



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

Análise Metabolômica de *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr.

Aluno: Augusto Lopes Souto

Orientador: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Coorientador: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

João Pessoa - Paraíba

2015

Augusto Lopes Souto

Análise Metabolômica de *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacoquímica

Orientador : Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Coorientador : Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

João Pessoa – PB

2015

S728a Souto, Augusto Lopes.

Análise metabolômica de *peperomia obtusifolia* (L.) A.
Dietr. / Augusto Lopes Souto.- João Pessoa, 2015.

131f. : il.

Orientador: José Maria Barbosa Filho

Coorientador: Josean Fechine Tavares

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. *Peperomia obtusifolia*.
3. Piperaceae. 4. Metabolômica. 5. Sinalização à longa
distância. 6. *Fingerprinting*.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

Augusto Lopes Souto

Análise Metabolômica de *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacoquímica

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

Universidade Federal da Paraíba – Coorientador

Prof^a. Dra Vanússia Cavalcanti França Pires

Universidade Estadual da Paraíba – Examinadora externa

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues

Universidade Federal da Paraíba – Examinador externo

Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti

Universidade Federal da Paraíba – Examinador interno

Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo

Universidade Federal da Paraíba – Examinador interno

Dedico aos meus pais, Múcio Antônio Sobreira Souto e Maria do Socorro Márcia Lopes Souto, pelo incentivo aos estudos e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Cecília e Marcelo, pelo companheirismo e apoio constante.

Agradecimentos

A Deus por ter me concedido o milagre da vida.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho pela orientação, incentivo, colaboração e confiança depositada em mim.

Ao prof. Dr. Josean Fachine Tavares pela orientação, apoio e ensinamentos passados durante o trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Sobral da Silva pelo apoio, colaboração e por ter me direcionado ao Doutorado .

Ao Professor Dr. Massuo Jorge Kato, por ter aberto as portas do Laboratório de Produtos Naturais da USP e me direcionado na área de metabolômica de plantas.

Ao técnico Dr. Vicente Carlos pela colaboração e obtenção dos espectros.

Ao técnico Raimundo Nonato pelo apoio técnico incondicional e indispensável à realização deste trabalho.

A todos os funcionários do IPeFarM que juntos nos proporcionam um ambiente agradável de trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório de produtos naturais do IPeFarM: Steno, Paula, Camila, Lázaro, Roosevelt, Marcelo e Isis.

Aos amigos e colegas de laboratório de produtos naturais da USP: Mauro, Harold, Tara, Gerardo, Marcílio, Anderson, Yasmim e Lydia, pelo ótimo convívio e pelo apoio mútuo na temporada em que lá passei.

A todos os amigos e familiares que direta ou indiretamente contribuíram, os meus sinceros agradecimentos.

Lista de abreviaturas, Siglas e Símbolos

AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COV	Composto Orgânico Volátil
DAD	Diode Array Detector
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
EMB	Extrato Metanólico Bruto
ESI	Electrospray Ionization
HS	<i>Headspace</i>
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
PCA	Principal Component Analysis
PTFE	Politetrafluoretileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Resonância Magnética Nuclear de Carbono-13
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Time of Flight

Lista de Quadros

Quadro 1 Exemplos de compostos isolados do gênero <i>Peperomia</i> e suas respectivas atividades biológicas	25
Quadro 2 Constituintes químico identificados e/ou isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i>	30
Quadro 3 Variedades existentes de <i>P. obtusifolia</i>	59
Quadro 4 Rendimento das extrações referente a 5 folhas adultas de cada espécie	60
Quadro 5 Genes ativados após estresse provocado, seja por injúria mecânica ou ataque por herbívoros.	70
Quadro 6 Exemplos de agentes promotores ou “ <i>Elicitors</i> ” encontrados em secreções orais de insetos ou fluidos de ovos depositados por insetos	73

Lista de Tabelas

Tabela 1 Metodologia de fracionamento de 50 mg extrato metanólico bruto de <i>P. obtusifolia</i> e seus rendimentos (média)	53
Tabela 2 Otimização da metodologia de extração e separação	55
Tabela 3 Mudança na ordem de sistemas de eluentes e quantidade de volume utilizados na CC	55
Tabela 4 Sistema utilizado para analisar os extratos brutos das 4 variedades de <i>P. obtusifolia</i> ACN: Água (0,1% ácido fórmico)	61
Tabela 5 Método utilizado para analisar os perfis dos extratos provenientes dos 3 grupos estudados em todos os períodos (10, 20 e 30 dias).....	79
Tabela 6 Porcentagem relativa de terpenoides liberados pelas folhas dos grupos “predado” “controle interno” e “controle externo”. ^a Índices de retenção calculados, baseado nos tempos de retenção comparados aos da série de n-alcenos em uma coluna capilar de 10 m do tipo Rxi-5ms ^b Índices de Kovat lineares retirados da literatura. IR: Índice de retenção; EM: espectro de massas; CI: co-injeção com padrões autênticos.	113

Lista de Figuras

Figura 1 Mapa de distribuição espécies da família Piperaceae.....	22
Figura 2 Mapa de distribuição das espécies do gênero <i>Peperomia</i>	23
Figura 3 Foto da espécie <i>Peperomia obtusifolia</i>	29
Figura 4 Metodologia de extração para obtenção do Extrato Metanólico Bruto das folhas de <i>P. obtusifolia</i>	48
Figura 5 Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico bruto das folhas frescas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	49
Figura 6 Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico bruto das folhas liofilizadas de <i>Peperomia obtusifolia</i>	50
Figura 7 Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico bruto das folhas secas em estufa de <i>Peperomia obtusifolia</i>	51
Figura 8 Metodologia empregada para extração e separação do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i>	53
Figura 9 Espectros de RMN ^1H de Extrato Bruto, fases apolar, intermediária e polar de <i>P. obtusifolia</i>	54
Figura 10 Espectros de RMN ^1H de Extrato Bruto, fases apolar, intermediária e polar de <i>P. obtusifolia</i> após otimização da extração e separação de compostos.	56
Figura 11 Metodologia empregada para a extração e separação dos extratos brutos	61
Figura 12 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto das variedades de <i>Peperomia obtusifolia</i> ,.....	63
Figura 13 Cromatogramas referentes aos extratos brutos das folhas de <i>Peperomia obtusifolia</i> e suas variedades.....	64
Figura 14 PCA dos extratos brutos de <i>Peperomia obtusifolia</i> e suas variedades analisados por RMN	65
Figura 15 Gráfico de loadings dos extratos brutos de <i>Peperomia obtusifolia</i> e suas variedades analisados por RMN.....	65
Figura 16 Deslocamentos químicos típicos dos cromenos.....	66
Figura 17 Mecanismo geral de defesa das plantas frente à diversos tipos de estresse provocados	76
Figura 18 Foto do besouro <i>Monoplatys</i> sp.	77
Figura 19 Plantas em contato inicial com os besouros (lado esquerdo). Grupo predado e controle interno dentro da estufa, devidamente separados.....	78
Figura 20 Metodologia de extração empregada para a análise dos grupos “predado”, “Controle Interno” e “Controle Externo”.....	78
Figura 21 Folhas de <i>P. obtusifolia</i> predadas após 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C).....	79
Figura 22 Perfil metabolômico do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> depois de 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C) de predação	83

Figura 23 Perfil metabolômico do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> representando o “controle interno” após 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C).....	83
Figura 24 Perfil metabolômico do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> representando o “controle externo” após 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C).....	84
Figura 25 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> após 10 dias de predação.....	86
Figura 26 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> após 20 dias de predação.....	86
Figura 27 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> após 30 dias de predação.....	87
Figura 28 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 10 dias	87
Figura 29 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 20 dias	88
Figura 30 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 30 dias	88
Figura 31 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 10 dias	89
Figura 32 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 20 dias	89
Figura 33 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 30 dias	90
Figura 34 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> após 10 dias de predação	90
Figura 35 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> após 20 dias de predação	91
Figura 36 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> após 30 dias de predação	91
Figura 37 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 10 dias	92
Figura 38 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 20 dias	92
Figura 39 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 30 dias	93
Figura 40 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 10 dias	93
Figura 41 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 20 dias	94
Figura 42 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 30 dias	94
Figura 43 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> após 10 dias de predação.....	95
Figura 44 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> após 20 dias de predação.....	95

Figura 45 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> após 30 dias de predação.....	96
Figura 46 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 10 dias	96
Figura 47 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 20 dias	97
Figura 48 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 30 dias	97
Figura 49 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 10 dias	98
Figura 50 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 20 dias	98
Figura 51 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 30 dias	99
Figura 52 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> após 10 dias de predação	99
Figura 53 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> após 20 dias de predação	100
Figura 54 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> após 30 dias de predação	100
Figura 55 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 10 dias	101
Figura 56 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 20 dias	101
Figura 57 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle interno após 30 dias	102
Figura 58 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 10 dias	102
Figura 59 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 20 dias	103
Figura 60 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de <i>P. obtusifolia</i> representando o controle externo após 30 dias	103
Figura 61 PCA (Dados não normalizados pela área) de todos os extratos brutos analisados por RMN ^1H	104
Figura 62 PCA (dados não normalizados pela área) de todos os extratos brutos analisados por RMN ^1H	105
Figura 63 PCA (dados normalizados pela área) de todos os extratos brutos analisados por RMN ^1H	105
Figura 64 PCA (dados não normalizados pela área) dos extratos brutos analisados por RMN ^1H , referentes apenas ao Controle Externo	106
Figura 65 PCA (dados normalizados pela área) dos extratos brutos analisados por RMN ^1H , referentes apenas ao Controle Externo	106
Figura 66 PCA (dados não normalizados pela área) dos extratos brutos analisados por RMN ^1H , referentes apenas ao Controle Interno.....	107

Figura 67 PCA (dados normalizados pela área) dos extratos brutos analisados por RMN ^1H , referentes apenas ao Controle Interno.....	107
Figura 68 PCA (dados não normalizados pela área) dos extratos brutos analisados por RMN ^1H , referentes apenas ao grupo predado	108
Figura 69 PCA (dados normalizados pela área) dos extratos brutos analisados por RMN ^1H , referentes apenas ao grupo predado	108
Figura 70 PCA (dados não normalizados pela área) de todas as fases apolares analisadas por RMN ^1H	109
Figura 71 PCA (dados normalizados pela área) de todas as fases apolares analisadas por RMN ^1H	109
Figura 72 PCA (dados não normalizados pela área) de todas as fases intermediárias analisadas por RMN ^1H	110
Figura 73 PCA (dados normalizados pela área) de todas as fases intermediárias analisadas por RMN ^1H	110
Figura 74 PCA (dados não normalizados pela área) de todas as fases polares analisadas por RMN ^1H	111
Figura 75 PCA (dados normalizados pela área) de todas as fases polares analisadas por RMN ^1H	111
Figura 76 Perfil cromatográfico dos voláteis liberados por <i>P.obtusifolia</i> após 10 dias(A), 20 dias (B) e 30 dias (C) de predação	114
Figura 77 Perfil cromatográfico dos voláteis liberados por <i>P.obtusifolia</i> representando o “controle interno” após 10 dias(A), 20 dias (B) e 30 dias (C)	114
Figura 78 Perfil cromatográfico dos voláteis liberados por <i>P.obtusifolia</i> representando o “controle externo” após 10 dias(A), 20 dias (B) e 30 dias (C)	115

Resumo

A espécie *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr, pertencente à família Piperaceae, é uma planta amplamente conhecida, cuja ocorrência vai desde o México até a América do Sul. Estudos fitoquímicos anteriores revelaram a presença de compostos de diversas classes, como: lignanas, flavonoides, amidas, compostos fenólicos e cromenos, os quais demonstraram atividade biológica bastante promissora. Este trabalho aborda a análise metabolômica de *Peperomia obtusifolia*, que visa estudar em tempo real o metabolismo desta espécie em diversos tipos de cenários. Entretanto, para que este estudo fosse realizado, primeiramente foi desenvolvido um protocolo padrão, capaz de preparar amostras de maneira reprodutível, possibilitando assim uma análise metabolômica que gerasse resultados fidedignos. Posteriormente foi realizado o estudo metabolômico de *Peperomia obtusifolia* e suas variedades, por análise de *fingerprinting*, que visa caracterizar os perfis metabólicos de cada organismo. Além disso, também foi avaliado o metaboloma da espécie frente ao estresse biótico provocado pela herbivoria do besouro *Monoplatys sp.* As análises das amostras foram realizadas por meio de RMN de ^1H (cujos dados foram interpretados por PCA), espectrometria de massas, CLAE, CG e técnicas hífenadas. Como resultado, descobriu-se que apesar das variedades de *Peperomia obtusifolia* pertencerem à mesma espécie, elas possuíam metabolomas diferentes. Já em relação ao estudo de estresse biótico aplicado à planta, foram detectadas nas plantas predadas, alterações nos perfis metabolômicos, configurando-se uma resposta contra o ataque provocado. Considera-se um resultado de maior importância, o fato de que plantas intactas que estavam próximas às predadas, responderam ao ataque de maneira semelhante, indicando assim, uma comunicação inter-plantas por meio de compostos voláteis, capaz de induzir a vizinhança ainda não atacada a se preparar para reagir ao ataque, possibilitando assim, maior chance de sobrevivência.

Palavras-chave: *Peperomia obtusifolia*, Piperaceae, Metabolômica, Sinalização à longa distância, *fingerprinting*.

Abstract

The species *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr, which belongs to the Piperaceae family, is a well-known plant, distributed from Mexico to South America. Previous phytochemical studies demonstrated the presence of compounds from several classes, such as: lignans, flavonoids, amides, phenolic compounds and chromenes, which demonstrated interesting biological activities. This work describes the metabolomic analysis of *Peperomia obtusifolia*, which study in real time, the metabolism of this species in many kinds of scenarios. However, to accomplish this study, firstly it was developed a standard protocol, capable of preparing the samples in a reproducible way, enabling the following metabolomic studies to generate reliable results. Later, it was conducted the metabolomic study of *Peperomia obtusifolia* and its varieties, by fingerprinting analysis, in order to characterize the metabolomic profiles of each one of them. Furthermore, it was also evaluated the behavior of the species against the stress induced by the herbivory of *Monoplatys* sp. In general, the analyzes were conducted by NMR of ^1H (which the data was interpreted by PCA), mass spectrometry, HPLC, GC and its hyphenated techniques. As a result, it was found that, despite the fact that the *Peperomia obtusifolia* varieties belong to the same species, they had different metabolomes. Regarding the study of the biotic stress against the plant, changes were detected on the metabolomic profile of the attacked plants, indicating a response against the herbivore attack. As a major result of this research, it can be highlighted the fact that the same changes were also detected on the metabolome of the intact plants closed to the attacked ones, indicating a sort of interplant communication by volatile compounds, capable to induce the neighborhood yet not attacked, to be prepared for an imminent attack, giving them a better chance of survival.

Keywords: *Peperomia obtusifolia*, Piperacea, Metabolomics, Long-distance signaling, fingerprinting.

Sumário

1. Introdução	18
1.1 A metabolômica	18
1.2 Aplicações da Metabolômica	19
1.3 Perspectivas da metabolômica.....	21
1.4 Considerações sobre a família Piperaceae.....	21
1.5 Considerações sobre o gênero <i>Peperomia</i>	23
1.6 Considerações sobre a espécie <i>Peperomia obtusifolia</i> :	29
2. Objetivos.....	40
2.1 Geral	40
2.2 Específicos.....	40
3. Desenvolvimento de metodologia padrão de preparo da amostra	41
3.1 Materiais e Métodos	46
3.2 Resultados e discussão:.....	52
3.3 Considerações finais	57
4. Análise metabolômica das 4 variedades de <i>P.obtusifolia</i> (L.) A. Dietr.....	58
4.1 Materiais e Métodos:.....	60
4.1.1 Análise por CLAE-DAD.....	61
4.1.2 Análise por RMN.....	62
4.1.3 Análise de Componente Principal (PCA).....	62
4.2 Resultados e discussão	62
4.3 Considerações Finais.....	66
5. Análise metabolômica de <i>P. obtusifolia</i> frente a estresse biótico provocado por <i>Monoplatys</i> sp: comunicação inter-plantas e reconfiguração metabólica.....	67
5.1 Materiais e Métodos	76
5.1.1 Material Botânico e Método de Cultivo	76
5.1.2 Metodologia de Extração.....	78
5.1.3 Análise por CLAE-DAD.....	79
5.1.4 Análise por CLAE-EM	79
5.1.5 Análise por HS-CG-EM.....	80
5.1.6 Análise por RMN.....	81
5.1.7 Análise de Componente Principal (PCA).....	81
5.2 Resultados e discussão	82

5.3 Considerações finais	112
6. Conclusões	117
7. Perspectivas	118
Referências bibliográficas	119
Apêndice A – Cromatogramas do extrato bruto de <i>P. obtusifolia</i> obtidos por LC-MS	128
Apêndice B – Espectros de Massas do extrato bruto de <i>P.obtusifolia</i> obtidos por LC-MS.....	129
Apêndice C – Análise Discriminante de Componente Principal (DPCA) dos extratos brutos de <i>Peperomia obtusifolia</i> , referente aos 3 grupos que foram analisados por RMN de ¹ H.....	132

1. Introdução

1.1 A metabolômica

A metabolômica ou metabonômica representa uma das plataformas tecnológicas conhecidas como ômicas, e tem como objetivo, isolar e caracterizar o maior número possível de metabólitos localizados em uma célula, tecido ou órgão de um determinado organismo vivo. Ao conjunto de todos esses metabólitos, dá-se o nome de metaboloma (Robertson, 2005; Tyagi et al., 2010).

Esses metabólitos são divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários e secundários. Os primários são moléculas essenciais nos processos metabólicos básicos de qualquer ser vivo, enquanto que os secundários não o são, sendo mais comuns em plantas e fungos, estão geralmente relacionados a sobrevivência da planta, atuando como atrativos para polinizadores, ou na defesa contra herbívoros e patógenos por exemplo (Dixon, 2001).

De acordo com Nicholson e colaboradores (1999), o termo metabonômica é definido como a medida quantitativa dinâmica da resposta metabólica multiparamétrica de sistemas vivos a estímulos patofisiológicos ou modificação genética, já segundo Fiehn (2000), metabolômica é definida como uma análise compreensiva e quantitativa de todos os metabólitos. Apesar de haver estes dois termos, ainda existe muita confusão em relação a sua aplicação, de maneira que ambos são considerado sinônimos (Tyagi et al., 2010).

Junto à metabolômica, existem várias outras ômicas, todavia, aquelas mais conhecidas são a genômica, a transcriptômica e a proteômica; elas tem como objetivo isolar e caracterizar respectivamente, o DNA, o RNA e as proteínas de organismos vivos (Binneck, 2004).

A primeira ômica a ser denominada como tal foi a genômica. Esse termo veio da palavra “genoma”, que por sua vez, deriva da junção das palavras “gene” e “cromossoma”, e devido a boa aceitação deste termo na

comunidade científica, os outros termos como metaboloma, transcriptoma e suas respectivas ômicas, foram também surgindo (Robertson, 2005).

A metabolômica também é descrita como um estudo sistemático dos “rastros” deixados por processos celulares específicos em um determinado momento, esses “rastros”, uma vez identificados, podem nos revelar o perfil fisiológico daquela célula, tecido ou órgão em um determinado momento (Tyagi et al., 2010).

A idéia de que fluidos biológicos refletem na saúde de um dado organismo não é de hoje. Médicos da antiga China, observavam a urina de pacientes e utilizavam formigas como parâmetro, caso a urina atraísse formigas, seria um sinal que a amostra possuía altas doses de açúcar, logo o paciente seria diagnosticado com diabetes. Na idade média era utilizado um mapa esquemático da urina, o qual relacionava a cor, o sabor e o cheiro da urina a diversas enfermidades (Nicholson and Lindon, 2008)

Desta forma, percebe-se que a metabolômica está intimamente ligada ao genótipo de um organismo, a sua fisiologia e ao meio ambiente, oferecendo uma oportunidade única para relacionar o fenótipo ao genótipo do organismo (Tyagi et al., 2010).

Assim como o transcriptoma e o proteoma, o metaboloma é dinâmico, modificando-se a cada segundo, além disso, com as tecnologias conhecidas hoje em dia, ainda é impossível identificar todos os metabólitos de um organismo. Sabe-se que existem muitos metabólitos em uma planta, mas não se sabe ainda um número real, contudo, uma estimativa considerável seria que existem tantos metabólitos quanto o número de genes existentes nela, resultando em um número em torno de 30 000 moléculas (Verpoorte et al., 2009). Em 2007, cientistas da universidade de Alberta e Calgary, mostraram o primeiro esboço do metaboloma humano, constituído de aproximadamente 2500 metabólitos, 1200 drogas e 3500 componentes nutricionais (Tyagi et al., 2010).

1.2 Aplicações da Metabolômica

Nos últimos anos, a metabolômica tem sido empregada em diversas áreas e com inúmeros propósitos. Todavia, em qualquer âmbito existem várias dificuldades a serem superadas, tanto na extração e separação

das amostras quanto na análise dos resultados (Fukusaki and Kobayashi, 2005).

As informações obtidas pela metabolômica têm sido utilizadas frequentemente em pesquisas de diversas áreas, como na área da nutrição por exemplo, a qual, através da análise dos perfis metabólicos de biofluidos de ratos, correlacionam-se as doenças em animais com a dieta dos mesmos (Fukusaki and Kobayashi, 2005; Robertson, 2005). Na área farmacêutica, a análise de biofluidos é realizada nas pesquisas de seleção de fármacos, onde são identificados marcadores biológicos que representem toxicidade (Robertson, 2005). Já na área da ecologia e evolução, tem-se realizado estudos comparativos de perfis metabólicos entre plantas selvagens e transgênicas, visando entender e detectar diferenças imprevistas entre elas. Além disso, tem-se estudado a relação planta-inseto, abordando os mecanismos de defesa de ambos, e seus metabólitos produzidos para este fim (Aharoni et al., 2005; Bennett and Wallsgrove, 1994; Howe and Jander, 2008; Mewis et al., 2005; Wu and Baldwin, 2009). Também são analisados os efeitos de herbicidas provocados em plantas de interesse agrônomico (Fukusaki and Kobayashi, 2005).

Outra aplicação seria no entendimento da relação planta-patógeno. Ao serem infectadas por fungos ou bactérias, por exemplo, as plantas produzem e liberam uma série de compostos chamados de fitoalexinas que as protegem contra esses invasores. Essa produção é induzida após contato com sinalizadores químicos oriundos dos patógenos, porém nem todas as plantas produzem os metabólitos necessários para o controle desses patógenos, desta forma, a metabolômica pode identificar espécies resistentes a pragas, selecioná-las e melhorá-las, ou podem iniciar estudos de engenharia de metabolismo; os quais primam por identificar os genes e as rotas metabólicas que produzem esses compostos de defesa, visando assim, aumentar ou possibilitar a sua produção nas plantas (Dixon, 2001).

Diante dessas premissas, decidiu-se então analisar o perfil metabolômico da espécie *Peperomia obtusifolia*, uma planta já bastante conhecida, não só por sua característica ornamental, como também, pela bioatividade de seus constituintes químicos (Mota et al., 2009; Tanaka et al., 1998)

1.3 Perspectivas da metabolômica

A metabolômica apenas começou (Fiehn, 2002), e como outras tecnologias, provavelmente esta também não irá superar todas as expectativas, mas certamente contribuirá para várias áreas da biologia (Robertson, 2005), pode-se dizer antecipadamente que a metabolômica será extremamente útil para completar o fechamento do ciclo das ômicas, que vai desde o gene (genômica), passando pela proteína (proteômica) e chegando ao metabólito (metabolômica). Dado que o fenótipo é considerado o ponto final, em muitos casos será mais fácil trabalhar de trás pra frente (do fenótipo para o genótipo) do que tentar descobrir o significado de milhares de mudanças na expressão gênica (Robertson, 2005). Teoricamente isso pode ser possível, ligar mudanças metabólicas às suas enzimas, e estas, aos seus respectivos genes, contudo, esse tipo de resultado ainda não foi publicado (Fiehn, 2002). Claramente, esta tecnologia já demonstrou um potencial significativo, agora se espera que este potencial seja realizado (Robertson, 2005) e para que isto ocorra, é importante que haja uma padronização nos métodos utilizados no estudo do metaboloma e que desta maneira seja possível comparar dados gerados em épocas e lugares diferentes. Para que essa tecnologia dê certo é imperativo que haja esta padronização para uma futura construção de um banco de dados público que possa ser acessado livremente e que seja usado em conjunto com os dados da transcriptômica e genômica (Kim and Verpoorte, 2009).

1.4 Considerações sobre a família Piperaceae

A família Piperaceae pertence à ordem Piperales, e é considerada uma das maiores famílias dentre as angiospermas basais (Wanke et al., 2006). Representada por mais de 4000 espécies (Batista et al., 2011), apresentam-se como ervas, subarbustos, arbustos ou lianas, geralmente aromáticas e dotadas de glândulas translúcidas, com tipo de indumento variado (Monteiro and Guimarães, 2008) .

Distribuem-se nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Fig.1), com centro de diversidade na Malásia e nas Américas Central e do Sul

(Wanke et al., 2006), ela é dividida em quatro gêneros: *Piper* L., *Peperomia* Ruiz e Pavon, *Manekia* Trel. e *Zippelia* Blume (Batista et al., 2009), dos quais, os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Piper* (~2000 espécies) e *Peperomia* (1500 – 1700 espécies) (Wanke et al., 2007).

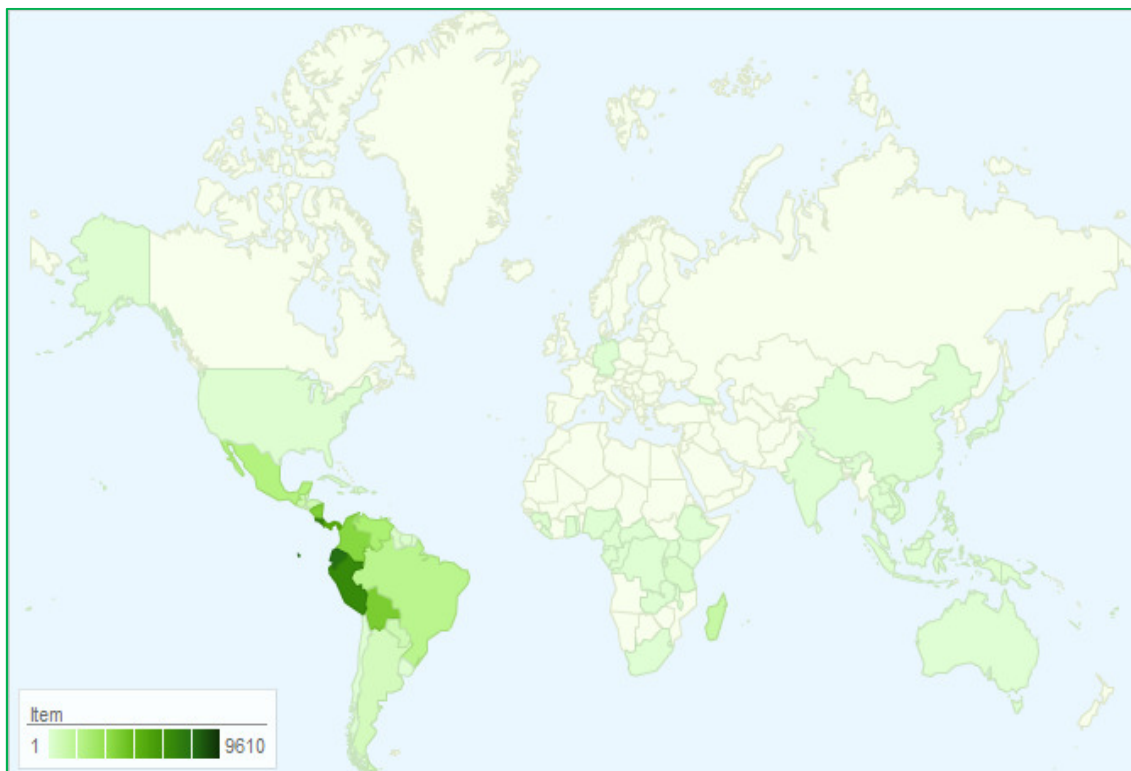


Figura 1 Mapa de distribuição espécies da família Piperaceae (Fonte: www.tropicos.org)

Sob o ponto de vista econômico e comercial, o gênero *Piper* é o mais importante, tendo como principal exemplo a *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), cujo fruto verde é empregado para a obtenção da pimenta negra (Wanke et al., 2007). Além disso, pode ser citada a *Piper methysticum*, cujos rizomas fornecem uma bebida calmante conhecida como kava-kava, a qual é muito utilizada nas ilhas do Pacífico em diversas cerimônias (Singh, 1992). Há relatos também do uso de certas espécies da família Piperaceae na medicina popular; os galhos de *Piper futokadsura* por exemplo, são utilizados no tratamento da asma e artrite, enquanto que preparações de folhas, raízes e sementes de *Piper beetle* são empregadas no tratamento de bronquite, doenças venéreas, gastrointestinais e reumatismo (Parmar et al., 1997).

Quimicamente falando, esta família possui uma riqueza estrutural bastante diversificada, pois já foram isolados metabólitos secundários de diversas classes, como por exemplo: fenilpropanóides, lignanas, neolignanas,

pironas, amidas alifáticas e aromáticas, alcaloides, policetídeos, derivados do ácido benzoico e benzopiranos (cromenos) (Batista et al., 2011; Mota et al., 2011).

1.5 Considerações sobre o gênero *Peperomia*

O gênero *Peperomia* é considerado o segundo maior gênero da família Piperaceae (Monteiro and Guimarães, 2008; Mota et al., 2011) pois possui aproximadamente 1700 espécies (Mota et al., 2009), as quais são distribuídas em regiões de florestas úmidas e áreas montanhosas, quase que exclusivamente no continente americano (Fig.2).

No Brasil, ocorrem aproximadamente 200 espécies deste gênero (Monteiro and Guimarães, 2008), o qual é dividido em 5 subgêneros: *Acrocarpidium*, *Micropiper*, *Rhynchophorum*, *Sphaerocarpidium* e *Tildenia* (Yuncker, 1974)

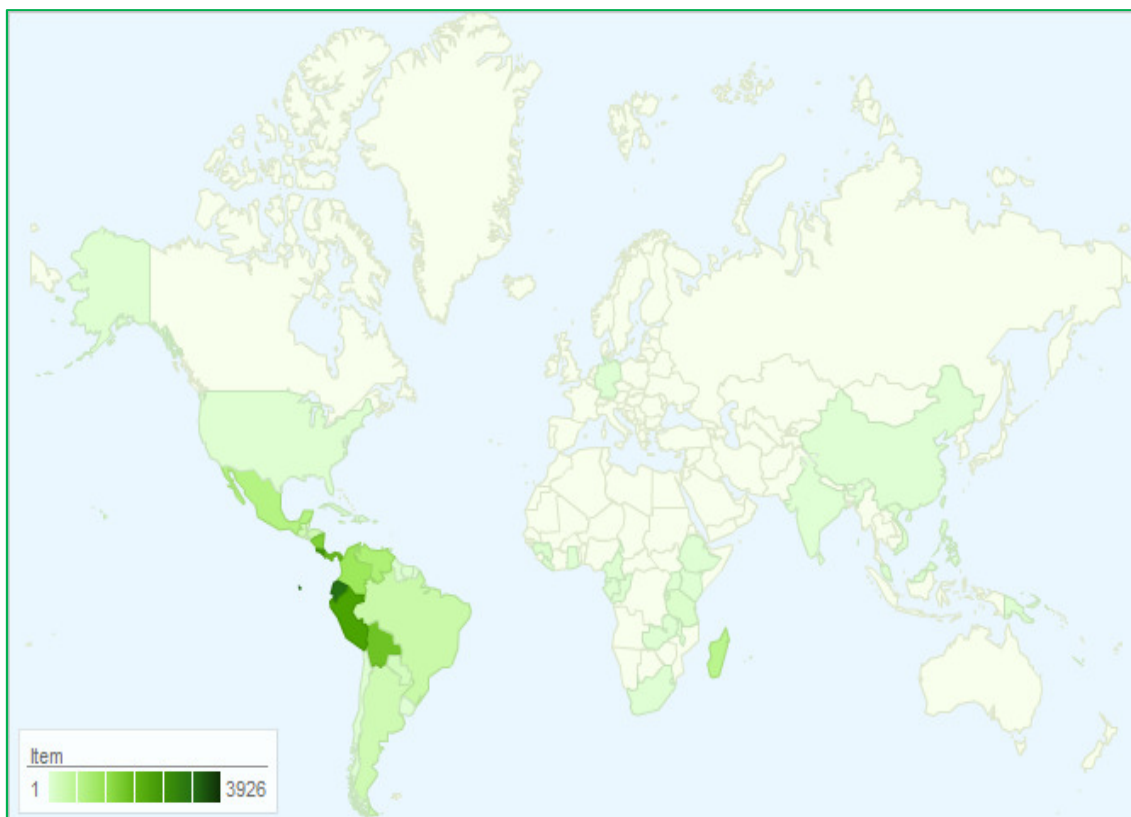


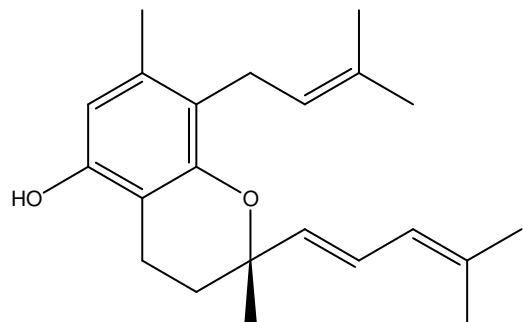
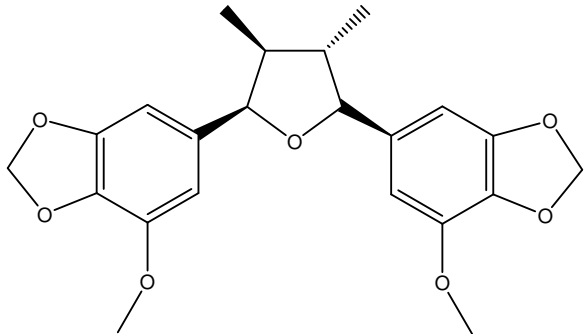
Figura 2 Mapa de distribuição das espécies do gênero *Peperomia* (Fonte: www.tropicos.org)

As espécies de *Peperomia* são ervas perenes ou anuais, terrestres, rupícolas ou epífitas, frequentemente carnosas, com folhas alternas, opostas ou verticiladas; inflorescências em racemos ou espigas terminais, axilares ou opostas às folhas com flores diminutas, protegidas por uma bractéola, ovário unicarpelar e estames dois, dispostos lateralmente, na base do pistilo e frutos comápice pontuado, mamiliforme, rostrado ou com escudo oblíquo, por vezes com pseudo-cúpula na base (Monteiro and Guimarães, 2008).

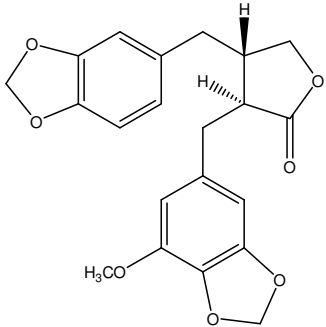
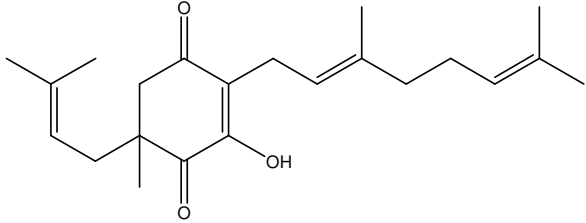
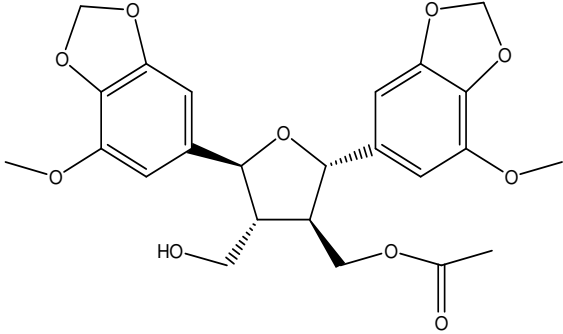
Por possuir folhagem vistosa, muitas espécies são utilizadas como plantas ornamentais (Monteiro and Guimarães, 2008), enquanto outras são utilizadas na medicina popular para o tratamento ou controle de certas doenças como por exemplo: a *Peperomia alata* e *Peperomia glabella* que são utilizadas para combater a malária (Milliken, 1997), e a *Peperomia rotundifolia*, a qual, é utilizada em distúrbios estomacais (Monteiro and Guimarães, 2008), já a *Peperomia pellucida* é utilizada como anti-inflamatório e analgésico (Arrigoni-Blank et al., 2004). Do ponto de vista comercial, a espécie *Peperomia pelucida* é empregada na culinária (Lorenzi and Matos, 2002).

Comparado ao gênero *Piper*, pouquíssimos estudos fitoquímicos foram realizados em espécies do gênero *Peperomia* (Mota et al., 2009; Tanaka et al., 1998); até o ano de 2008, menos de 20 espécies haviam sido investigadas (LI et al., 2008), apesar disso, o gênero *Peperomia* ainda é considerado a segunda maior fonte de compostos bioativos dentro da família, representando 15% do total destas substâncias (Lopez et al., 2010). Dentre os 15% dos compostos bioativos mencionados, podem ser citados: lignanas, secolignanas, compostos fenólicos prenilados e cromenos (Batista et al., 2009; LI et al., 2008). Esta última classe, junto com as secolignanas, são de grande ocorrência no gênero, sendo considerados portanto, ótimos marcadores quimiotaxonômicos (Batista et al., 2009). O Quadro 1 apresenta alguns exemplos de compostos isolados de espécies do gênero *Peperomia* que possuem atividade biológica:

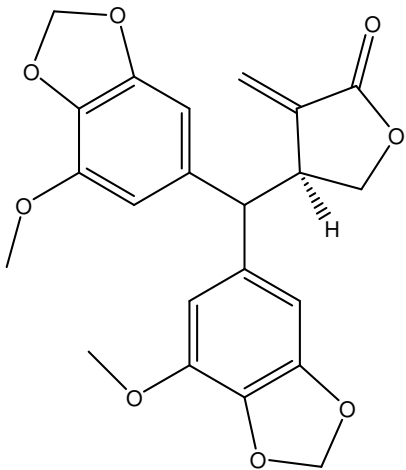
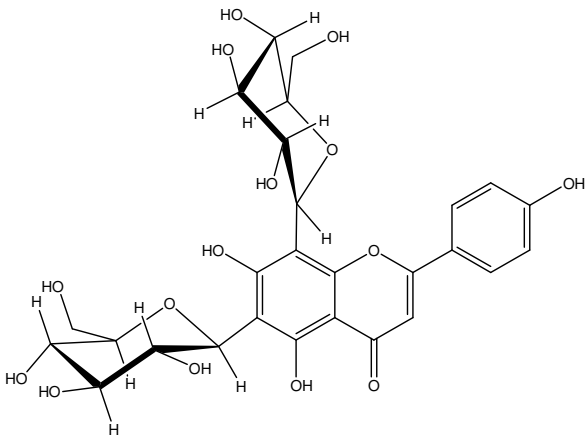
Quadro 1 Exemplos de compostos isolados do gênero *Peperomia* e suas respectivas atividades biológicas

Composto	Espécie	Atividade Biológica	Referência
Peperobtusina A 	<i>Peperomia obtusifolia</i>	Tripanocida (IC ₅₀ 3.1 μM)	(Mota et al., 2009)
4,5,4',5'-dimetilenodioxi-3,3'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana 	<i>Peperomia Blanda</i>	Tripanocida (IC ₅₀ 9.6 μg/mL)	(Felippe et al., 2008)

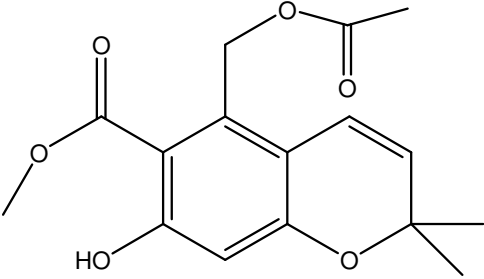
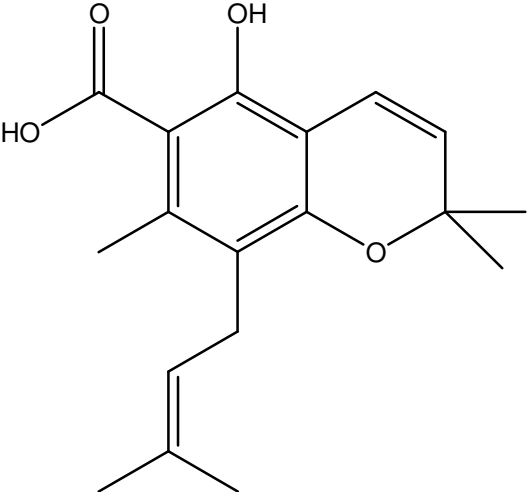
Continuação quadro 1

2-(5-metoxi-3,4-metilenodioxibenzil)-3-(3,4-metilenodioxibenzil)butirolactona 	<i>Peperomia duclouxii</i>	Citotóxica Linhagem VA-13 (IC₅₀ 23.12μM) Linhagem HepG2 (IC₅₀ 26.4μM)	(Li et al., 2006)
Hidropiperona 	<i>Peperomia galioides</i>	Leishmanicida (Lise total à 100μg/mL contra <i>L.braziliensis</i>, <i>L.donovani</i> e <i>L.amazonensis</i>)	(Mahiou et al., 1996)
7,8-trans-8,8'-trans-7',8'-trans-7,7'-bis(5-metoxi-3,4-metilenodioxifenil)-8-acetoximetil-8'-hidroximetiltetrahidrofurano 	<i>Peperomia dindygulensis</i>	Citotóxica Linhagem VA-13 (IC₅₀ 36.2μM)	(Wu et al., 2005)

Continuação quadro 1

Peperomina E 	<i>Peperomia dindygulensis</i>	Citotóxica Linhagem VA-13 (IC₅₀ 1.93µM)	(Wu et al., 2006)
Vicenina 	<i>Peperomia Blanda</i>	Antioxidante IC₅₀ 90.5µM	(Veloza et al., 2009)

Continuação quadro 1

Metil-5-acetoximetanol-7-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato 	<i>Peperomia villipetiola</i>	Fungicida forte <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	(Salazar et al., 2005)
Ácido 5-hidroxi-8-(3'-metil-2'-butenil)-2,2,7-trimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico 	<i>Peperomia serpens</i>	Fungicida fraca <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	(Kitamura et al., 2006)

1.6 Considerações sobre a espécie *Peperomia obtusifolia*:

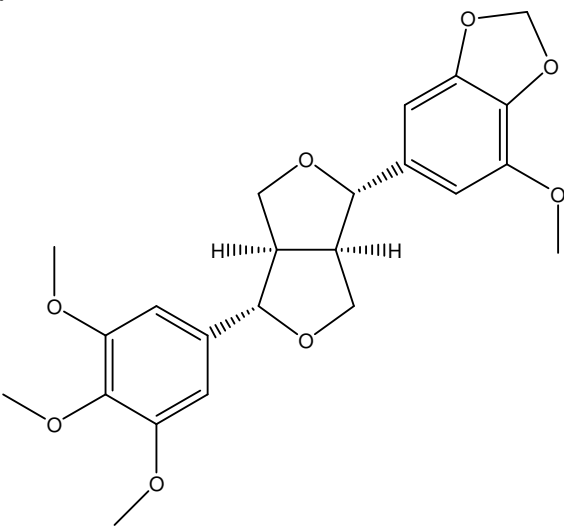
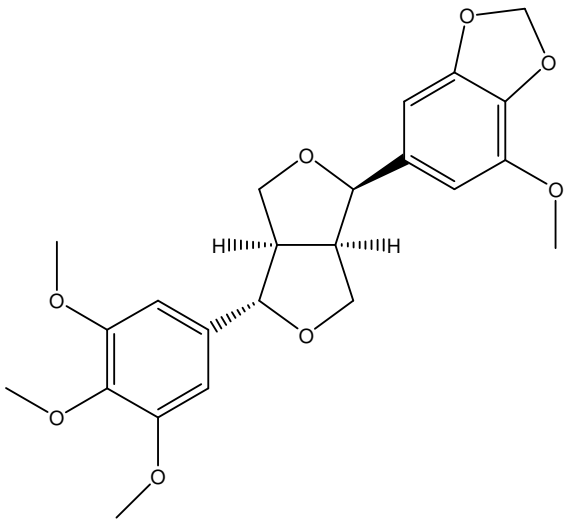
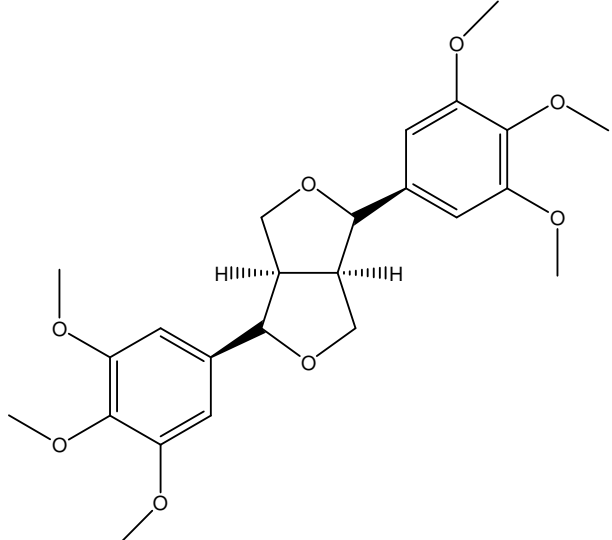
Peperomia obtusifolia é uma planta ornamental bastante conhecida, cuja ocorrência vai desde o México até a América do Sul (Mota et al., 2009; Tanaka et al., 1998). É uma erva carnosa, umbrófila, que possui de 20 a 25 cm de altura e desenvolve-se em altitudes que variam entre 5 e 650 metros (Fig.3). Suas folhas são alternas, suculentas, largamente obovado-espatuladas, de ápice arredondado, emarginado ou não (Guimarães and Costa, 1980)



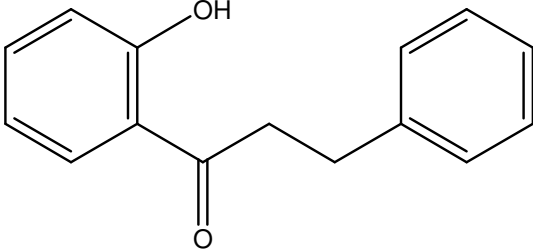
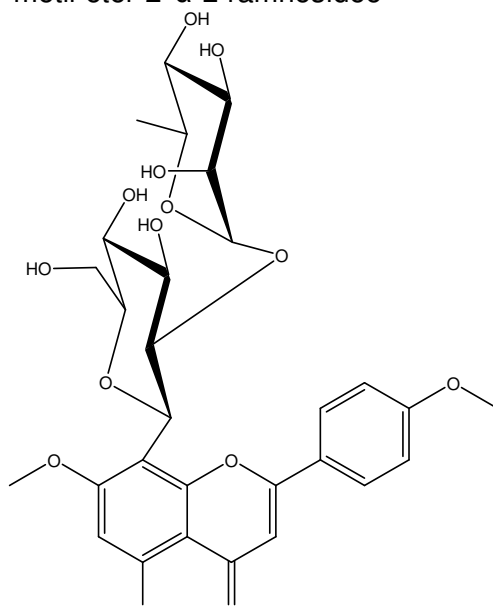
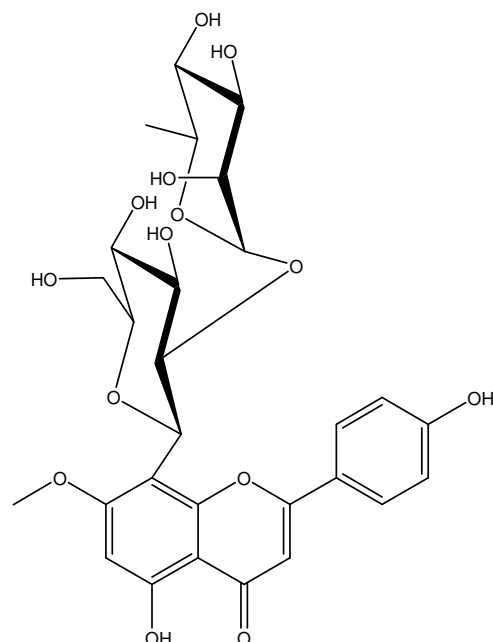
Figura 3 Foto da espécie *Peperomia obtusifolia* (Fonte www.imgkid.com)

Evidências indicam que algumas comunidades da América Central, utilizam esta planta para tratar picadas de inseto e de cobra, além disso também a utilizam na limpeza de pele (Batista et al., 2012). Entre os metabólitos secundários já isolados da espécie (Quadro 2), pode-se mencionar classes como: Lignanas, flavonoides (Mota et al., 2011), compostos fenólicos (Tanaka et al., 1998) amidas (Mota et al., 2006) e cromenos (Batista et al., 2009). Entre os cromenos, pode-se destacar a atividade tripanocida da Peperobtusina A ($IC_{50} = 3.1 \mu M$), o qual demonstrou ser muito mais potente que o benznidazol ($IC_{50}=10.4\mu M$) (Mota et al., 2009).

