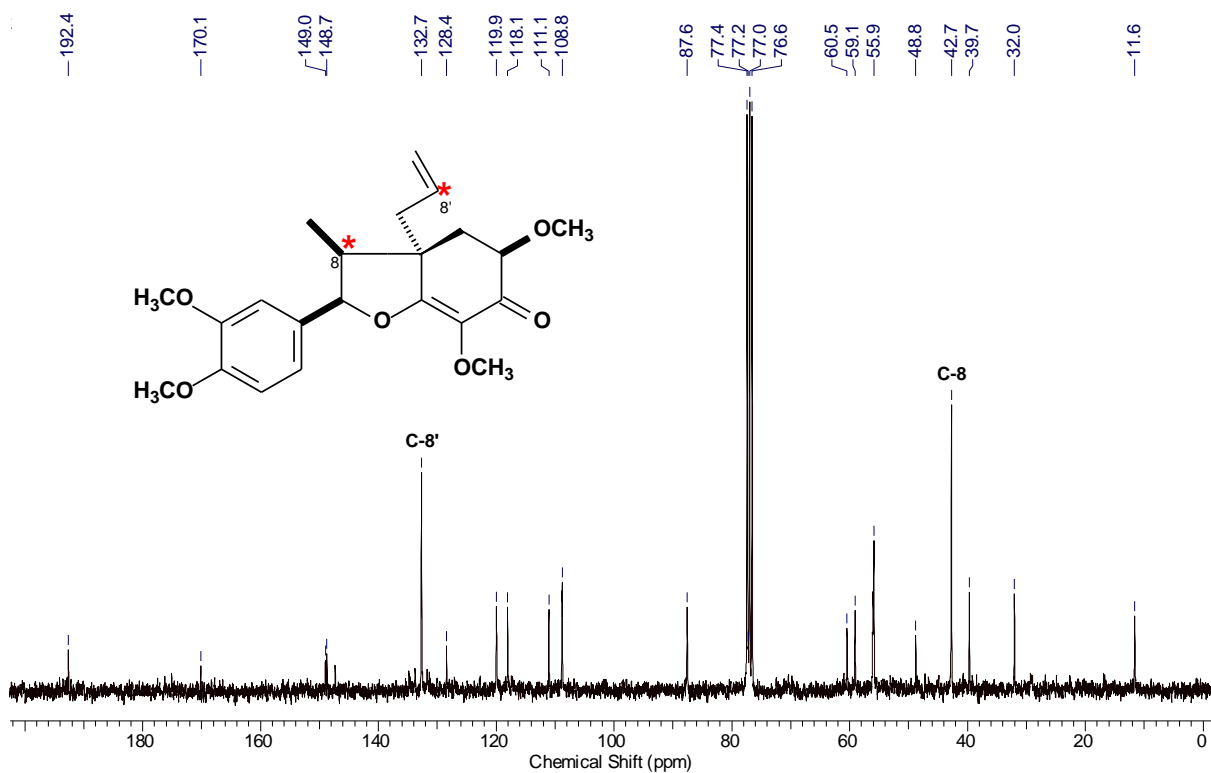


Figura 8.18 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina enriquecida com L-[2- ^{13}C]-fenilalanina

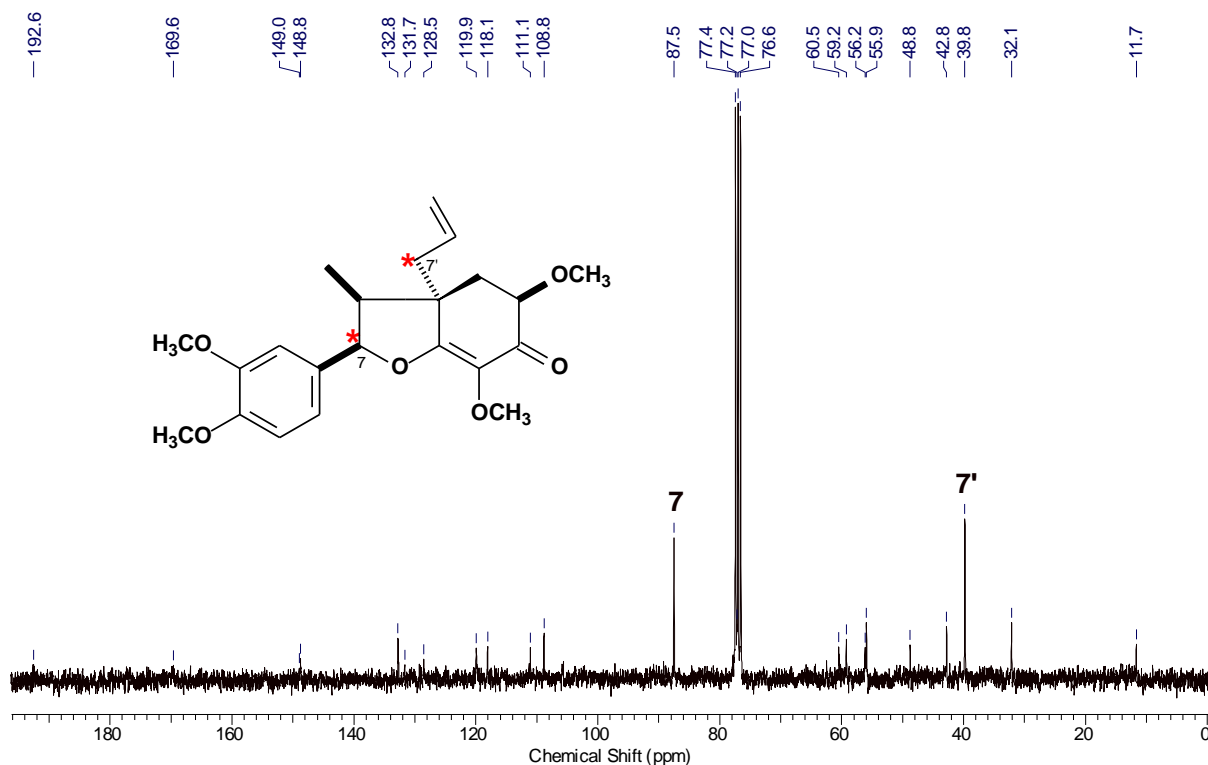


Figura 8.19 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina enriquecida com L-[3- ^{13}C]-fenilalanina

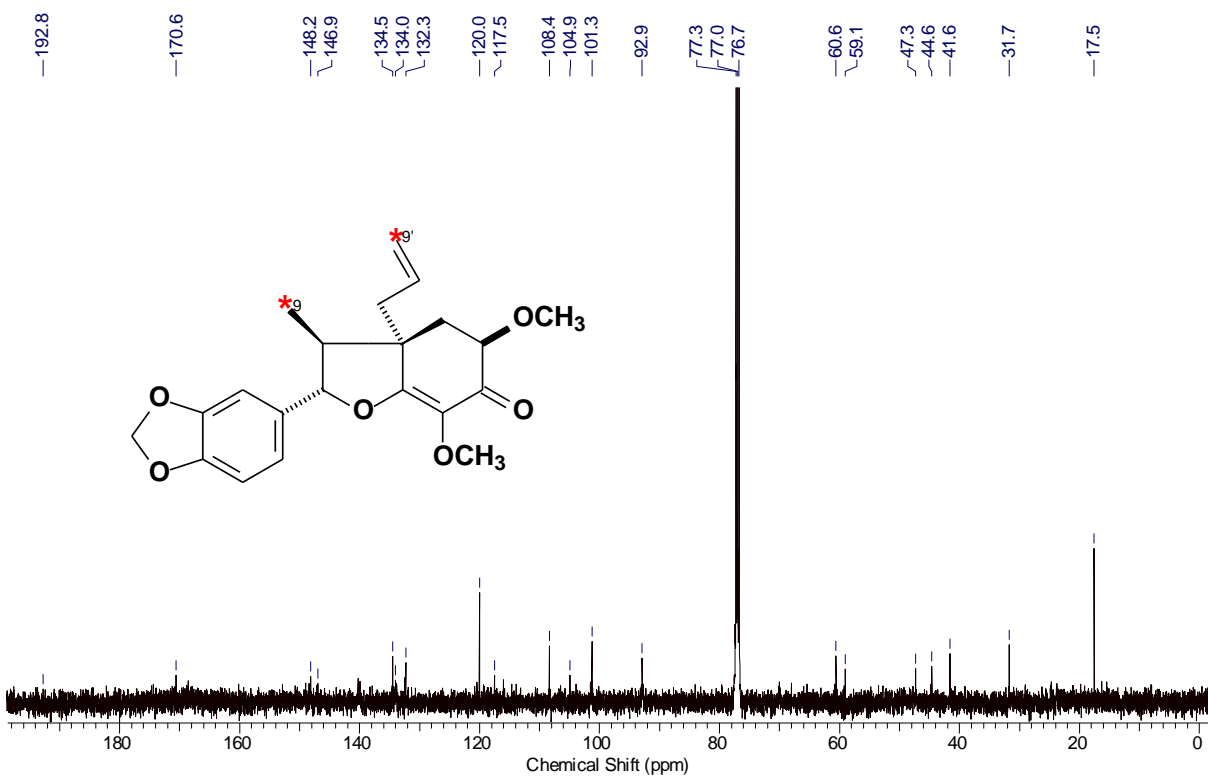


Figura 8.20 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da armenina B enriquecida com L-[1- ^{13}C]-fenilalanina

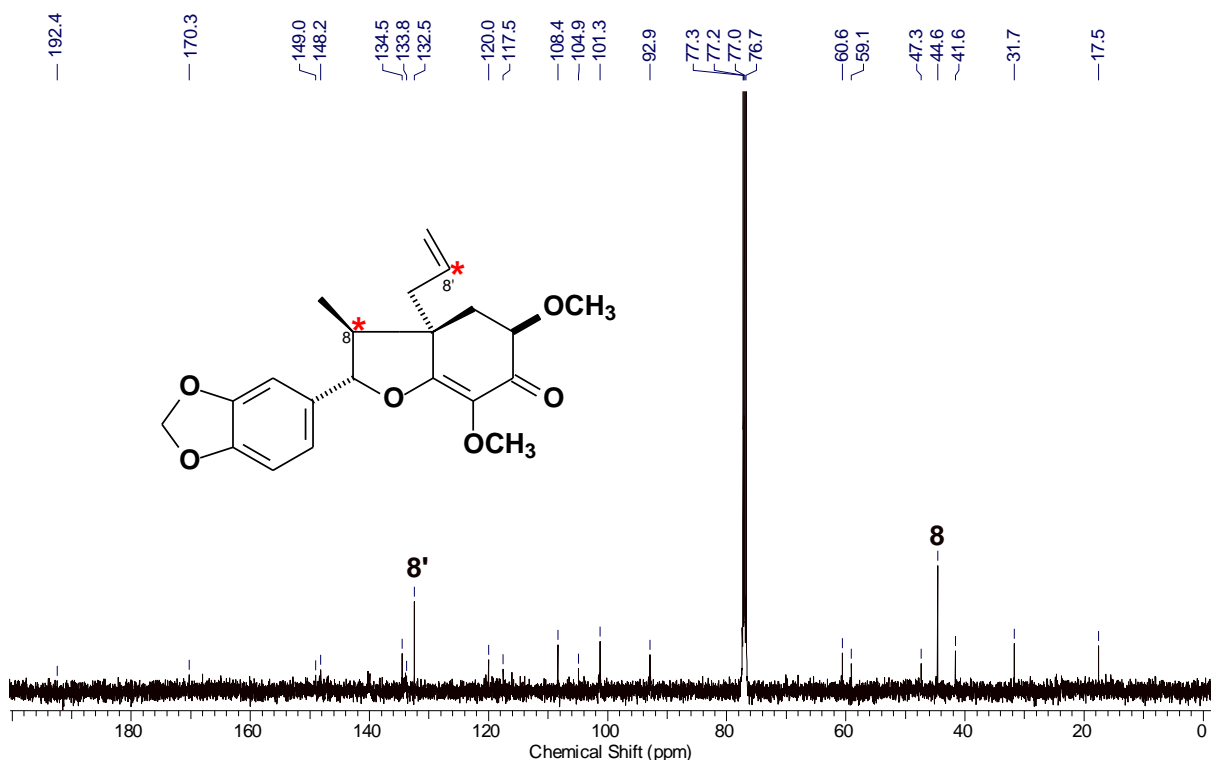


Figura 8.21 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da armenina B enriquecida com L-[2- ^{13}C]-fenilalanina