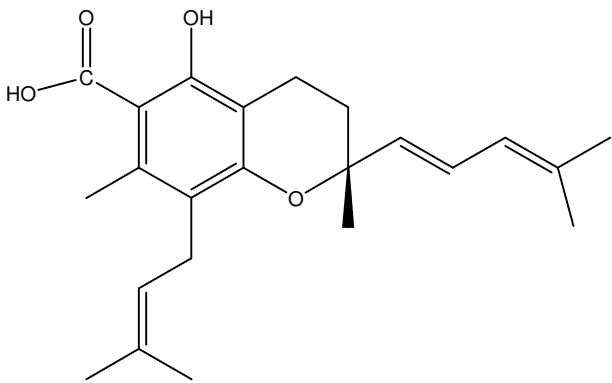
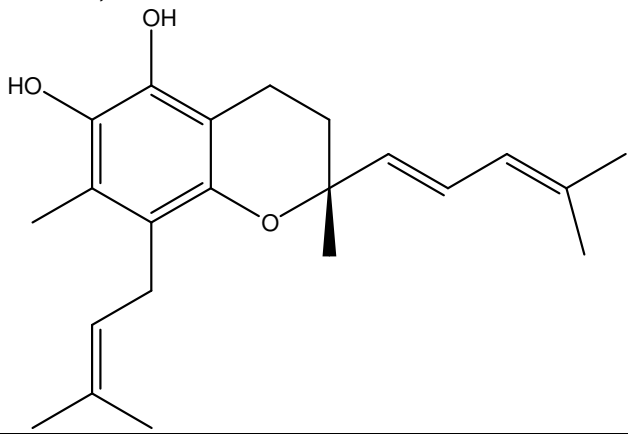
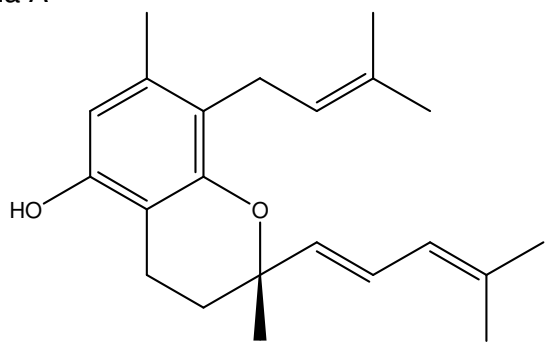
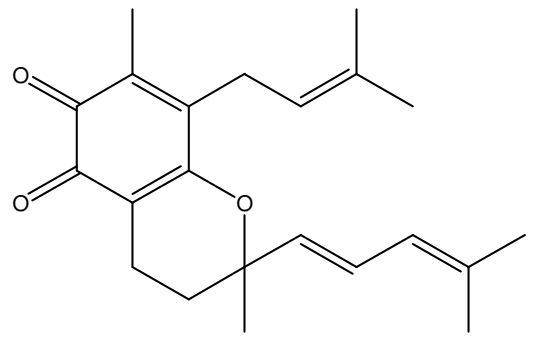
Quadro 2 Constituintes químico identificados e/ou isolados de *Peperomia obtusifolia*

Composto	Referência
Sesartemina 	(Mota et al., 2009; Mota et al., 2006)
2-Episesalatina 	(Mota et al., 2011; Mota et al., 2009; Mota et al., 2006)
(+)-Diaiangambina 	(Mota et al., 2011)

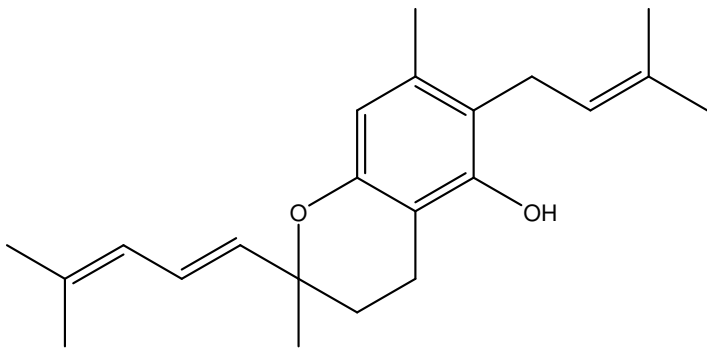
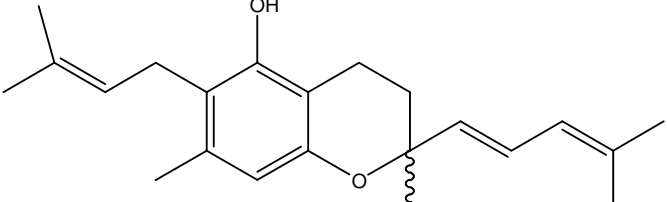
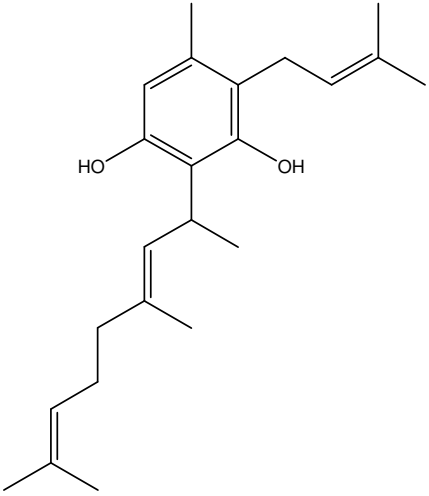
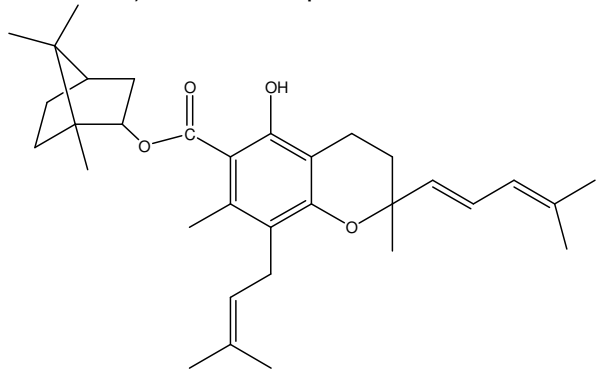
Continuação quadro 2

2'-Hidroxiidrochalcona 	(Tanaka et al., 1998)
Isosvertisina-4'-metil-éter-2''α-L-ramnosídeo 	(Mota et al., 2011; Mota et al., 2009; Mota et al., 2006)
Isosvertisina-2''α-L-ramnosídeo 	(Mota et al., 2011; Mota et al., 2009; Mota et al., 2006)

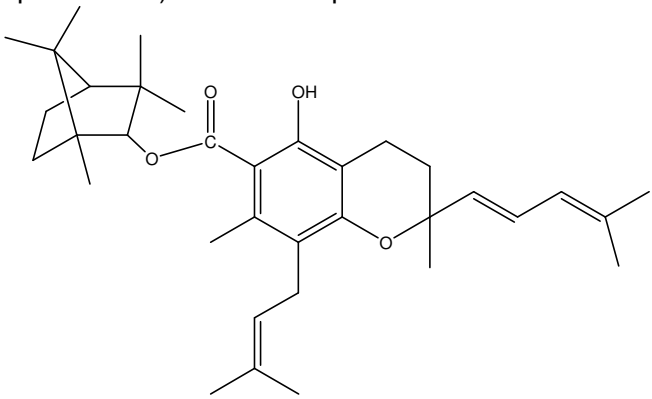
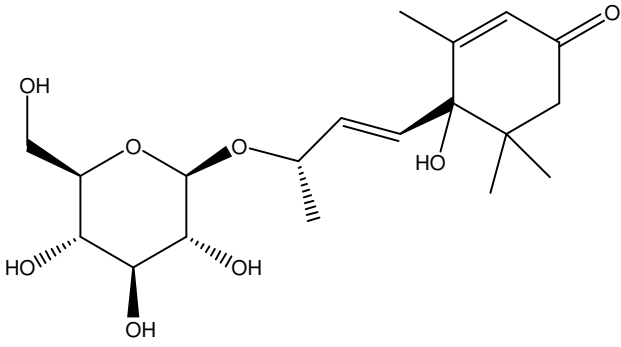
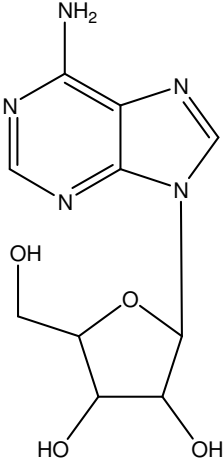
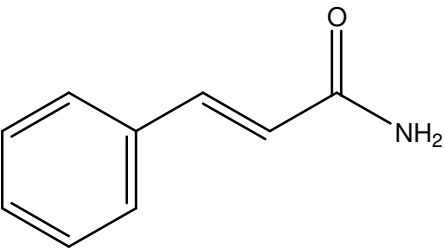
Continuação quadro 2

Ácido 3,4-diidro-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(2"-metil-2"-butenil)-2-(4'-metil-1',3'-pentadienil)-2H-1-benzopiran-6-carboxílico 	(Batista et al., 2009; Mota et al., 2009; Mota et al., 2006)
2,7-dimethyl-8-(3-methylbut-2-enyl)-2-(4-methylpenta-1,3-dienyl)chroman-5,6-diol 	(Mota et al., 2006)
Peperobtusina A 	(Mota et al., 2009; Tanaka et al., 1998)
Peperobtusina B 	(Tanaka et al., 1998)

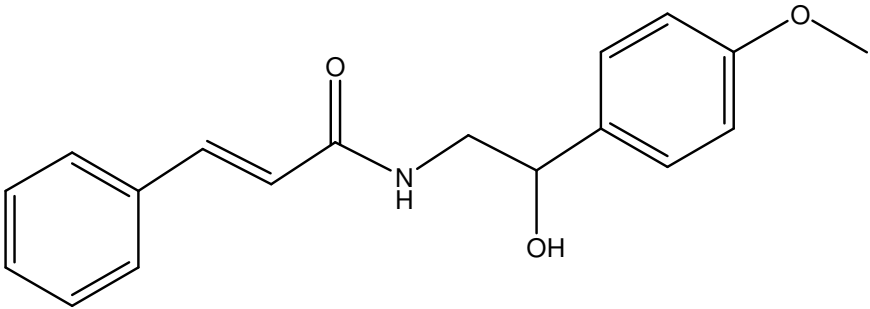
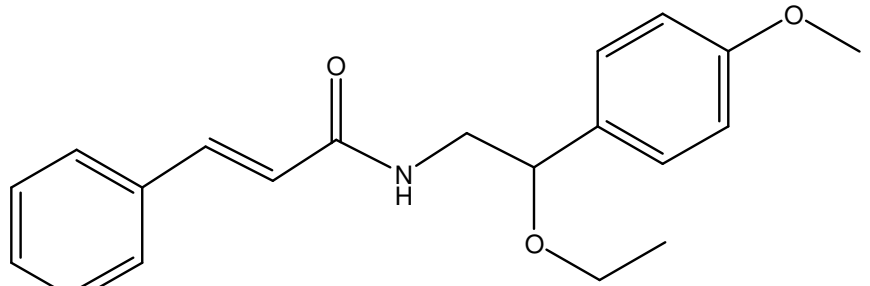
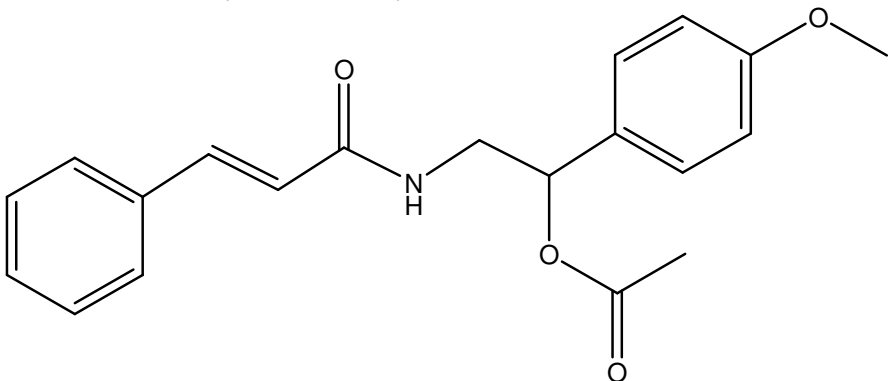
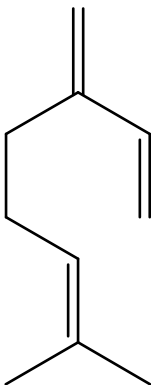
Continuação quadro 2

Isopeperobtusina A 	(Tanaka et al., 1998)
Clusifoliol 	(Mota et al., 2009)
Piperogalina 	(Tanaka et al., 1998)
Bornil-3,4-diidro-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3''-metil-2''-butenil)-2-(4'-metil-1',3'-pentadienil)-2H-1-benzopiran-6-carboxilato 	(Batista et al., 2011)

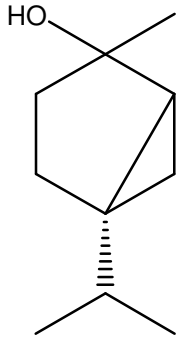
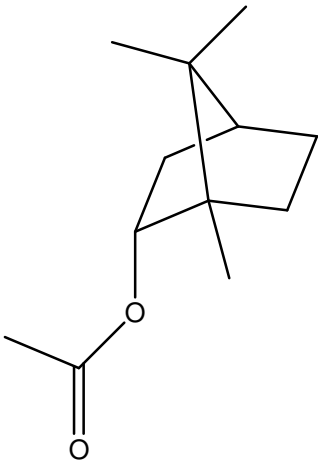
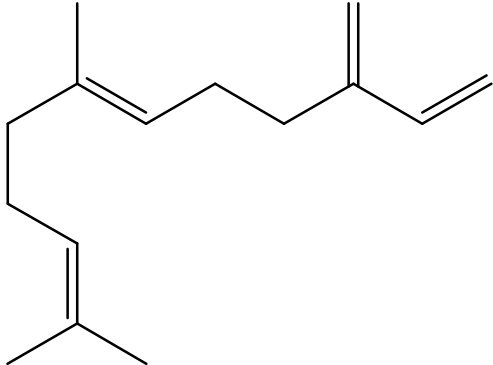
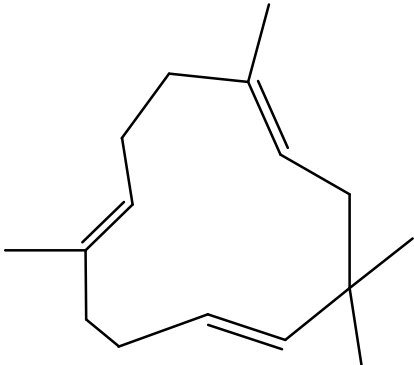
Continuação quadro 2

Fenchil-3,4-diidro-5-hidroxi-2,7-dimetil-8-(3''-metil-2''-butenil)-2-(4'-metil-1',3'-pentadienil)-2H-1-benzopirano-6-carboxilato 	(Batista et al., 2011)
Corcoionosídeo C 	(Mota et al., 2011)
2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-(hydroximetil)-tetrahidrofuran-3,4-diol 	(Mota et al., 2006)
Cinamamida 	(Mota et al., 2006)

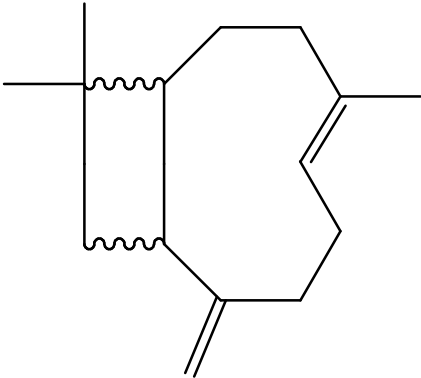
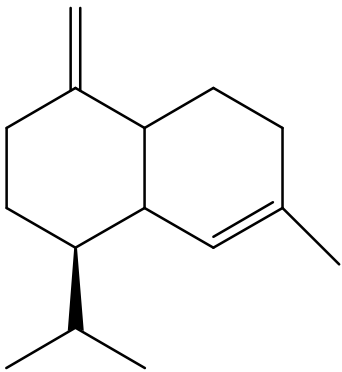
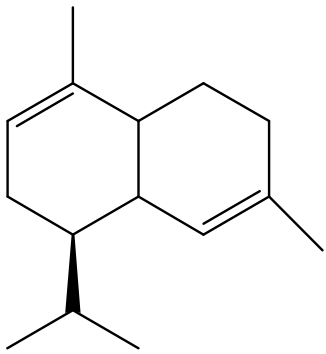
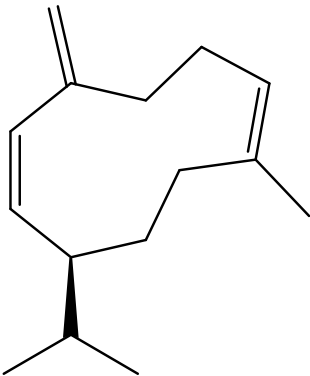
Continuação quadro 2

N-(2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)etil)cinamamida 	(Mota et al., 2006)
N-(2-etoxi-2-(4-metoxifenil)etil)cinamamida 	(Mota et al., 2006)
2-cinamamido-1-(4-metoxifenil)etil acetato 	(Mota et al., 2006)
Mirceno 	(Moreira et al., 1999)

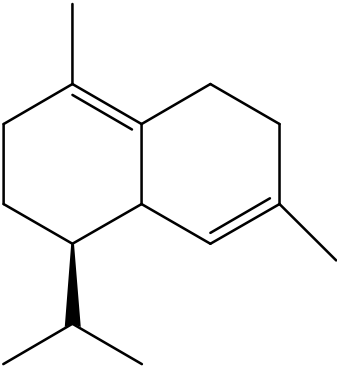
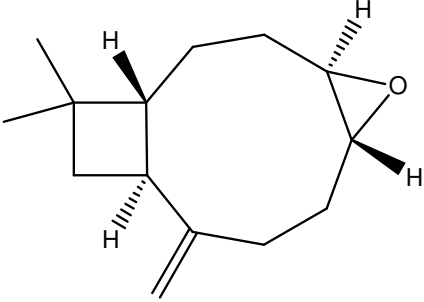
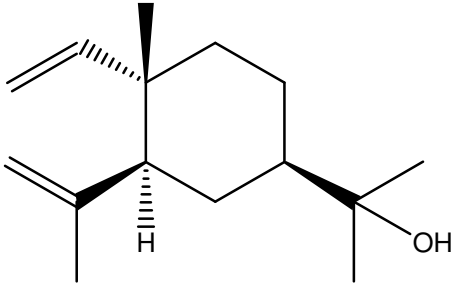
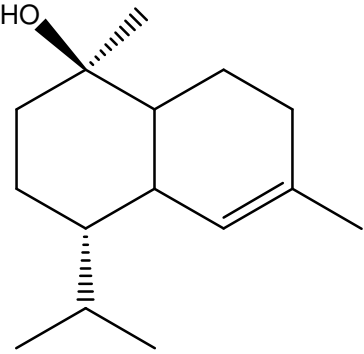
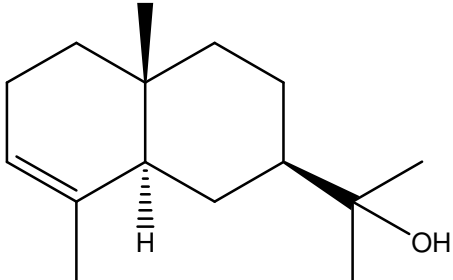
Continuação quadro 2

4-Tujanol 	(Moreira et al., 1999)
Acetato de bornil 	(Moreira et al., 1999)
β(E)-Farneseno 	(Moreira et al., 1999)
α-Cariofileno 	(Moreira et al., 1999)

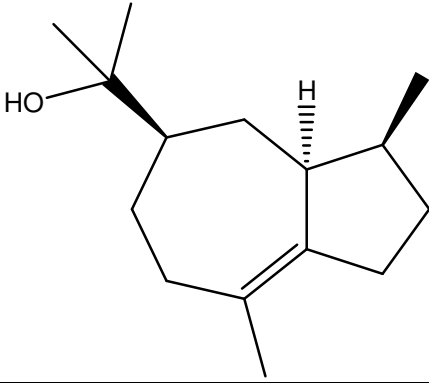
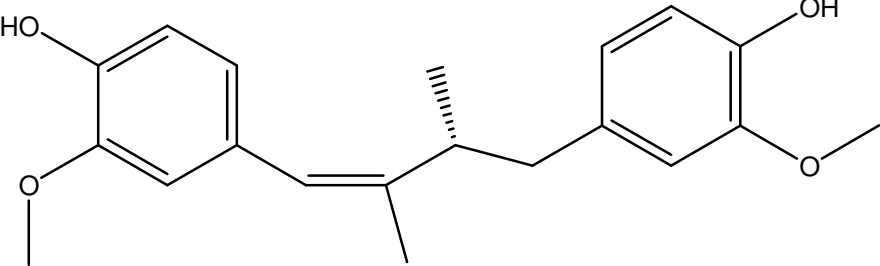
Continuação quadro 2

E-Cariofileno 	(Moreira et al., 1999)
γ-Muroleno 	(Moreira et al., 1999)
α-Muroleno 	(Moreira et al., 1999)
Germacreno D 	(Moreira et al., 1999)

Continuação quadro 2

δ-Cadineno 	(Moreira et al., 1999)
Óxido de Cariofileno 	(Moreira et al., 1999)
Elemol 	(Moreira et al., 1999)
δ-Cadinol 	(Moreira et al., 1999)
α-Eudesmol 	(Moreira et al., 1999)

Continuação quadro 2

Bulnesol 	(Moreira et al., 1999)
Ácido Guaiácico 	(Moreira et al., 1999)

2. Objetivos

2.1 Geral

- Realizar a análise metabolômica da espécie *Peperomia obtusifolia*

2.2 Específicos

- Elaborar uma metodologia padrão de preparo de amostra, que possibilite os estudos metabolômicos seguintes
- Realizar cultivo controlado de *Peperomia obtusifolia*
- Obter espectros de RMN de ^1H , cromatogramas de CLAE e CG das amostras de *P. obtusifolia* obtidas por meio da metodologia padrão desenvolvida
- Realizar Análise Multivariada dos dados obtidos por RMN de ^1H
- Analisar o perfil metabolômico de *Peperomia obtusifolia* e das suas variedades
- Avaliar a resposta de *Peperomia obtusifolia* frente ao estresse biótico provocado pelo besouro *monoplatus* sp.

3. Desenvolvimento de metodologia padrão de preparo da amostra

A análise do metaboloma envolve algumas etapas, são elas: preparo da amostra, aquisição dos dados e análise dos dados. Todas essas etapas estão fortemente interligadas, principalmente as duas primeiras, uma vez que o método analítico utilizado requer certas propriedades do analito, refletindo assim na maneira em que a amostra deveria ser preparada. Sendo assim, quando o analito é adulterado ou não extraído durante o preparo da amostra, a acurácia dos dados coletados e sua interpretação biológica podem ser comprometidos (Kim and Verpoorte, 2009; Vuckovic, 2012). É por isso que a escolha da estratégia durante o preparo da amostra é crucial para o sucesso de um dado experimento, porém isto ainda é um aspecto subestimado na metabolômica (Moco et al., 2007)

Infelizmente, os avanços conquistados nas técnicas analíticas não foram acompanhados da mesma maneira em relação à metodologia empregada no preparo da amostra. Atualmente, devido a grande diversidade de metabólitos secundários contidos nas plantas, ainda não há uma metodologia padrão, e desta maneira, muitos laboratórios utilizam métodos desenvolvidos por eles mesmos, onde cada protocolo é desenvolvido para cada caso específico (Fukusaki and Kobayashi, 2005; Schripsema, 2009)

Sem dúvida, o preparo da amostra é uma etapa crítica, uma vez que qualquer displicência pode interferir no resultado final da análise (Fukusaki and Kobayashi, 2005). Esta etapa por sua vez, envolve sub-etapas, como: cultivo, coleta, secagem (opcional), extração e preparação para a análise da amostra; alguns desses procedimentos são passíveis de provocarem grandes alterações nos níveis metabólicos da planta (Fukusaki and Kobayashi, 2005; Kim and Verpoorte, 2009), e para que isso não ocorra, todas essas variáveis devem ser controladas da melhor maneira possível, possibilitando assim uma análise fidedigna e reprodutível (Schripsema, 2009).

Recentemente foi provado que pequenas mudanças no metaboloma podem ser explicadas por perturbações impostas nas plantas, como por exemplo, mudanças no meio, estresse físico, estresse abiótico,

estresse nutricional e mutação (Fukusaki and Kobayashi, 2005). Portanto no cultivo das plantas, fatores como adubação, temperatura, tempo de exposição à radiação e quantidade de água irrigada por planta devem ser controlados. Na coleta de folhas, por exemplo, a idade da folha, a posição em que elas se encontram na planta e a hora da coleta, são também fatores que se não forem monitorados podem gerar grande variação na análise. Recomenda-se congelar as folhas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta a fim de cessar as reações metabólicas do organismo e assim, saber com precisão, posteriormente, como estava o metaboloma da planta naquele momento. Outra maneira de cessar as reações enzimáticas da planta, seria através da secagem, uma vez que elas ocorrem em meio aquoso (Kim and Verpoorte, 2009; Schripsema, 2009).

A técnica de secagem mais indicada para a metabolômica é a secagem a frio (*freeze drying*) ou liofilização, onde o material botânico é congelado e em seguida exposto a baixa pressão para que a água que está na forma sólida, sublima, passando diretamente para a fase gasosa, conservando desta maneira compostos voláteis e termolábeis que poderão ser detectados posteriormente. Uma maneira de melhorar esta secagem seria, pulverizar a planta previamente com auxílio de nitrogênio líquido, aumentando a superfície de contato da amostra, deste modo não só melhoraria a secagem, como também o rendimento da extração. Existe também a secagem por *spray-drying*, na qual a solução extrativa é nebulizada, formando gotículas, aumentando assim sua superfície de contato, em seguida essas gotículas entram em uma câmara de ar quente por um curto período de tempo para que o solvente seja evaporado, restando apenas os componentes sólidos que em seguida entram em contato com um adjuvante farmacêutico, formando assim um pó (Kim and Verpoorte, 2009; Schripsema, 2009).

A extração na metabolômica pode ser realizada por maceração, não diferindo muito da extração realizada em estudos fitoquímicos, neste processo, muitos fatores devem ser controlados para evitar variações experimentais, como temperatura, tempo de extração (quanto maior a temperatura e o tempo, maior será o rendimento, porém há o risco de formação de artefatos) e a razão entre solvente e amostra (elas devem ser iguais no preparo de todas as amostras) (Fukusaki and Kobayashi, 2005; Kim and

Verpoorte, 2009; Schripsema, 2009). Outra técnica comumente utilizada é a extração com solvente deuterado (extração direta) combinada com a ultrasonicação, desta forma, a energia adicionada pelo ultrasonicador ao sistema, facilita a extração de compostos do material botânico, uma vez que essa energia adicionada facilita a abertura dos poros da parede celular, e consequentemente aumenta a velocidade de difusão dos metabólitos em direção ao solvente. Este método é simples, fácil e não possui limitações em relação ao tipo de solvente a ser utilizado. Existe também a extração por moinho de bolas, onde uma certa quantidade de material botânico fresco junto com o solvente extrator são colocadas em um compartimento, que em seguida é fechado com uma bola de metal no interior, que irá vibrar e esmagar o material ao mesmo tempo que os constituintes são difundidos em direção ao solvente. Após a extração, as amostras podem ser secas a temperatura ambiente, em rotaevaporador ou em contato com nitrogênio gasoso (Kim and Verpoorte, 2009; Schripsema, 2009).

Uma vez que a amostra está pronta, o próximo passo é submetê-la a métodos analíticos para detectar os metabólitos existentes na amostra, esses métodos são geralmente espectroscópicos (RMN, EM, UV, IV), métodos cromatográficos (CG, CLAE) e técnicas hífenadas (Ex: CLAE-EM e CG-EM) que serão explicados mais a frente (Kim and Verpoorte, 2009; Schripsema, 2009).

Atualmente na metabolômica, um dos maiores entraves reside no problema de detectar, através da análise de uma única amostra, todos os metabólitos contidos em um organismo, o que ainda é virtualmente impossível, pois o metaboloma consiste de uma grande variedade de compostos, em diferentes concentrações e com diferentes polaridades, onde muitos destes compostos podem ser instáveis; o que não é o caso quando comparado às outras ômicas, por exemplo, na proteômica, os metabólitos analisados (proteínas), englobam um universo formado por 20 aminoácidos, já na genômica, os compostos a serem analisados são constituídos por apenas 4 tipos de nucleotídeos (Schripsema, 2009).

Em relação às concentrações dos metabólitos, temos os metabólitos primários como açúcares e ácidos orgânicos, que são muito mais abundantes do que metabólitos secundários, cujos sinais aparecem

frequentemente no espectro de RMN se sobrepondo a outros sinais de metabólitos secundários, os quais geralmente encontram-se em concentrações menores, neste caso, seria interessante realizar um pré-tratamento ou pré-fracionamento da amostra para detectar os metabólitos secundários que estariam mascarados. Uma maneira de fazer um pré-tratamento, seria através do fracionamento do extrato com solventes de diversas polaridades, através de cromatografia em fase reversa ou normal ou também através de separação por peso molecular, utilizando o sephadex como fase fixa (Kim and Verpoorte, 2009; Schripsema, 2009).

O ponto mais crítico desse pré-fracionamento é a escolha do solvente a ser utilizado para a separação (Fukusaki and Kobayashi, 2005). Deve-se prestar muita atenção nas possíveis interferências que esse solvente pode causar nos equipamentos de análise, assim como nas possíveis reações indesejadas que podem ocorrer entre o solvente e a amostra, que podem produzir artefatos (Robertson, 2005). O maior objetivo do fracionamento de amostras para estudos de metabolômica é obter uma melhor visão dos diferentes compostos presentes, ou um melhor perfil dos espectros, e esse perfil depende, sobretudo, dos equipamentos a serem utilizados no fracionamento (Fukusaki and Kobayashi, 2005).

Na aquisição de dados, as técnicas como a espectrometria de massas (EM) e suas variações hífenadas (CG-EM e CLAE-EM), assim como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), dominam a literatura (Fiehn, 2002; Kim and Verpoorte, 2009; Nicholson et al., 1999; Robertson, 2005; Schripsema, 2009). Cada técnica possui suas vantagens e desvantagens, as quais são utilizadas de acordo com o que o pesquisador procura e que juntas se complementam (Robertson, 2005).

CG-EM é uma técnica, na qual a cromatografia gasosa de alta resolução é acoplada a um espectrômetro de massas de impacto eletrônico. A ionização por impacto eletrônico gera um espectro de massas para cada composto que foi separado na cromatografia com suas respectivas fragmentações, facilitando assim a sua identificação, que é auxiliada pela comparação das massas das fragmentações com as do banco de dados. A grande desvantagem desta técnica é que os compostos submetidos a este procedimento precisam ser voláteis e estáveis durante a análise, uma vez que

eles sofrem a influência de altas temperaturas. Reações de derivatização como acetilação ou metilação podem ser aplicadas em compostos não voláteis (Ex: glicosídeos) para que estes se tornem voláteis e assim sejam analisados (Schripsema, 2009).

Por outro lado, na CLAE-EM, utiliza-se como técnica cromatográfica, a cromatografia líquida de alta eficiência, na qual, compostos não voláteis são facilmente separados, e em seguida submetidos a EM, neste espectrômetro o método de ionização pode variar bastante, podendo ser, time-of-flight (TOF), íon-trap e etc (Fukusaki and Kobayashi, 2005; Schripsema, 2009). Nessas técnicas de ionização branda, os compostos a serem analisados não precisam ser voláteis ou volatilizados para serem ionizados e posteriormente detectados. O conceito do TOF baseia-se na teoria de que a massa do íon está relacionada a sua velocidade de deslocamento, logo, o tempo gasto que o íon gerado leva para atingir o detector é proporcional a sua massa, e devido a alta sensibilidade do detector (detecção na escala de microssegundos), pode-se revelar a massa exata de cada íon. Em relação ao espectrômetro de massas por íon-trap, pode-se dizer que ele é mais apropriado para análises qualitativas, especialmente de íons pouco abundantes, pois o objetivo do íon-trap é isolar esses íons e mantê-los “presos” (*trapped*), aumentando assim, a sua população até que esteja grande o suficiente para se fazer uma análise não só dos íons, mas de suas respectivas fragmentações (Allwood and Goodacre, 2009).

Comparando de uma maneira geral as técnicas de EM e RMN, pode-se afirmar que a EM é muito mais sensível e de maior alcance, podendo identificar dezenas de compostos em uma única análise, esta ferramenta é indispensável na metabolômica, especialmente quando se pretende identificar novos biomarcadores. Em relação a RMN, o número de compostos que podem ser analisados em uma única amostra é limitado, porém, as informações dadas sobre o conteúdo estrutural dessas moléculas, a reprodutibilidade da análise e a quantificação da amostra são superiores a espectrometria de massas (Robertson, 2005; Schripsema, 2009). Devido a essas peculiaridades, a maioria dos grupos de pesquisa voltada aos estudos de metabolômica está usando tanto os equipamentos de EM como os de RMN (Robertson, 2005).

Após todas essas etapas, faz-se necessário a conversão de dados obtidos por CG-EM, CL-EM, ou RMN para uma linguagem digital que possa ser utilizada em análise multivariada através de ferramentas de estatística (Fiehn, 2002; Fukusaki and Kobayashi, 2005; Robertson, 2005). As ferramentas estatísticas são de extrema importância no campo da metabolômica; para se ter um idéia, um estudo de metabolômica qualquer pode gerar milhares de espectros para serem analisados, o que seria uma tarefa no mínimo exaustiva, mesmo para um espectroscopista experiente (Fiehn, 2002; Fukusaki and Kobayashi, 2005; Robertson, 2005). Desta forma, muitas ferramentas estatísticas utilizadas em outras áreas tem sido adotadas pela metabolômica a fim de analisar um grande número de dados rapidamente (Fukusaki and Kobayashi, 2005).

A ferramenta mais utilizada na metabolômica para análise multivariada de dados é o PCA (*Principal Component Analysis*) (Fiehn, 2002; Fukusaki and Kobayashi, 2005; Robertson, 2005), que é uma ferramenta da estatística que reduz um grande numero de dados , e a partir de uma série de cálculos, seleciona os sinais mais abundantes, chamados de componentes principais, em seguida pode-se visualizar as diferenças dentro da amostra e agrupar os compostos hierarquicamente (Fukusaki and Kobayashi, 2005)

Baseando-se em toda essa fundamentação, decidiu-se elaborar um protocolo confiável e reprodutível acerca do preparo da amostra das folhas adultas de *Peperomia obtusifolia*. Diante disso, estabeleceu-se como objetivo principal, descobrir a melhor metodologia de preparo de amostra, que possua o menor número de etapas possível e que seja reprodutível, assim como, descobrir que tipo de amostra seria a melhor ou a mais viável para a análise: amostra fresca, seca em estufa ou liofilizada.

3.1 Materiais e Métodos

Decidiu-se então, comparar o perfil metabólico de diferentes amostras de folhas de *Peperomia obtusifolia* (amostra fresca, seca em estufa e liofilizada). Estas folhas foram coletadas no mesmo horário, nos jardins do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade de São Paulo

(LQPN-USP), das quais se separou 5 folhas adultas de 5 lugares diferentes para cada amostra, totalizando 25 folhas por amostra. As amostras foram preparadas por métodos semelhantes, com algumas diferenças em relação a aplicação ou não de *quenching* pós coleta, ao tipo de secagem e a trituração (Fig.4). O preparo das amostras obedeceu a seguinte sequência:

- Amostra fresca sofreu *quenching* em N₂ líquido e em seguida foi triturada em gral. Seguida de extração em turrax (5 x de 100mL de MeOH), filtração em papel e concentração em rotaevaporador a 35 – 40 °C
- Amostra seca em estufa a 50 °C por 72 horas, foi triturada em moinho portátil seguida de extração realizada em turrax (5 x de 100 mL de MeOH) seguida de filtração em papel e concentração em rotaevaporador a 35 – 40 °C
- Amostra liofilizada sofreu *quenching* em N₂ líquido e em seguida foi triturada em gral, cujo material triturado sofreu liofilização por um período de 72Horas. A extração foi realizada em turrax (5 x de 100 mL de MeOH) seguida de filtração em papel e concentração em rotaevaporador a 35 – 40 °C

Todos os extratos obtidos foram armazenados em freezer a -20 °C a fim de evitar degradação dos seus compostos; em seguida, foram analisados por RMN de ¹H (CDCl₃, 300 Mhz). Os extratos brutos foram analisados sempre sob as mesmas condições: concentração (10 mg/mL), volume (700 µL) e número de scans (32) . As amostras foram analisadas em triplicata (Fig 5-7).

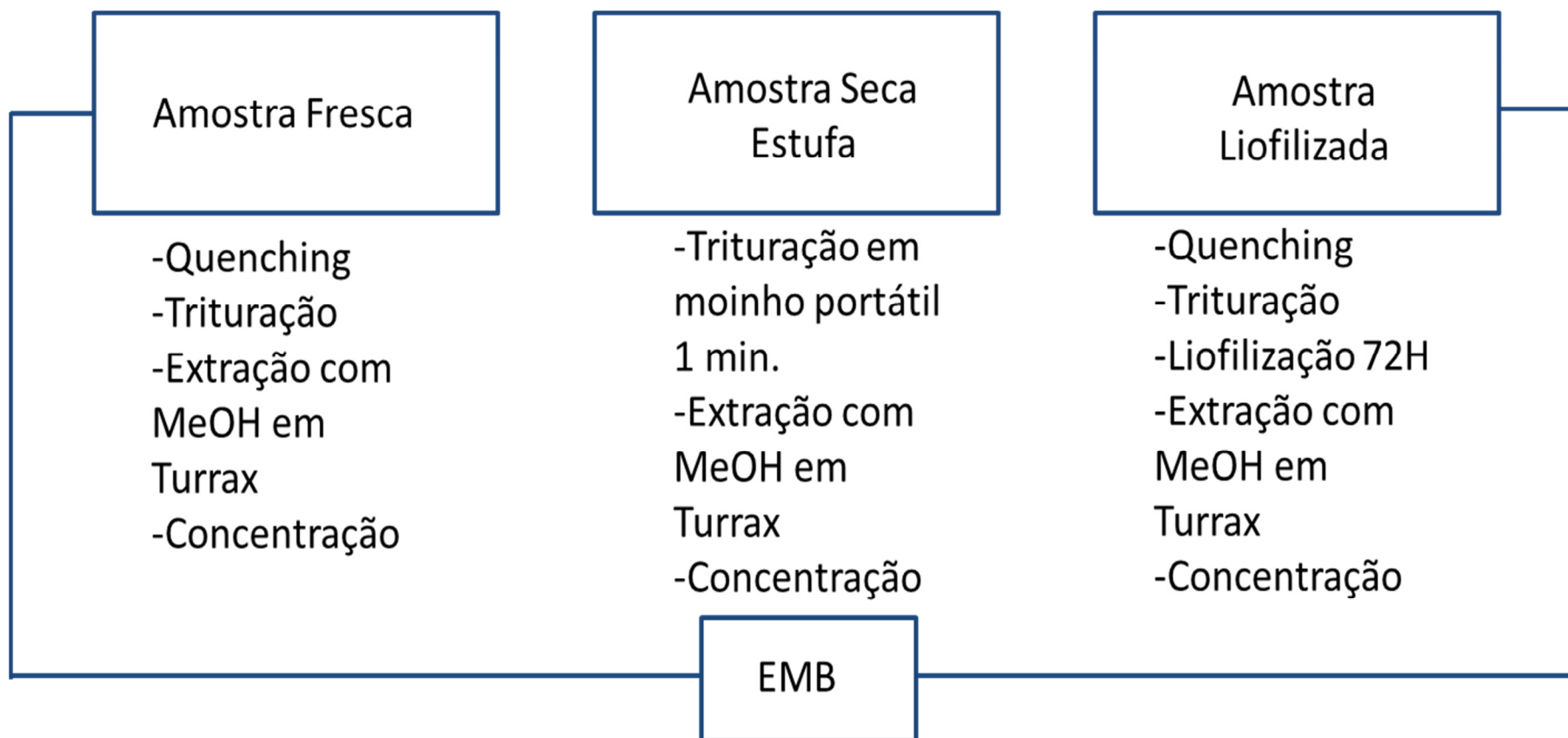


Figura 4 Metodologia de extração para obtenção do Extrato Metanólico Bruto das folhas de *P. obtusifolia*

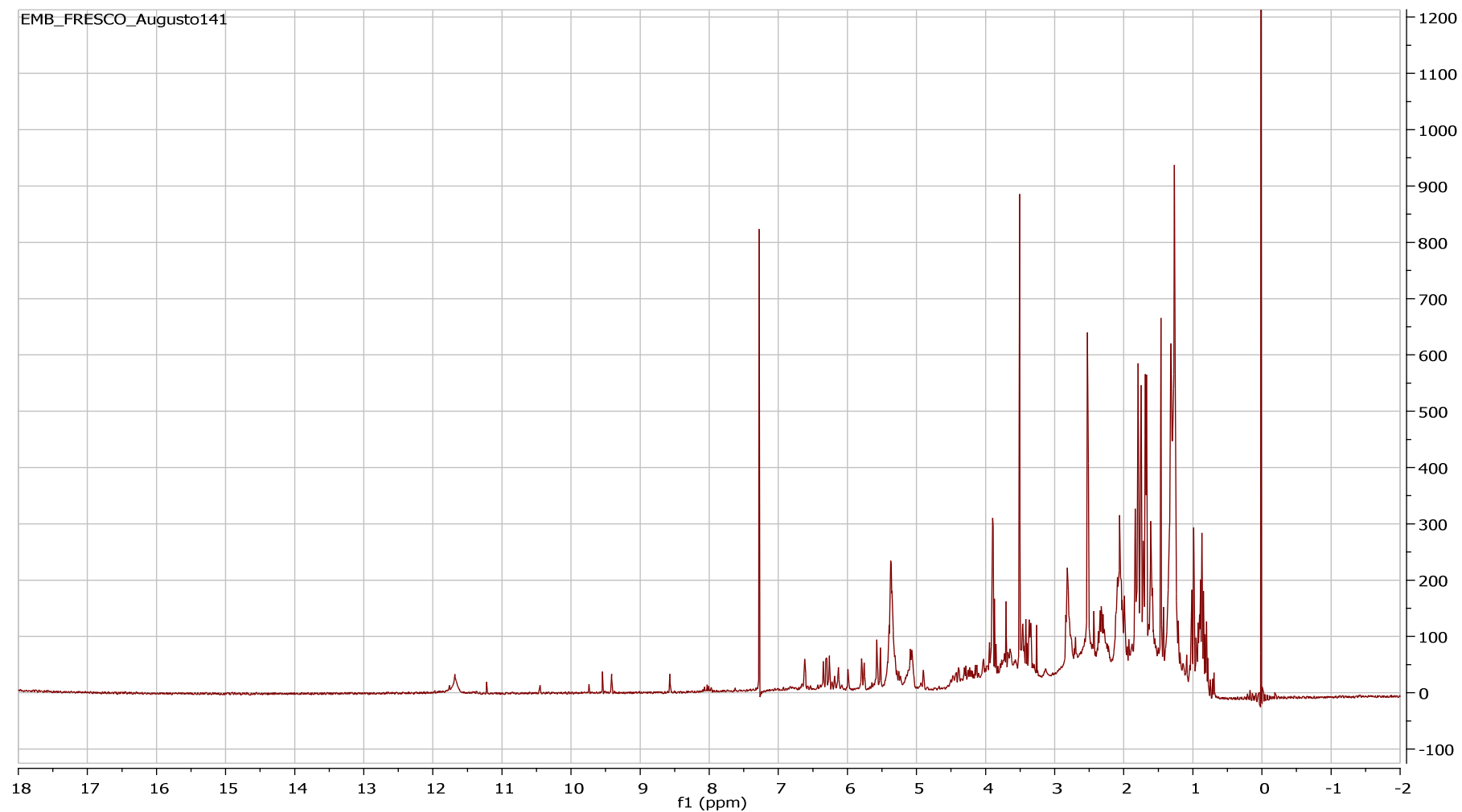


Figura 5 Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico bruto das folhas frescas de *Peperomia obtusifolia* (CDCl_3 , 300 Mhz)

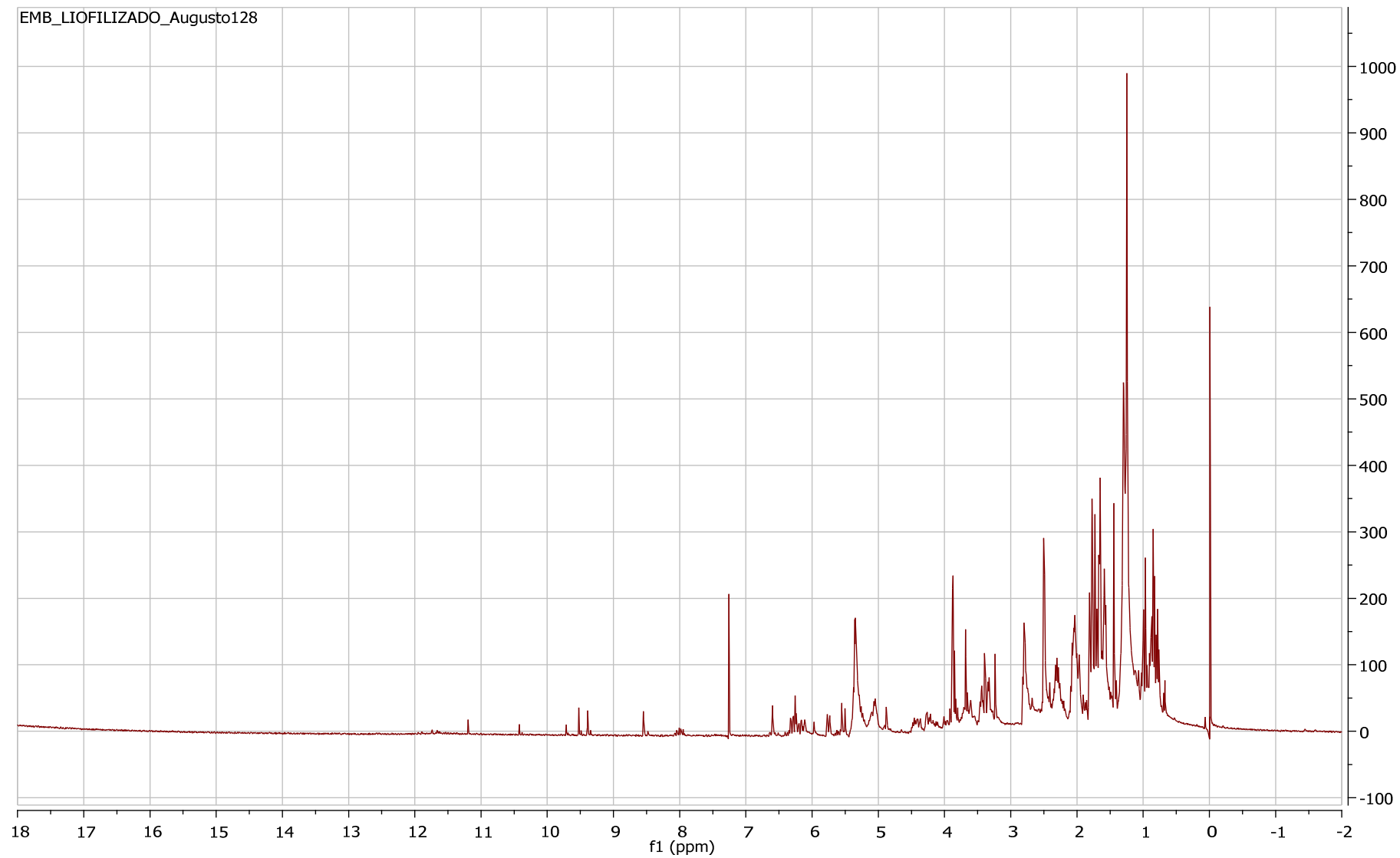


Figura 6 Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico bruto das folhas liofilizadas de *Peperomia obtusifolia* (CDCl_3 , 300 Mhz)

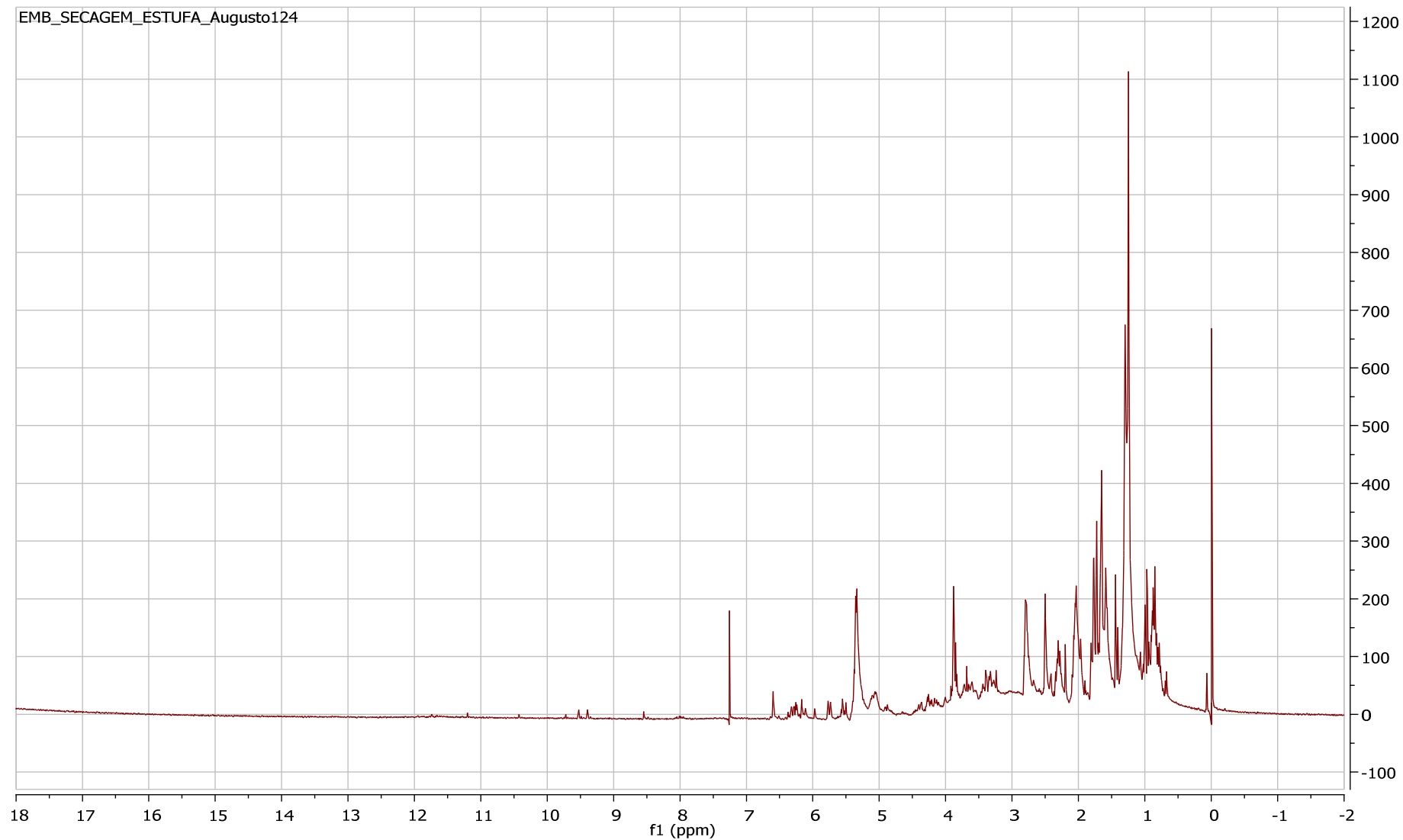


Figura 7 Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico bruto das folhas secas em estufa de *Peperomia obtusifolia* (CDCl_3 , 300 Mhz)

3.2 Resultados e discussão:

Após analisar as amostras por meio de RMN de ^1H , percebeu-se que os 3 tipos de amostras apresentavam perfis semelhantes, porém, como o protocolo de preparo da amostra fresca, foi o que demorava menos tempo a ser realizado (pois possuía menos etapas), decidiu-se adotá-lo como modelo a ser seguido, passando a utilizá-lo como padrão para as análises posteriores, desta vez em menor escala, utilizando apenas 5 folhas por extração, ao invés de 25 e 3 volumes de 50 mL de MeOH para realizar extração, ao invés de 5 volumes de 100 mL.