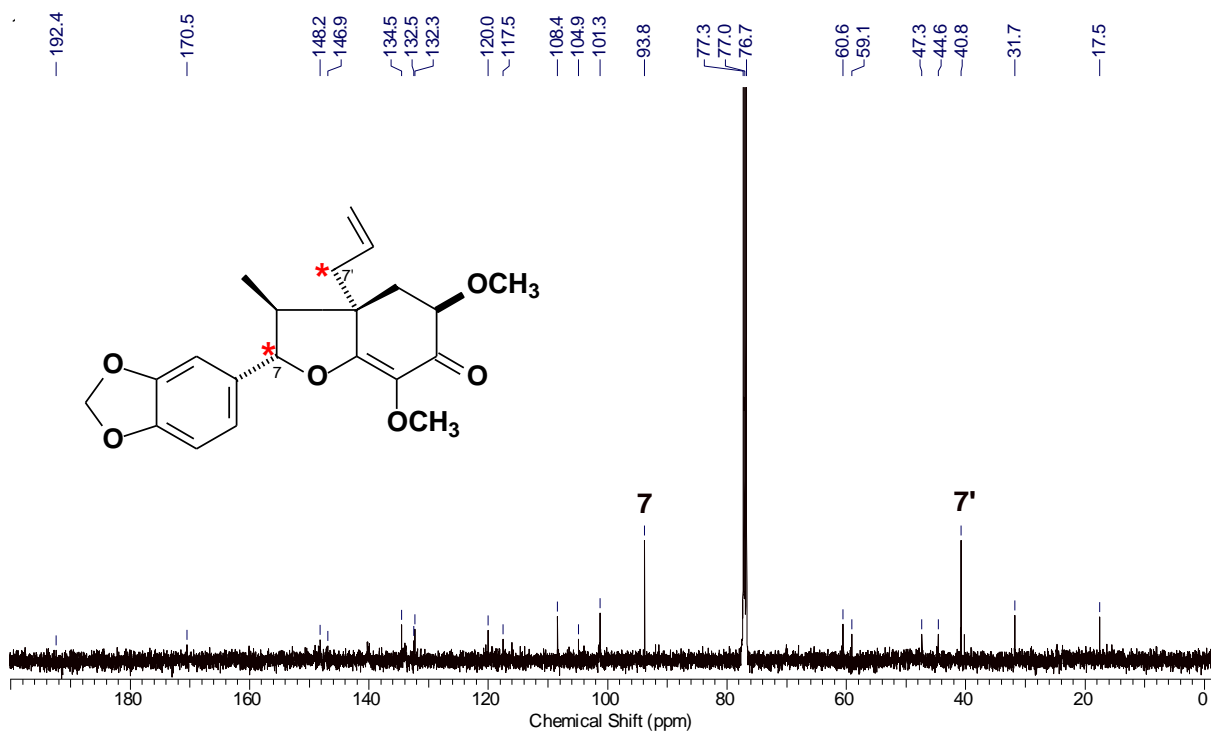


Figura 8.22 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) da armenina B enriquecida com L-[3- ^{13}C]-fenilalanina

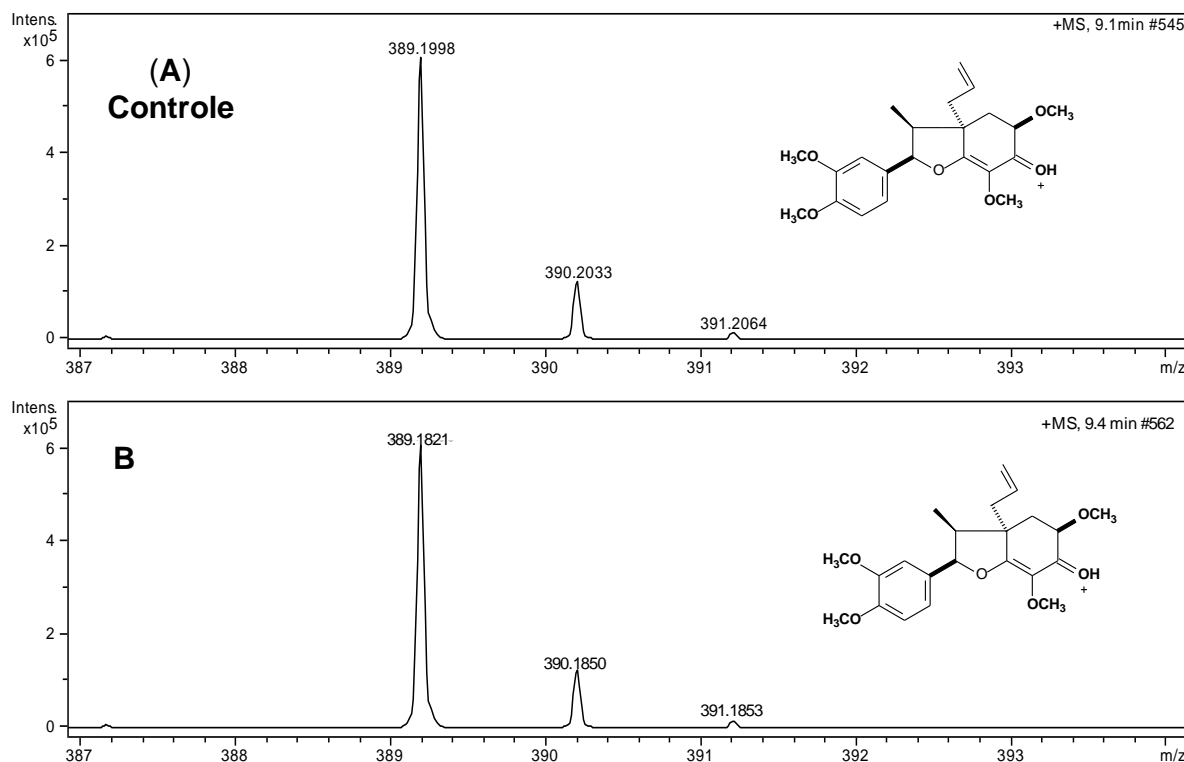


Figura 8.23 Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação do ácido [8-¹³C]-ferúlico na 5'-metoxi porosina. (A) Controle; (B) 5'-metoxiporosina após incubação com ácido [8-¹³C]-ferúlico.