A fim de melhorar o perfil do espectro, decidiu-se submeter o extrato bruto obtido a partir da planta fresca, a uma cromatografia em coluna (Fig.8), a fim de retirar compostos como açúcares e ácidos graxos, os quais se encontram geralmente em grande concentração, e cujos sinais podem se sobrepor a outros que apresentam deslocamento químico semelhante e concentração inferior; esta sobreposição é mais conhecida como *overlapping*.

A Separação foi realizada por CC, a qual foi padronizada da seguinte maneira:

- A quantidade de extrato bruto utilizada para a separação foi de 50 mg
- Coluna de vidro com as seguintes dimensões: diâmetro= 1,8 cm altura = 12 cm
- Quantidade de fase fixa utilizada: 2,5 g de sílica gel
- Quantidade de extrato bruto utilizado: 50 mg devidamente seco
- Eluentes utilizados: Hexano, AcOEt e MeOH em ordem crescente de polaridade
- Volume de eluente utilizado por sistema : 15 mL

Através de monitoramento das frações por CCDA, elas foram divididas em três fases:

Apolar – Hexano 100% até Hexano : AcOEt (9:1)

Intermediária - Hexano : AcOEt (9:1) até AcOEt 100%

Polar – AcOEt 100% até MeOH 100%

Todas as fases foram secas em nitrogênio gasoso, e posteriormente analisadas por RMN de ^1H (300 Mhz). Essas amostras foram preparadas em triplicata, com o mesmo volume de solvente deuterado (700 μL) a fim de minimizar variações entre as replicatas (Schripsema, 2009).

Baseado na média dos rendimentos das fases obtidas após fracionamento de 50 mg de extrato bruto (Tabela 1), cada fase foi analisada por RMN, com uma determinada concentração. Desta forma, os extratos e fases foram analisados com as seguintes concentrações: EMB = 10 mg/mL, fase apolar = 1mg/mL, fase intermediária = 5mg/mL e fase polar = 10mg/mL.

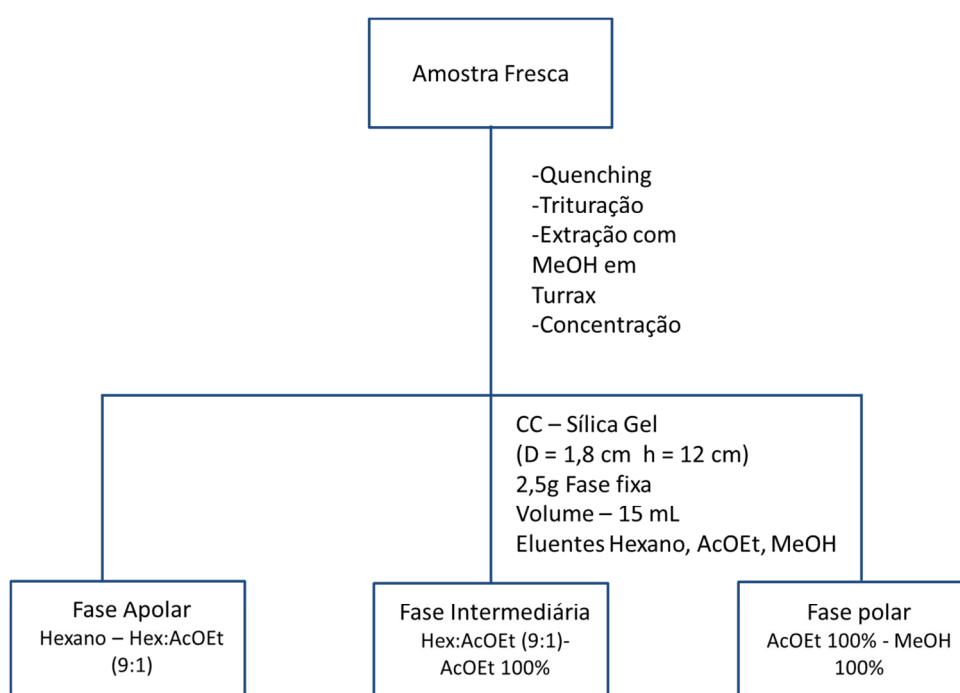


Figura 8 Metodologia empregada para extração e separação do extrato bruto de *P. obtusifolia*

SISTEMA UTILIZADO	VOLUME	POLARIDADE	Peso(média)
Hexano 100 %	15 mL	Apolar	2 mg
Hexano AcOEt (95:5)	15 mL		
Hexano:AcOEt(90:10)	15 mL		
Hexano:AcOEt(1:1)	15 mL	Intermediária	6,9 mg
AcOEt 100%	15 mL		
AcOEt:MeOH(8:2)	15 mL	Polar	31,7 mg
MeOH 100%	15 mL		

Tabela 1 Metodologia de fracionamento de 50 mg extrato metanólico bruto de *P. obtusifolia* e seus rendimentos (média)

Após o tratamento, pôde-se verificar uma melhora significativa no perfil dos espectros das fases resultantes do fracionamento do EMB de *P. obtusifolia* (Fig.9), podendo-se destacar o perfil da fase intermediária, por possibilitar o aparecimento de picos antes não vistos no espectro referente ao extrato bruto.

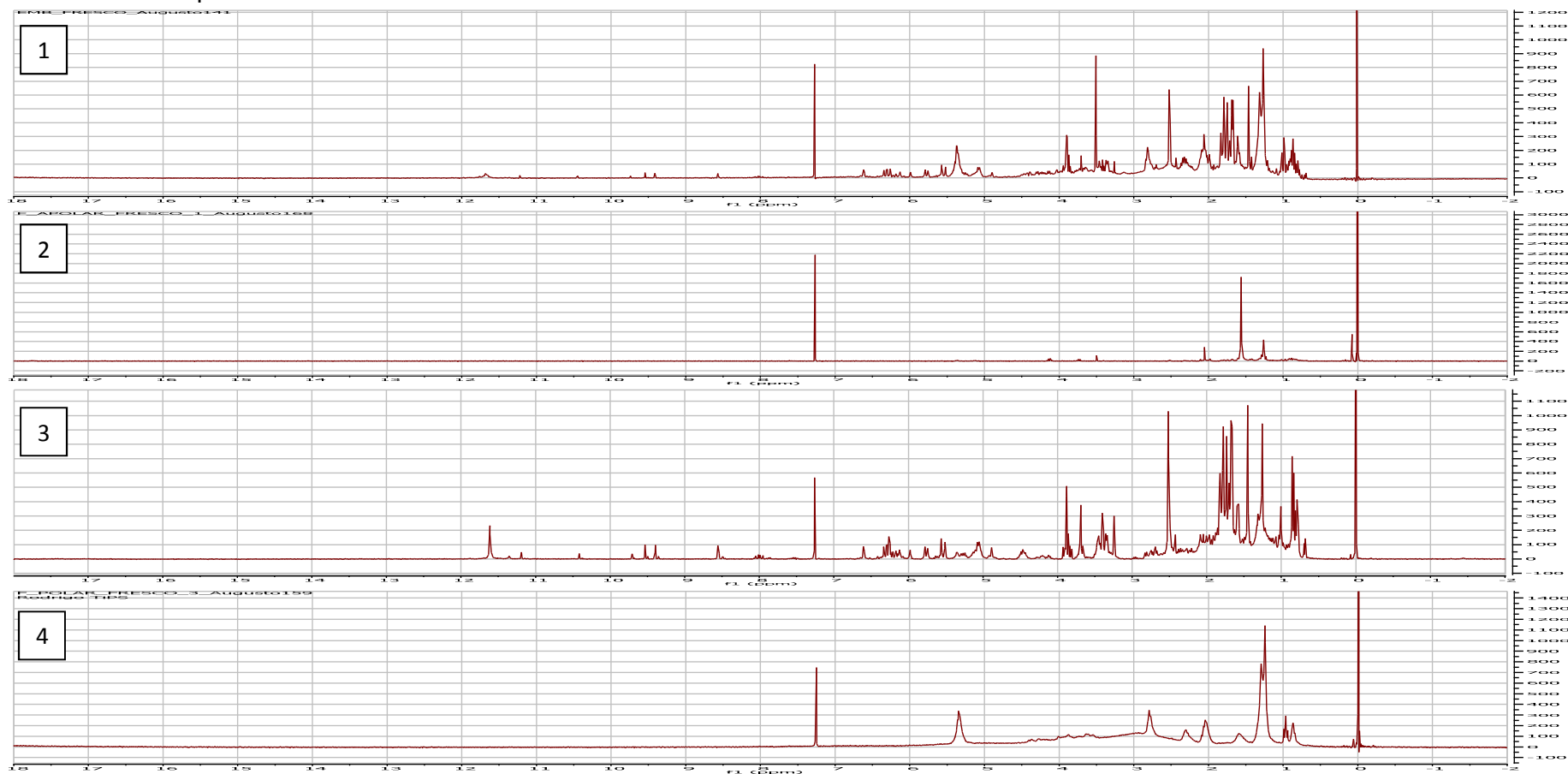


Figura 9 Espectros de RMN ¹H de Extrato Bruto, fases apolar, intermediária e polar de *P. obtusifolia*. Obs: as análises foram sempre realizadas no mesmo volume de solvente (700 µL de CDCl₃) e nas mesmas concentrações (EMB = 10 mg/mL, fase apolar = 1mg/mL, fase intermediária = 5mg/mL e fase polar = 10mg/mL). As amostras foram analisadas em triplicata. 1. Extrato Bruto 2. Fase Apolar 3. Fase Intermediária 4. Fase Polar

Essa metodologia de extração e separação ainda pôde ser melhorada reduzindo-se o volume de solvente utilizado nas etapas de extração e separação, além disso, na etapa de concentração, a temperatura foi reduzida para temperatura ambiente a fim de evitar possíveis formações de artefatos (Tabela 2):

	Metodologia Inicial	Metodologia otimizada
Extração	3 x 50 mL Com auxílio do Turrax	2 x 50 mL com auxílio do Turrax
Concentração	Rotaevaporador (35 - 40 °C)	Rotaevaporador a temperatura ambiente
Separação	7 volumes de 15 mL	3 volumes de 15 mL

Tabela 2 Otimização da metodologia de extração e separação

SISTEMA UTILIZADO	VOLUME	POLARIDADE
Hexano:AcOEt (90:10)	15 mL	Apolar
AcOEt 100%	15 mL	Intermediária
MeOH 100%	15 mL	Polar

Tabela 3 Mudança na ordem de sistemas de eluentes e quantidade de volume utilizados na CC

Depois de realizadas as mudanças no protocolo de preparo das amostras, pôde-se perceber uma redução significativa em termos de volume e tempo utilizados. Além disso, após reduzir a temperatura na etapa de concentração, não houve nenhuma mudança acerca do perfil dos novos espectros obtidos, tanto de extrato bruto, quanto de fase, caracterizando seus compostos como pouco termolábeis. Esta nova metodologia pode então ser considerada como mais rápida, mais confiável e com menor custo.

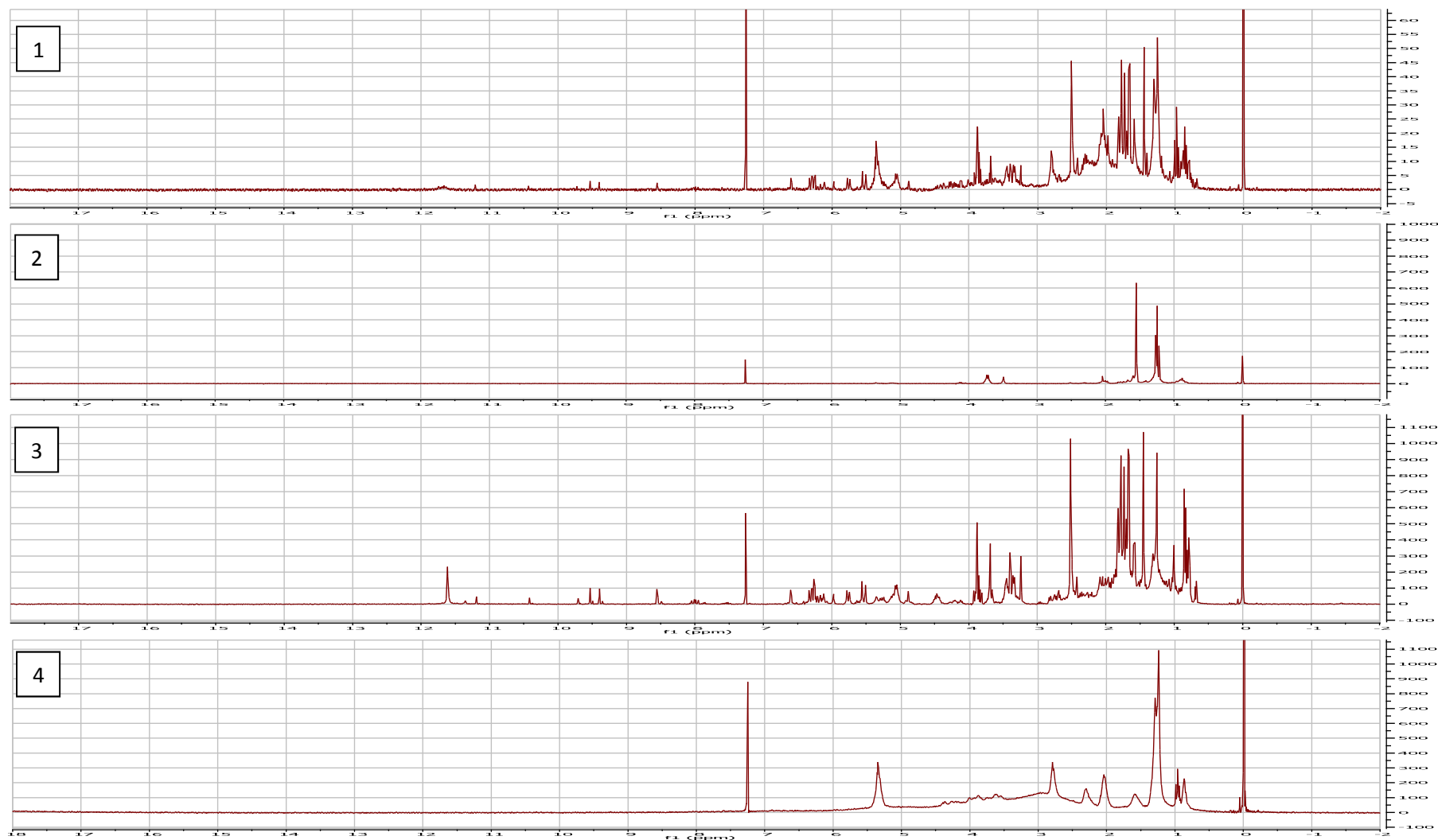


Figura 10 Espectros de RMN ^1H de Extrato Bruto, fases apolar, intermediária e polar de *P. obtusifolia* após otimização da extração e separação de compostos. Obs: as análises foram sempre realizadas no mesmo volume de solvente (700 μL de CDCl_3) e nas mesmas concentrações (EMB = 10 mg/mL, fase apolar = 1mg/mL, fase intermediária = 5mg/mL e fase polar = 10mg/mL). As amostras foram analisadas em triplicata. 1. Extrato Bruto 2. Fase Apolar 3. Fase Intermediária 4. Fase Polar

3.3 Considerações finais

Pode-se concluir então que a metodologia de extração empregada para amostras frescas de folhas adultas de *P.obtusifolia*, foi escolhida como a metodologia padrão, pois apesar de apresentar espectros com perfis semelhantes aos das outras amostras (seca em estufa e liofilizada), demandava menos tempo, pois possuía menos etapas envolvidas no processo.

Posteriormente, esse protocolo foi otimizado, havendo redução de tempo e custo significativas, assim como também foi adicionado uma metodologia de separação do extrato bruto resultante, em 3 fases (apolar, intermediária e polar) a qual também foi otimizada. Essas fases originaram espectros de RMN com melhores perfis, sendo mais fáceis de serem analisados. Consequentemente, esta metodologia foi adotada como modelo para análises metabolômicas posteriores.

4. Análise metabolômica das 4 variedades de *P.obtusifolia* (L.) A. Dietr.

Nos últimos anos, metabolômica ou “fingerprinting” metabólico têm sido aplicados em diversas áreas, e particularmente na ciência de plantas, provendo informações de grande importância (Frederich et al., 2009).

Entre as aplicações mencionadas, podemos relacioná-las as seguintes áreas: descoberta de biomarcadores clinicamente relevantes (Ceglarek et al., 2009; Koulman et al., 2009b), metabolismo de plantas e reprodução (Koulman et al., 2009a; Ryan and Robards, 2006), resistência de plantas contra pestes e doenças (Verpoorte et al., 2010) e *fingerprinting* direcionado ao controle de qualidade de espécies e órgãos de plantas (Choi et al., 2005; Kim et al., 2005)

A metabolômica pode ser definida como um estudo analítico de todos os tipos de moléculas presentes em um determinado sistema biológico (metaboloma) (Vuckovic, 2012), ou também pode ser definido como uma “foto” de um organismo, mostrando quais compostos estariam presentes e em quais quantidades em um determinado momento (Kim et al., 2011).

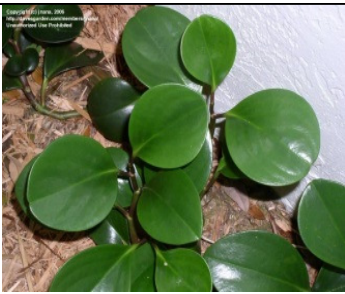
A análise de várias amostras, ou várias “fotos”, pode facilitar a identificação de padrões ou marcadores biológicos que são específicos de uma determinada espécie, cultivar ou de um determinado estágio de desenvolvimento da planta. Pode-se identificar também, padrões característicos de plantas doentes, estressadas ou ainda padrões metabólicos de plantas em determinadas estações do ano (Kim et al., 2011). Estes metabólitos identificados, são considerados os produtos finais da expressão gênica (Gromova and Roby, 2010) representando assim, o verdadeiro fenótipo molecular de uma célula, tecido, órgão ou organismo (Duportet et al., 2011; Tyagi et al., 2010)

Algumas plantas, apesar de pertencerem à mesma espécie, apresentam características morfológicas ou fenotípicas diferentes entre si (Kim et al., 2011) , *P. obtusifolia*, é uma espécie amplamente cultivada e várias variedades foram desenvolvidas com a finalidade comercial, incluindo: *P. obtusifolia*, *P. obtusifolia* variedade rubi, *P. obtusifolia* variedade limão e *P. obtusifolia* variedade variegata

Desta forma, decidiu-se então analisar e comparar os perfis metabolômicos destas 4 variedades, a fim de descobrir o fator ou fatores

responsáveis por essas mudanças morfológicas entre as variedades. Estas 4 variedades de *P. obtusifolia* podem ser encontradas nos jardins do LQPN-USP; são elas:

Quadro 3 Variedades existentes de *P. obtusifolia*

Variedade	Foto
<i>Peperomia obtusifolia</i>	 Fonte: www.davesgarden.com
<i>Peperomia obtusifolia</i> variedade “rubi”	 Fonte: www.gopixpic.com
<i>Peperomia obtusifolia</i> variedade “limão”	 Fonte: www.cloudjungle.com
<i>Peperomia obtusifolia</i> variedade “Variegata”	 Fonte: www.gopixpic.com

4.1 Materiais e Métodos:

A coleta das folhas aconteceu no mesmo horário, nos jardins do LQPN-USP, cujo preparo da amostra foi realizado a partir de 5 folhas adultas por variedade. Este procedimento foi feito de acordo com a metodologia padronizada, descrita na seção 3 (Fig.11), onde os rendimentos encontram-se no quadro 4:

Quadro 4 Rendimento das extrações referente a 5 folhas adultas de cada espécie

Variedade	Material Fresco	EMB	Foto
<i>Peperomia obtusifolia</i>	19,4 g	0,195 g	 Fonte: www.davesgarden.com
<i>Peperomia obtusifolia</i> variedade "Rubi"	24,7 g	0,280 g	 Fonte: www.gopixpic.com
<i>Peperomia obtusifolia</i> variedade "Limão"	13,75 g	0,171 g	 Fonte: www.cloudjungle.com
<i>Peperomia obtusifolia</i> variedade "Variegata"	22,5 g	0,232 g	 Fonte: www.gopixpic.com

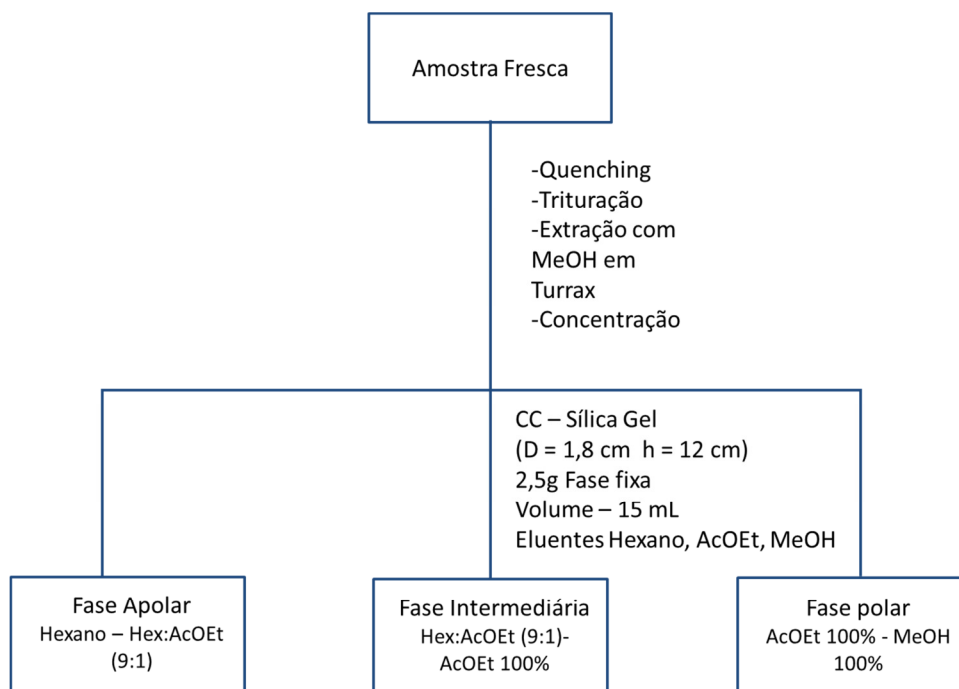


Figura 11 Metodologia empregada para a extração e separação dos extratos brutos

4.1.1 Análise por CLAE-DAD

Os extratos brutos foram dissolvidos em metanol a fim de se obter uma concentração de 1mg/mL, em seguida a solução foi filtrada em filtros PTFE de 0,45µm. Alíquotas de 20 µL foram analisadas por CLAE-DAD Shimadzu, com sistema de bombas binário (LC-10 AD) equipado com detector de arranjo de diodo (SPD-10 AVP), coluna Phenomenex Luna (C18, 5µm, 250 x 4.6 µm) e uma unidade de controle SCL-10.

A fase móvel utilizada consistiu de ACN:H₂O (1% ácido fórmico), aplicando-se o modo de eluição por gradiente (Tabela 4) em um fluxo de 1 mL/minuto. Três replicatas de cada grupo foram analisadas. Os dados foram coletados por meio do software Class-VP

Tempo (min)	Concentração ACN (%)
0-2	30
2-10	30-40
10-45	40-100
45-50	100
50-55	100-30
55-60	30

Tabela 4 Sistema utilizado para analisar os extratos brutos das 4 variedades de *P. obtusifolia* ACN: Água (0,1% ácido fórmico)

4.1.2 Análise por RMN

Para análise de RMN de ^1H , foi utilizado espectrômetro DRX 300 (Bruker) com frequência de 300 MHz, e os solventes deuterados da Merck foram : CDCl_3 e DMSO. As amostras analisadas seguiram um padrão, possuindo a mesma concentração (1mg/mL para a fase apolar, 5mg/mL para a fase intermediária, 10 mg/mL para a fase polar e 10mg/mL para o extrato bruto), o mesmo volume (700 μL) e mesmo número de scans (32). Três replicatas biológicas (extrato e fases) de cada grupo foram analisadas.

4.1.3 Análise de Componente Principal (PCA)

As análises de componentes principais foram realizadas sobre os dados de RMN obtidos, onde a faixa total escolhida para análise foi entre 0.1 e 12 ppm, com *binings* de 0.02 ppm. O software utilizado foi o “ The Unscrambler” versão 9.7 . Os picos referentes ao TMS e CDCl_3 foram descartados. Os dados não foram normalizados pela área.

4.2 Resultados e discussão

A fim de analisar diferenças não só na forma dos perfis gerados por RMN de ^1H , como também na concentração destes, os dados não foram normalizados pela área, pois uma vez normalizados desta maneira, todos os picos ficam com a mesma área, não permitindo mais este tipo de avaliação, pois a área dos picos está diretamente relacionada à concentração.

Analisando os cromatogramas e os espectros dos extratos brutos de *P. obtusifolia* e suas variedades, não foram observadas diferenças significativas entre os perfis das amostras, porém, pôde-se perceber certa diferença entre as variedades, ao verificar os dados de RMN analisados por PCA. Segundo o gráfico de *scores* e *loadings* (Fig.14-15), pôde-se verificar que a *P. obtusifolia* estava fortemente influenciada por picos típicos de hidrogênio metilênico de anel, em 2.5 e 2.48 ppm, e também por picos típicos de hidrogênio de metila prenilada, com deslocamentos químicos em 1.64, 1.66, 1.72, 1.76 e 1.78 ppm, o que certamente diferenciou o grupo *Peperomia obtusifolia* de suas variedades. Adicionalmente também foi observado em 1.24 ppm (picos característicos de Hidrogênios metilênicos de ácidos graxos de cadeia longa), influenciando a variedade “Variegata”.

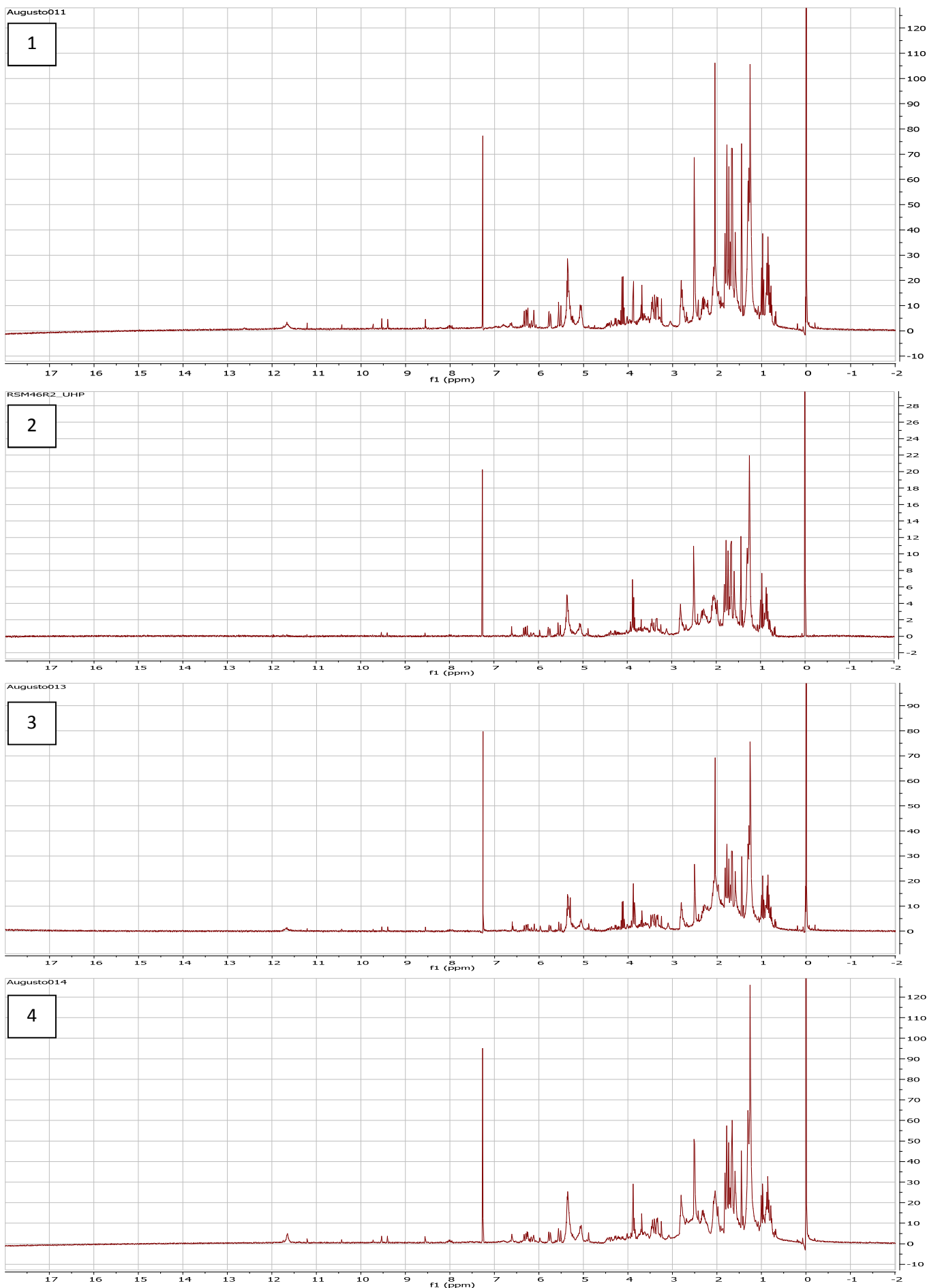


Figura 12 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto das variedades de *Peperomia obtusifolia*, (CDCl_3 , 300 MHz). 1. Variedade Rubi 2. Variedade Limão 3. Variedade Variegata 4. *P. obtusifolia*.

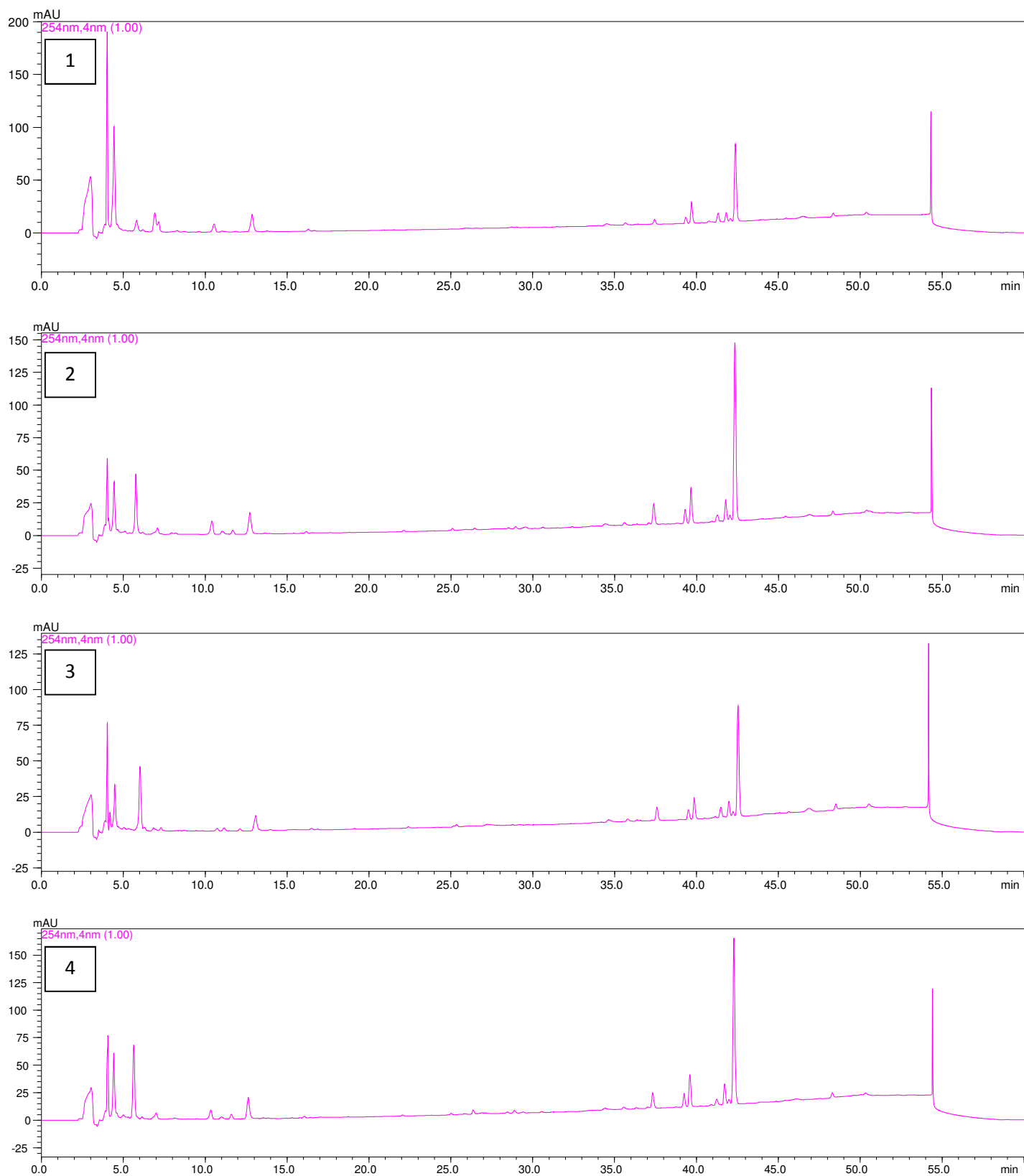


Figura 13 Cromatogramas referentes aos extratos brutos das folhas de *Peperomia obtusifolia* e suas variedades. $\lambda=254$ nm 1. Variedade Rubi 2. Variedade Limão 3. Variedade Variegata 4. *P. Obtusifolia*

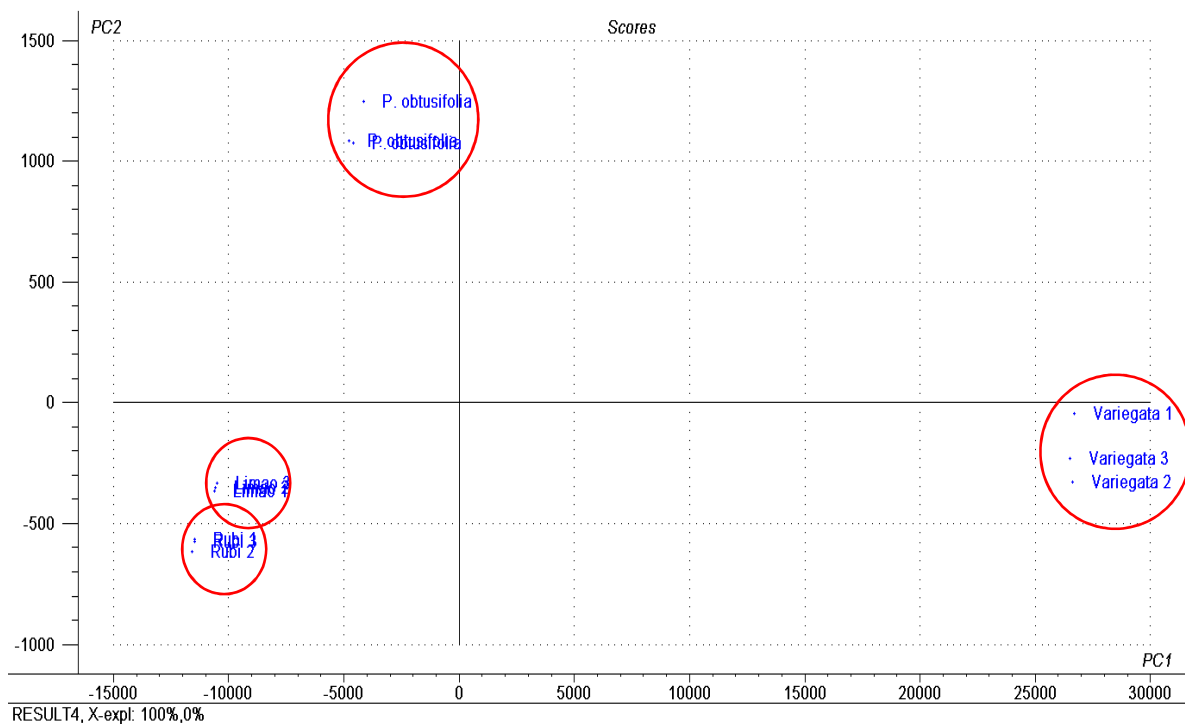


Figura 14 PCA dos extratos brutos de *Peperomia obtusifolia* e suas variedades (limão, rubi e variegata) analisados por RMN

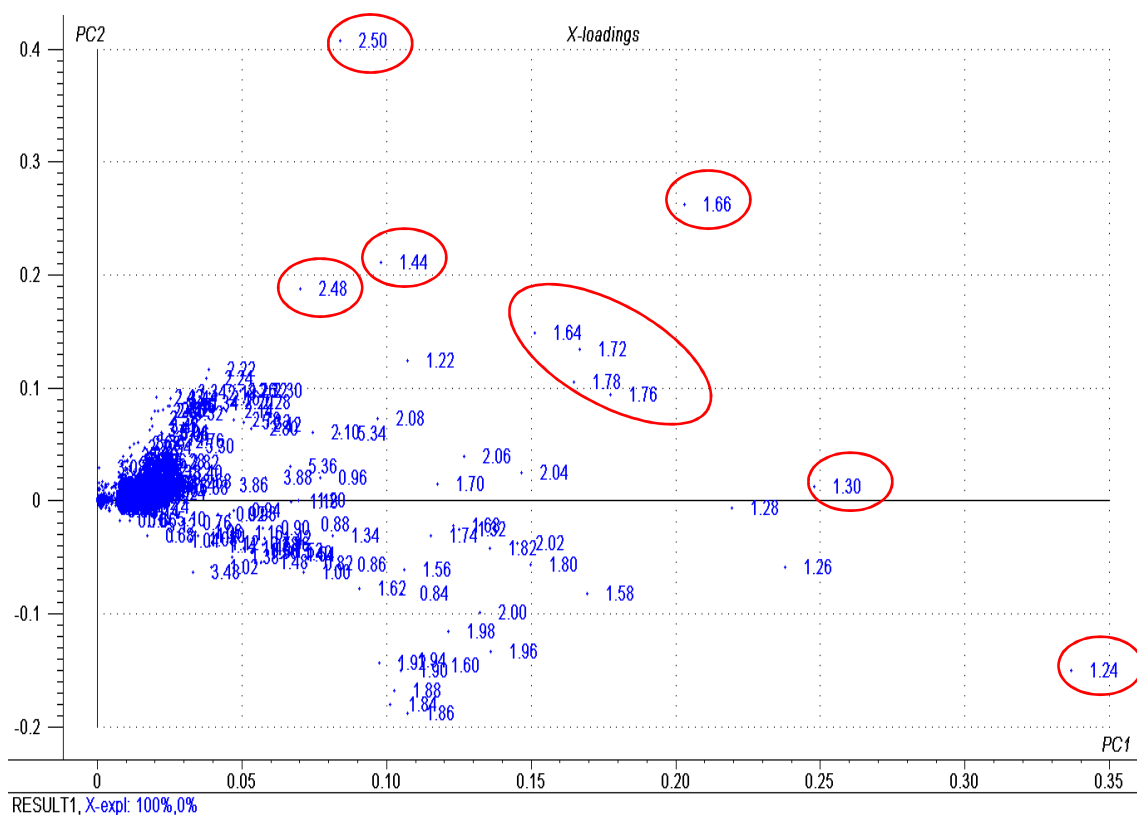


Figura 15 Gráfico de loadings dos extratos brutos de *Peperomia obtusifolia* e suas variedades (limão, rubi e variegata) analisados por RMN

Ao comparar os deslocamentos químicos das substâncias já isoladas da espécie (Tanaka et al., 1998) com os picos do gráfico de loadings que influenciavam a espécie *Peperomia obtusifolia*, pôde-se perceber que se tratava de picos característicos de cromenos, como a Peperobtusina A e Peperobtusina B (Fig. 16)

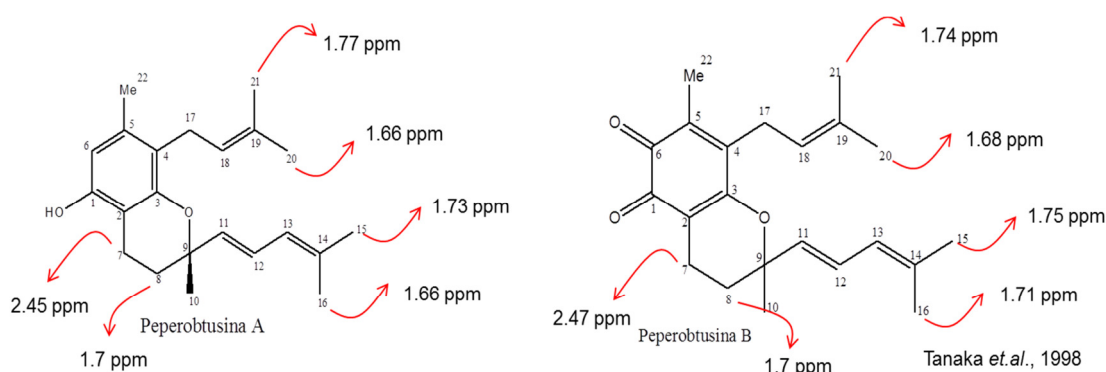


Figura 16 Deslocamentos químicos típicos dos cromenos

4.3 Considerações Finais

Diante disso, pode-se concluir, que apesar das 4 variedades serem da mesma espécie, elas possuem sim, metabolomas ou fenótipos diferentes, uma vez que o metaboloma representa o fenótipo de cada indivíduo. Essa diferença entre os grupos foi caracterizada pela maior influência de picos típicos de cromenos sobre o grupo *P. obtusifolia* e pela influência de picos de ácidos graxos de cadeia longa sobre a variedade “Variegata”

Pode-se concluir também que a espectroscopia de RMN de ^1H aliada a análise multivariada de dados, demonstra ser uma ferramenta bastante útil na análise de *fingerprinting* metabólico de *P. obtusifolia* e suas variedades, gerando um rápido *screening* dos perfis metabolômicos, e possibilitando a identificação metabólitos responsáveis pela separação entre as variedades.