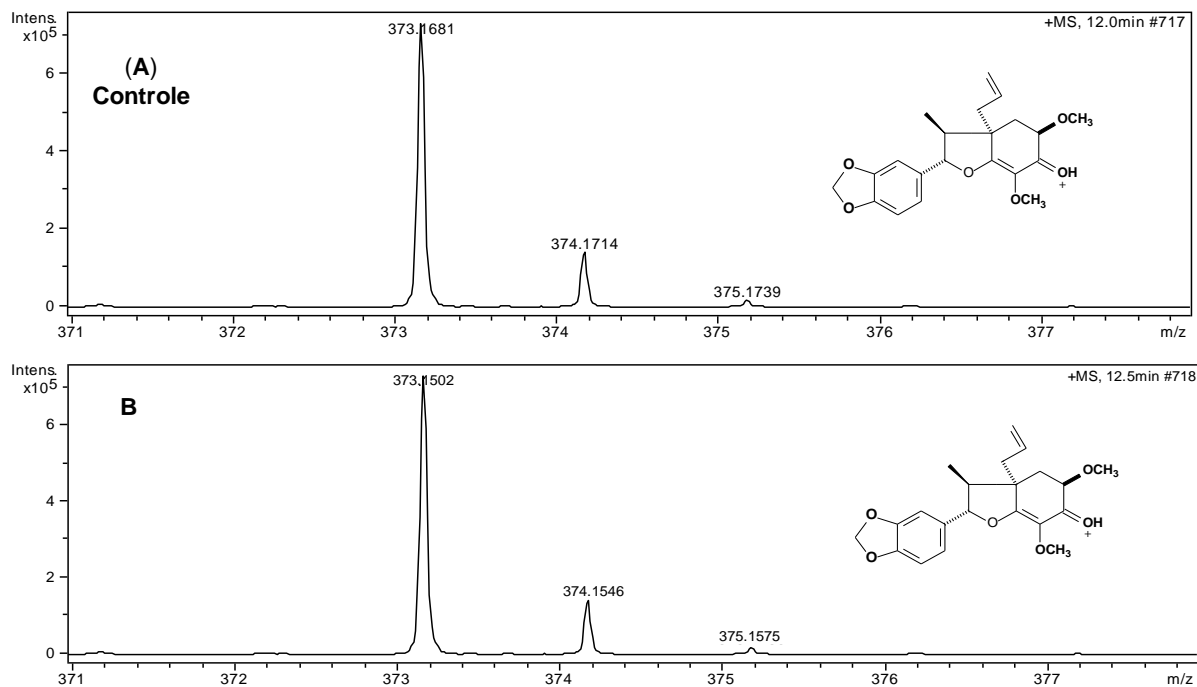


Figura 8.24 Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação do ácido [8-¹³C]-ferúlico na armenina B. (A) Controle; (B) armenina B após incubação com ácido [8-¹³C]-ferúlico.

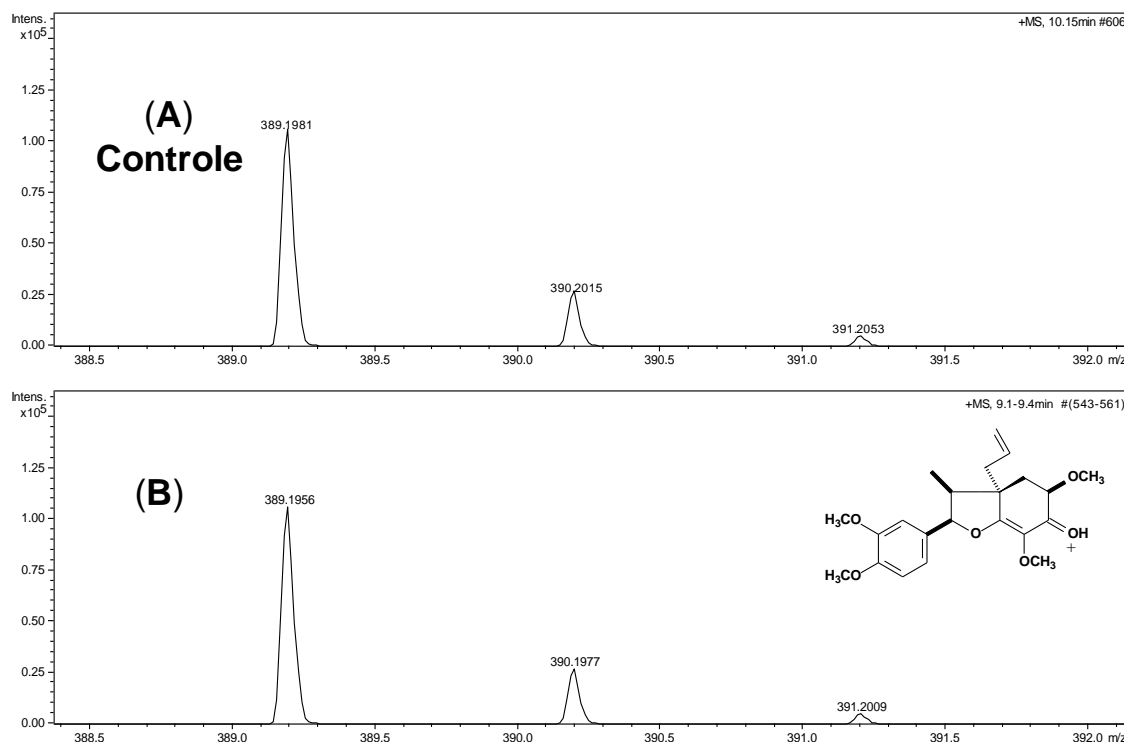


Figura 8.25 Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação do álcool $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferílico na 5'-metoxiporosina. (A) Controle; (B) 5'-metoxiporosina após incubação com álcool $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferílico

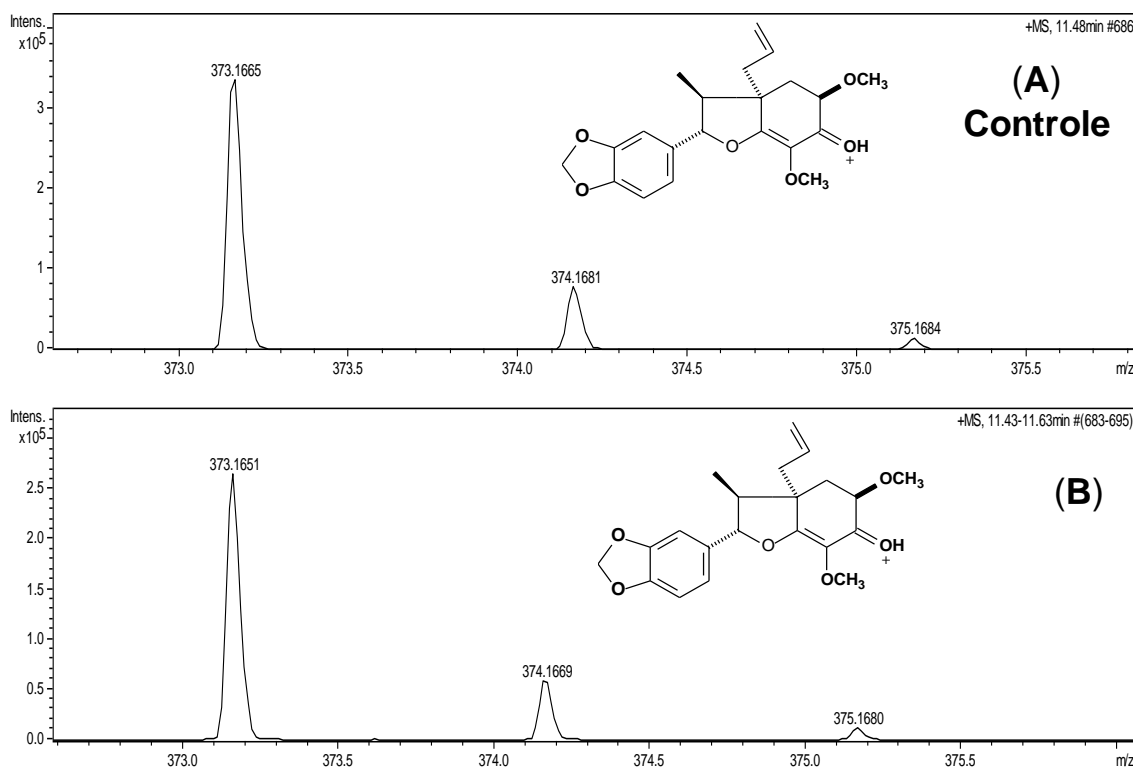


Figura 8.26 Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação do álcool $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferílico na armenina B. (A) Controle; (B) armenina B após incubação com álcool $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferílico

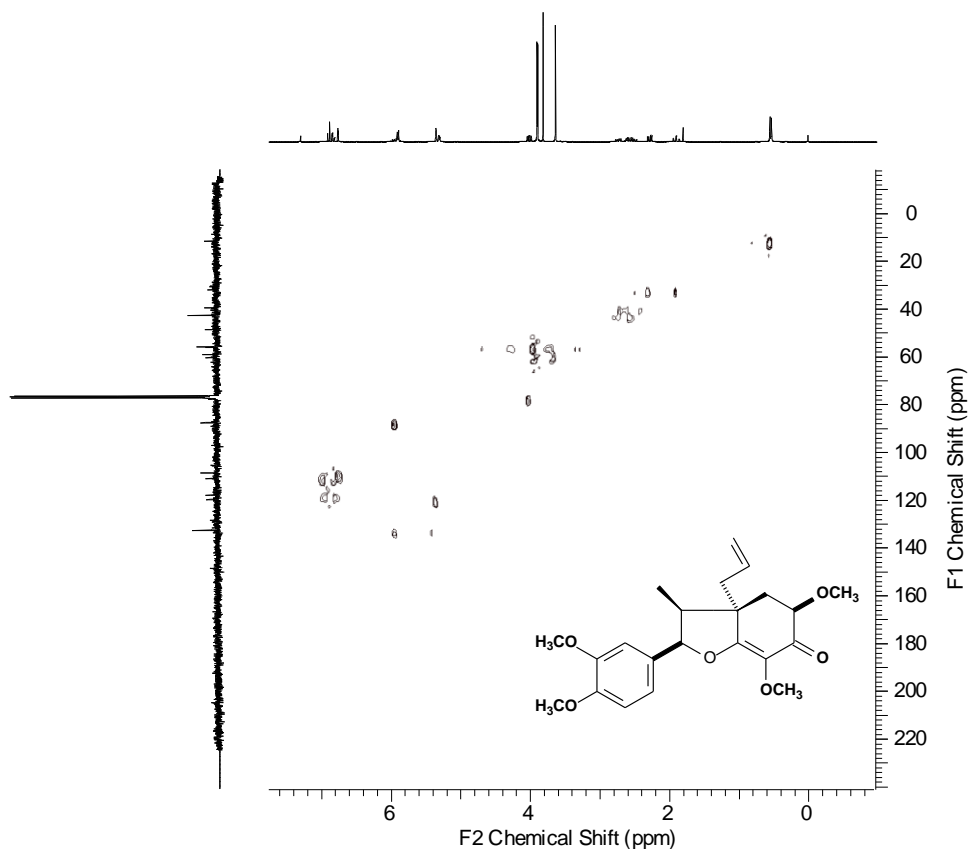


Figura 8.27 Espectro de RMN-2D (HSQC, CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxi porosina após incubação com acetato de $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferila.