5. Análise metabolômica de *P. obtusifolia* frente a estresse biótico provocado por *Monoplatys* sp: comunicação inter-plantas e reconfiguração metabólica.

Plantas terrestres servem como fonte de alimento para uma estimativa de 1 milhão de espécies de insetos herbívoros, dos quais, aproximadamente, dois terços são besouros (Coleoptera) ou lagartas (Lepidoptera) que geralmente causam danos por meio de suas mandíbulas, desenvolvidas para mastigar, cortar ou rasgar (Shoonhoven et al., 1998)

No seu habitat natural, as plantas passam por diversos tipos de estresse biótico todos os dias (Walling, 2000) representando uma batalha entre plantas e insetos, quem tem ocorrido ao longo de milhões de anos (Wu and Baldwin, 2009)

Como consumidores primários, os insetos lançam mão de várias estratégias para conseguirem obter alimentos de suas plantas hospedeiras (Howe and Jander, 2008). Por outro lado, as plantas, como organismos sésseis, possuem mecanismos de defesa contra ataques de herbívoros, os quais evoluíram nesses milhões de anos (Wu and Baldwin, 2009)

Essas defesas podem ser representadas por uma variedade de compostos produzidos pela planta que funcionam como defesa direta ou indireta (Bennett and Wallsgrove, 1994)

Glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, alcaloides, terpenoides, compostos fenólicos, inibidores de proteínas (IP's) etc., são exemplos de compostos utilizados em defesa direta, pois possuem efeitos tóxicos, repelentes e anti-digestivos contra possíveis predadores como herbívoros ou patógenos (Bennett and Wallsgrove, 1994; Pechan et al., 2000). Outras classes de metabólitos secundários derivados de plantas com propriedades de defesa bem conhecidas, também podem ser incluídos, como por exemplo: taninos, saponinas, cardenolídeos e furanocumarinas (Aharoni et al., 2005; Frey et al., 1997). Evidências indicam que a diversidade metabólica de toxinas produzidas por plantas, ampliam o espectro de defesa contra múltiplos herbívoros que por

sua vez, possuem diferentes estratégias para se alimentar e diferentes mecanismos de resistência (Aharoni et al., 2005; Mewis et al., 2005)

Logo, há uma boa razão para se acreditar que os metabólitos secundários, resultam de uma coevolução entre herbívoros e plantas, onde aqueles tentam comer e estes tentam não ser comidos (Becerra, 2007). Barreiras físicas como cutículas, tricomas e espinhos, também podem ser classificadas como mecanismos de defesa direta (Kessler and Baldwin, 2002).

Como estes compostos de defesa são potencialmente tóxicos (até mesmo para as plantas que os produzem), o armazenamento de precursores inativos ou atóxicos que são ativados após ataque de herbívoros, é um tema bastante estudado em biologia de plantas. Por exemplo, 2,4-diidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIBOA), uma toxina encontrada no milho, é armazenada na sua forma inativa (DIBOA-glicosídeo) (Howe and Jander, 2008). Glicosinolatos, geralmente são enzimaticamente ativados através de fragmentação provocada pela enzima mirosinase, para assim produzir produtos tóxicos originados desta fragmentação. Além disso, cianeto de hidrogênio, o inibidor respiratório é liberado a partir de glicosídeos cianogênicos durante ataque de herbívoros (Hummelbrunner and Isman, 2001; Mewis et al., 2005).

Após sofrer uma injúria mecânica ou um ataque de herbívoro, as plantas podem acionar um sistema de defesa indireta, liberando um complexo *bouquet* de compostos orgânicos voláteis (COV's) ou produzindo néctar extrafloral, a fim de atrair parasitoides e predadores, os inimigos naturais destes herbívoros (Dicke, 1999; Engelberth et al., 2004; Heil, 2008; Kessler and Baldwin, 2002; Pare and Tumlinson, 1999).

Além de atrair os predadores naturais destes herbívoros, essa mistura de voláteis também pode funcionar como defesa direta, repelindo os ovos depositados pelos insetos por exemplo (De Moraes et al., 2001; Kessler and Baldwin, 2001). Outra função, estaria atrelada à interação planta-planta, mais precisamente relacionada à defesa, um tipo de comunicação exercida por meio de voláteis emitidos de uma planta predada para suas vizinhas (Farmer, 2001; Kessler and Baldwin, 2002). Estudos em laboratórios com vários tipos de espécies diferentes de planta, evidenciaram que COV's liberados por plantas predadas, podem induzir suas vizinhas intactas, a se prepararem para o pior, o que foi comprovado por mudanças na transcrição de genes relacionados à

defesa (Quadro 5) (Arimura et al., 2000; Arimura et al., 2002; Gomi et al., 2003; Kost and Heil, 2006; Paschold et al., 2006), ou seja, plantas que podem perceber estes voláteis emitidos pelos vizinhos e ativar um mecanismo de defesa adequado, obtêm uma certa vantagem em relação às plantas que são incapazes de interpretar este tipo de “informação” (Kost and Heil, 2006).

Estes COV's consistem basicamente de produtos da rota do ácido chiquímico/triptofano (indólicos e salicilato de metila), rota dos isoprenóides (terpenóides cíclicos e acíclicos), derivados de lipídios resultantes da rota da lipoxigenase/hidroperóxido liase (voláteis de 6 carbonos ou voláteis C₆) e por último, oximas e nitrilas (derivados de aminoácidos) (Dicke, 1999; Dicke et al., 1999; Engelberth et al., 2004; Pare and Tumlinson, 1999)

Estudos indicam que após sofrerem injúria mecânica ou ataque por herbívoros, as plantas liberam voláteis em duas fases (McCall et al., 1994; Walling, 2000): na primeira fase, os voláteis são liberados imediatamente (na primeira hora) após injúria, já na segunda fase, outros voláteis recém sintetizados são liberados de 5 a 6 horas após a injúria (Pare and Tumlinson, 1998; Walling, 2000)

Em outras palavras, dentro de um ecossistema natural, o sinergismo dos mecanismos de defesa direta e indireta, provêm uma maior resistência contra um amplo espectro de herbívoros (Gatehouse, 2002; Kessler et al., 2004)

Já em relação ao momento em que estes mecanismos de defesa são ativados (maneira como eles são regulados), eles podem ser classificados em duas categorias: defesa constitutiva (ou estática) e defesa induzida (ou ativa) (Gatehouse, 2002). A Defesa constitutiva é constituída por barreiras físicas (como calose, parede celular, espinho) e metabólitos de defesa, os quais são armazenados nos tecidos das plantas, independente do nível de ameaça que a planta esteja sofrendo (Bostock, 2005; Paiva, 2000). Por exemplo, tecidos de órgãos reprodutores tipicamente acumulam grandes quantidades de metabólitos e proteínas de defesa (Bostock, 2005). Por outro lado, plantas podem ativar uma resposta induzida no local onde o tecido foi danificado ou amplificar esta resposta sistemicamente, preparando assim,

Quadro 5 Genes ativados após estresse provocado, seja por injúria mecânica ou ataque por herbívoros. As espécies são mencionadas porque genes similares em outras plantas possuem nomes diferentes, embora o produto gerado pela ativação desses genes tenha

Genes	Função desempenhada pelos produtos dos genes	Referência
LOX (Tomate) LOX1, LOX2 (<i>Arabidopsis</i>)	LOX codifica a 13-lipoxigenase, que sintetiza o ácido 13-hidroperóxido-octadecatrienóico a partir do ácido linolênico (um ácido graxo do tipo 18:3)	(Walling, 2000)
PAL (Tomate) PAL (<i>Arabidopsis</i>)	PAL (Fenilalanina amônia liase) é importante para a biossíntese do ácido salicílico, flavonóides, fitoalexinas, ligninas e outros fenólicos que compõem as paredes celulares	(Walling, 2000)
Pin2, pin1 (Tomate) Pin (<i>Arabidopsis</i>)	Genes Pin codificam inibidores de serina proteases. Pins interferem no crescimento e desenvolvimento de insetos por meio de uma hiperindução de proteases no intestino do inseto	(Walling, 2000)
Sys (Tomate)	Sys codifica a prosistemina, proteína que é proteoliticamente transformada na sua forma ativa, a sistemina. Sistemina é encontrada apenas em plantas da família Solanaceae e é um potente ativador da rota dos octadecanóides	(Walling, 2000)
AOS (<i>Arabidopsis</i>)	AOS codifica a enzima aleno oxido sintase, a qual converte o ácido linolênico (18:3) para a forma 13-hidroperóxido. Esta enzima está envolvida na rota dos octadecanóides, tendo um papel importante na resposta à danos mecânicos.	(Walling, 2000)
PR-2 (Tabaco)	PR-2 codifica a proteína β -1,3-glucanase, proteína relacionada à patogênese, possui atividade antifúngica, pois o β -1,3-glucano é um componente importante presente na parede celular de muitos fungos patogênicos.	(Ebrahim et al., 2011)
PR-3 (Tabaco)	PR-3 codifica as quitinasases I, II, IV, V, VI, VII, , proteína relacionada à patogênese, possui atividade antifúngica, pois a quitina é um componente importante presente na parede celular de muitos fungos patogênicos.	(Ebrahim et al., 2011)
CHS (<i>Arabidopsis</i>)	CHS codifica a enzima chalcona sintase, importante na síntese de flavonóides	(Walling, 2000)
GPX (<i>Arabidopsis</i>)	GPX codifica a glutathione peroxidase, importante no combate a radicais livres.	(Walling, 2000)
PDF1.2 (<i>Arabidopsis</i>)	PDF1.2 codifica a proteína defensina, que possui atividade antimicrobiana.	(Walling, 2000)
WR3 (<i>Arabidopsis</i>)	WR3 (Wound Response 3) codifica um RNA que acumula em resposta a injúria mecânica, função incerta.	(Walling, 2000)
Thi2.1 (<i>Arabidopsis</i>)	Thi2.1 codifica a tionina, um pequeno polipeptídeo com atividade antifúngica	(Walling, 2000)

tecidos mais distantes e ainda intactos, para um futuro ataque (Bostock, 2005; Heil and Ton, 2008; Karban and Baldwin, 1997; Kessler and Baldwin, 2002). Muitas destas respostas induzidas ocorrem em apenas algumas horas (Bostock, 2005; Karban and Baldwin, 1997)

Ambas as defesas podem custar caro para as plantas, uma vez que elas desviam reservas de carbono e nitrogênio, antes direcionadas ao crescimento e reprodução, para suprir seus mecanismos de proteção, logo, estes mecanismos de defesa devem ser finamente regulados a fim de não comprometerem a vitalidade, longevidade ou reprodução da planta (Tian et al., 2003; Walling, 2000; Wu and Baldwin, 2009; Zavala et al., 2004). A partir disso, presume-se que plantas utilizam um sistema regulatório sofisticado em seu metabolismo, identificando e priorizando cada tipo de sinalização ou rota metabólica, a fim de manter o equilíbrio entre crescimento e defesa (Karbon and Baldwin, 1997; Wu and Baldwin, 2009)

Pouco se sabe ainda sobre os eventos de reconhecimento molecular que ativam a imunidade da planta. Embora a injúria mecânica e o ataque de herbívoros, levem ambos a danos ou perdas teciduais, plantas respondem de maneira diferente a esses dois tipos de estresse (Alborn et al., 1997; Arimura et al., 2000; Baldwin, 1990; Halitschke et al., 2001; Reymond et al., 2004; Wu and Baldwin, 2009; Wu et al., 2007). De alguma maneira elas conseguem distinguir um ataque por herbívoro de uma simples injúria mecânica, e diante disso, elas ativam respostas específicas para cada situação, evitando assim, o desperdício de metabólitos ou reservas direcionadas a defesa (Felton and Tumlinson, 2008; Jones and Dangl, 2006; Mithofer and Boland, 2008; Wu and Baldwin, 2009)

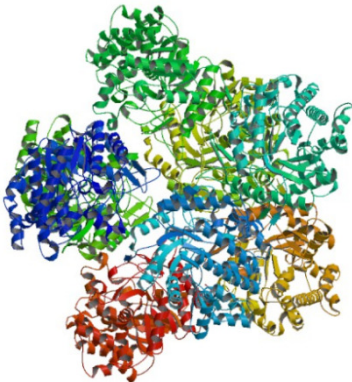
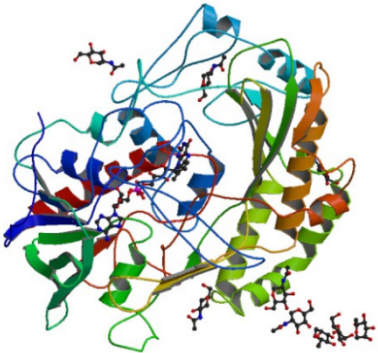
Evidências indicadas por estudos de diversos tipos de combinações inseto-planta, demonstraram que o ataque por herbívoro, ou simplesmente a adição de secreções orais de herbívoros aos tecidos de plantas danificados, promovem uma resposta diferente ou maior que uma resposta provocada apenas por injúria mecânica (Arimura et al., 2004a; Arimura et al., 2004b; De Moraes et al., 2001; Schmelz et al., 2006; Turlings et al., 1990)

Existem duas teorias que podem explicar como as plantas diferenciam uma simples injúria mecânica de um ataque provocado por inseto. A primeira teoria diz que as plantas são capazes de perceber moléculas exógenas, conhecidas como promotores químicos (Quadro 6), que compreendem compostos de plantas modificados pelo inseto ou moléculas encontradas em secreções orais de insetos e fluidos de ovos depositados (Jones and Dangl, 2006; Mithofer et al., 2005). A segunda teoria diz que as plantas também podem reconhecer padrões específicos de danos teciduais, como a quantidade de tecido removido e a frequência com que é removido, e isto pode diferenciar um ataque por herbívoro de um simples dano tecidual (Jones and Dangl, 2006; Mithofer et al., 2005; Wu and Baldwin, 2009)

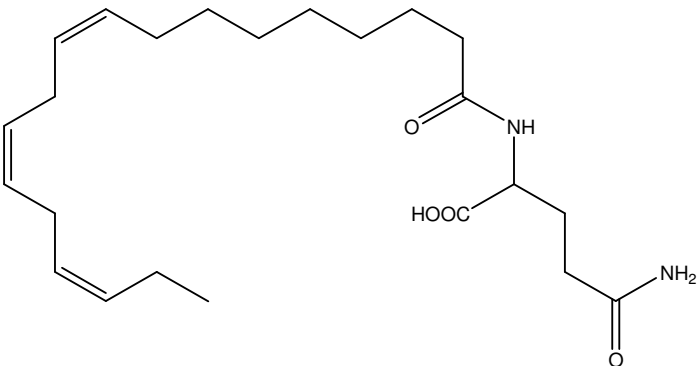
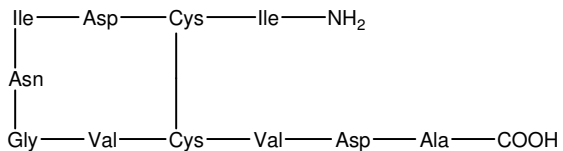
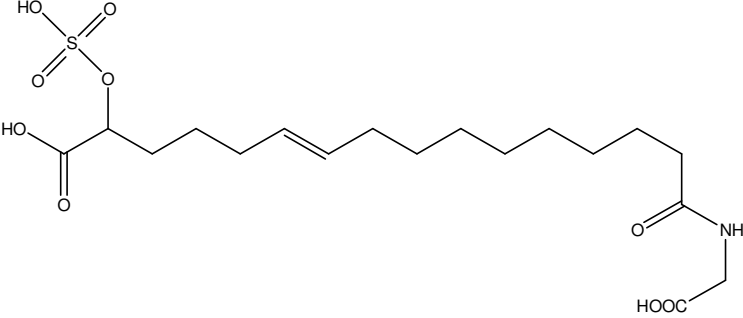
Os detalhes sobre os mecanismos de transdução de sinais envolvidos na resposta do sistema imune da planta merecem certamente um estudo mais profundo, entretanto, sabe-se até agora que este sistema altamente sensível é acionado no sítio onde ocorreu o dano, por meio de sinais hidráulicos e elétricos (Rhodes et al., 1999) que rapidamente induzem a uma série de eventos como despolarização de membrana celular, fluxo de íons, modulação de fitormônios, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico e ativação de cascatas de sinais que envolvem quinases e fosfatases (Bolwell and Wojtaszek, 1997; Maffei et al., 2004; Maffei et al., 2006; Orozco-Cardenas et al., 2001; Orozco-Cardenas and Ryan, 2002; Wu et al., 2007).

Essa cascata de sinais resultam no acúmulo de RNAs e proteínas relacionados à defesa, seja local ou sistemicamente, os quais possuem diversos papéis, como por exemplo: fortificar e modificar paredes celulares, modificar proteínas, aumentar a síntese de metabólitos secundários (Kombrink and Somssich, 1997; Reymond and Farmer, 1998) ou produção de segundo mensageiro como os jasmonatos, fitormônios da rota dos octadecanóides, que possuem um papel dominante na resposta imunológica das plantas frente a estresses provocados de diversas maneiras (Fig.17) (Chini et al., 2007; Staswick, 2008; Thines et al., 2007)

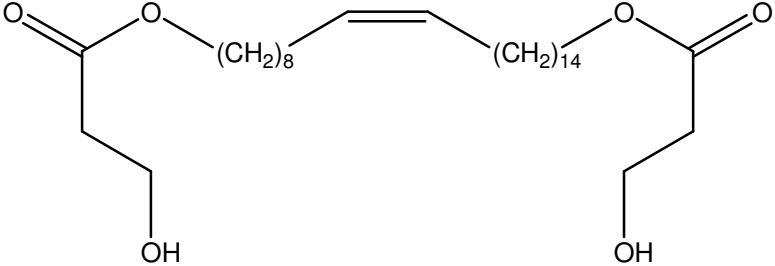
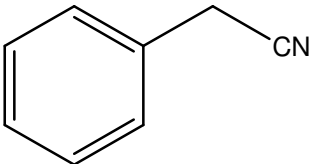
Quadro 6 Exemplos de agentes promotores ou “*Elicitors*” encontrados em secreções orais de insetos ou fluidos de ovos depositados por insetos. As plantas são mencionadas na tabela, pois nem todas as espécies respondem aos agentes promotores da mesma maneira. *Imagem retirada do site <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Protein Data Bank)

Substância	Origem	Tipo	Ação	Referência
 β-glicosidase *	Secreção oral de <i>Pieris bassicae</i>	Enzima	Induz a liberação de compostos voláteis das folhas de repolho	(Kessler and Baldwin, 2002)
 Glicose oxidase *	Secreção oral de <i>Helicoverpa zea</i>	Enzima	Estimula a produção de H ₂ O ₂ no local de ataque, formando ROS e assim potencializando a defesa da planta	(Kessler and Baldwin, 2002)

Continuação quadro 6

 N-17-Hidroxinolenoil-L-glutamina (Volicitina)	Secreção oral de Lepidoptera	Ác. Graxo conjugado com aminoácido (FAC)	Induz a liberação de compostos voláteis das folhas de milho Provoca alteração no proteoma, induz mudanças na expressão gênica, estimula a produção de nicotina e inibidores de proteínase em <i>Nicotiana attenuata</i>	(Kessler and Baldwin, 2002; Wu and Baldwin, 2009) (Howe and Jander, 2008)
 Inceptina	Secreção oral de Lepidoptera	Peptídeo	Estimula a liberação de etileno em feijão e caupi Induz a produção de etileno, Ác. jasmônico e Ác. salicílico em caupi	(Howe and Jander, 2008) (Wu and Baldwin, 2009)
 Caeliferina B (16:1)	Secreção oral de <i>Shistocerca americana</i>	Ác. Graxo sulfatado conjugado com aminoácido	Induz a liberação de compostos voláteis em milho	(Howe and Jander, 2008; Wu and Baldwin, 2009)

Continuação quadro 6

 Bruquina	Fluidos de ovos de <i>Bruchus pisorum</i> L.	Diol de cadeia longa esterificado	Induz a formação de pequenas calosidades debaixo dos ovos em espécies de ervilha	(Howe and Jander, 2008; Wu and Baldwin, 2009)
 Cianeto de benzila	Fluidos de ovos de <i>Pieris brassicae</i>	Derivados aromáticos	Impede a oviposição de ovos em couve	(Wu and Baldwin, 2009)

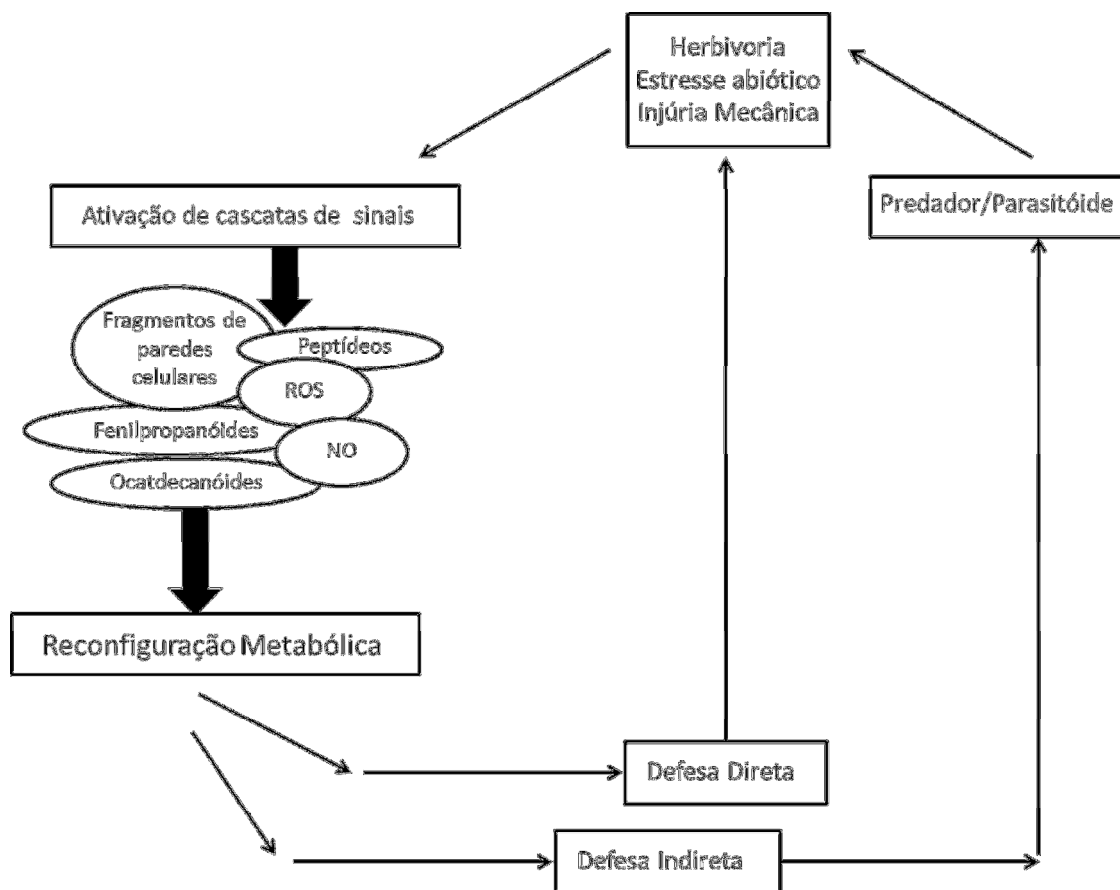


Figura 17 Mecanismo geral de defesa das plantas frente à diversos tipos de estresse provocados

Estudos relacionados indicam que metabólitos de defesa são produzidos (voláteis ou não) após injúria ou ataque por herbívoro dentro de algumas horas (Arimura et al., 2000; Bostock, 2005; Karban and Baldwin, 1997; Mattiacci et al., 1995). Neste atual estudo, realizou-se uma abordagem diferente, a qual foram analisadas respostas à longo prazo, identificando o que foi produzido após dias ou semanas (ao invés de horas) pós-estresse, e os resultados obtidos foram bem diferentes em relação aos estudos de curto prazo. Para este tipo de experimento, foi escolhida a espécie *Peperomia obtusifolia*.

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Material Botânico e Método de Cultivo

Trinta plantas adultas e saudáveis da espécie *Peperomia obtusifolia*, foram transferidas dos jardins do Instituto de Química da

Universidade de São Paulo para vasos de plástico (uma planta por vaso), contendo terra adubada .

Todas as plantas (adultas e intactas) do referido estudo foram retiradas dos jardins do LQPN-USP e plantadas individualmente em vasos de plástico (volume de 500 mL), as quais foram cultivadas em uma estufa (CLIMACELL, do grupo MMM) com diversos parâmetros controlados, como : potência da luz irradiada (100%), fotoperíodo (12 horas), temperatura (21 °C no ciclo escuro/30 °C no ciclo claro) e umidade relativa (50%). Elas foram divididas em três grupos de dez, os quais foram intitulados: “predado” , “controle interno” e “controle externo” , onde cada grupo foi submetido a um tipo de situação diferente. O primeiro grupo, ou grupo “predado”, ficou confinado em uma caixa de plástico transparente com entrada de ar, ao qual foram adicionados 25 besouros da espécie *Monoplatus* sp (Fig.18). O segundo grupo, chamado “controle interno”, foi colocado no mesmo ambiente do grupo “predado”, porém como o grupo predado encontrava-se dentro de uma caixa de plástico, os besouros ficaram impossibilitados de atacar as plantas do controle interno (Fig.19), já o terceiro grupo (“controle externo”) também foi cultivado em estufa, porém, isolado dos outros dois grupos. As amostras de folhas de cada grupo foi analisado por RMN de ^1H , CLAE, espectrometria de massas e CG em intervalos de 10 dias, terminando o experimento no 30º dia.

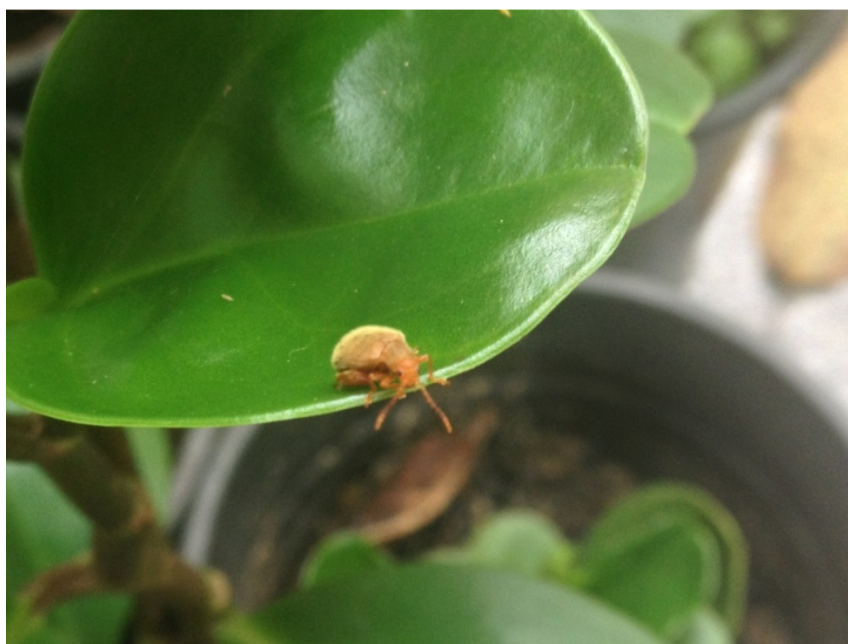


Figura 18 Foto do besouro *Monoplatus* sp.



Figura 19 Plantas em contato inicial com os besouros (lado esquerdo). Grupo predado e controle interno dentro da estufa, devidamente separados.

5.1.2 Metodologia de Extração

Cinco folhas adultas de cada grupo foram colhidas (coleta sempre na mesma hora) e imediatamente congeladas sob nitrogênio líquido, posteriormente foram trituradas com ajuda de gral e pistilo a fim de realizar a extração com 50 mL de Metanol (2 x) à temperatura ambiente (Fig.20). A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador a 20 °C e a água residual foi evaporada sob vácuo (CentriVap – Labconco).

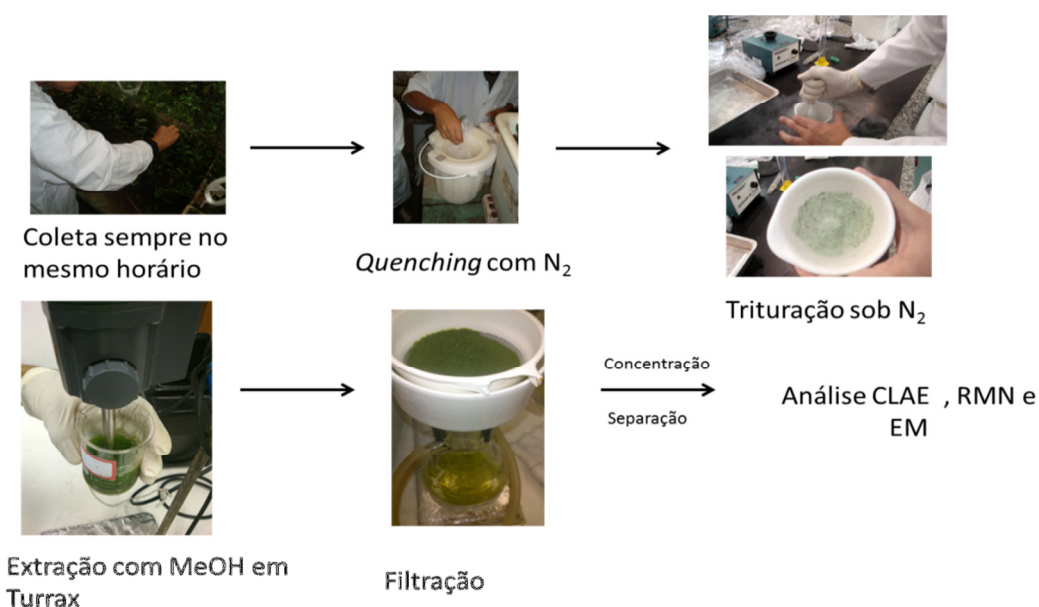


Figura 20 Metodologia de extração empregada para a análise dos grupos “predado” , “Controle Interno” e “Controle Externo”

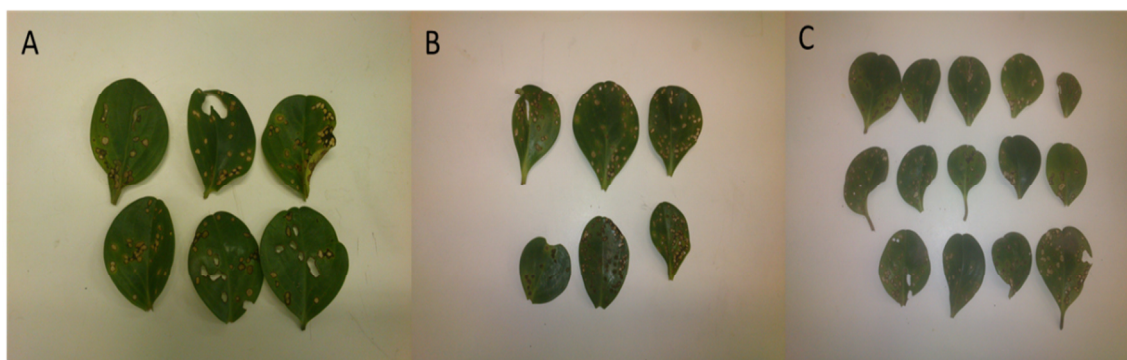


Figura 21 Folhas de *P.obtusifolia* predadas após 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C)

5.1.3 Análise por CLAE-DAD

Os extratos brutos foram dissolvidos em metanol a fim de se obter uma concentração de 1mg/mL, em seguida a solução foi filtrada em filtros PTFE de 0,45µm. Alíquotas de 20 µL foram analisadas por CLAE-DAD Shimadzu, com sistema de bombas binário (LC-10 AD) equipado com detector de arranjo de diodo (SPD-10 AVP), coluna Phenomenex Luna (C18, 5µm, 250 x 4.6 µm) e uma unidade de controle SCL-10.

A fase móvel utilizada consistiu de ACN:H₂O (0,1% ácido fórmico), aplicando-se o modo de eluição por gradiente (Tabela 5) em um fluxo de 1 mL/minuto. Três replicatas de cada grupo foram analisadas em todos os períodos (10, 20 e 30 dias); os dados foram coletados por meio do software Class-VP

Tempo (min)	Concentração ACN (%)
0-2	20
2-10	20-40
10-45	40-100
45-50	100
50-55	100-20
55-60	20

Tabela 5 Método utilizado para analisar os perfis dos extratos provenientes dos 3 grupos estudados em todos os períodos (10, 20 e 30 dias)

5.1.4 Análise por CLAE-EM

As amostras dos extratos brutos foram preparadas do mesmo modo que as amostras citadas anteriormente, que em seguida foram

analisadas por CLAE-EM (Apêndices A-B). O cromatógrafo utilizado era da marca Shimadzu com duas bombas analíticas modelo LC-20 AD, equipado com coluna Phenomenex Luna (C18, 5µm, 250 x 4.6 µm), detector UV/Vis SPD-20A e uma unidade de controle CBM-20A. A fase móvel utilizada consistiu de ACN:H₂O (0,1% ácido fórmico) no modo de eluição por gradiente (Tabela 6) em um fluxo de 1 mL/minuto. Os comprimentos de onda escolhidos para análise foram: 254nm e 280 nm. Esse sistema estava acoplado a um espectrômetro de massas Bruker, o qual utilizava ionização por electrospray a 4kv (modo positivo e negativo) e analisador do tipo microTOF-QII. O fluxo utilizado para o massas foi de 200 µL/min, com gás N₂ nebulizado a 2 Bar e gás N₂ de secagem a 8 L/min. A temperatura de secagem utilizada foi de 200 °C, a energia do quadrupolo foi de 5 eV e a energia de colisão foi de 10 eV. A radiofrequência de colisão foi de 200 Vpp e o alcande de massas foi de 100 a 1000 Daltons. A calibração foi realizada utilizando formiato de sódio.

5.1.5 Análise por HS-CG-EM

As folha frescas (~1g) foram seladas em vials de vidro, os quais foram mantidos a -20°C até serem analisados por HS-CG-EM. A cromatografia gasosa de *headspace* foi realizada utilizando-se um auto-injetor Shimadzu, com coluna capilar Rxi-5ms de 10m x 0.1mm x 0.1µm, acoplado a uma espectrômetro de massas operando no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

A temperatura do forno aumentou de 40°C para 90°C a 36°C/min. A temperatura do injetor e do detector estava a 250°C. A temperatura da agulha foi mantida a 60°C e o volume de injeção foi de 2000 µL. Hélio gasoso foi utilizado como gás carreador em um fluxo de 1 mL.min⁻¹ com a pressão do inlet a 30 psi no modo Split (1:30).

A quantidade de cada volátil detectado foi calculada baseada na área do pico e expressa como porcentagem relativa em relação a área total de todos os picos do cromatograma. As porcentagens das áreas foram obtidas do espectro do CG sem a utilização de padrão interno ou fatores de correção. A identificação dos compostos voláteis foi baseada nos índices de retenção de

Kovat (IK), referenciados a uma série de homólogos de n-alcenos (C8-C40) e calculados de acordo com a equação de Van den Dool & Kratz (Vandendool and Kratz, 1963). Comparação dos espectros de massa publicados (Adams, 2007) com os espectros da biblioteca do GC/MS (NIST 98 e WILEY) também foram utilizados para identificar compostos. Co-injeção com padrões autênticos de α -pineno, β -pineno, mirceno, α -terpineno e limoneno também foram utilizados na identificação de voláteis (todos os padrões produzidos pela Sigma-Aldrich Brasil). Três replicatas biológicas de cada grupo foram analisadas em todos os períodos mencionados (10, 20 e 30 dias)

5.1.6 Análise por RMN

Os extratos brutos, assim como as fases, obtidas por metodologia padronizada descrita na seção 4, foram analisados por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H . O espectrômetro DRX 300 (Bruker) possuía frequência de 300 MHz, e foram utilizados CDCl_3 e DMSO da Merck como solventes deuterados.

As amostras analisadas seguiram um padrão, possuindo a mesma concentração (1mg/mL para a fase apolar, 5mg/mL para a fase intermediária, 10 mg/mL para a fase polar e 10mg/mL para o extrato bruto), o mesmo volume (700 μL) e mesmo número de scans (32). Três replicatas biológicas (extrato e fases) de cada grupo foram analisadas em todos os períodos mencionados (10, 20 e 30 dias).

5.1.7 Análise de Componente Principal (PCA)

As análises de componentes principais foram realizadas sobre os dados de RMN obtidos, onde a faixa total escolhida para análise foi entre 0.1 e 12 ppm, com *binings* de 0.02 ppm. O software utilizado foi o “The Unscrambler” versão 9.7 e o “R” versão 3.1.1.

No *software* “The Unscrambler”, os dados foram obtidos com normalização pela área e sem normalização pela área. Já com o *software* “R” os dados foram obtidos sem normalização pela área (Apêndice C). Em nenhum momento foi realizado escalonamento dos dados obtidos por RMN.

5.2 Resultados e discussão

Para ter certeza de que o estresse provocado à planta estaria diretamente relacionado à predação provocada pelo besouro *Monoplatys* sp, decidiu-se controlar variáveis como: intensidade da luz irradiada, tempo de exposição à luz, umidade relativa, temperatura do ambiente e irrigação, as quais, se não controladas, possivelmente poderiam influenciar na mudança do perfil metabólico da espécie. Além de padronizar o cultivo, o método de coleta das folhas, extração, fracionamento do extrato bruto e análise, obedeceram ao protocolo estabelecido na seção 3, possibilitando assim, a obtenção de resultados fidedignos.

Analisando-se os perfis cromatográficos dos extratos brutos provenientes dos três grupos mencionados anteriormente (Fig. 22-24), foi detectado um aumento na concentração dos picos (X Y) nos grupos “predado” e “controle interno” em relação ao “controle externo” (no qual os picos mantiveram-se estáveis nos períodos analisados), mais especificamente na análise do 20º dia, onde os maiores níveis de concentração foram atingidos (Fig. 22B e 23B). Paralelamente, também se observou uma diminuição na concentração do pico “Z” nos grupos “predado” e “controle interno” (Fig. 22-23) , em relação ao “controle externo” .

Diante dos cromatogramas obtidos dos três grupos estudados, pode-se dizer então, que houve uma possível resposta, representada por uma reconfiguração metabólica, por parte das plantas predadas e das plantas do controle interno, pois foi detectada uma mudança no perfil metabólico desses dois grupos. Além disso, seria possível correlacionar a mudança de concentração dos picos X e Y (picos polares) com o pico Z (apolar), pois uma vez que o pico Z, diminui de tamanho, os picos X e Y aumentam, ocorrendo assim uma possível relação biosintética entre esses picos.

Pode-se adicionar também, que o grupo “controle interno” (10 dias) passou a responder de forma semelhante ao grupo predado, apenas no vigésimo dia, observando-se então, uma demanda maior de tempo, para se reconfigurar de maneira semelhante ao grupo predado.

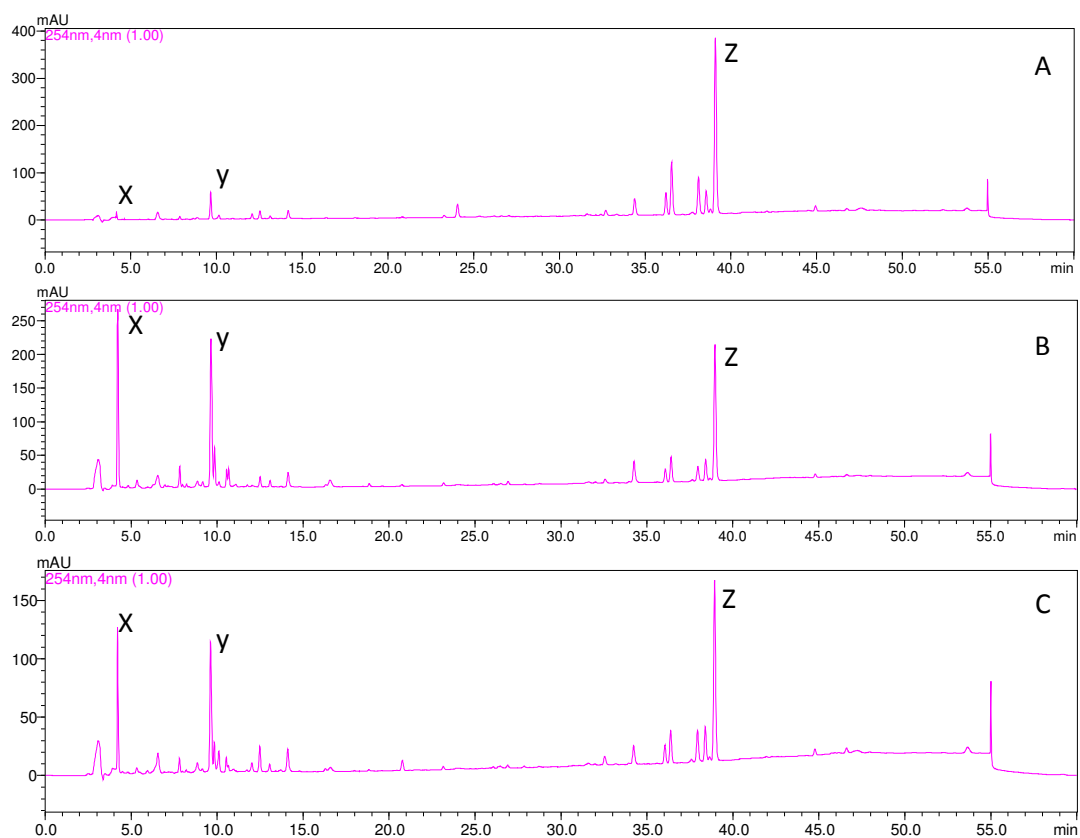


Figura 22 Perfil metabolômico do extrato bruto de *P. obtusifolia* depois de 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C) de predação

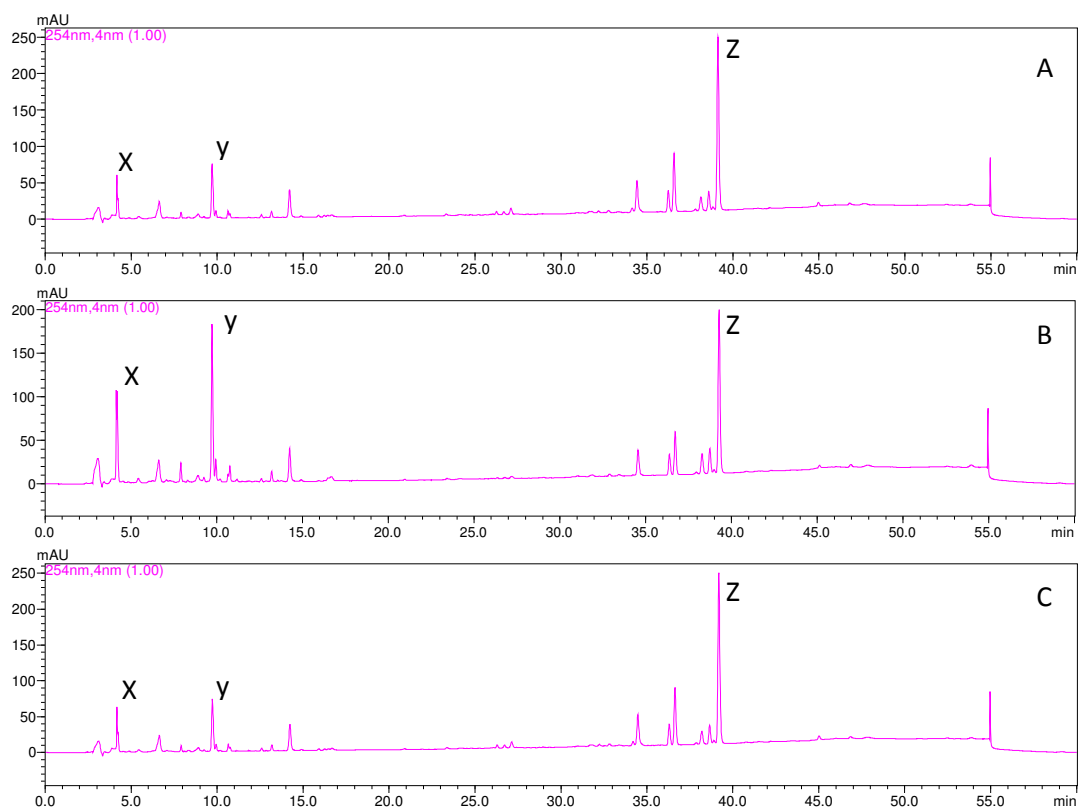


Figura 23 Perfil metabolômico do extrato bruto de *P. obtusifolia* representando o "controle interno" após 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C)

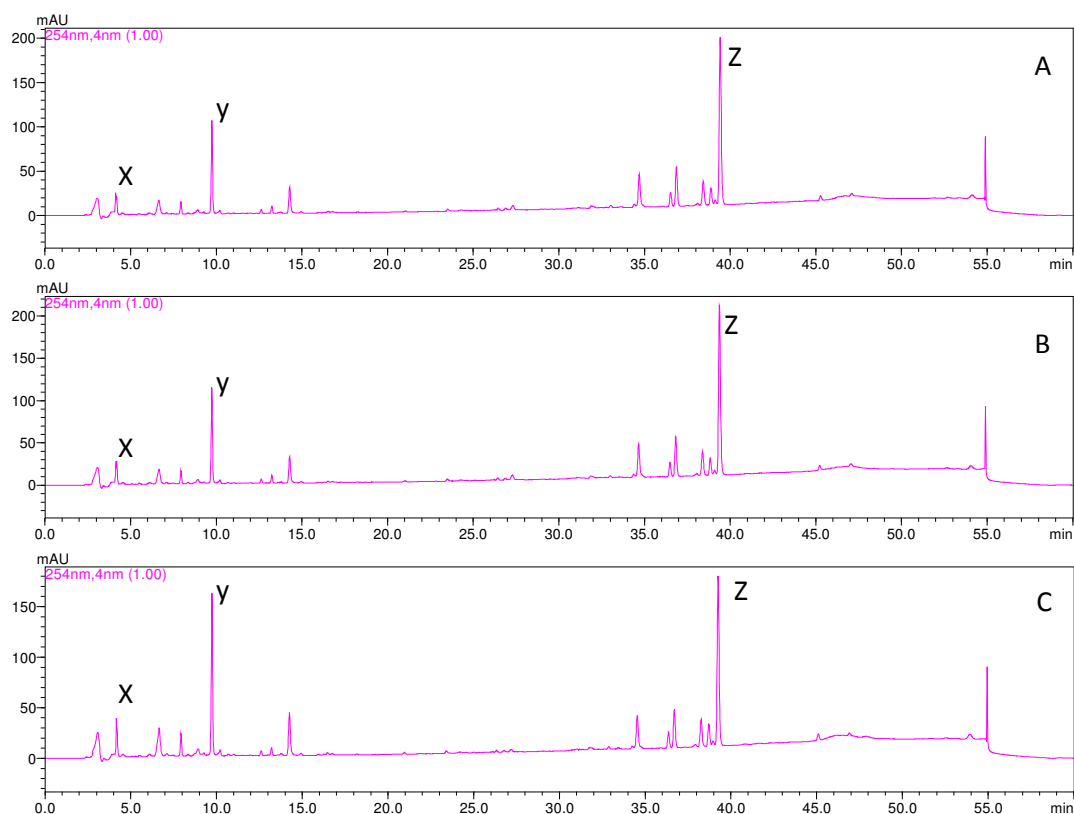


Figura 24 Perfil metabolômico do extrato bruto de *P. obtusifolia* representando o “controle externo” após 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C)

Em relação aos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H dos extratos brutos referentes aos três grupos em estudo em todos os períodos de análise (10, 20 e 30 dias) (Fig.25-60), pôde-se perceber por meio da análise de componente principal (dados não normalizados), utilizando apenas o PC1, (Fig.61), a formação de 2 grupos distintos, com o primeiro grupo representando o controle externo (10,20 e 30 dias) e o segundo grupo, representado pelas amostras restantes (“predado” e “controle interno”, 10, 20 e 30 dias).