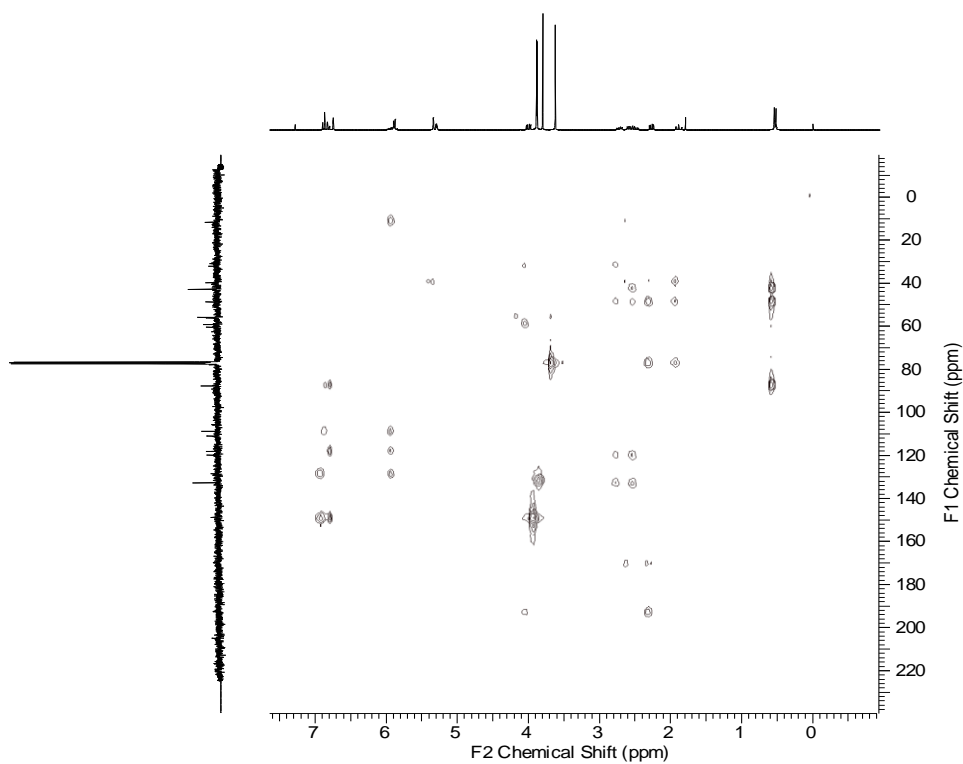


Figura 8.28 Espectro de RMN-2D (HMBC, CDCl_3 , 500 MHz) da 5'-metoxiporosina após incubação com acetato de $[8-^{13}\text{C}]$ -coniferila.

ANEXO 1: Análise proteômica e de peroxidase nos embriões somáticos de *O. catharinensis*

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Obtenção do extrato proteico para análise em eletroforese unidimensional

Foram pesados 500 mg de embriões frescos de *O. catharinensis*, triturados em nitrogênio líquido a 4°C, com 1,0 mL de tampão fosfato pH 7,0 contendo 0,445 g de fosfato de sódio dibásico 50 mmol.L⁻¹, 1,0 mL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 50 mmol.L⁻¹; 0,08% de β-mercaptaetanol 10 mmol.L⁻¹. O material foi homogeneizado utilizando-se cadinho e pistilo, transferido para tubos de 2,0 mL, centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante coletado, pois, corresponde à fração proteica solúvel.

1.2. Quantificação do extrato proteico e aplicação no gel SDS-PAGE

Para a estimativa do conteúdo de proteína foi utilizado o kit Plus One 2D Quant-Kit (Amershan Pharmacia), utilizando a proteína albumina bovina sérica (BSA) como padrão. A curva (**Gráfico 1**) de calibração foi construída com base em soluções contendo BSA de concentrações conhecidas e com base nas leituras de absorbância a 480 nm. Deste modo, a concentração proteica das amostras foi determinada a partir das absorbâncias em 480 nm e na curva de calibração do BSA previamente obtida.

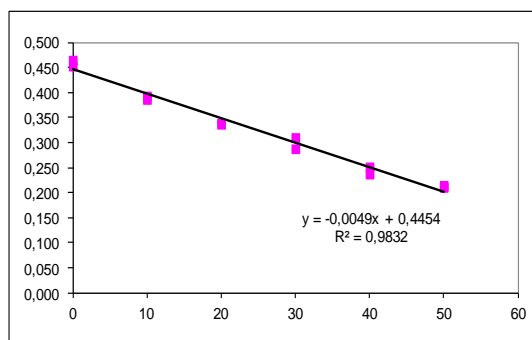


Gráfico 1. Curva de calibração construída com BSA para determinar a concentração de proteínas em embriões de *O. catharinensis*

A análise dos perfis proteicos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A quantidade de proteína adicionada no gel foi de 15µg. Os géis possuíam espessura de 0,75 milímetros de gradiente de poliacrilamida 10%. A separação por eletroforese foi realizada a 20°C e corrente constante de 35mA. Após a separação das bandas, o gel de poliacrilamida foi dividido em duas partes, sendo uma parte corada com dianisidina e a outra com Coomassie Brilliant Blue (Sigma USA).

1.3 Digestão de proteínas em gel para análise em MALDI-TOF e LC-MS/MS

Este procedimento foi realizado de acordo com a metodologia de Celedon *et al.*, 2007. Os *spots* de interesse foram excisados do gel de poliacrilamida e lavados com uma solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 25 mmol.L⁻¹ de bicarbonato de amônio (AMBIC) por 30 min. Posteriormente foram desidratados em ACN 100% e reidratados em dithiothreitol (DTT) (20 mmol.L⁻¹ DTT/50 mmol.L⁻¹

AMBIC) a 56°C por 40 min. Após a incubação o sobrenadante foi descartado e substituído por iodoacetamida (IAA) 55 mmol.L⁻¹. Os tubos foram mantidos no escuro durante 30 min. A iodoacetamida foi removida e os fragmentos lavados em 25 mmol.L⁻¹ AMBIC e posteriormente desidratados em 100% de ACN. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporando a temperatura ambiente. As proteínas foram digeridas com 15 uL de solução contendo 150 ng de tripsina em 25 mM de AMBIC. Após 15 min foi adicionado 25m mol.L⁻¹ de AMBIC até a completa cobertura dos spots. Os tubos contendo os géis foram incubados a 37°C por 14 horas. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15uL de solução bloqueadora (50% v/v acetonitrila e 5% v/v ácido fórmico). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com solução de 50% v/v ACN e 1% ácido fórmico e uma lavagem com ACN 100% a 40°C sob sonificação. Os sobrenadantes foram combinados e secos sob vácuo. Após a secagem, os peptídeos foram ressuspensos em 12 uL 1% (v/v) de ácido fórmico, para posteriormente serem analisados por espectrometria de massas.