Analisando-se o PC1 x PC2 (Fig.62), pôde-se observar desta vez, três grupos distintos, representados pelo grupo “Controle Externo” (10 20 e 30 dias), grupo “predado” (10,20 e 30 dias) junto com “Controle Interno” (20 e 30 dias), e finalmente, o terceiro grupo, representado pelo “controle interno” (CI) (10 dias). Esses dados (PC1 x PC2) corroboraram com os perfis metabólicos observados nos cromatogramas citados acima, pois foi observado nenhuma mudança nos perfis do controle externo (configurando o primeiro grupo), assim

como também foi observado que os grupos “predado” (10,20 e 30 dias) junto com “Controle Interno” (20 e 30 dias) mudaram seus perfis de maneira semelhante (caracterizando o segundo grupo) e finalmente, foi observado que o grupo “controle Interno” só passou a “responder” ou mudar seu perfil metabólico de maneira semelhante ao grupo predado no vigésimo dia, originando um terceiro grupo (Controle interno 10 dias).

Analisando o gráfico de *loadings* (Fig.62), pôde-se perceber que o grupo “predado” e “Controle Interno” (20 e 30 dias) sofriam uma forte influência de picos que apresentavam deslocamentos químicos em 2.5 ppm (típico de hidrogênio metilênico de anel), assim como picos em 1.66, 1.68, 1.70, 1.72, 1.74 e 1.78 ppm.(típicos de hidrogênio de metila prenilada).

Ao comparar os deslocamentos químicos das substâncias já isoladas da espécie (Tanaka et al., 1998) com os picos do gráfico de *loadings* que influenciavam o grupo “predado” e “controle interno”, observou-se então que se tratava de picos característicos de cromenos (compostos típicos do gênero), como a Peperobtusina A e Peperobtusina B (Fig. 16), indicando assim, que a reconfiguração metabólica da espécie frente ao estresse biótico era caracterizada por um aumento significativo da produção de cromenos.

Ao realizar a análise de componente principal dos mesmos dados, porém, desta vez, normalizados pela área (Fig.63), não foi possível observar estas mudanças de concentração de compostos entre os grupos estudados, uma vez que ao normalizar os dados pela área, boa parte da variância é reduzida, mascarando então estas diferenças. Porém, com os dados normalizados, pôde-se observar três grupos distintos, cuja diferença foi baseada nos períodos de análise, e não no tipo de grupo estudado, configurando assim, outra visão sobre o perfil metabólico, influenciado pelo envelhecimento das plantas.

Os grupos: “Controle Externo”, “Controle Interno” e “Predado” também foram analisados isoladamente (Fig. 64-69), demonstrando que havia uma diferença intra grupo entre as amostras de 10,20,30 dias, o que não foi observado, quando foram analisados todos os grupos simultaneamente.

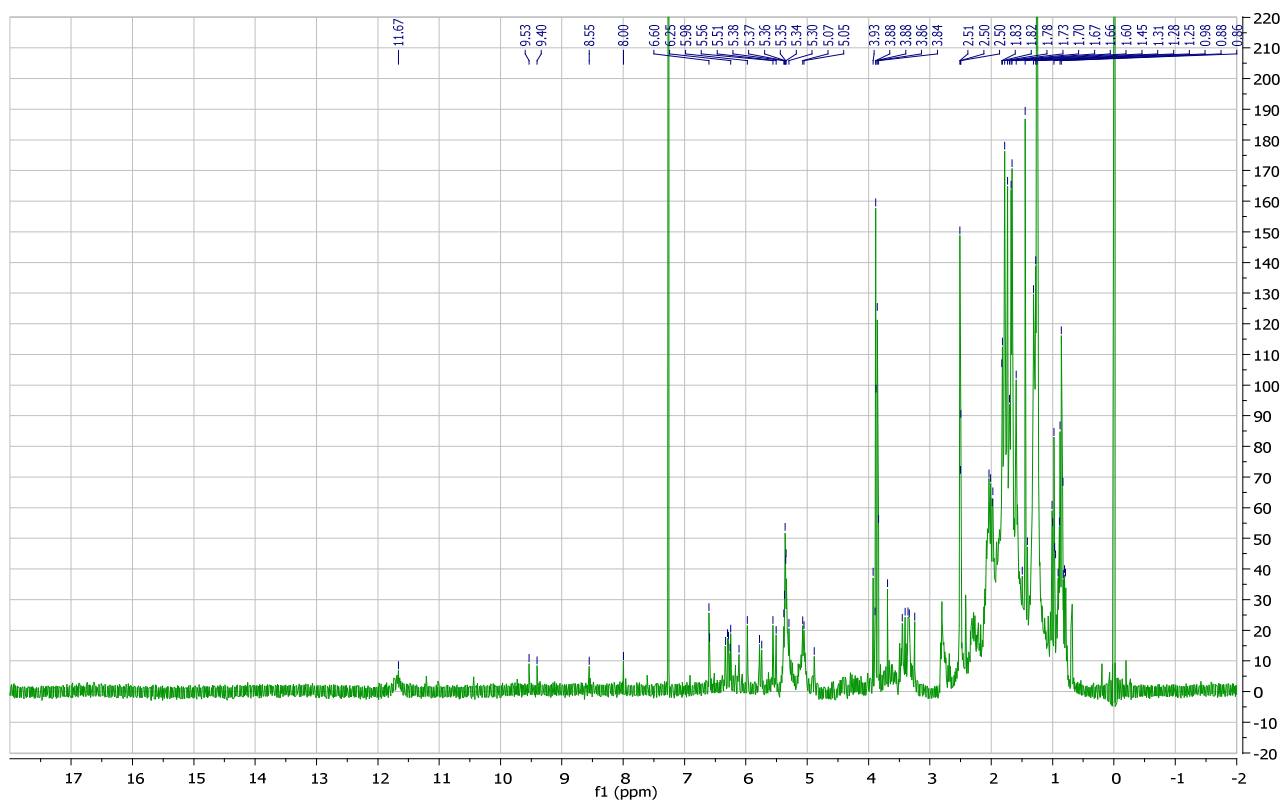


Figura 25 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* após 10 dias de predação (CDCl₃ 300 MHz)

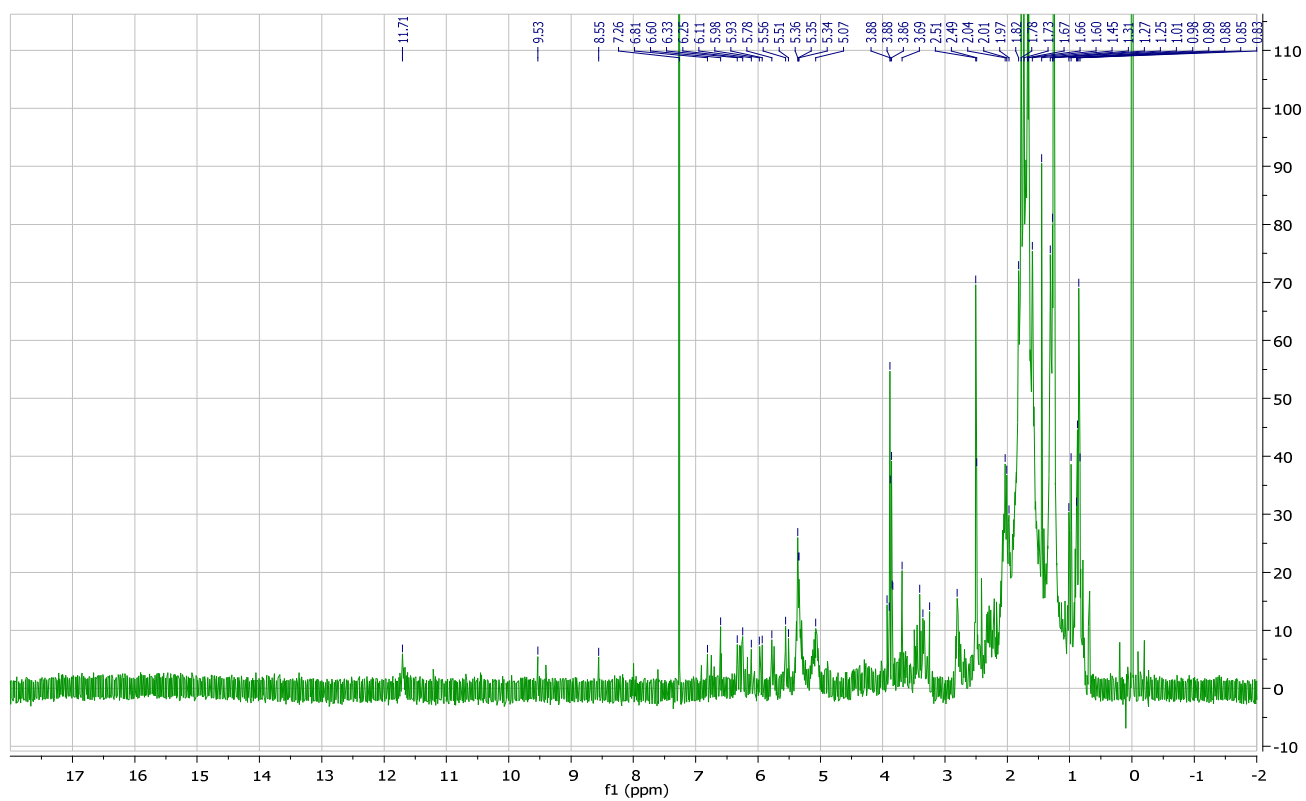


Figura 26 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* após 20 dias de predação (CDCl₃ 300 MHz)

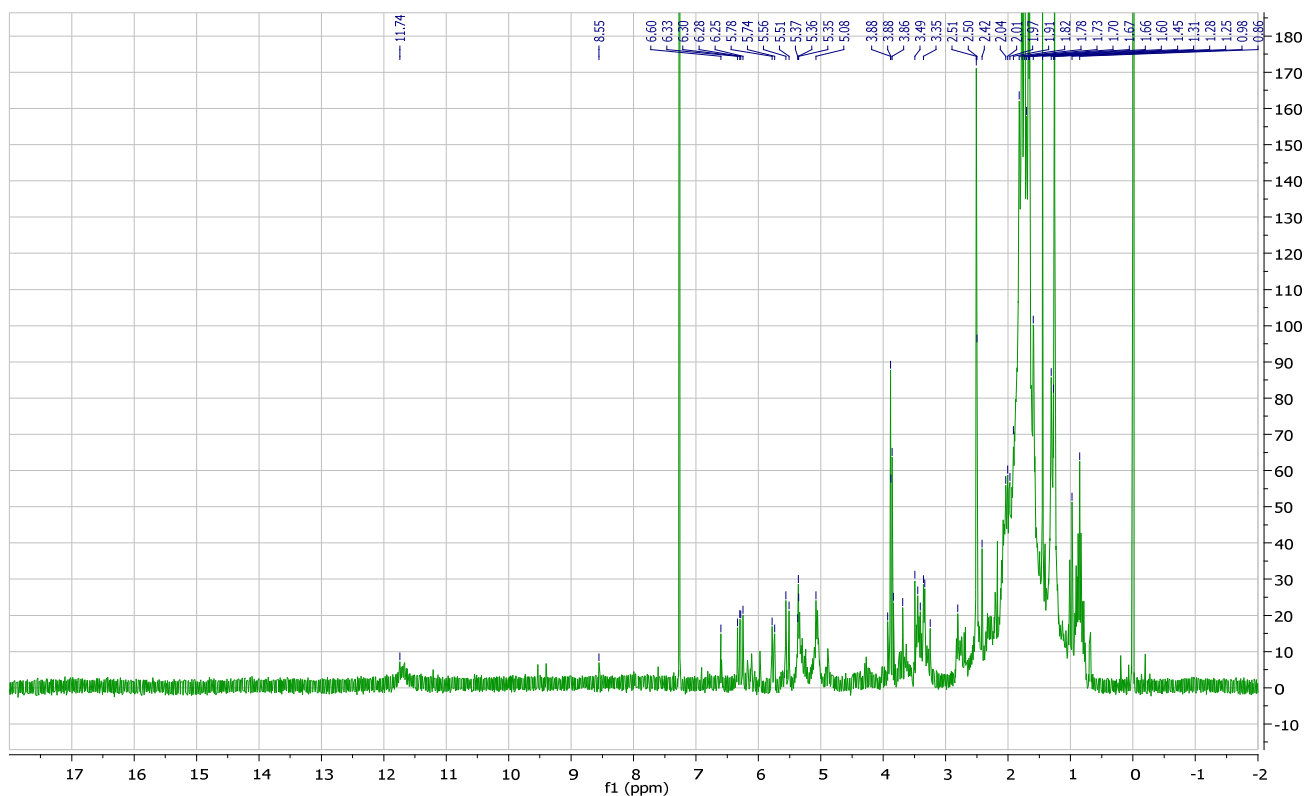


Figura 27 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* após 30 dias de predação (CDCl_3 300 MHz)

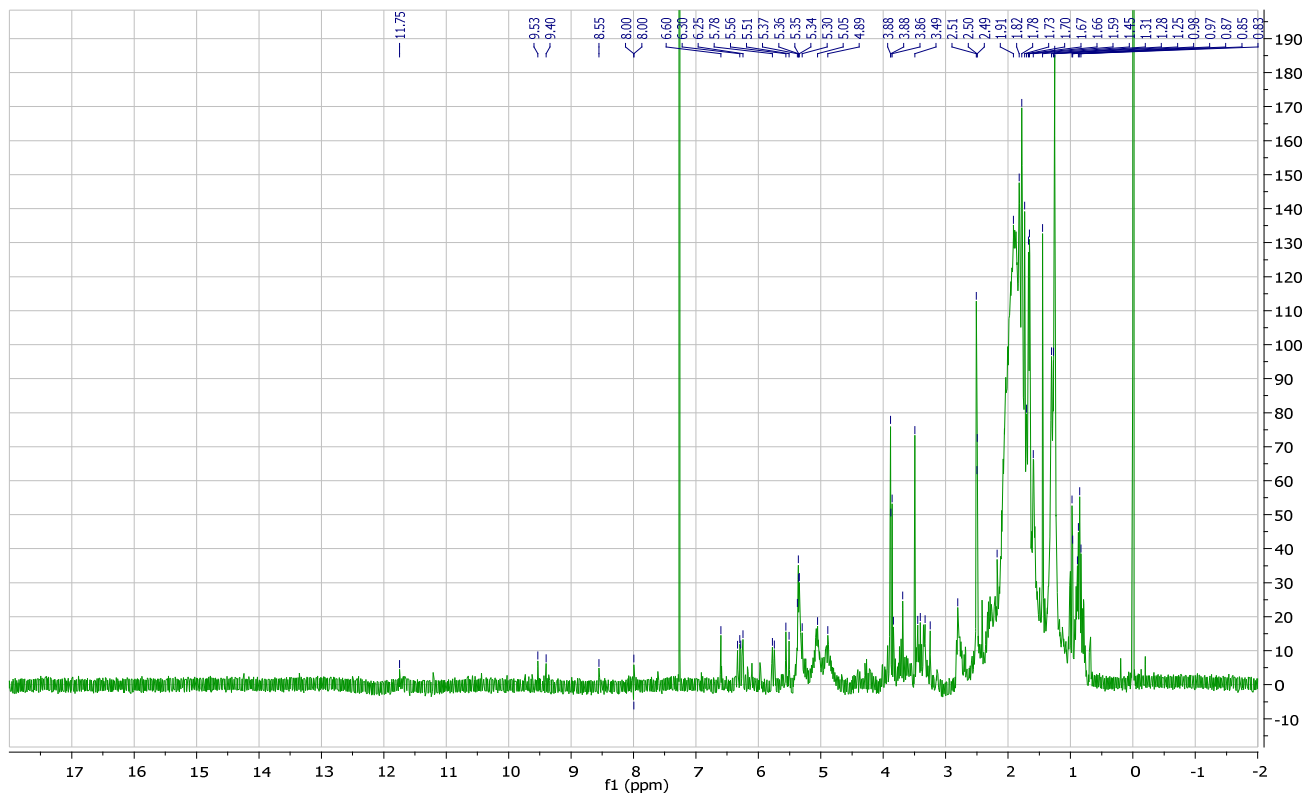


Figura 28 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 10 dias (CDCl_3 300 MHz)

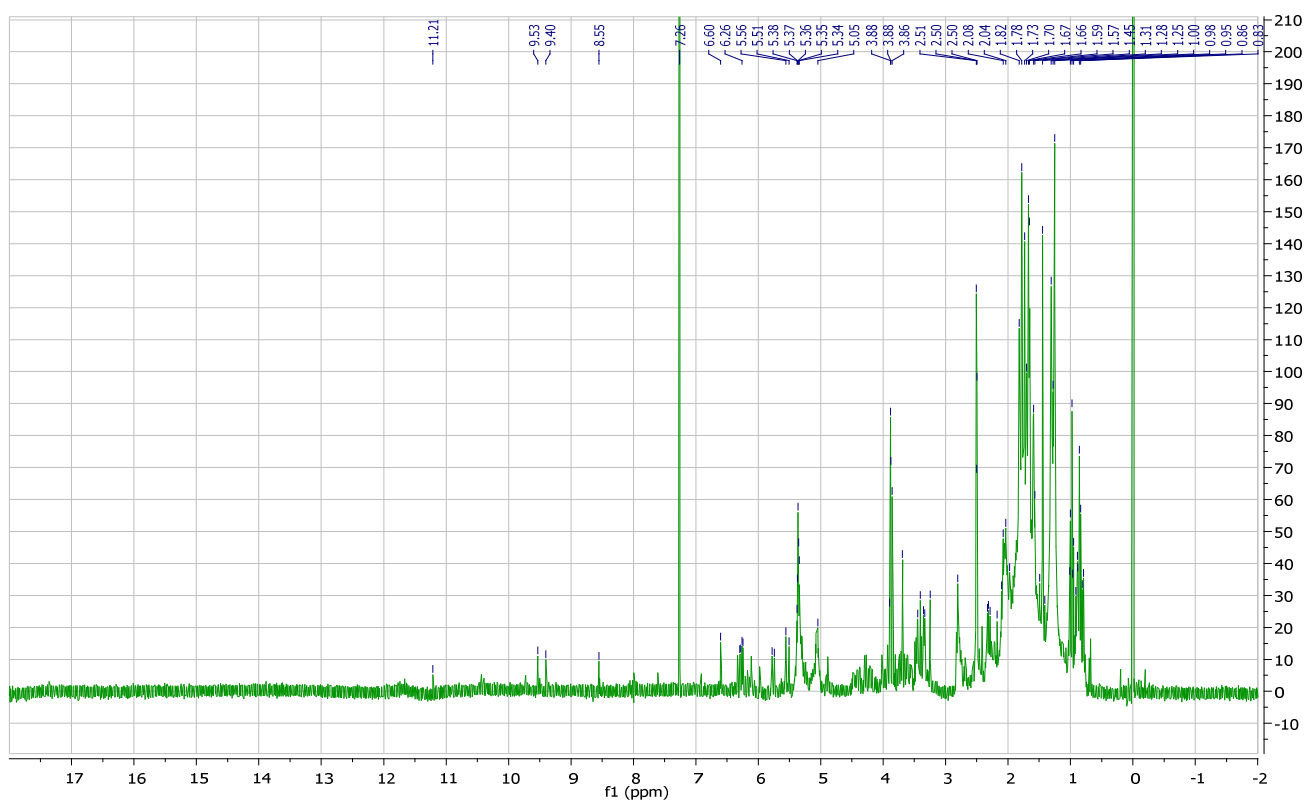


Figura 29 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 20 dias (CDCl_3 300 MHz)

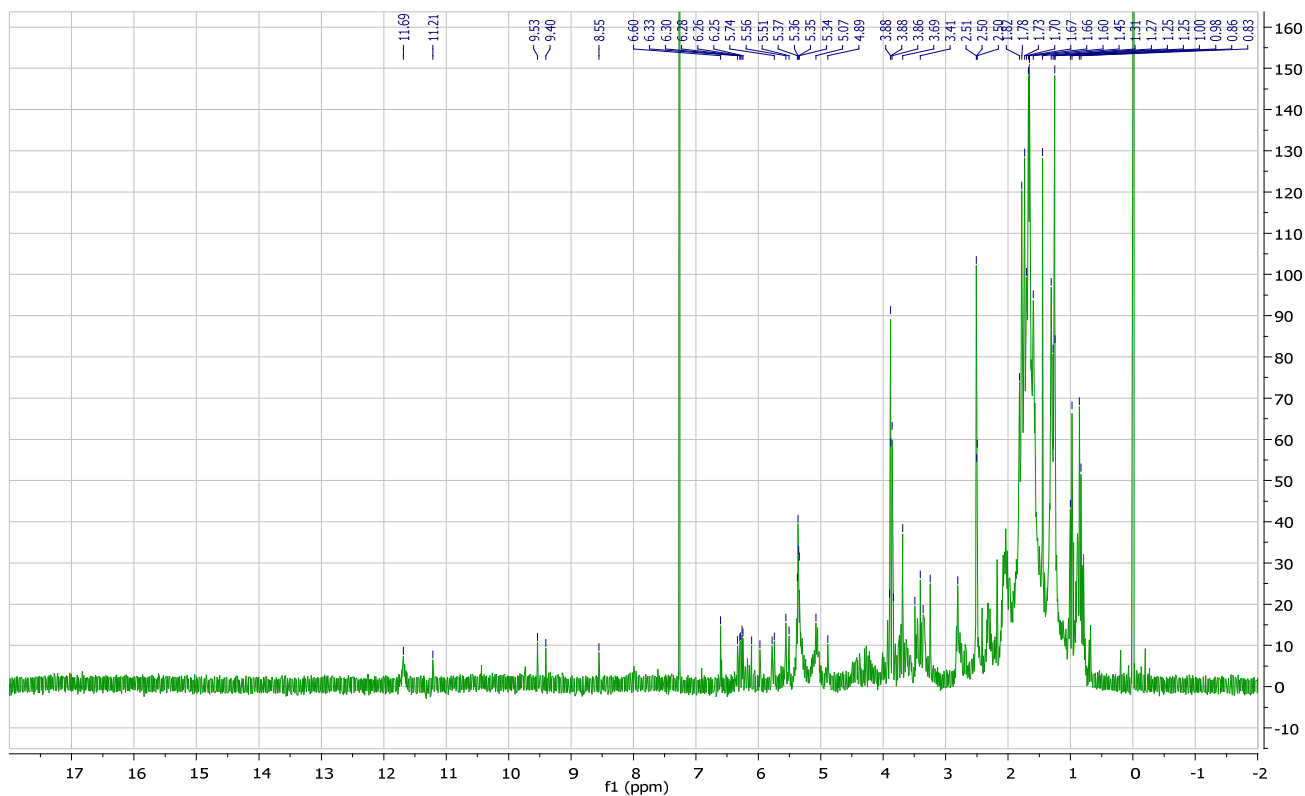


Figura 30 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 30 dias (CDCl_3 300 MHz)

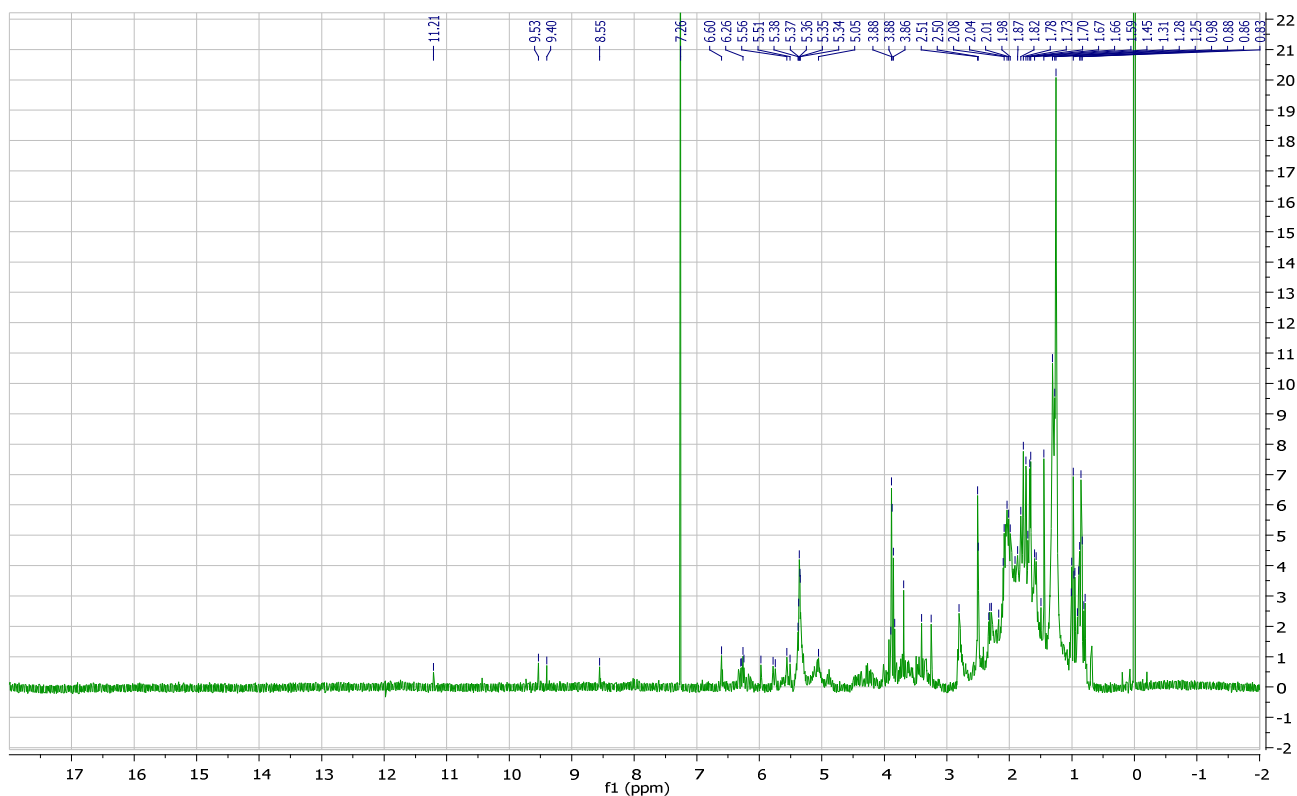


Figura 31 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 10 dias (CDCl_3 300 MHz)

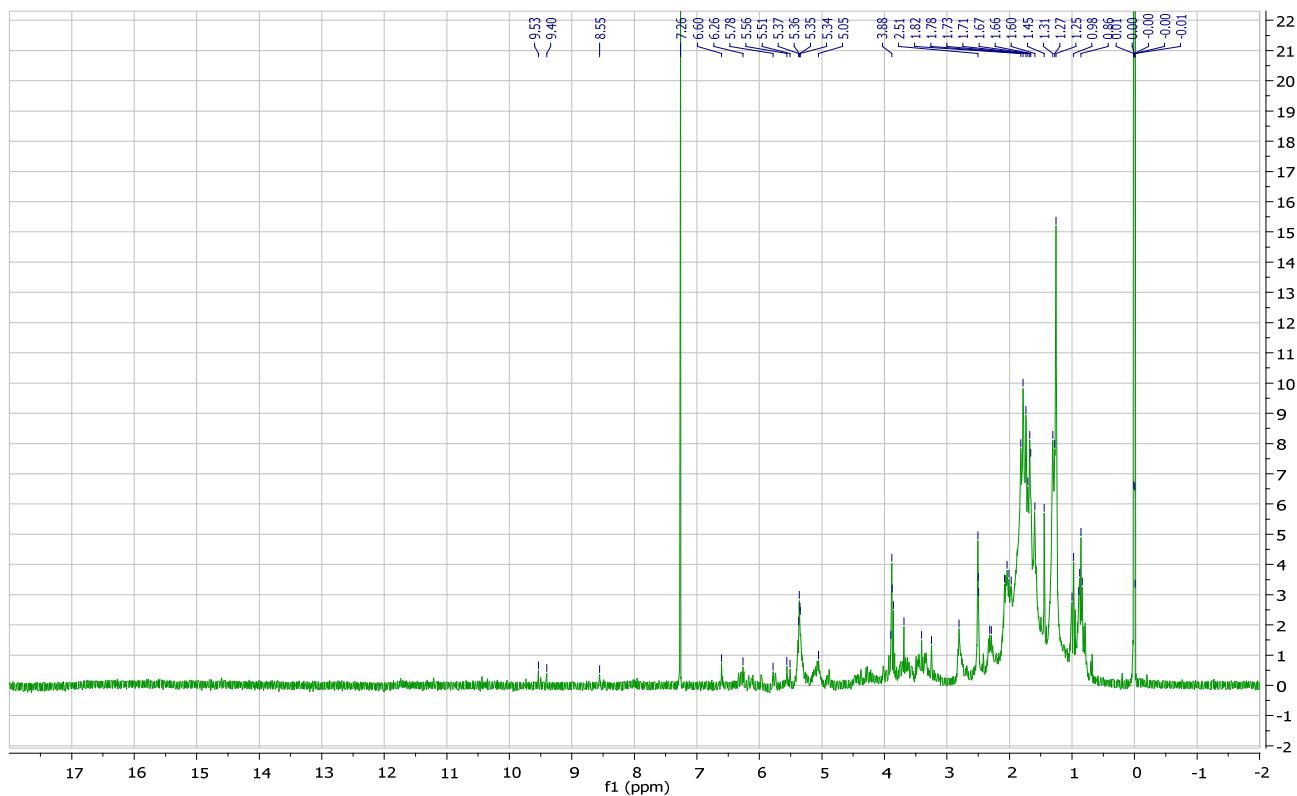


Figura 32 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 20 dias (CDCl_3 300 MHz)

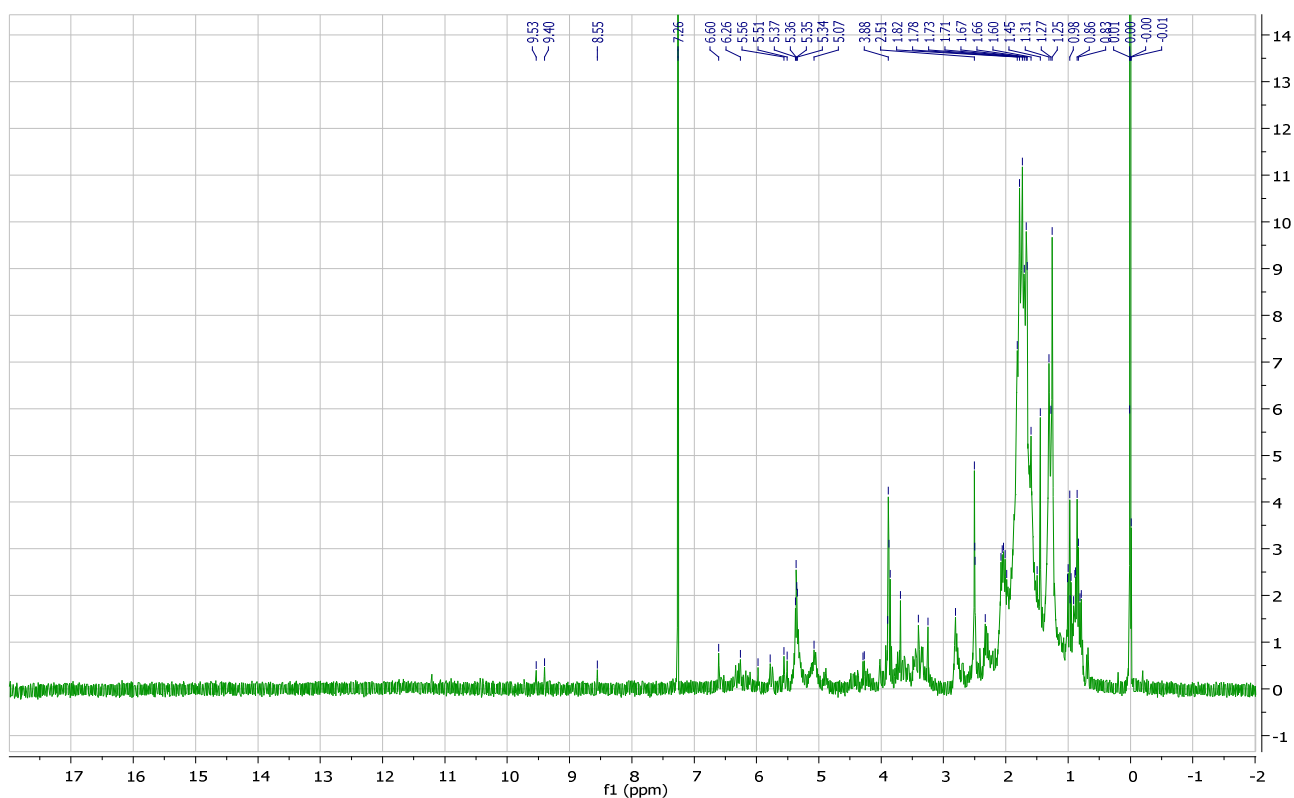


Figura 33 Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 30 dias (CDCl_3 300 MHz)

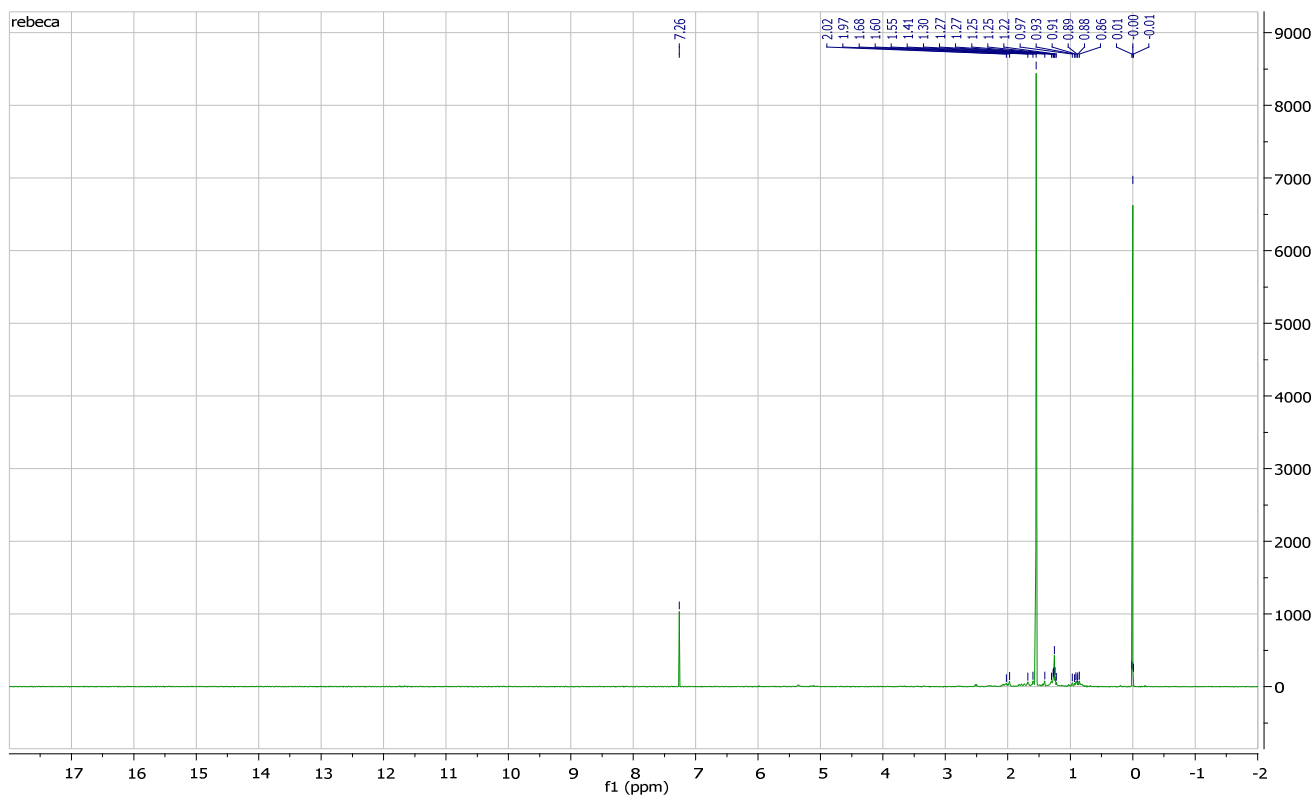


Figura 34 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de *P. obtusifolia* após 10 dias de predação (CDCl_3 300 MHz)

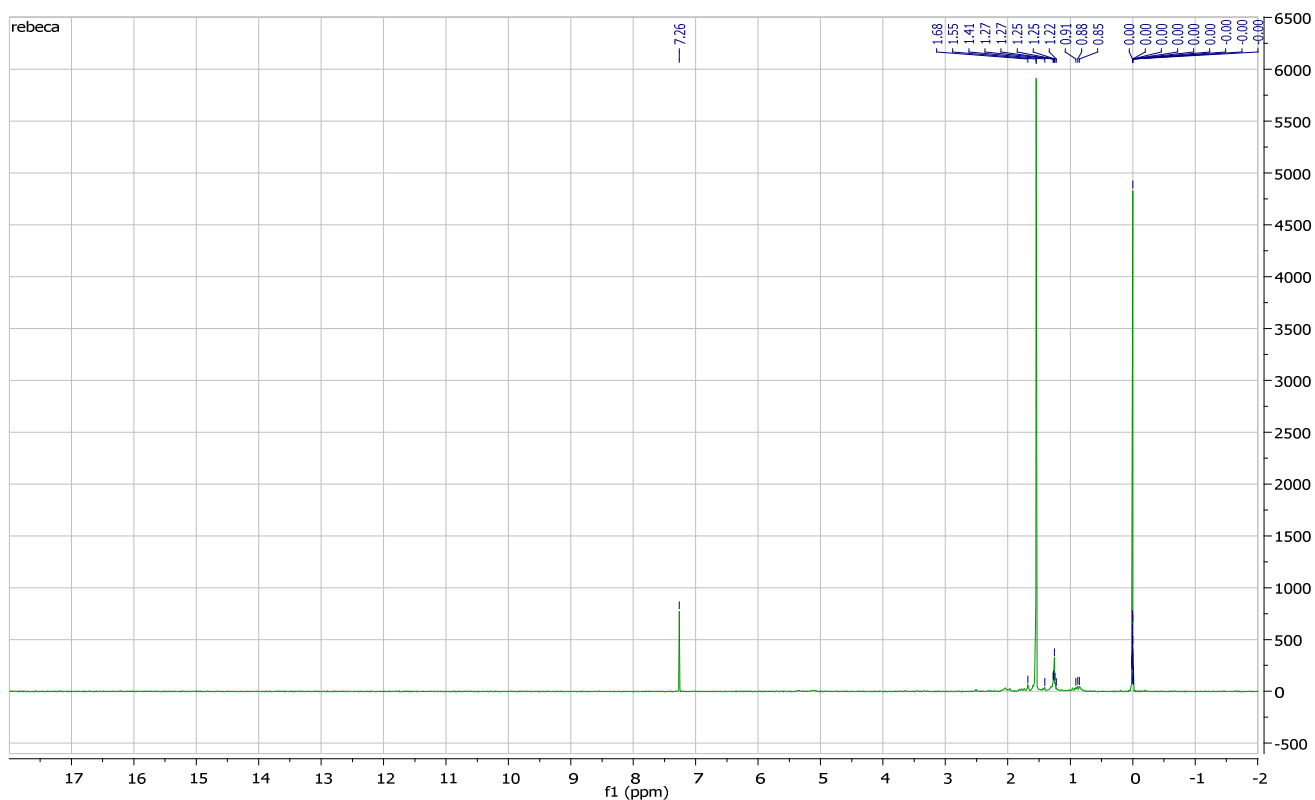


Figura 35 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de *P. obtusifolia* após 20 dias de predação (CDCl_3 300 MHz)

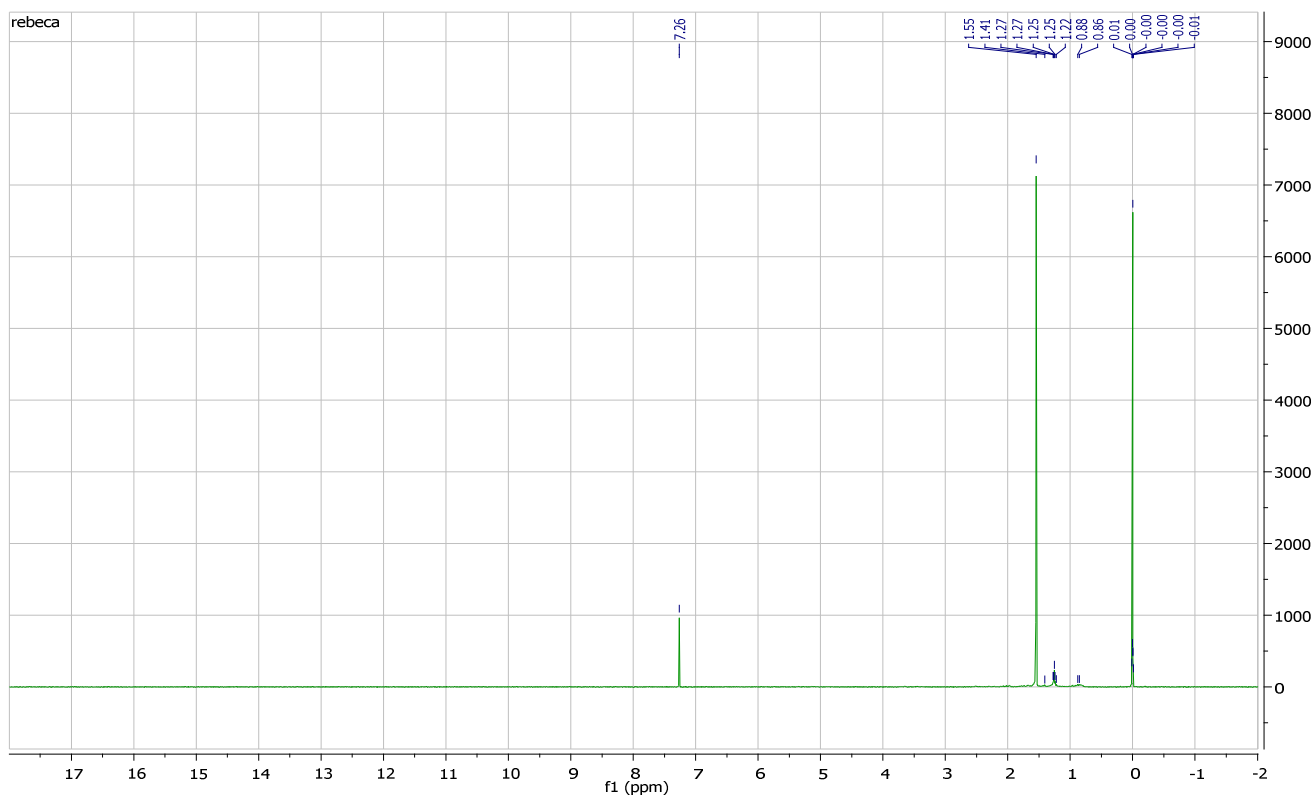


Figura 36 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de *P. obtusifolia* após 30 dias de predação (CDCl_3 300 MHz)

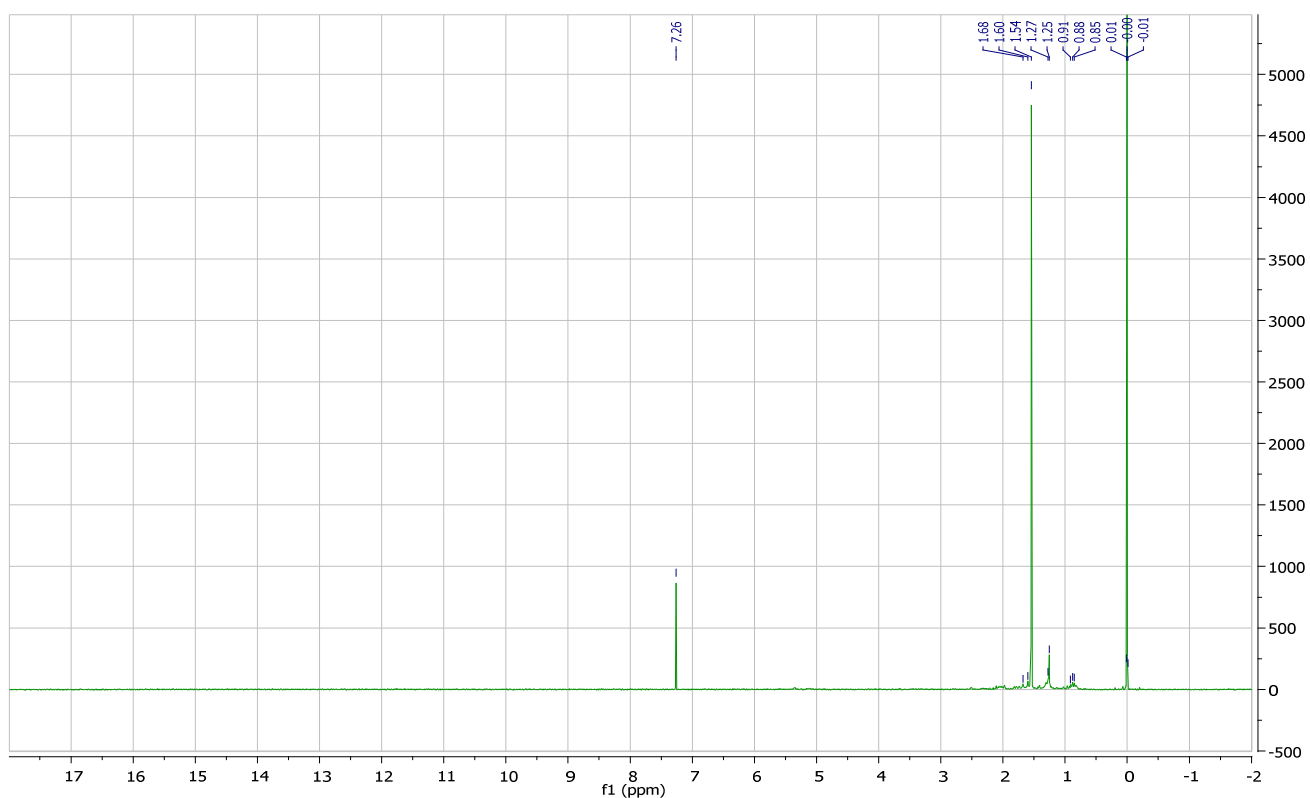


Figura 37 Espectro de RMN de ¹H da fase apolar de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 10 dias (CDCl₃ 300 MHz)