1.4 Extração das proteínas para análise em eletroforese bidimensional (2-DE)

O extrato proteico foi obtido de acordo com a metodologia de Natarajan *et al.*, 2005. Os embriões somáticos de *O. catharinensis* (500 mg) foram triturados na presença de nitrogênio líquido e ressuspensos em 1 mL de tampão de extração (uréia 7M, tiouréia 2M, 1% de dihiotereitol (DTT), 2% de triton 100, 0,5% de Pharmalyte[®] (GE Healthcare[®]), 1mM de fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) e 5µM de pepstatina). O material foi vortexado por 2 min e posteriormente centrifugado por 10 min a 14000 rpm a 25°C. Para a eliminação de interferentes, os extratos proteicos

foram precipitados com ácido tricloroacético 10% (TCA). Pós a incubação por 30 min a 4°C, a amostra foi centrifugada por 10 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado proteico foi lavado duas vezes com acetona a frio, seguido de centrifugação por 10 min a 14000 rpm. O precipitado foi ressuspendido em 1mL de tampão de extração (ureia:tiouréia) e vortexado por 2 min. O sobrenadante contendo a fração proteica foi coletado e armazenado a -20°C, para a quantificação das proteínas como descrito no item 3.3.1.

2. RESULTADOS

2.1 Avaliação do extrato proteico de *O. catharinensis* por eletroforese SDS-PAGE

As peroxidases são um grupo de enzimas oxirredutases, que catalisam a reação de acoplamento oxidativo, de compostos fenólicos em que o peróxido de hidrogênio atua como aceitador de elétrons enquanto os compostos fenólicos agem como doares de átomos de hidrogênio (Baucher *et al.*, 1998, O'Brien, 2000). Sabe-se que estas enzimas são iniciadoras das unidades monoméricas radiculares derivadas de alil- e propenilfenóis cujo acoplamento oxidativo entre estas unidades poderiam dar origem às neolignanas benzofurânicas (**Figura 1**).

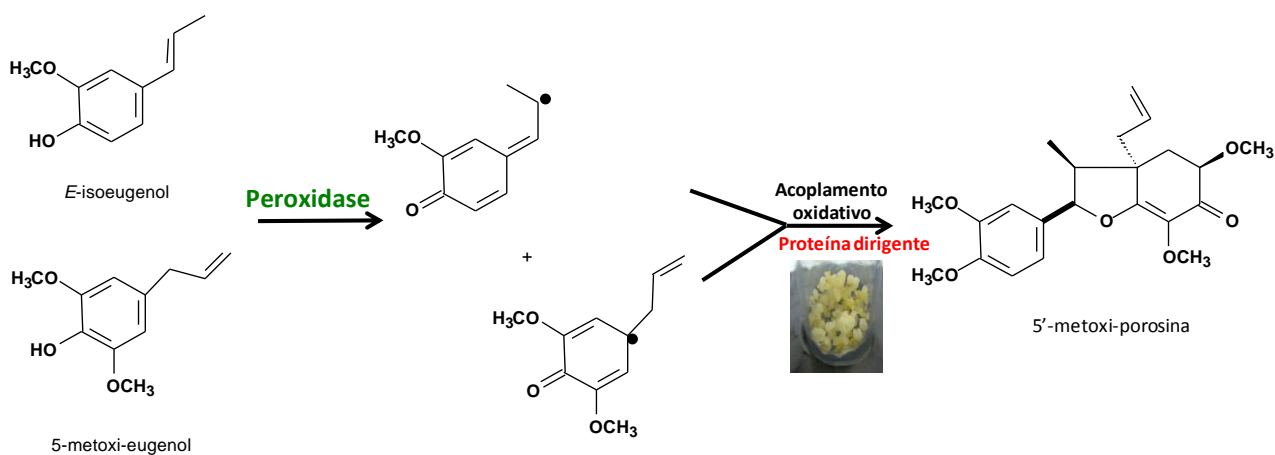


Figura 1. Formação de unidades radiculares iniciadas por peroxidases

Foi observado no gel corado com diazidina a presença de uma banda na região de peso molecular entre 36-49 kDa. A banda equivalente a esta região do gel corado com Comassie foi excisada, digerida e enviada para análises de MALDITOF e LCMS/MS.

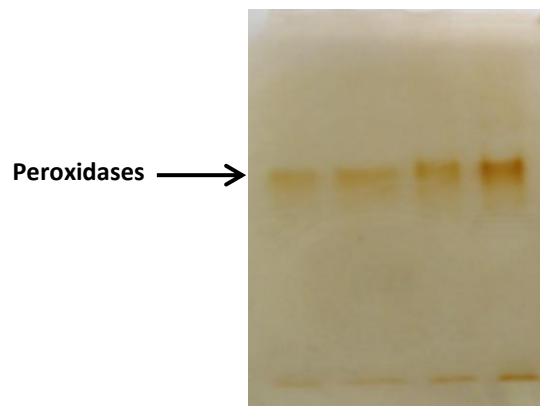


Figura 2. Gel SDS-PAGE do extrato proteico de *Ocotea catharinensis* corado com diazinidina

2.2 Avaliação do extrato proteico dos embriões de *Ocotea catharinensis* por eletroforese bidimensional (2-DE)

Os padrões de expressão proteicos associados aos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário de *O. catharinensis*, 0, 7, 14 e 21 dias, estão sendo investigados neste trabalho, utilizando a análise dos mapas proteômicos por 2-DE. O estudo das análises durante a embriogênese somática de *O. catharinensis*, abre perspectivas para a identificação de proteínas expressas diferencialmente, que possam servir como marcadores no desenvolvimento embrionário e/ou que possam estar envolvidas na biossíntese de neolignanas.

Inicialmente o protocolo para a eletroforese bidimensional (2-DE) das amostras de embriões somáticos, após 14 e 21 dias de desenvolvimento, foi de gradientes imobilizados de pH de 3-10. Esses apresentavam as proteínas acumuladas na sua parte ácida o que diminuía a resolução dos *spots* específicos dessa região dificultando a análise (**Figura 3**).