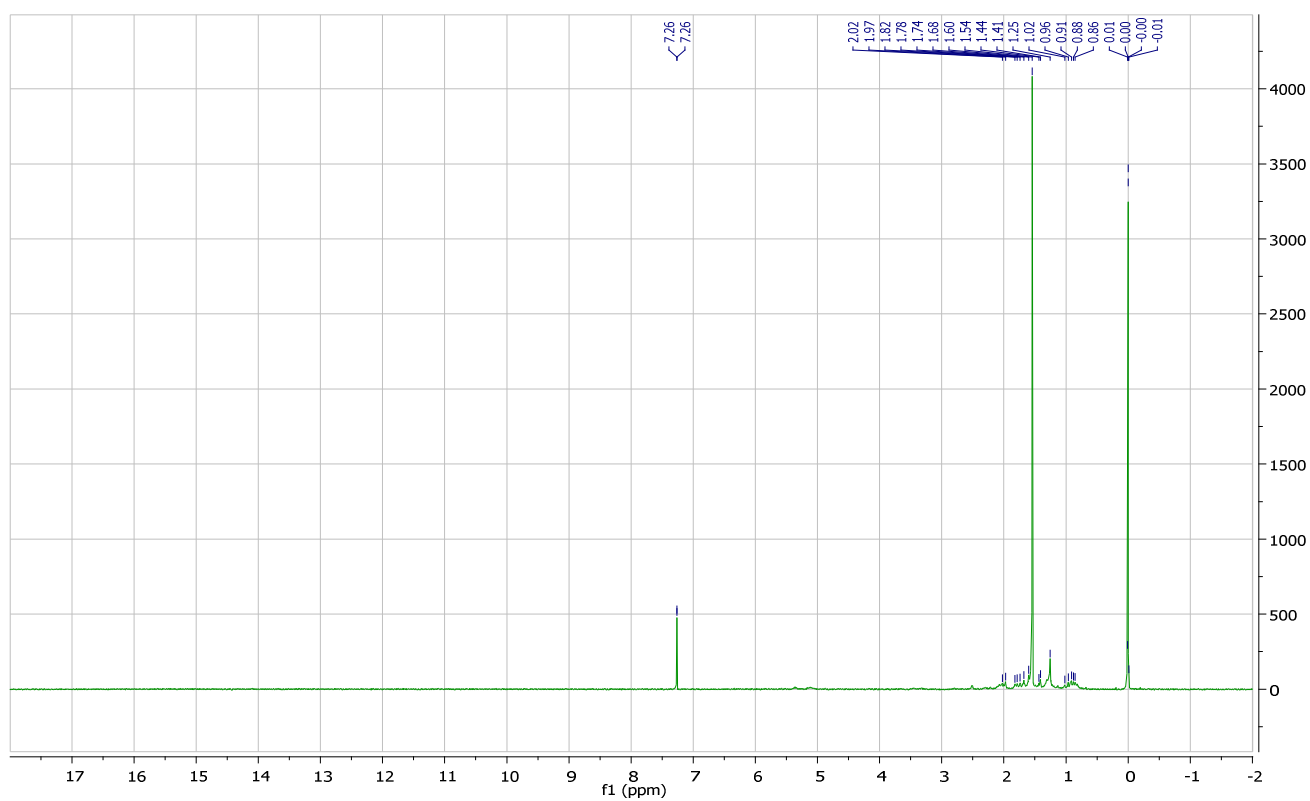


Figura 38 Espectro de RMN de ¹H da fase apolar de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 20 dias (CDCl₃ 300 MHz)

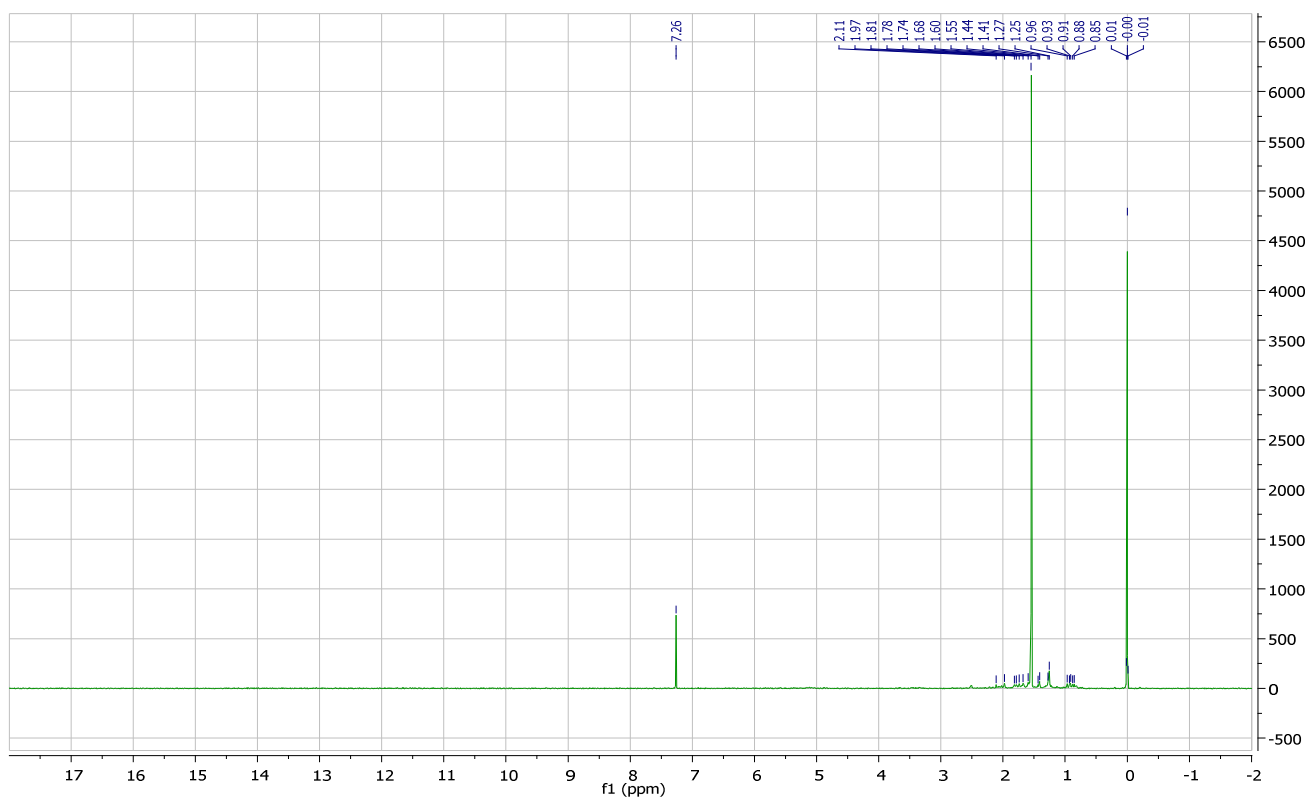


Figura 39 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 30 dias (CDCl_3 300 MHz)

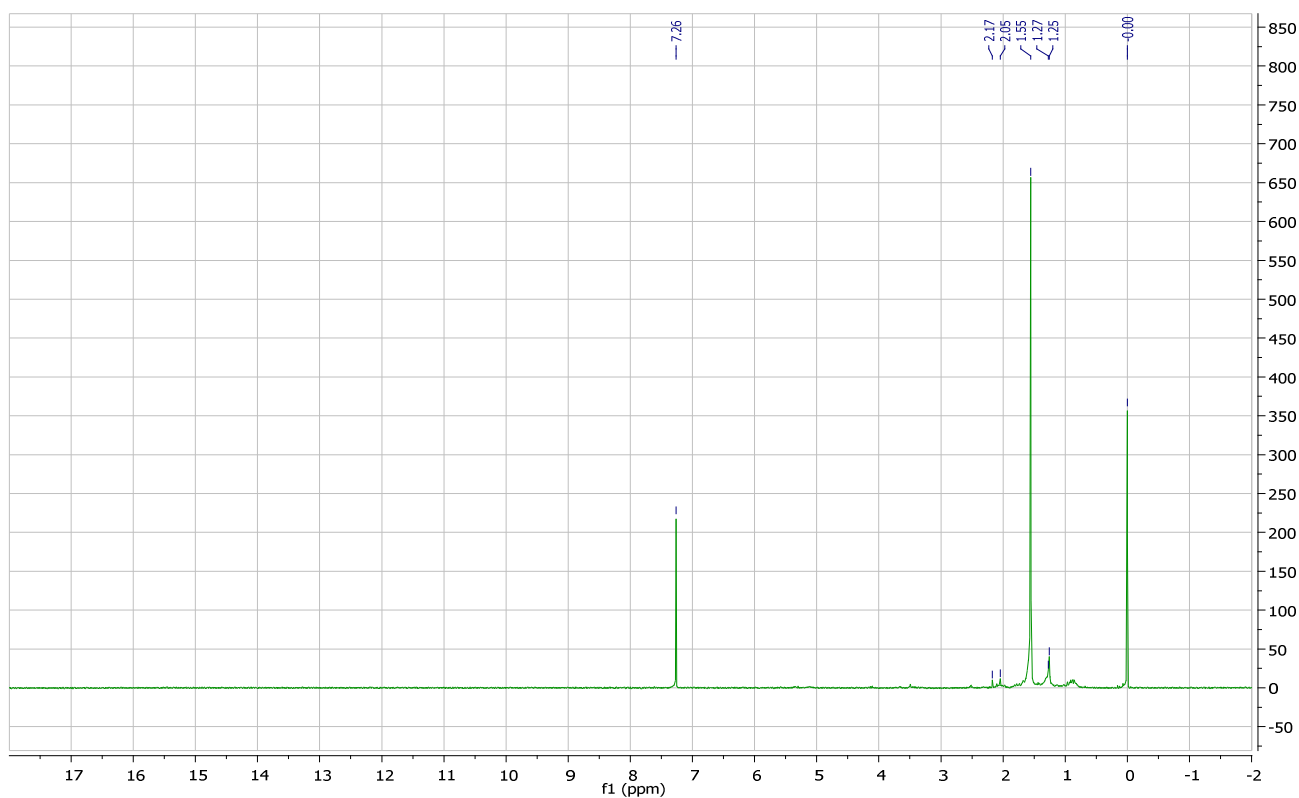


Figura 40 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 10 dias (CDCl_3 300 MHz)

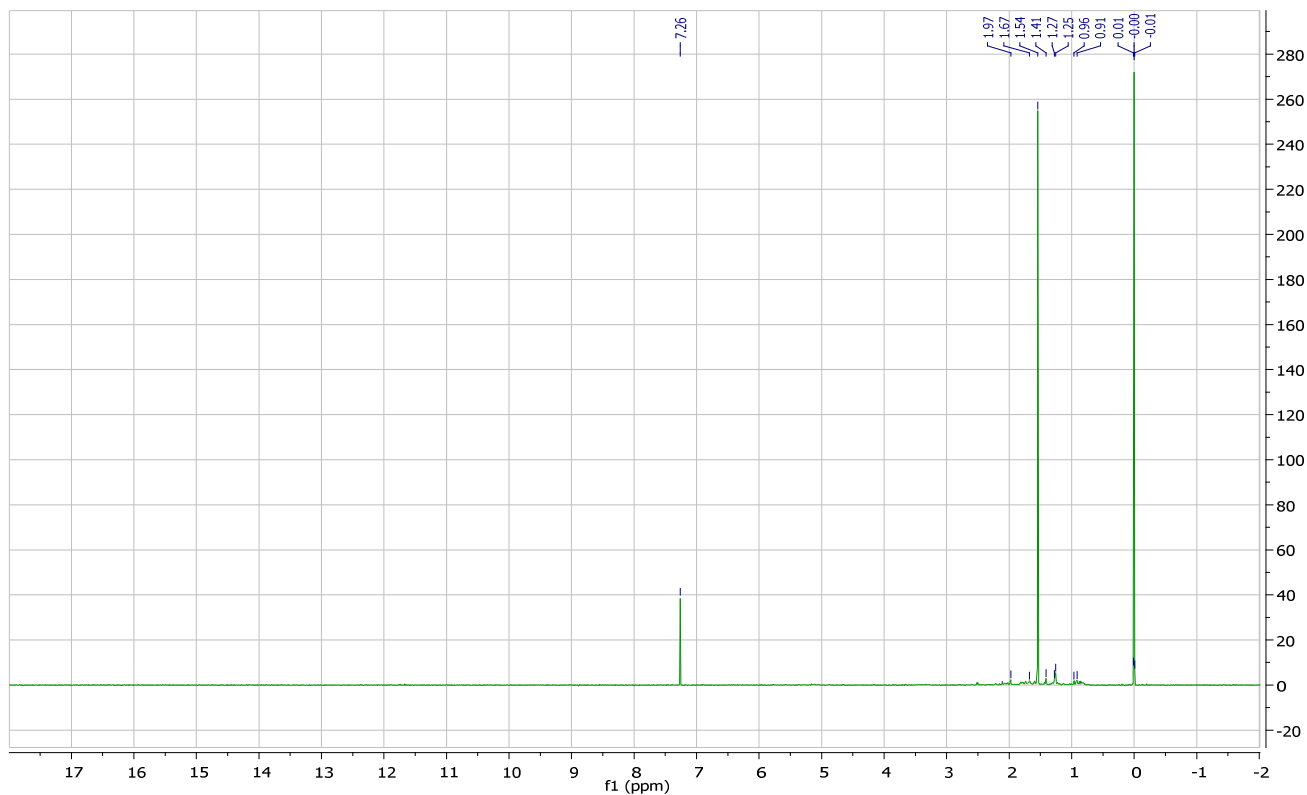


Figura 41 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 20 dias (CDCl_3 300 MHz)

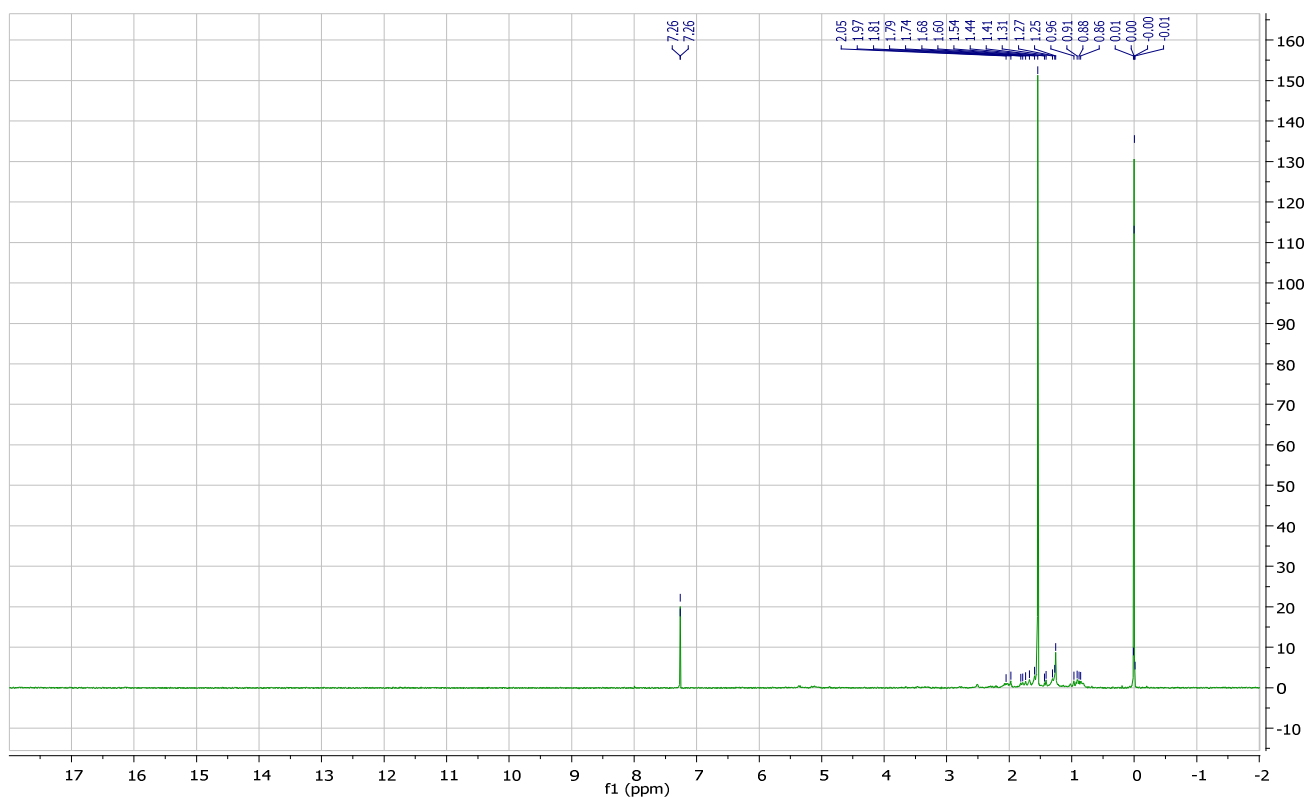


Figura 42 Espectro de RMN de ^1H da fase apolar de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 30 dias (CDCl_3 300 MHz)

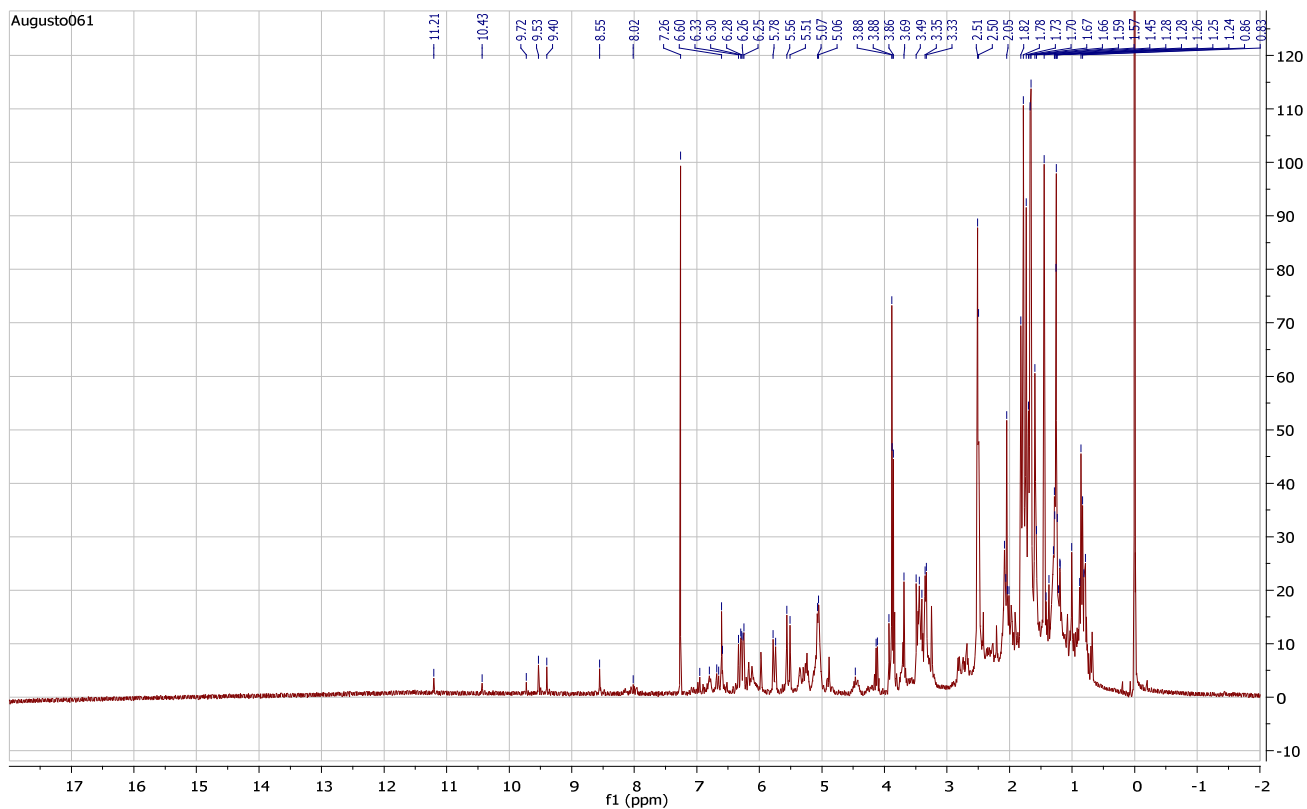


Figura 43 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* após 10 dias de predação (CDCl_3 300 MHz)

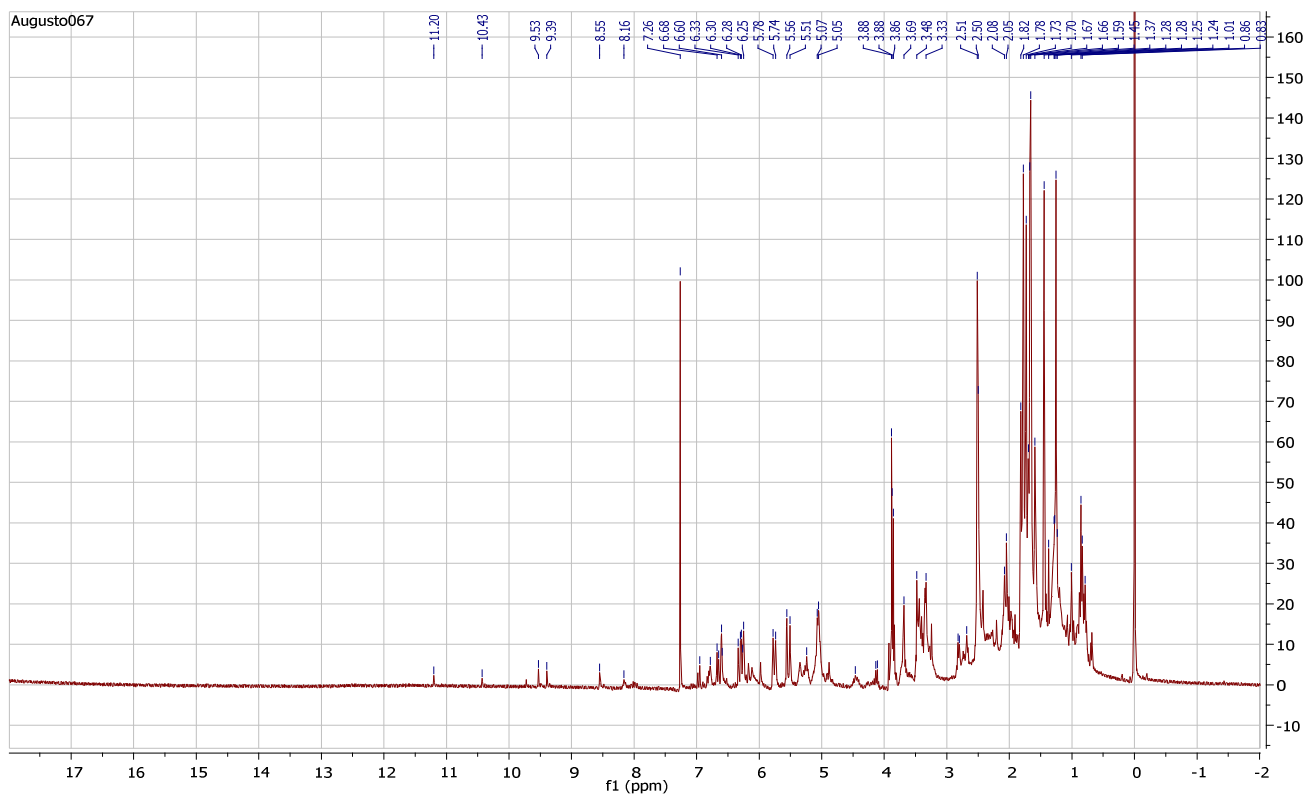


Figura 44 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* após 20 dias de predação (CDCl_3 300 MHz)

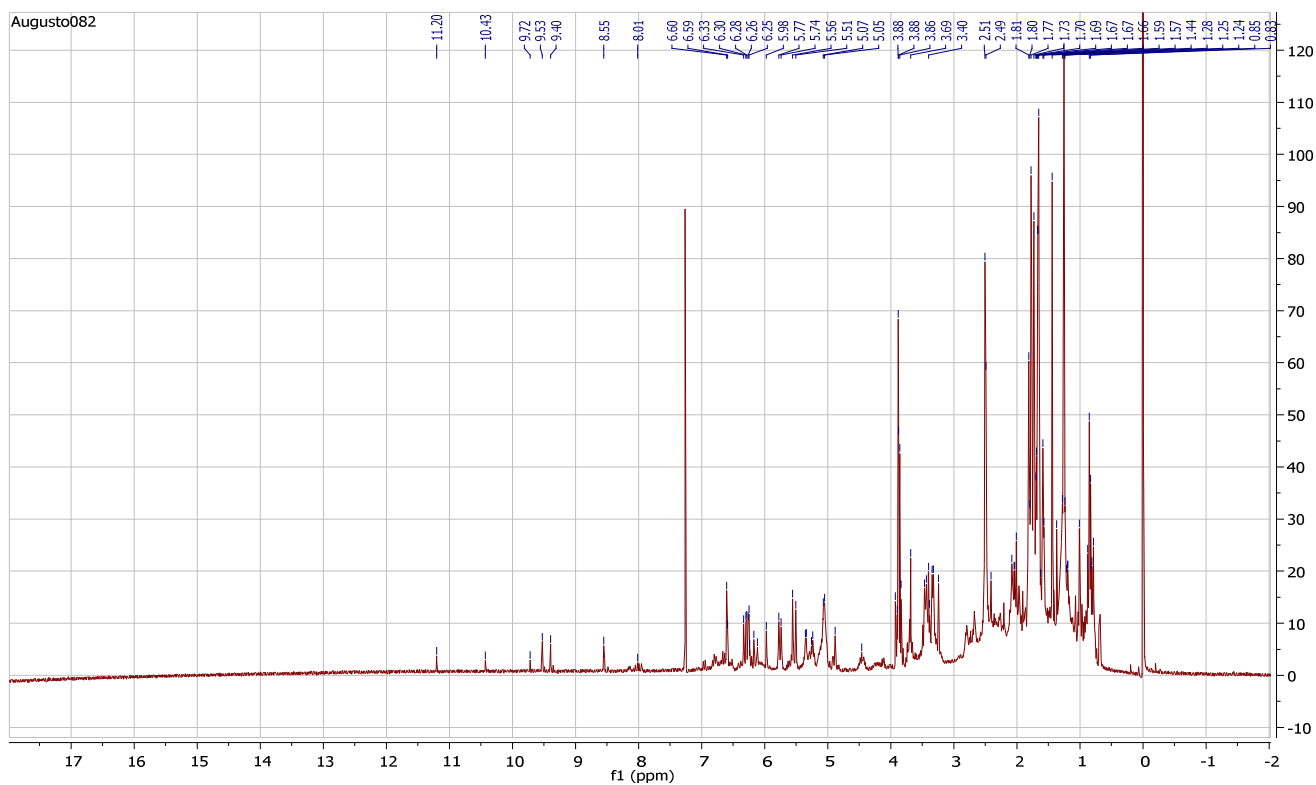


Figura 45 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* após 30 dias de predação (CDCl_3 300 MHz)

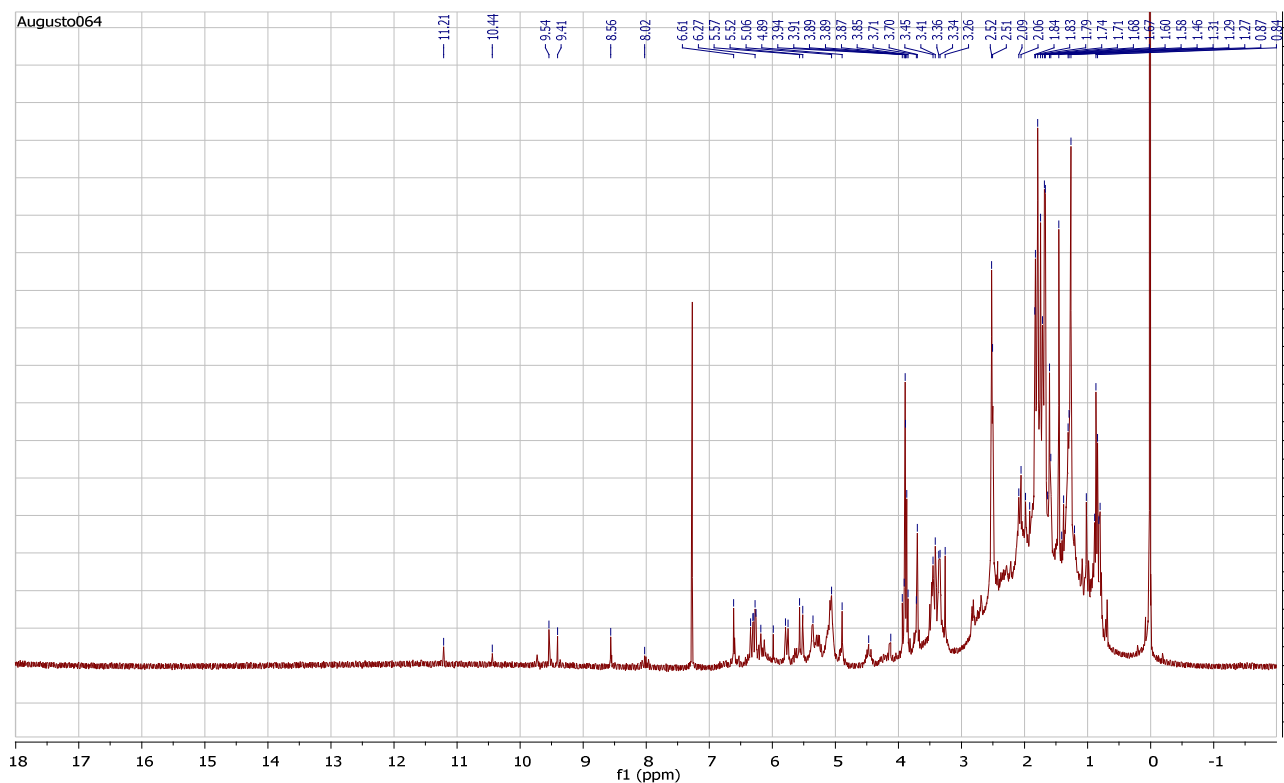


Figura 46 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 10 dias (CDCl_3 300 MHz)

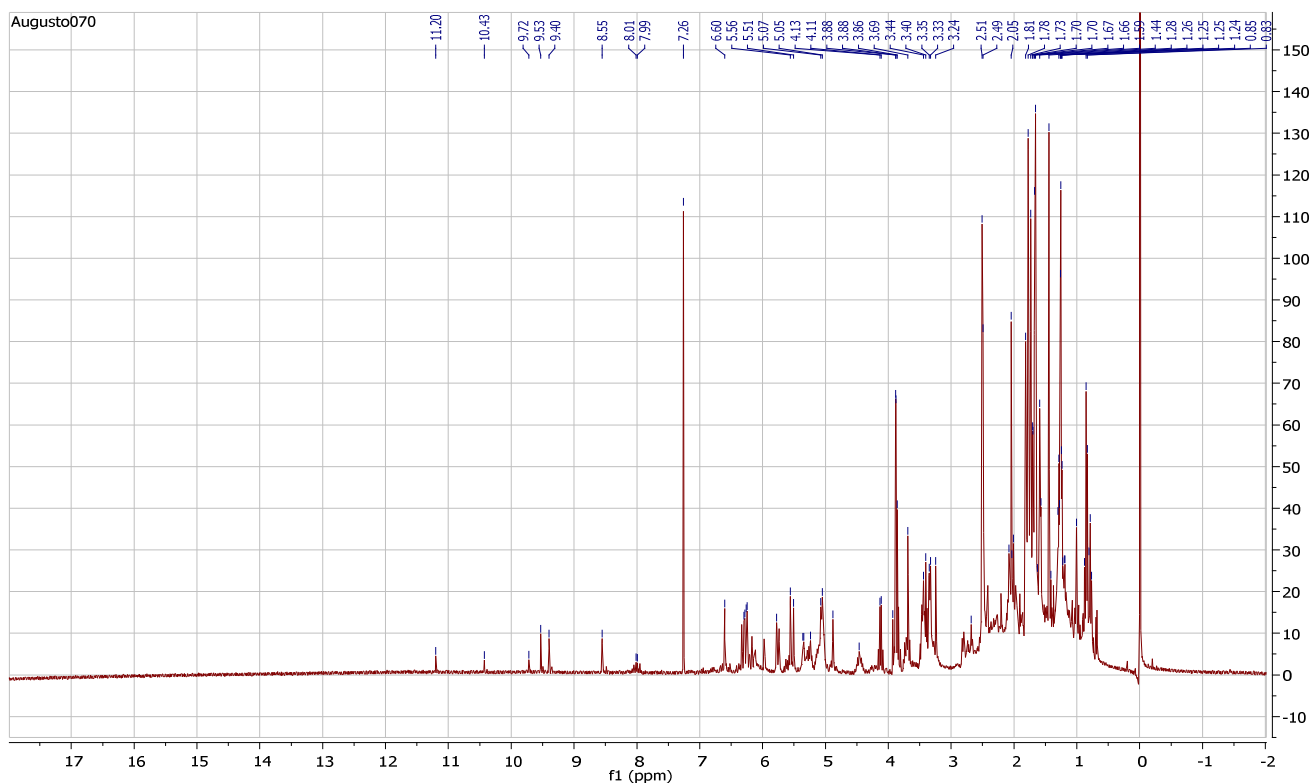


Figura 47 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 20 dias (CDCl_3 300 MHz)

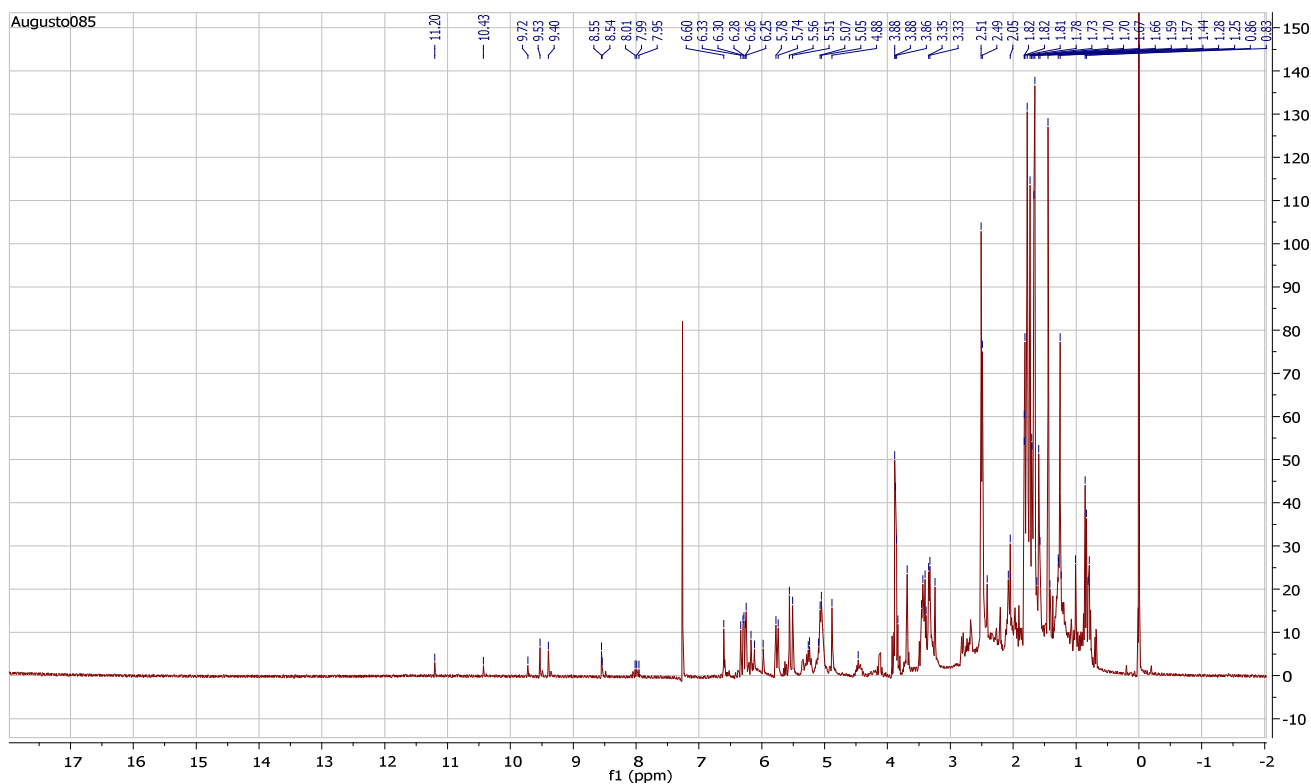


Figura 48 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 30 dias (CDCl_3 300 MHz)

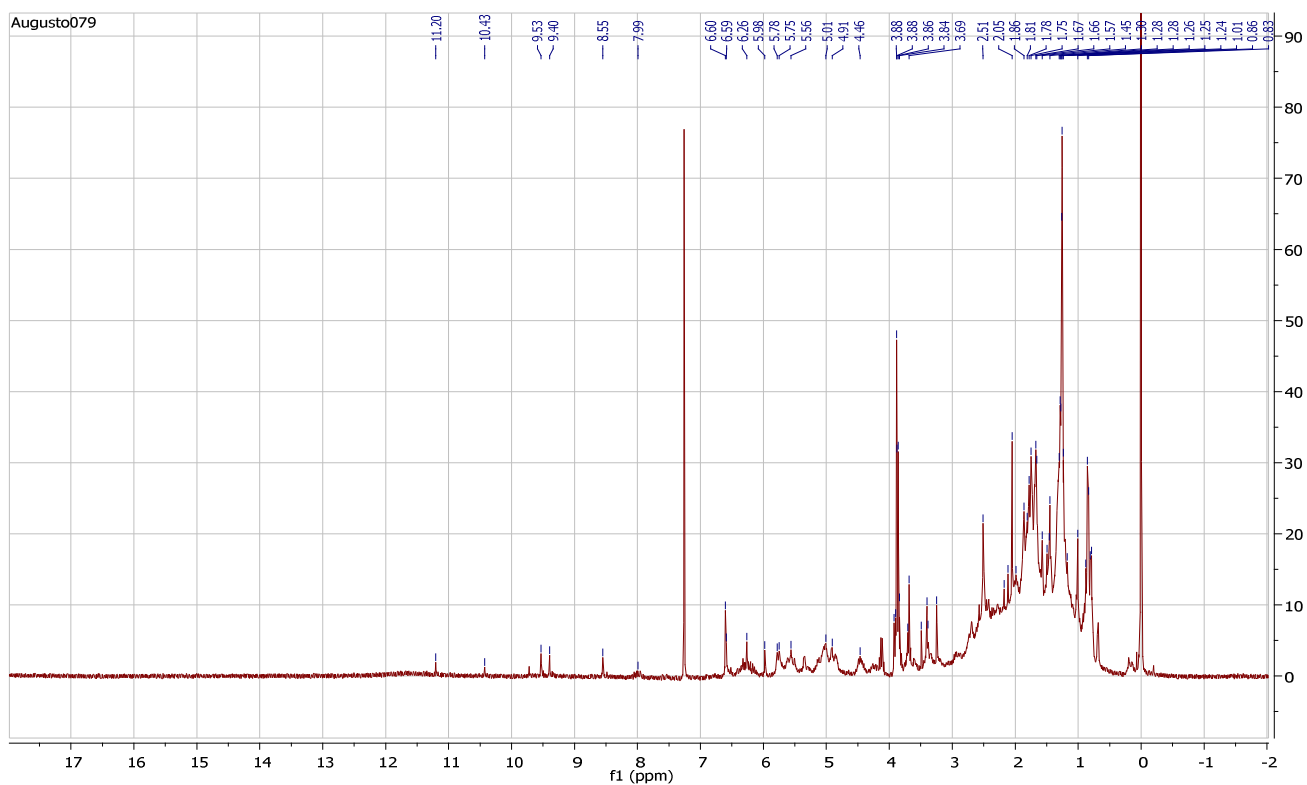


Figura 49 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 10 dias (CDCl_3 300 MHz)

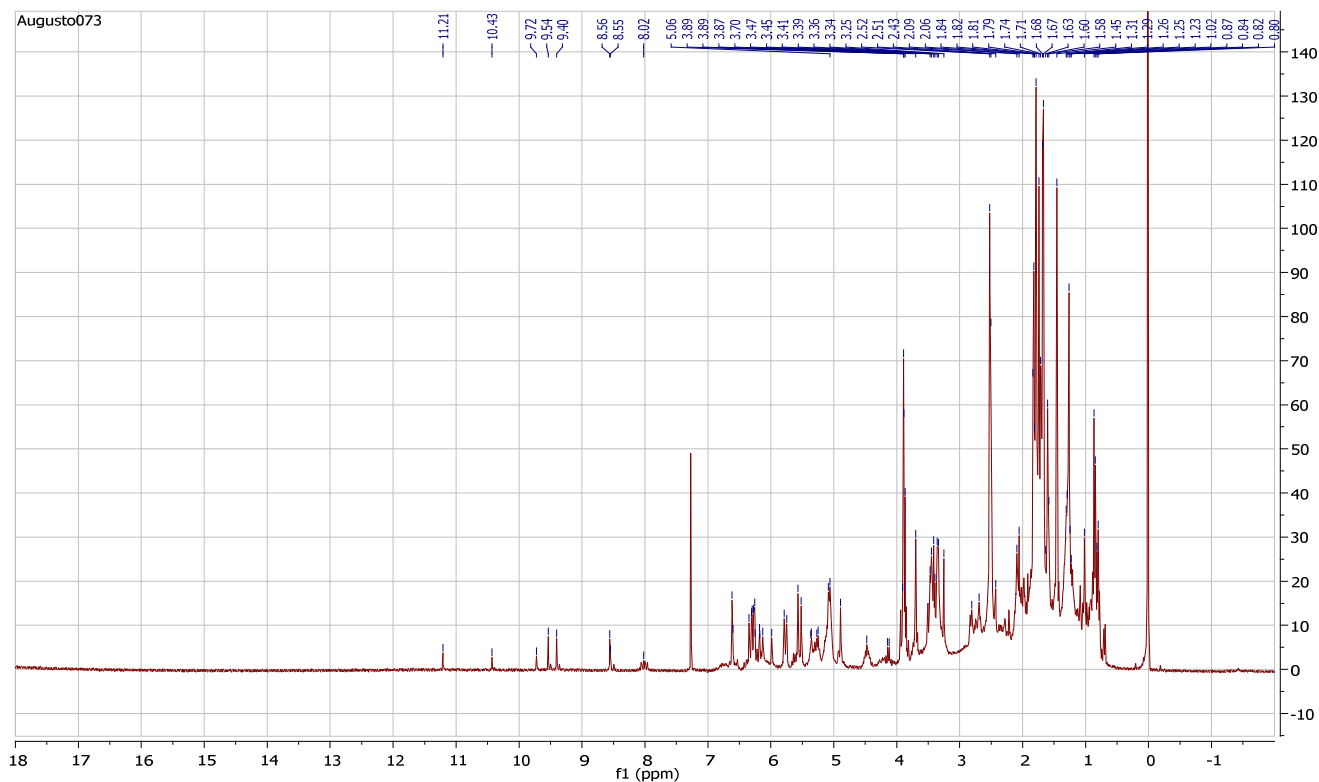


Figura 50 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 20 dias (CDCl_3 300 MHz)

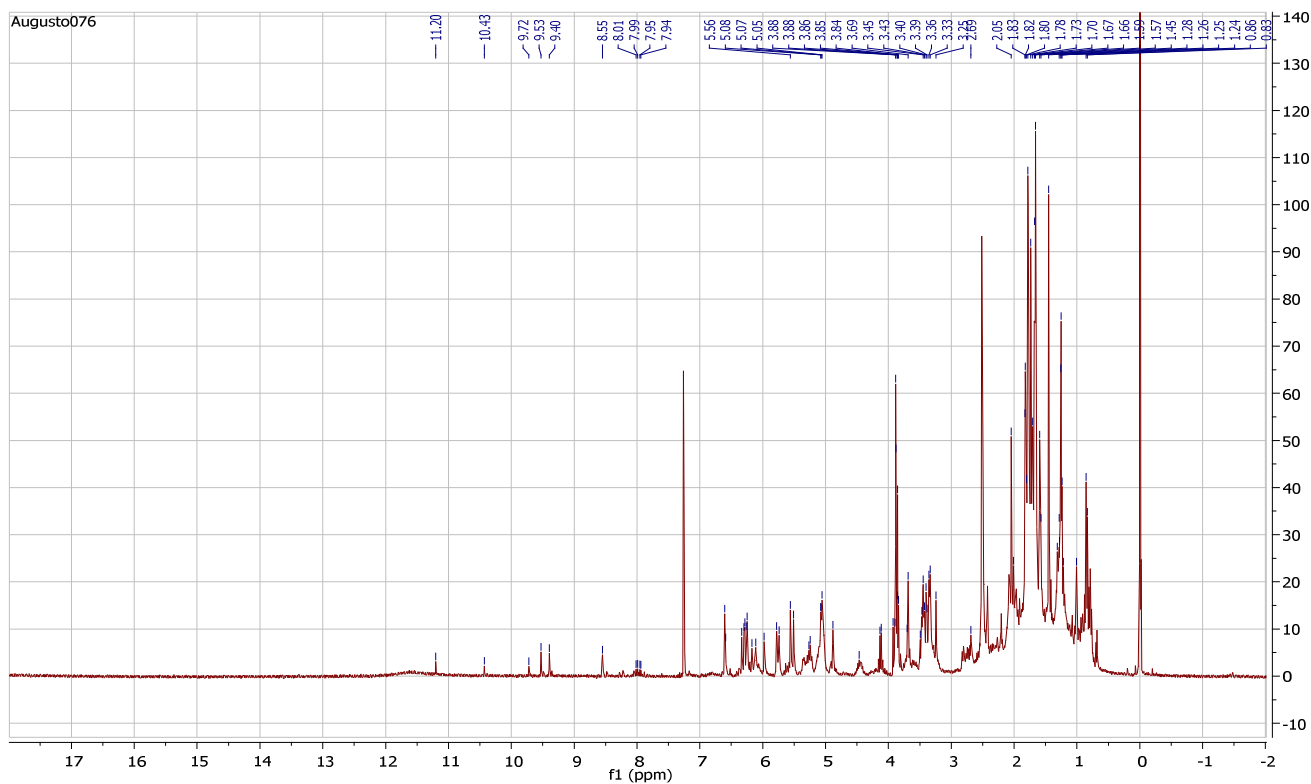


Figura 51 Espectro de RMN de ^1H da fase intermediária de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 30 dias (CDCl_3 300 MHz)

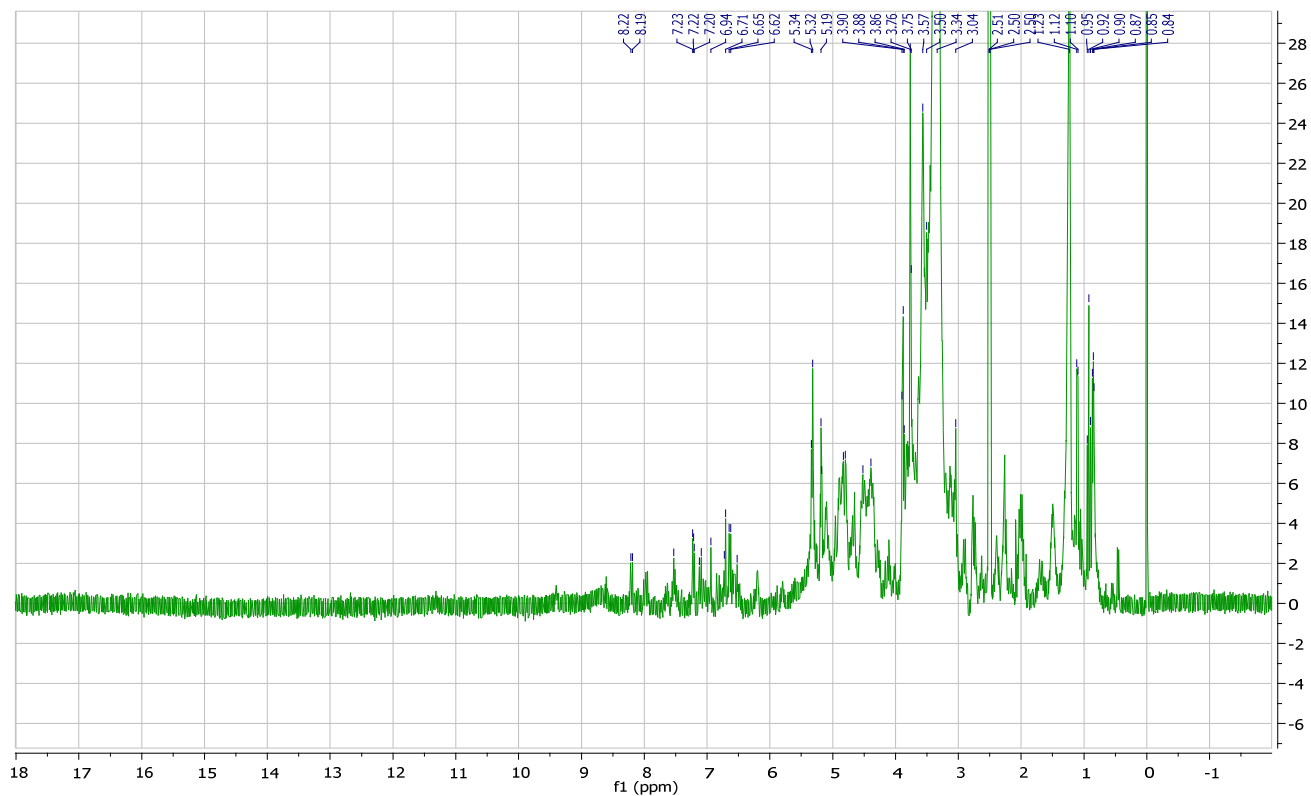


Figura 52 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de *P. obtusifolia* após 10 dias de predação (DMSO , 300 MHz)

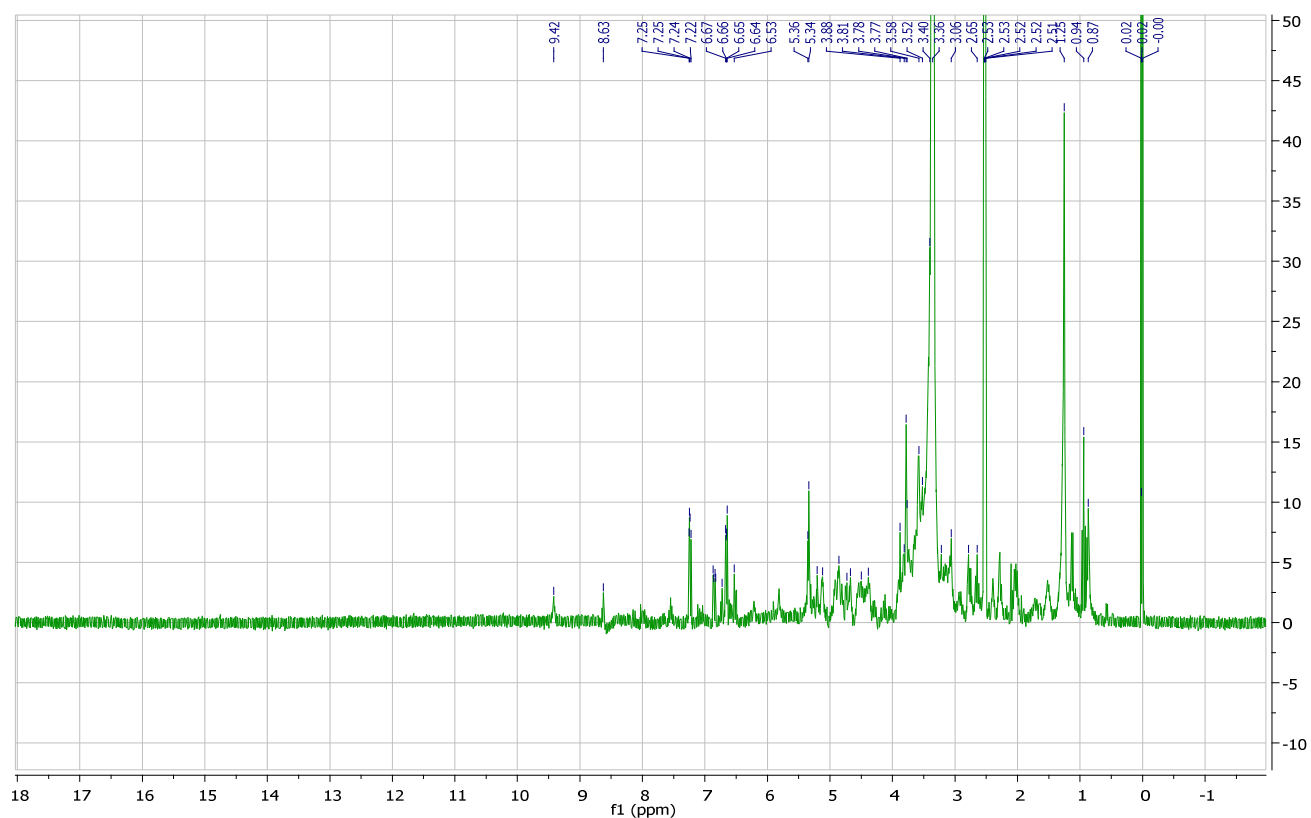


Figura 53 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de *P. obtusifolia* após 20 dias de predação (DMSO, 300 MHz)

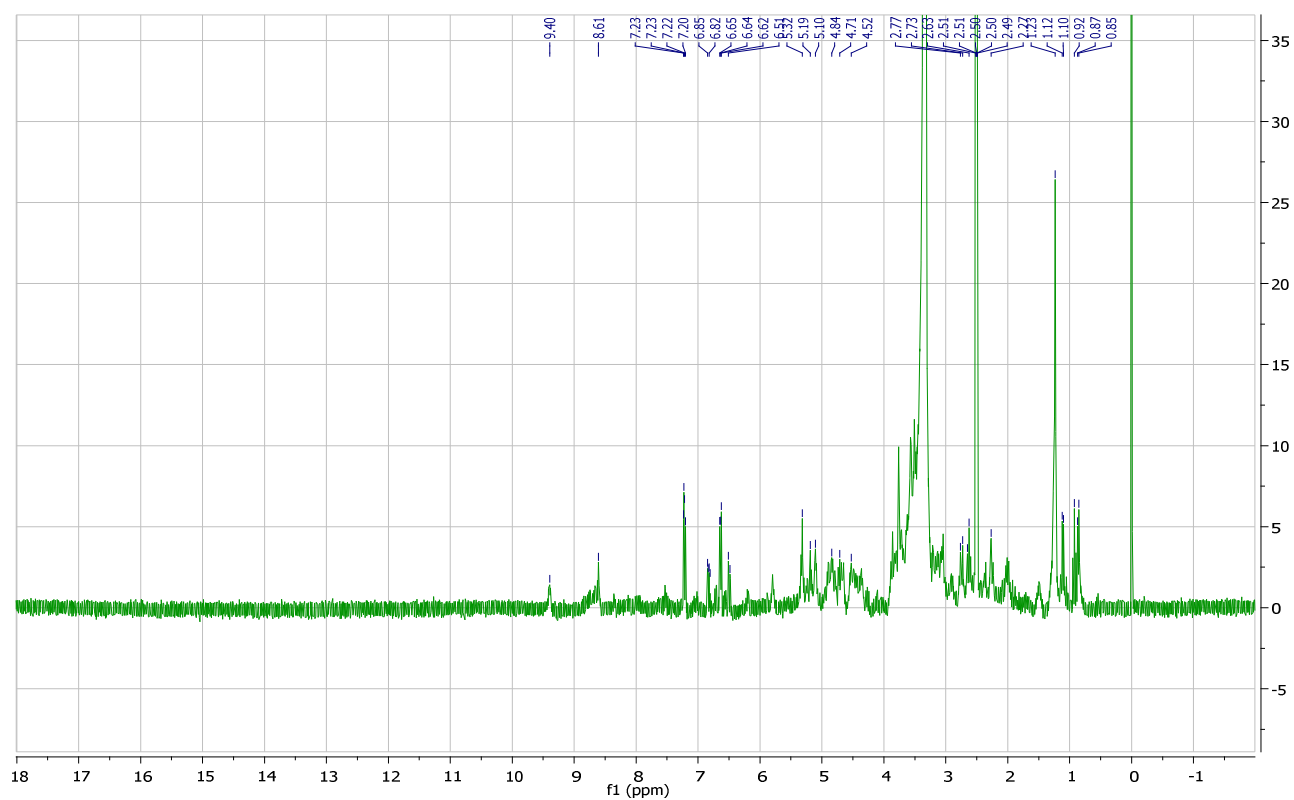


Figura 54 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de *P. obtusifolia* após 30 dias de predação (DMSO, 300 MHz)

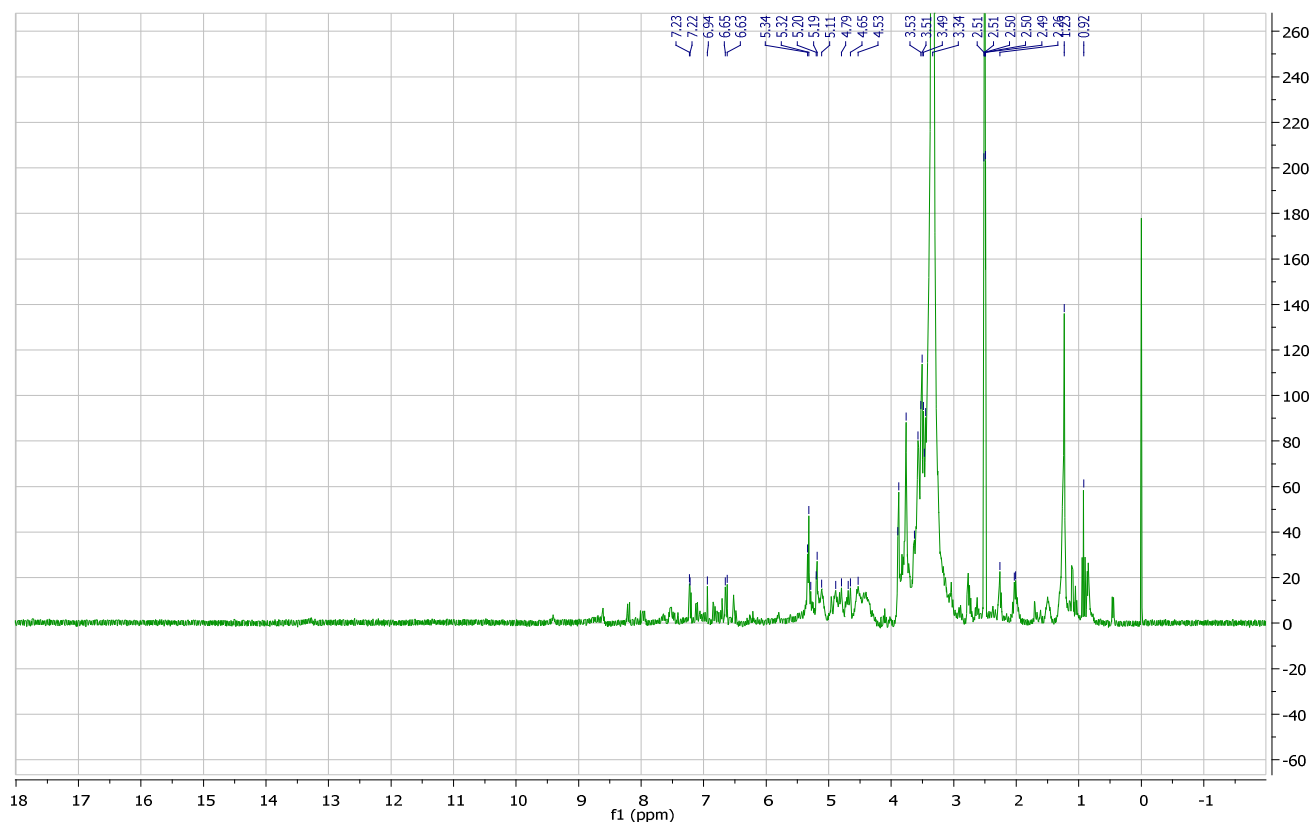


Figura 55 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 10 dias (DMSO, 300 MHz)

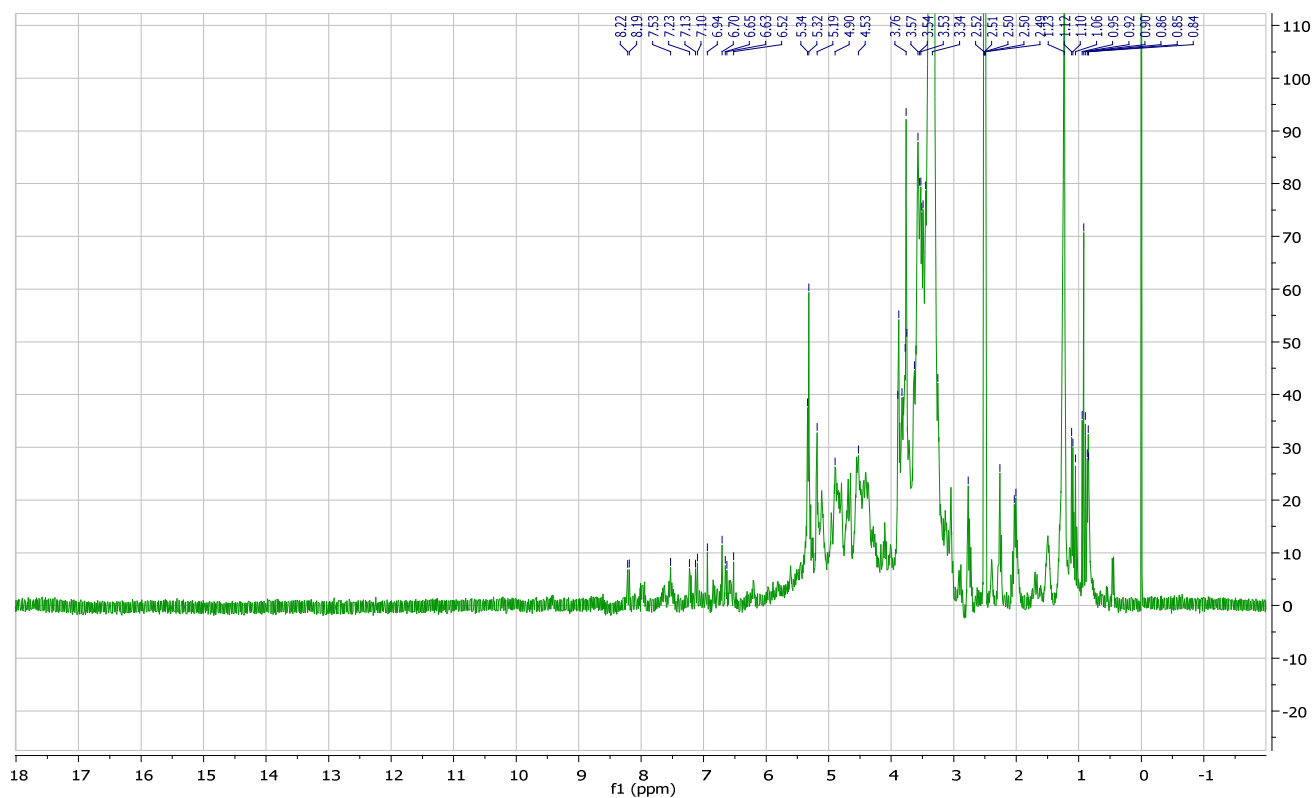


Figura 56 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 20 dias (DMSO, 300 MHz)

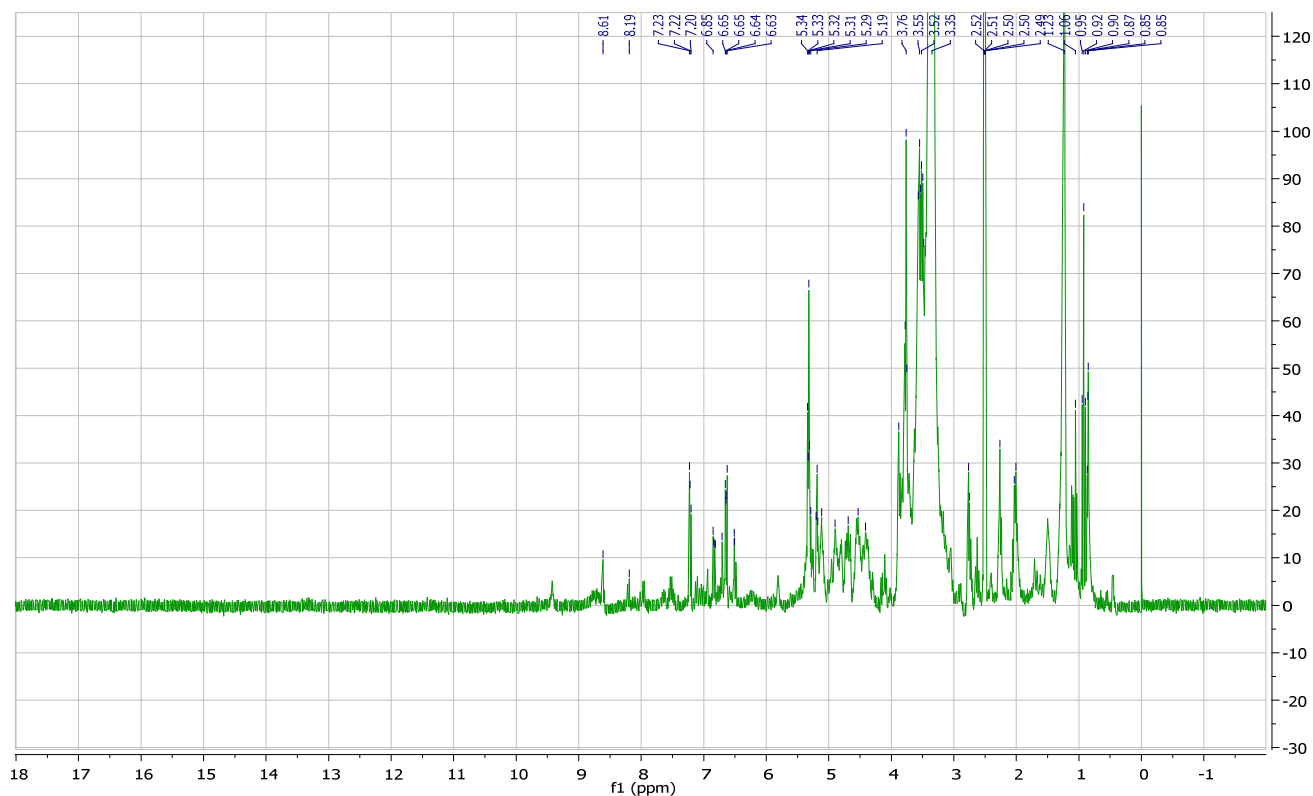


Figura 57 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de *P. obtusifolia* representando o controle interno após 30 dias (DMSO, 300 MHz)

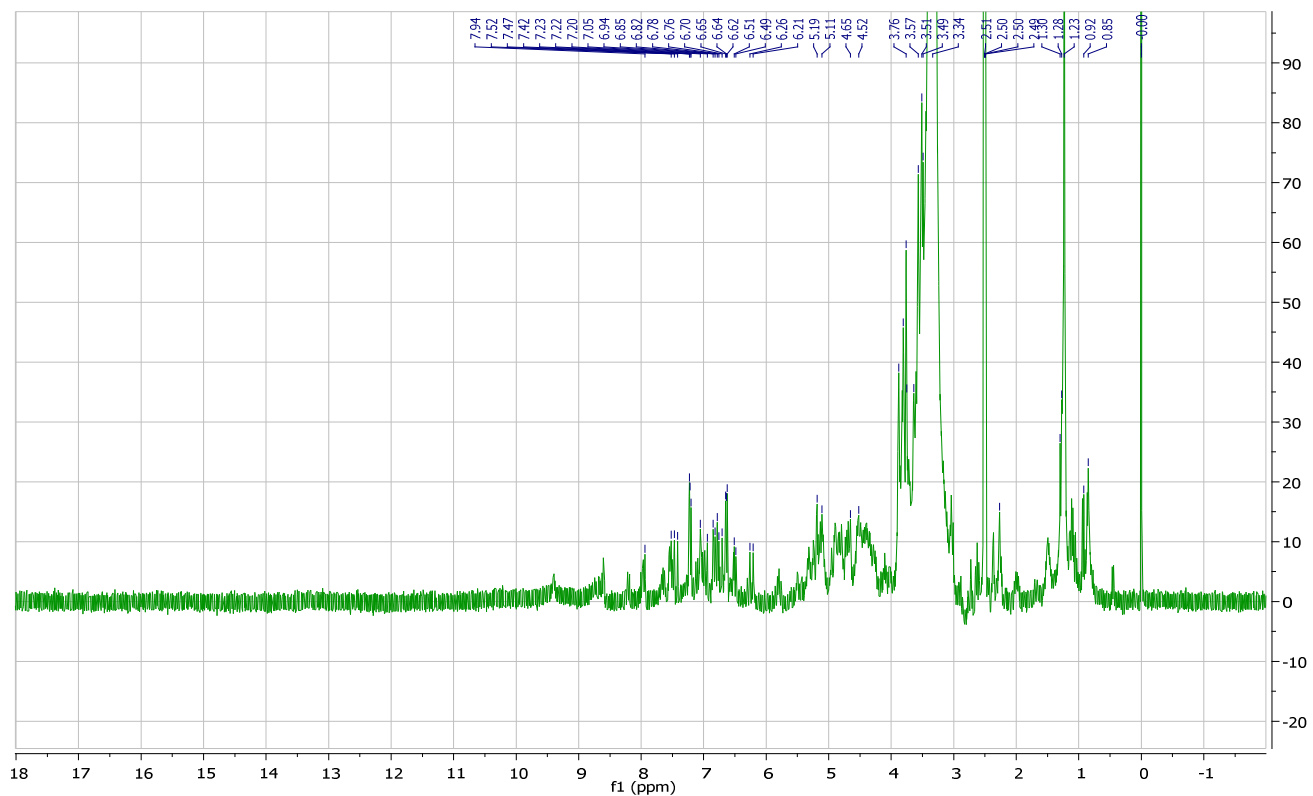


Figura 58 Espectro de RMN de ^1H da fase polar de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 10 dias (DMSO, 300 MHz)

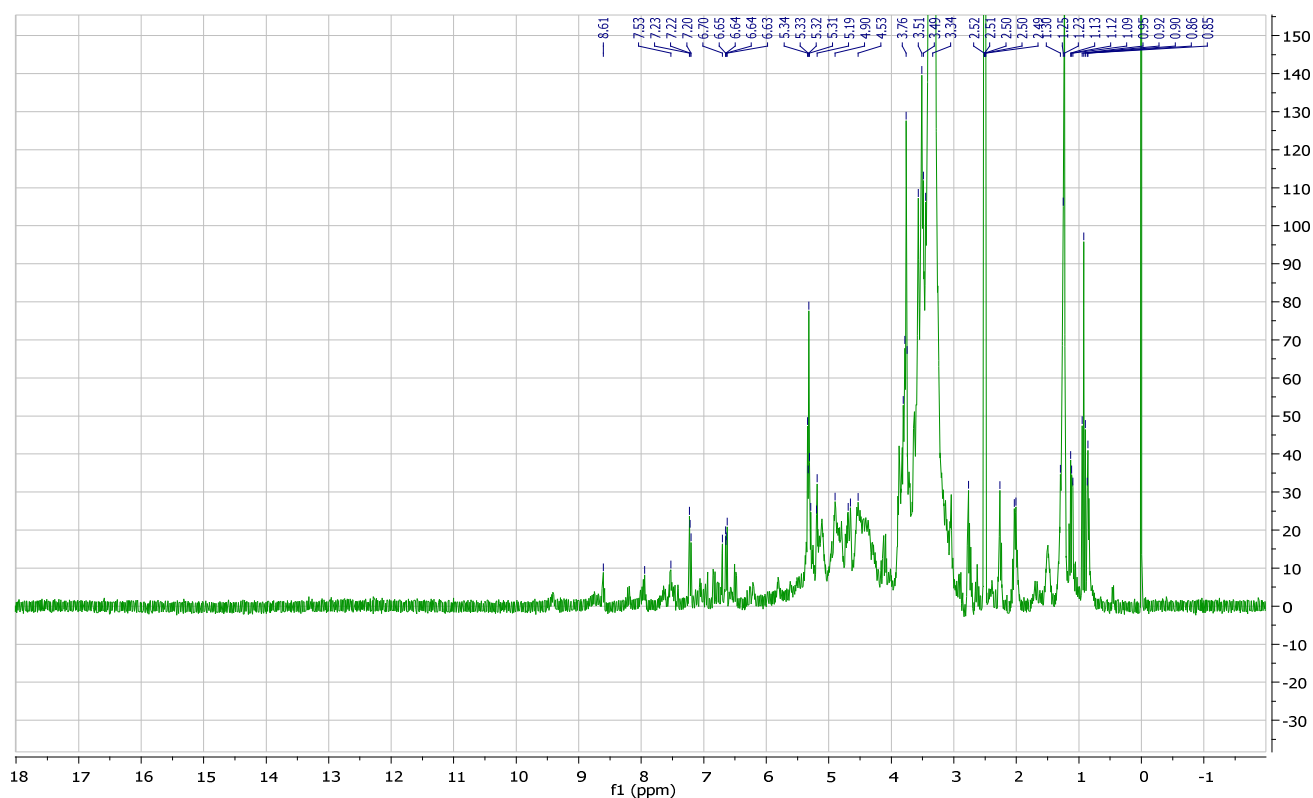


Figura 59 Espectro de RMN de ¹H da fase polar de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 20 dias (DMSO, 300 MHz)

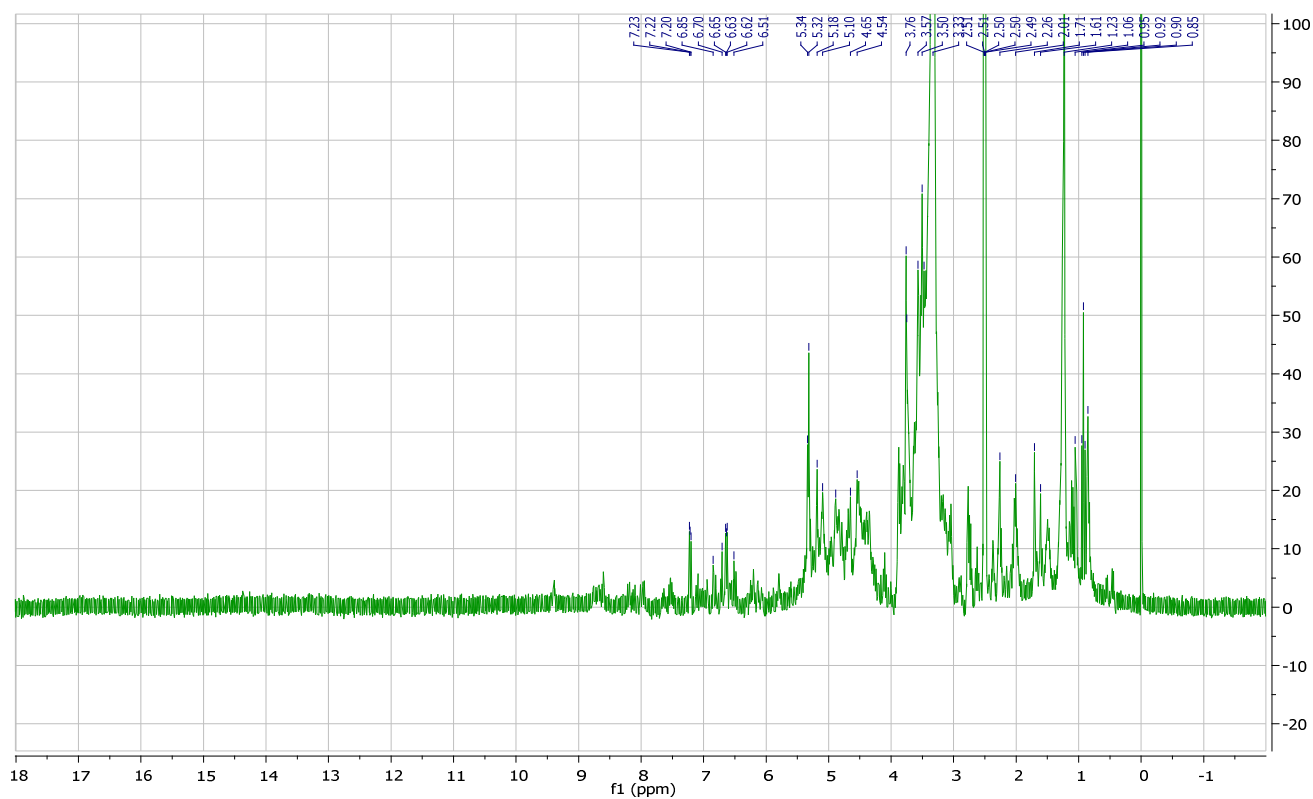


Figura 60 Espectro de RMN de ¹H da fase polar de *P. obtusifolia* representando o controle externo após 30 dias (DMSO, 300 MHz)

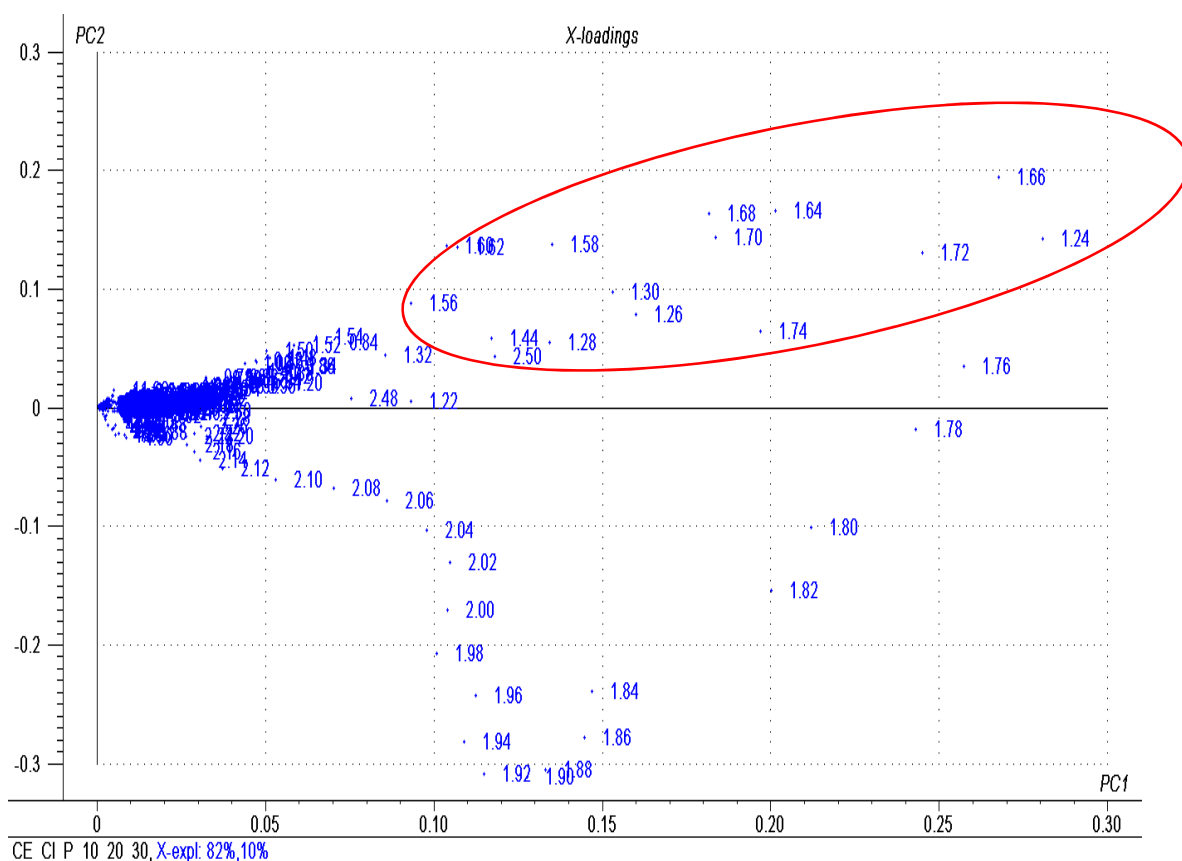
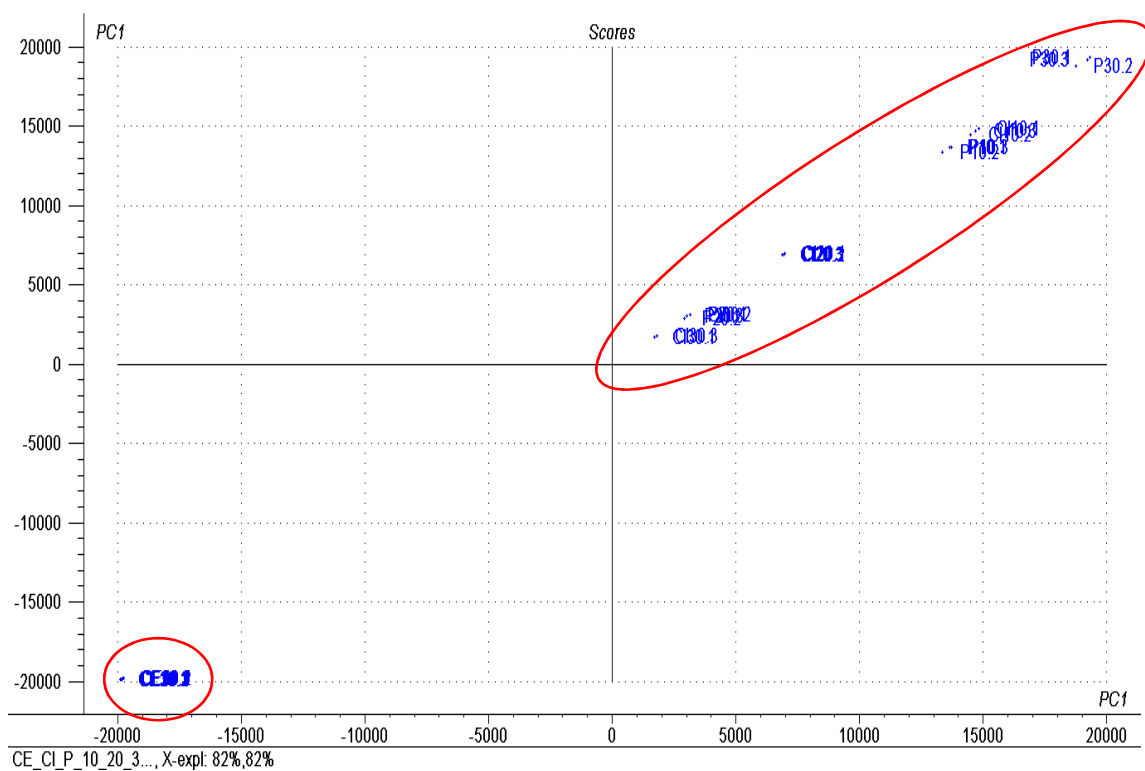


Figura 61 PCA (Dados não normalizados pela área) de todos os extratos brutos analisados por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação).

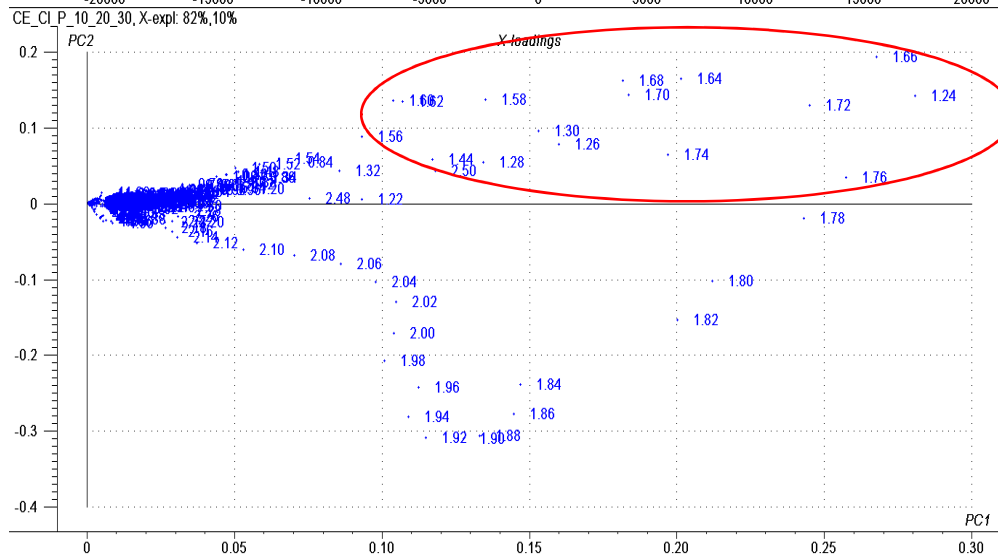


Figura 62 PCA (dados não normalizados pela área) de todos os extratos brutos analisados por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)

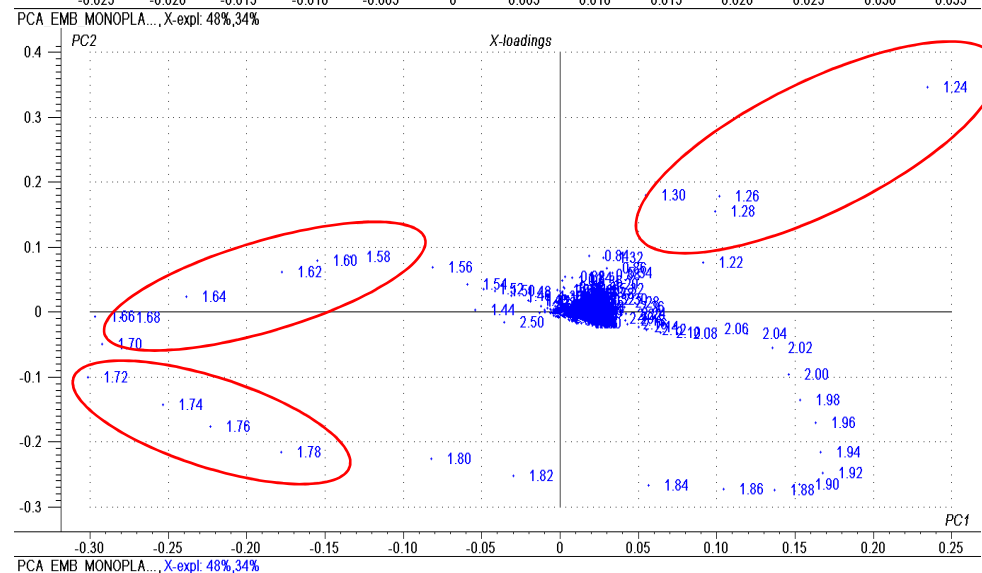
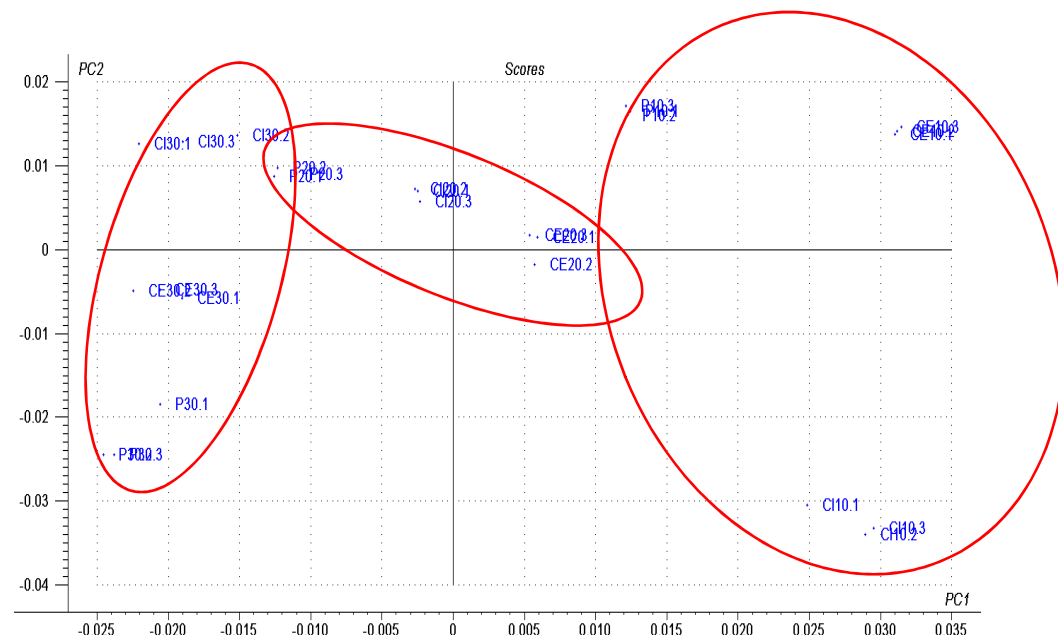
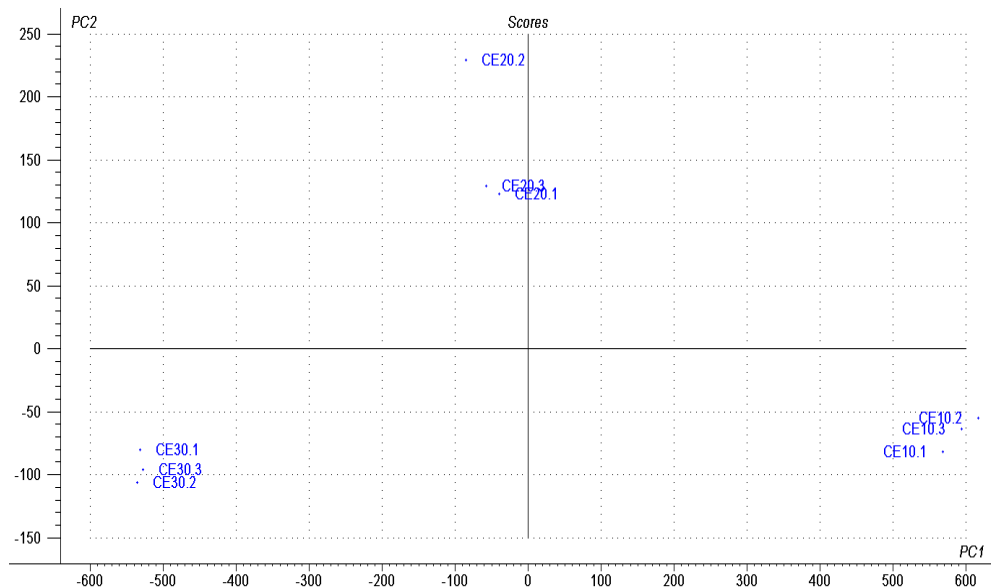
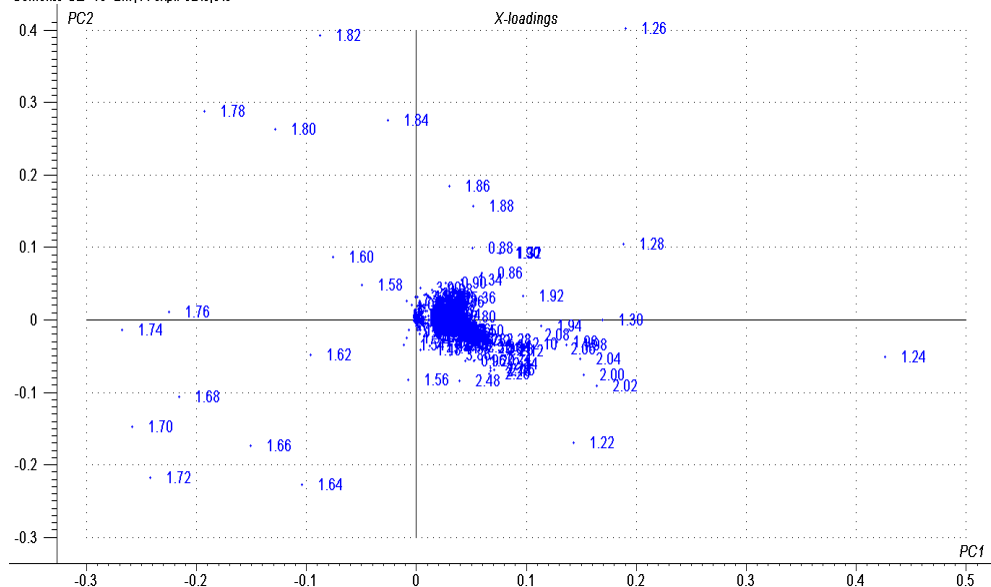


Figura 63 PCA (dados normalizados pela área) de todos os extratos brutos analisados por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)

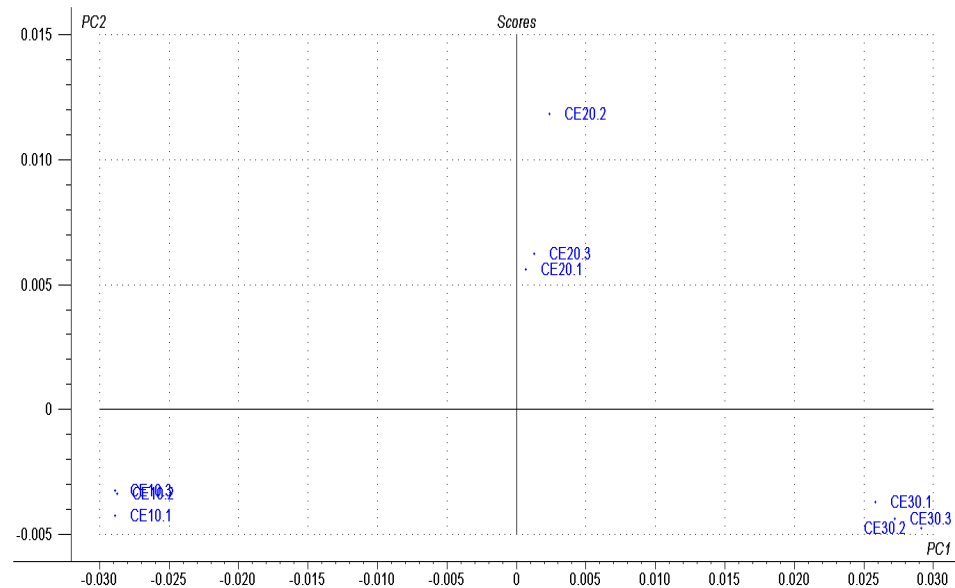


Somente CE_10_20..., X-expl: 92%,6%

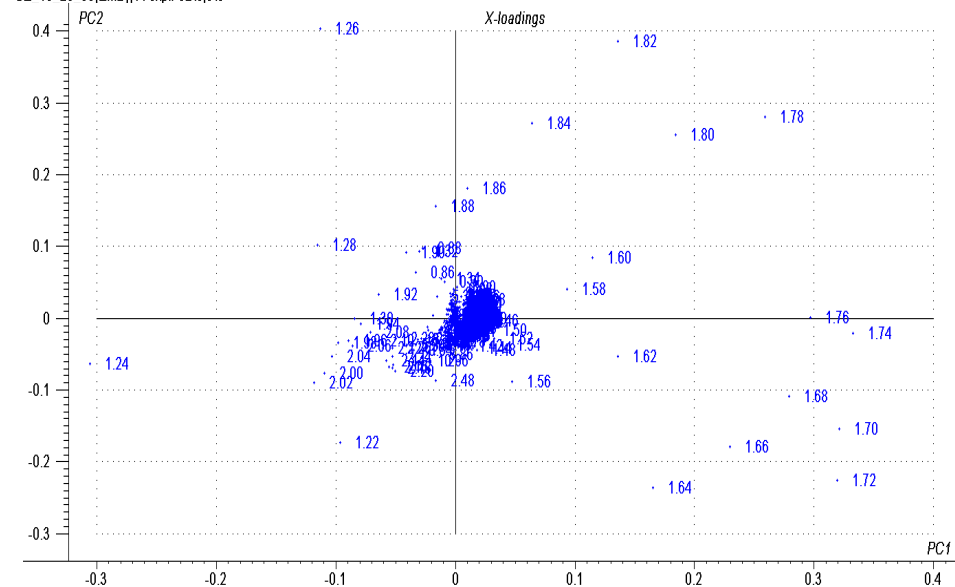


Somente CE_10_20..., X-expl: 92%,6%

Figura 64 PCA (dados não normalizados pela área) dos extratos brutos analisados por RMN ^1H , referentes apenas ao Controle Externo

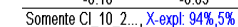
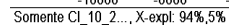


CE_10_20_30(EMB), X-expl: 92%,6%



CE_10_20_30(EMB), X-expl: 92%,6%

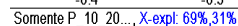
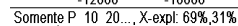
Figura 65 PCA (dados normalizados pela área) dos extratos brutos analisados por RMN ^1H , referentes apenas ao Controle Externo



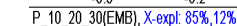
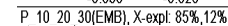
CI 10 20 30(EMB), X-expl: 91%,7%



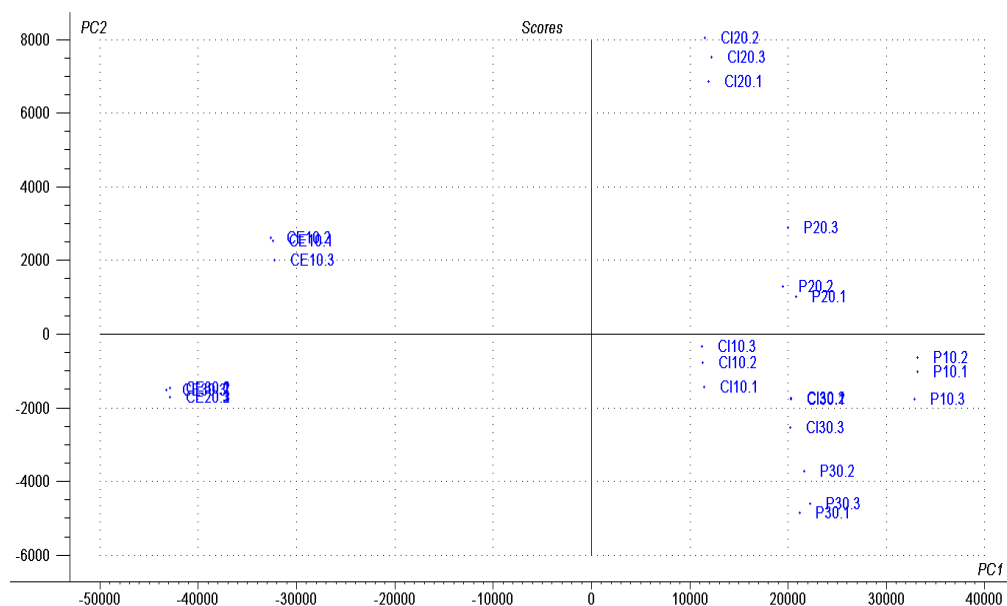
107



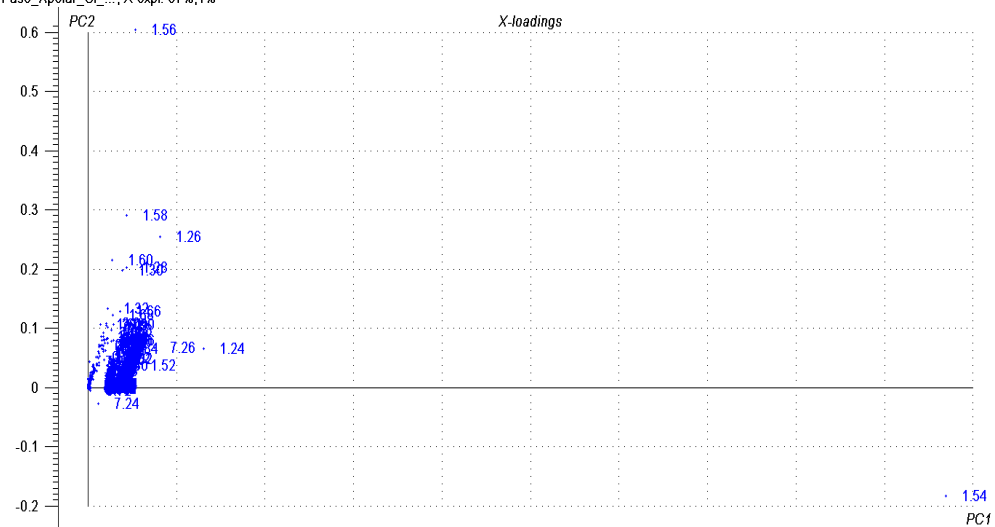
PCA plot showing scores for PC1 and PC2. The plot displays several points labeled P20.1, P20.2, P20.3, P30.1, P30.2, P30.3, P40.1, and P40.3. The x-axis is PC1 (ranging from -0.030 to 0.025) and the y-axis is PC2 (ranging from -0.010 to 0.015). A vertical line is drawn at PC1 = 0.