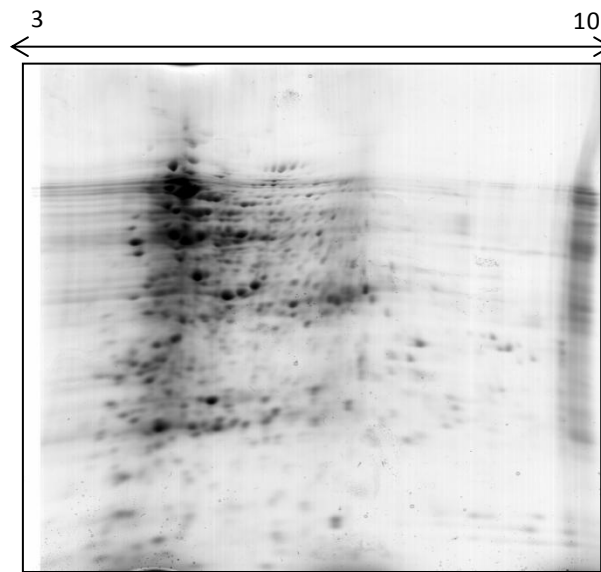


Figura 3. Mapa proteômico bidimensional dos embriões de *O. catharinensis* após 21 dias de cultivo. Focalização isoeétrica realizada com IPGs de pH 3-10 não linear. Gradiente de poliacrilamida 12%, com 250 µg de amostra e corados com Comassie Brilliant Blue coloidal

Assim sendo, optou-se pelo uso de géis na faixa de pH 4-7. Essa faixa de pH mais estreita permitiu a maior resolução dos *spots* e conseqüentemente um melhor perfil bidimensional (**Figura 3**).

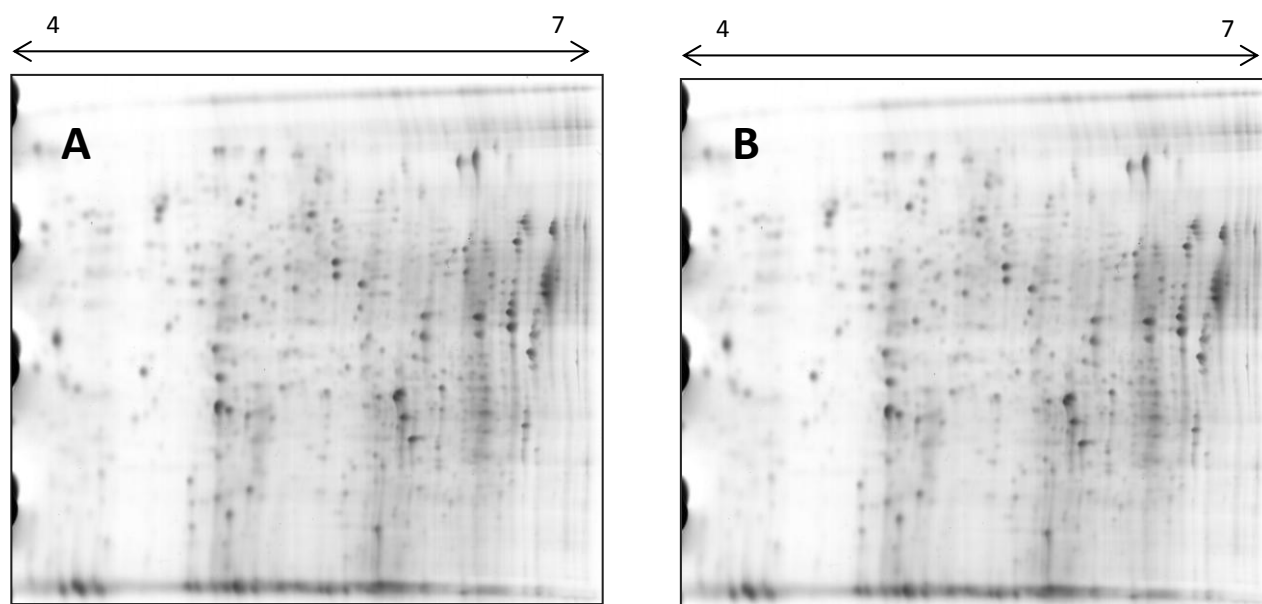


Figura 4. Mapas proteômicos bidimensionais dos embriões de *O. catharinensis* **A)** após 14 dias de cultivo; focalização isoeétrica com IPGs de pH 4-7 **B)** após 21 dias de cultivo; A focalização isoeétrica foi realizada com IPGs de pH 4-7; 12% de poliacrilamida com 250 µg de amostra e corados com Comassie Brilliant Blue coloidal

Nos géis 2-DE as diferenças entre os estágios de desenvolvimento dos embriões, após 14 e 21 dias (**Figura 4**), não foram facilmente visualizadas qualitativamente. Novos estudos com o extrato proteico, de 0 a 7 dias de desenvolvimento dos embriões somáticos estão em andamento, com o intuito de visualizar os *spots* isoladamente, necessitando-se de um programa computacional específico para a análise dos géis, *Image master 2D v.5* (GE Healthcare), que calcula a massa molecular, o ponto isoeétrico (*pI*) aproximado, volume e o número de *spots* em géis submetidos à comparação.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Érica Luiz dos Santos

Local de nascimento: São Paulo/SP

Data de nascimento: 12 de março de 1983

EDUCAÇÃO:

Ensino Médio: Colégio Novo Milênio
1998-2000

Graduação: Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste
Licenciatura em Química
2001-2004

Mestrado: Universidade Federal do Paraná
Departamento de Química
2006-2008

Doutorado: Universidade de São Paulo-USP
Instituto de Química
2009-2014

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. Santos, Érica Luiz dos, Costa, E. V., Marques, F. A., Vaz, Nelissa Pacheco, Maia, B. H. L. N. S., Magalhães, E. G., Tozzi, A. M. A. Toxicidade e atividade antioxidante de flavonóides das cascas das raízes de *Lonchocarpus filipes*. *Química Nova*, v.32, p.2255 - 2258, 2009.
2. Vaz, Nelissa Pacheco, Costa, E. V., Santos, Érica Luiz dos, Marques, F. A., Maia, B. H. L. N. S. Caavuranamide, a Novel Steroidal Alkaloid from the Ripe Fruits of *Solanum caavurana* Vell. (Solanaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.23, p.1 - 6, 2012.