108

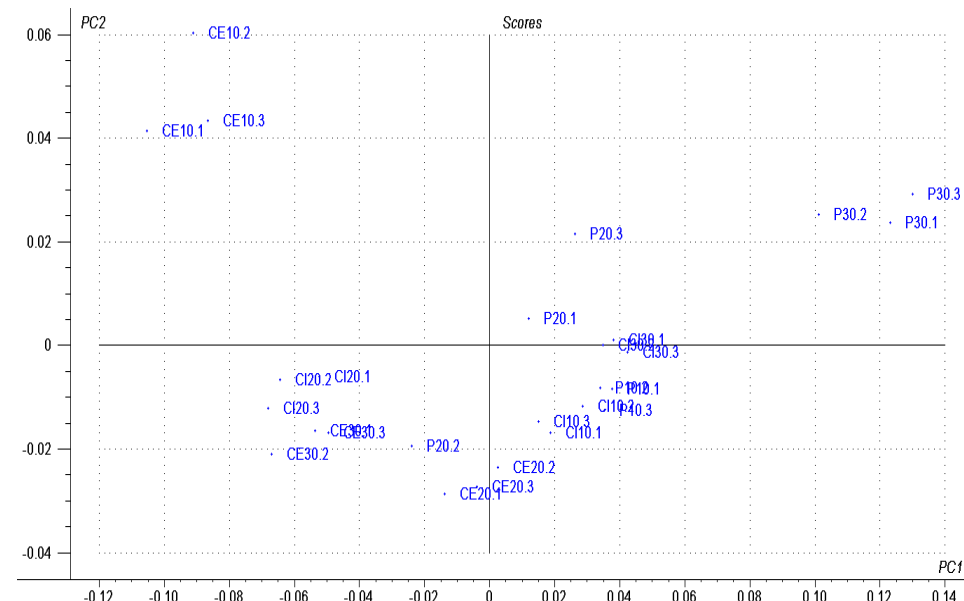


Fase_Apolar_CI..., X-expl: 97%,1%

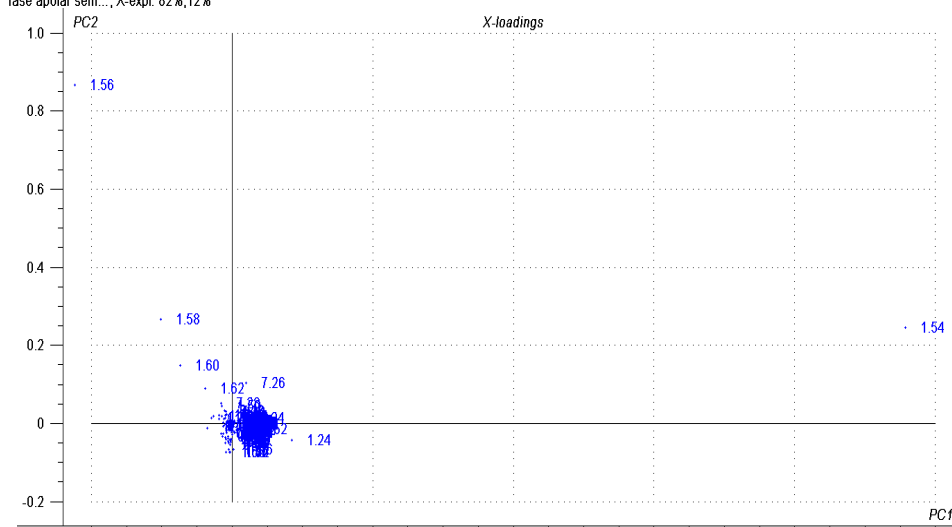


Fase_Apolar_CI..., X-expl: 97%,1%

Figura 70 PCA (dados não normalizados pela área) de todas as fases apolares analisadas por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)



fase apolar sem..., X-expl: 82%,12%



fase apolar sem..., X-expl: 82%,12%

Figura 71 PCA (dados normalizados pela área) de todas as fases apolares analisadas por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)

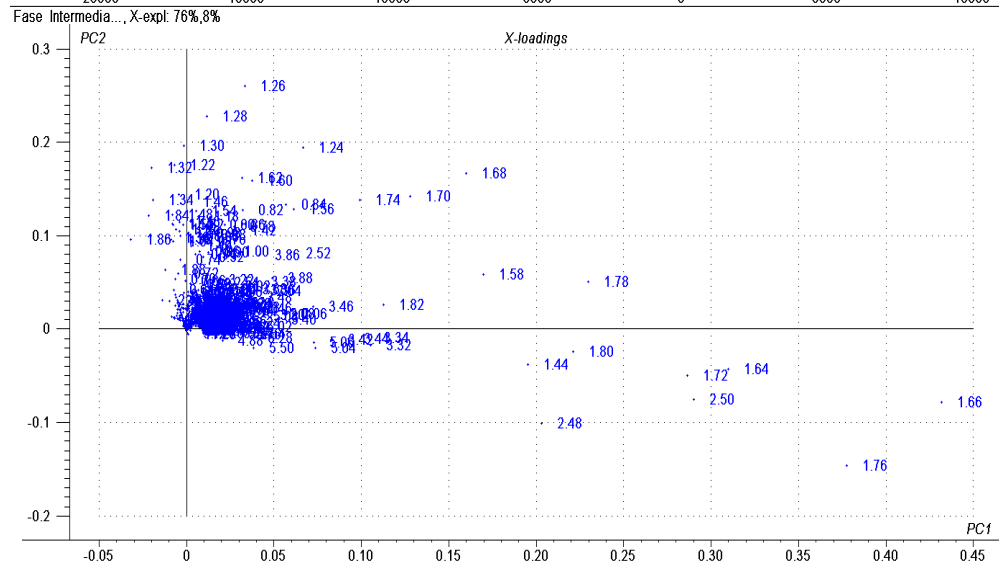
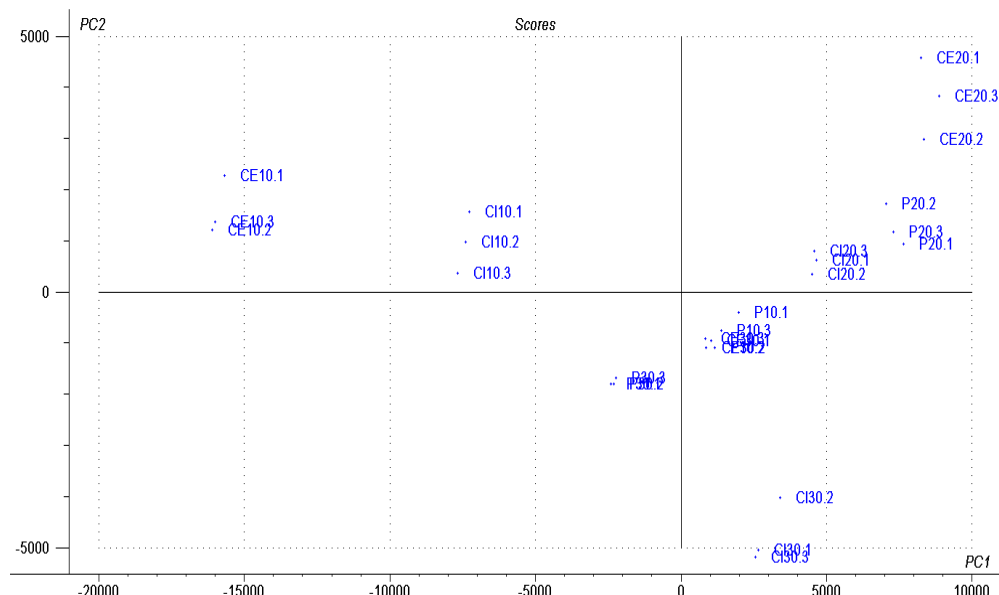


Figura 72 PCA (dados não normalizados pela área) de todas as fases intermediárias analisadas por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)

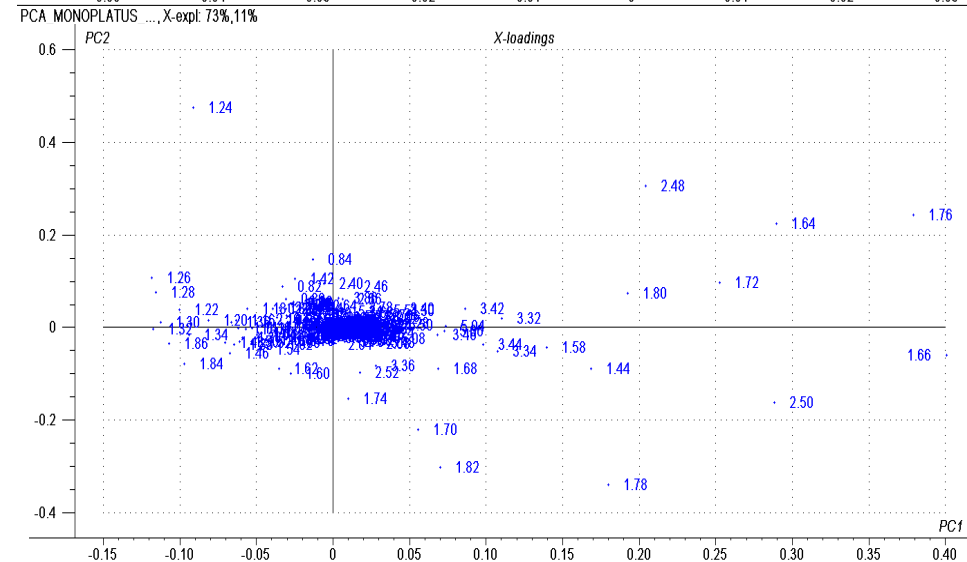
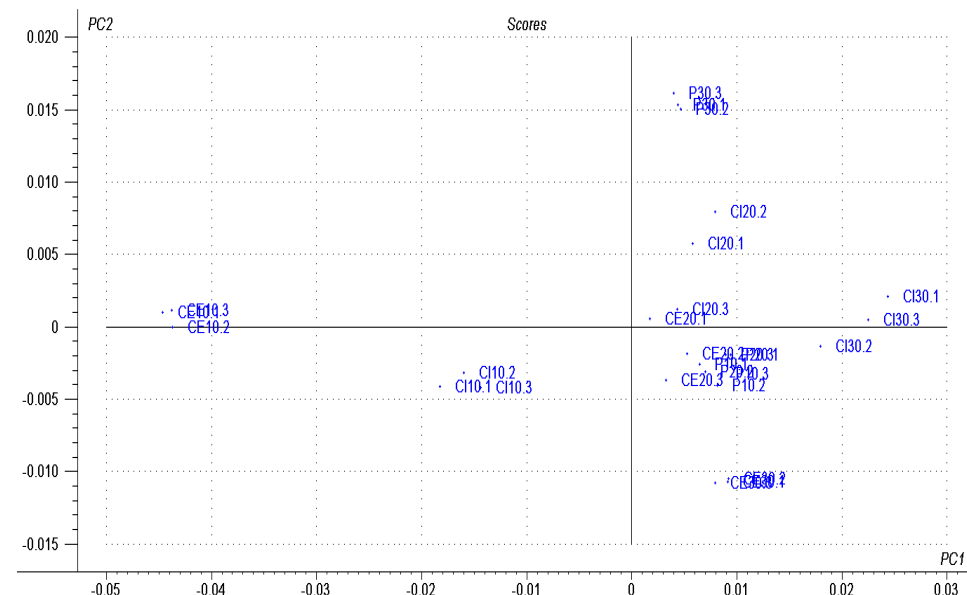


Figura 73 PCA (dados normalizados pela área) de todas as fases intermediárias analisadas por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)

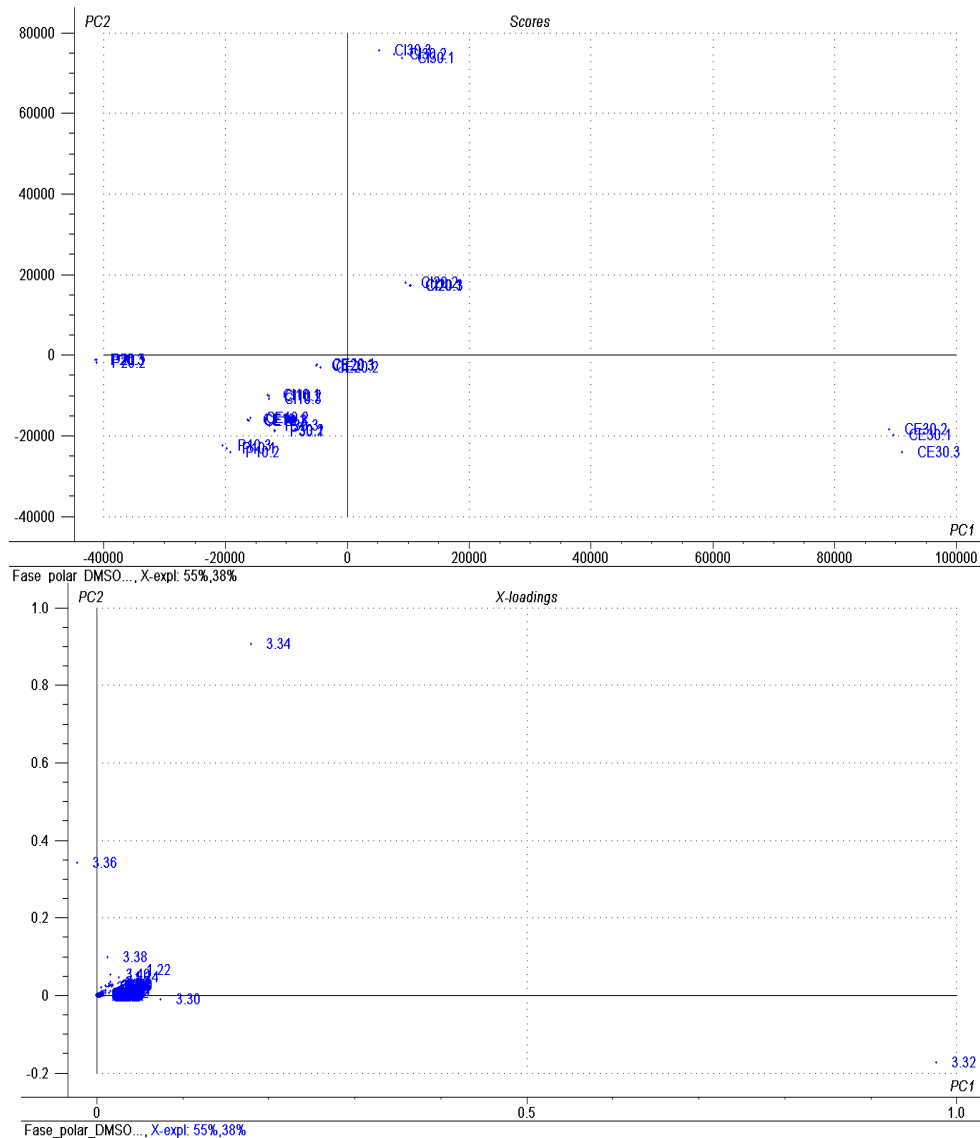


Figura 74 PCA (dados não normalizados pela área) de todas as fases polares analisadas por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)

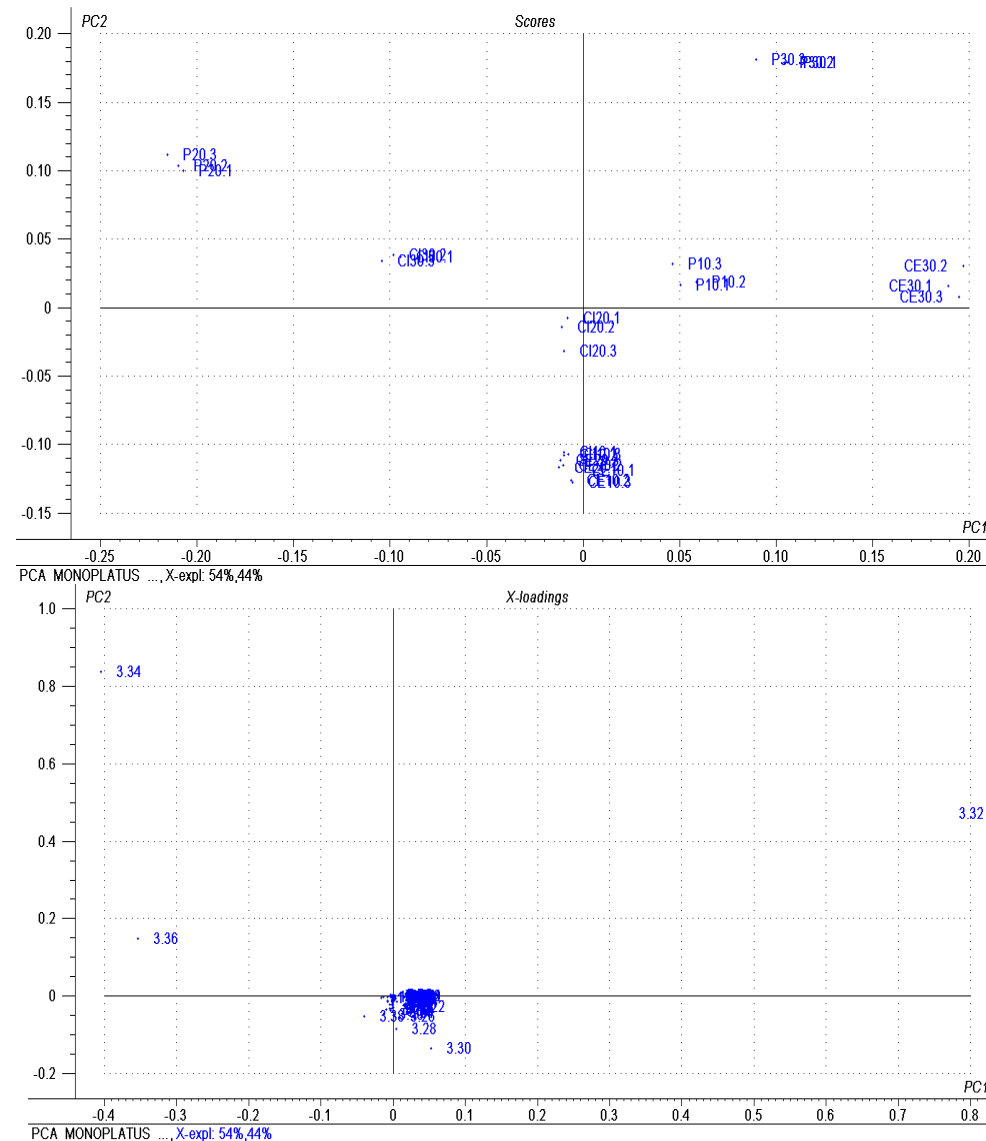


Figura 75 PCA (dados normalizados pela área) de todas as fases polares analisadas por RMN ^1H (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)

Decidiu-se então investigar mais profundamente por que o controle interno no vigésimo dia de experimento, estava respondendo de maneira semelhante ao grupo predado, mesmo sem estar sofrendo nenhum tipo de predação por parte do *Monoplatys* sp. Lançou-se então a hipótese de haver uma possível comunicação interplantas (planta predada com controle Interno), por meio de compostos voláteis, o que foi estudado por meio de cromatografia gasosa de *headspace* das folhas dos três grupos.

Ao analisar por CG de *headspace* a porcentagem relativa de terpenoides liberados (Tabela 6) pelos três grupos, nos três períodos de análise (10,20 e 30 dias), percebeu-se que houve um aumento significativo na porcentagem de α -pineno e β -pineno no grupo “predado” (Fig. 76) e “controle interno” (Fig. 77) em relação ao “controle externo” (Fig. 78), enquanto que o oposto aconteceu com os terpenos mirceno e limoneno. Este aumento ou diminuição da porcentagem de voláteis liberados, foi detectado já na primeira análise, aos 10 dias de tratamento, e os referidos níveis foram mantidos até a última análise, ocorrida no 30º dia. Os outros terpenos detectados como: β -ocimeno, terpinoleno, canfeno etc, não mostraram mudanças significativas em nenhum grupo durante os 30 dias de experimento.

5.3 Considerações finais

As diferenças entre os perfis do grupo “predado” e “controle externo”, ambos detectados por análise de CLAE, RMN e CG, indicam que foi acionado algum tipo de mecanismo de defesa ou reconfiguração metabólica por parte da planta atacada, o que foi demonstrado por CLAE, pelo aumento dos picos X Y e redução do pico Z (Fig. 22B), corroborados pelos dados de RMN analisados por PCA e por mudanças nos níveis de concentração de compostos fixos, como os cromenos e copostos voláteis liberados, caracterizado pelo aumento dos níveis de α -pineno e β -pineno e diminuição de limoneno e mirceno.

Além disso, a semelhança entre os perfis dos grupos “predado” e “controle interno” sugere que houve um tipo de comunicação entre eles, provavelmente através da mudança de seu *bouquet* de compostos voláteis emitidos do grupo “predado” para o “controle interno”, o que pode ter induzido o “controle interno” a se reconfigurar de maneira semelhante ao grupo “predado”, mesmo sem ter sofrido nenhum tipo de ataque por herbívoro.

Tempo	Compound	IK ^b	IK ^a	C.Externo 10 DIAS	C.Externo 20 DIAS	C.Externo 30 DIAS	C.Interno 10 dias	C.Interno 20 dias	C.Interno 30 dias	Predação 10 dias	Predação 20 dias	Predação 30 dias	Método de identificação
2.675	α-pineno	939	938	26.6±0.6	26.0±0.5	24.9±0.8	41.3±1.2	41.1±1.1	46.4±0.6	47.0±0.1	40.4±0.7	46.0±1.5	IR, EM, CI
2.784	Canfeno	954	954	6.2±0.6	5.4±0.2	6.1±0.3	5.2±0.4	4.6±0.2	6.8±0.7	5.9±0.3	4.0±0.7	4.4±0.2	IR, EM
3.042	β-pineno	979	979	0.3±0.1	0.5±0.2	0.4±0.2	1.8±0.1	8.5±0.3	4.6±0.2	6.1±0.3	20.5±1.0	8.2±0.6	IR, EM, CI
3.089	Mirceno	990	901	44.4±0.7	44.0±1.0	45.4±0.7	34.8±0.5	33.9±0.7	30.9±0.2	30.1±0.1	27.3±0.4	26.8±1.1	IR, EM, CI
3.265	α-terpineno	1017	1019	1.1±0.1	0.9±0.3	1.0±0.2	0.6±0.1	0.6±0.3	0.2±0.0	-	-	0.9±0.1	IR, EM, CI
3.319	O-cimeno	1026	1025	0.4±0.2	0.5±0.1	0.6±0.2	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	-	-	-	IR, EM
3.348	Limoneno	1030	1031	13.2±0.7	12.2±0.4	12.7±0.5	7.4±0.2	6.5±0.5	6.6±0.2	6.2±0.7	4.2±0.1	6.8±0.5	IR, EM, CI
3.409	Silvestreno	1032	1032	0.8±0.3	0.8±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.0	0.4±0.0	-	-	0.7±0.1	IR, EM
3.477	Z-β-ocimeno	1050	1052	3.3±0.8	4.2±0.2	3.9±0.6	4.0±0.3	2.3±0.4	2.0±0.5	2.5±0.3	1.8±0.3	4.0±0.4	IR, EM
3.55	E-β-ocimeno	1088	1090	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.0	0.6±0.2	0.7±0.3	0.8±0.1	1.1±0.2	0.9±0.1	1.1±0.2	IR, EM
3.748	Terpinoleno	1288	1289	2.4±0.3	2.3±0.2	2.1±0.4	1.5±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	-	-	-	IR, EM, CI
Total				99.2±0.4	97.3±0.8	98.2±0.9	98.0±1.0	98.9±0.5	98.8±0.7	98.9±0.3	98.6±0.5	98.8±0.4	

Tabela 6 Porcentagem relativa de terpenoides liberados pelas folhas dos grupos “predado” “controle interno” e “controle externo”.^a Índices de retenção calculados, baseado nos tempos de retenção comparados aos da série de n-alcenos em uma coluna capilar de 10 m do tipo Rxi-5ms ^b Índices de Kovat lineares retirados da literatura. IR: Índice de retenção; EM: espectro de massas; CI: co-injeção com padrões autênticos.

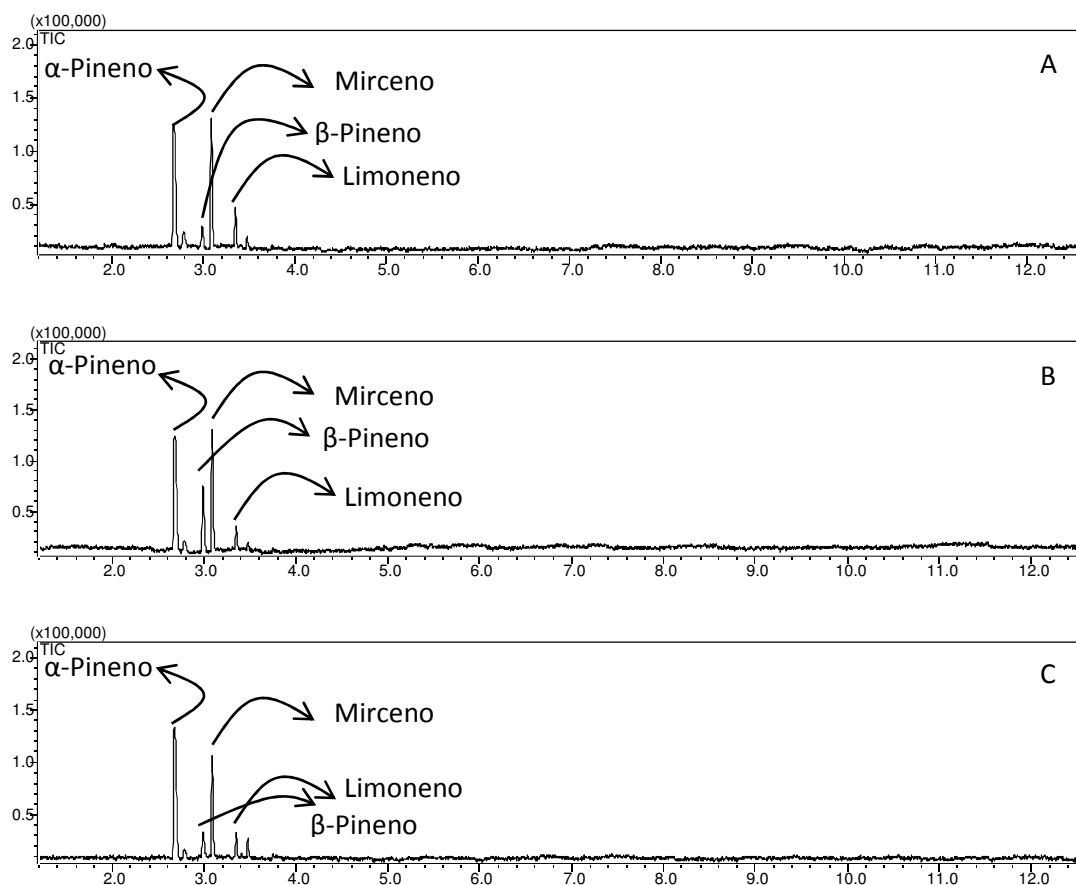


Figura 76 Perfil cromatográfico dos voláteis liberados por *P. obtusifolia* após 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C) de predação

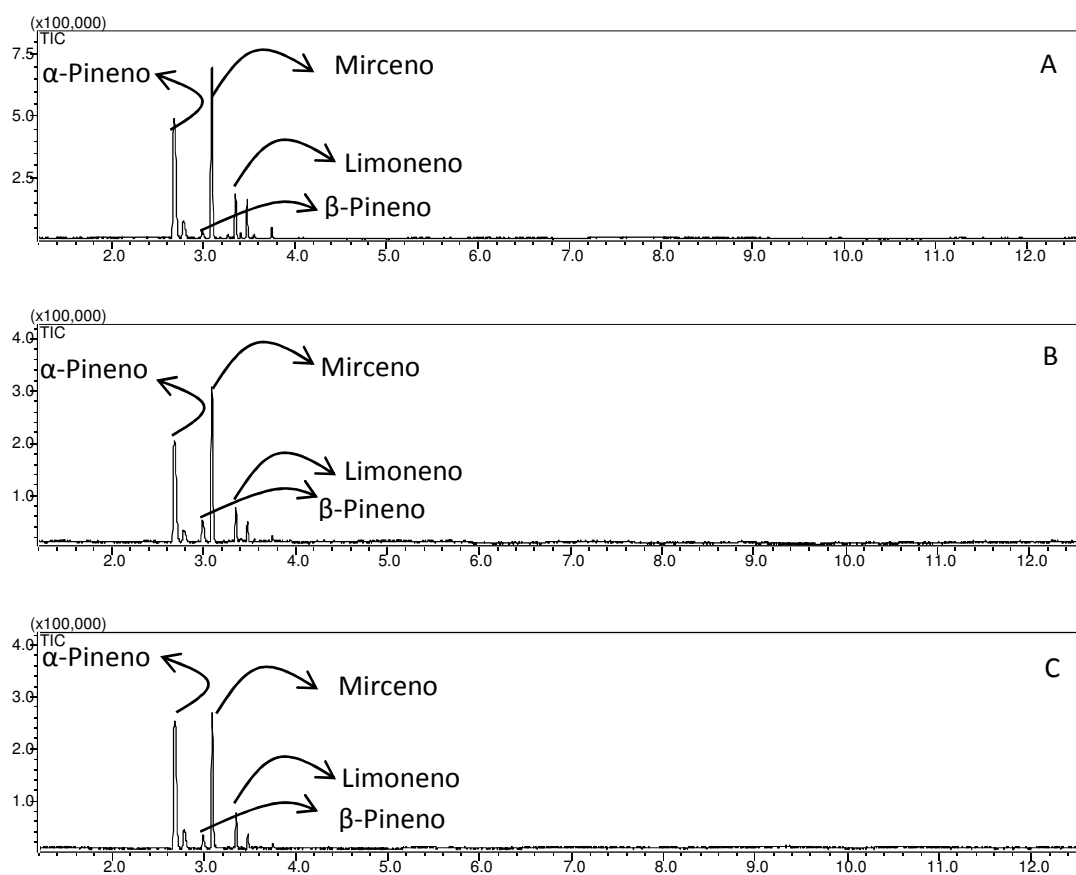


Figura 77 Perfil cromatográfico dos voláteis liberados por *P. obtusifolia* representando o “controle interno” após 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C)

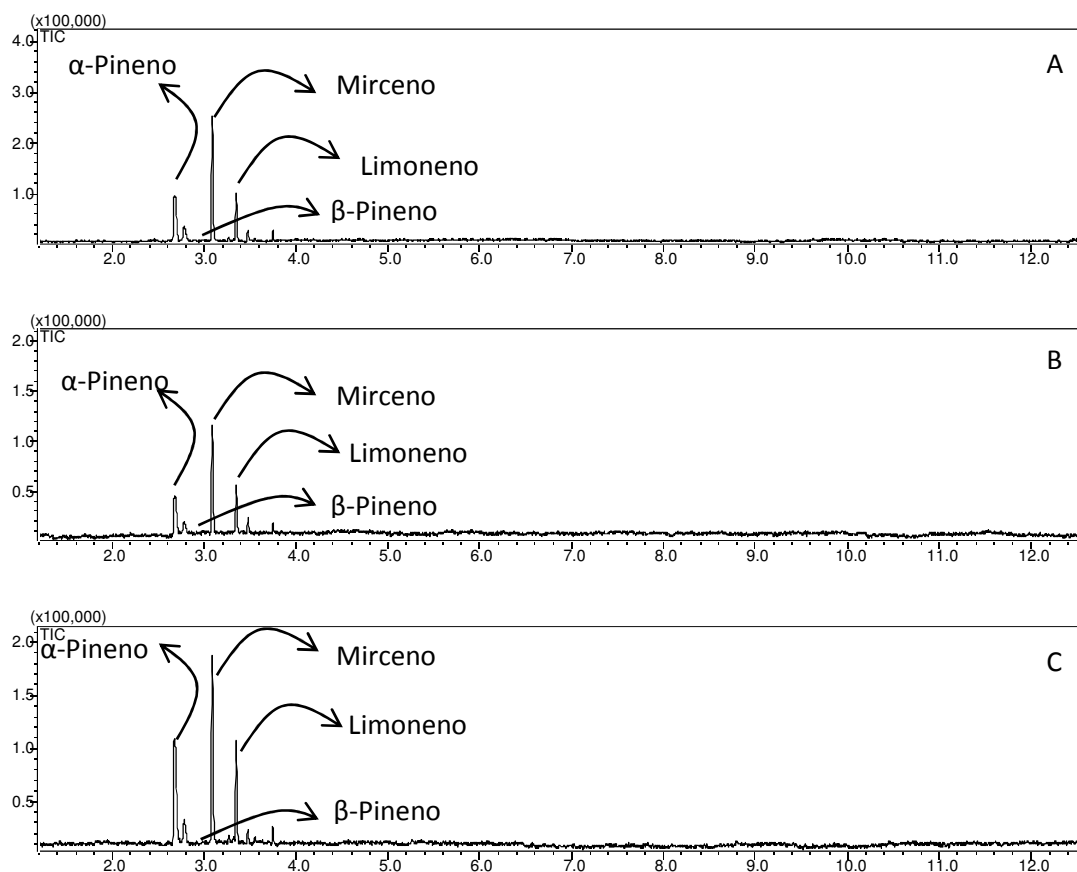


Figura 78 Perfil cromatográfico dos voláteis liberados por *P. obtusifolia* representando o “controle externo” após 10 dias(A), 20 dias (B) e 30 dias (C)

Outra observação importante pode ser mencionada em relação aos picos X Y , do grupo “predado”, os quais, obtiveram o maior nível detectado no 20º dia (Fig. 22B) seguido de decréscimo no 30º dia, sugerindo assim, que o mecanismo de defesa da planta possui um ciclo com um período de tempo ainda não sabido ou que a planta simplesmente mudou sua estratégia de defesa, utilizando outros meios biosintéticos.

Estudos anteriores compararam a quantidade de voláteis liberados por folhas infestadas e não infestadas de feijão-lima. Nestes estudos foram realizadas análises de curto prazo, as quais indicaram um aumento de Z(3)hexenol (composto volátil de 6 carbonos) após 1 hora de ataque promovido por ácaros; além disso, um aumento na concentração de E(β)-ocimeno foi detectado após 24 horas de ataque (Arimura et al., 2000). Constatou-se também que folhas de feijão-lima, expressam genes relacionados à defesa como : PR-2 básico, SAMS, SAMDC e ACO após 24 horas de exposição à vapores de E(β)-ocimeno sintetizados (Arimura et al., 2002).

Diante destes resultados, pode-se concluir que, apesar de não ter sido detectada nenhuma mudança nos níveis de concentração de

Z(3)hexenol ou (β)-ocimeno, como descrito anteriormente por estudos de curto prazo, as mudanças observadas neste atual estudo, podem sugerir um mecanismo de defesa de longo prazo, representado pela emissão de um *bouquet* de voláteis de constituição diferente, o qual pode acionar seus vizinhos a se prepararem para um ataque iminente, induzindo-os a modificar seu metaboloma, prepará-los para reagir ao ataque, e assim, aumentar suas chances de sobrevivência.

6. Conclusões

- Através de estudos com três tipos de materiais botânicos da mesma espécie (material fresco, liofilizado e seco em estufa) definiu-se que o material botânico fresco foi o melhor indicado para ser utilizado no protocolo padrão para preparo das amostras de *Peperomia obtusifolia*.
- Por meio da análise de PCA dos dados de RMN das 4 variedades de *Peperomia obtusifolia*, pode-se perceber que apesar de pertencerem a mesma espécie, todas possuíam metabolomas diferentes entre si.
- A espectroscopia de RMN de ^1H aliada a análise de dados multivariada demonstrou ser uma ferramenta bastante útil na análise de *fingerprinting* metabólico de *P. obtusifolia* e suas variedades. Esta metodologia foi definida como uma análise modelo para diferenciar a *Peperomia obtusifolia* de suas variedades.
- O estudo sobre o estresse biótico provocado pelo besouro *Monoplatus* sp. sobre a planta em estudo, demonstrou por meio de técnicas analíticas como: CLAE, CLAE-EM, RMN, e HS-CG, que as plantas predadas respondiam ao estresse provocado, através de uma modificação ou reconfiguração metabólica, alterando assim a concentração dos compostos do seu metaboloma, como os cromenos por exemplo.
- Também foi verificado que não apenas as plantas predadas, como as plantas intactas que estavam no mesmo ambiente das plantas predadas, responderam de maneira semelhante ao grupo predado.
- Esta resposta das plantas intactas que estavam no mesmo ambiente das plantas predadas deve-se a um tipo de comunicação entre as plantas predadas e não predadas, cuja “mensagem” é passada por meio de um complexo *bouquet* de voláteis, o qual induz suas vizinhas a se prepararem para um possível ataque, melhorando a eficiência da resposta e deste modo, aumentar suas chances de sobrevivência.
- Foi detectado por meio de HS-CG, que o *bouquet* de voláteis das plantas predadas, possuía um teor diferente do padrão (chamado neste estudo de “controle externo”), caracterizado por uma menor concentração de limoneno e mirceno e uma maior concentração de α -pineno e β -pineno, configurando possivelmente a “mensagem” que induzia seus vizinhos a modificar seu metaboloma.

7 Perspectivas

- Isolar e identificar os principais compostos envolvidos na mudança do metaboloma de *Peperomia obtusifolia*, assim como, o de suas variedades.
- Entender melhor o mecanismo de comunicação inter-plantas por meio de voláteis, e verificar se este tipo de comunicação segue um padrão em outras espécies.
- Descobrir quais são os genes responsáveis por mudar o perfil metabolômico de *Peperomia obtusifolia* após estresse biótico provocado.

Referências bibliográficas

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry, 4 ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Bouwmeester, H.J., 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science* 10, 594-602.
- Alborn, H.T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H., Tumlinson, J.H., 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276, 945-949.
- Allwood, J.W., Goodacre, R., 2009. An Introduction to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Instrumentation Applied in Plant Metabolomic Analyses. *Phytochemical Analysis* 21, 33-47.
- Arimura, G.-i., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W., Takabayashi, J., 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406, 512-515.
- Arimura, G., Huber, D.P.W., Bohlmann, J., 2004a. Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *Plant J.* 37, 603-616.
- Arimura, G., Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J., Bohlmann, J., 2004b. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 135, 1976-1983.
- Arimura, G., Ozawa, R., Nishioka, T., Boland, W., Koch, T., Kuhnemann, F., Takabayashi, J., 2002. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *Plant J.* 29, 87-98.
- Arrigoni-Blank, M.d.F., Dmitrieva, E.G., Franzotti, E.M., Antonioli, A.R., Andrade, M.r.R., Marchioro, M., 2004. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 91, 215-218.
- Baldwin, I.T., 1990. Herbivory simulations in ecological research. *Trends Ecol. Evol.* 5, 91-93.
- Batista, J.M., Batista, A.N.L., Kato, M.J., Bolzani, V.S., Lopez, S.N., Nafie, L.A., Furlan, M., 2012. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. *Tetrahedron Lett.* 53, 6051-6054.

Batista, J.M., Jr., Batista, A.N.L., Mota, J.S., Cass, Q.B., Kato, M.J., Bolzani, V.S., Freedman, T.B., Lopez, S.N., Furlan, M., Nafie, L.A., 2011. Structure Elucidation and Absolute Stereochemistry of Isomeric Monoterpene Chromane Esters. *Journal of Organic Chemistry* 76, 2603-2612.

Batista, J.M., Lopez, S.N., Mota, J.D., Vanzolini, K.L., Cass, Q.B., Rinaldo, D., Vilegas, W., Bolzani, V.D., Kato, M.J., Furlan, M., 2009. Resolution and absolute configuration assignment of a natural racemic chromane from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). *Chirality* 21, 799-801.

Becerra, J.X., 2007. The impact of herbivore-plant coevolution on plant community structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7483-7488.

Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* 127, 617-633.

Binneck, E., 2004. As ômicas: Integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 32, 28-37.

Bolwell, G.P., Wojtaszek, P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 347-366.

Bostock, R.M., 2005. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit, *Annual Review of Phytopathology. Annual Reviews*, Palo Alto, pp. 545-580.

Ceglarek, U., Leichtle, A., Bruegel, M., Kortz, L., Brauer, R., Bresler, K., Thiery, J., Fiedler, G.M., 2009. Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. *Molecular and Cellular Endocrinology* 301, 266-271.

Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., Solano, R., 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666-U664.

Choi, Y.H., Sertic, S., Kim, H.K., Wilson, E.G., Michopoulos, F., Lefeber, A.W.M., Erkelens, C., Kricun, S.D.P., Verpoorte, R., 2005. Classification of Ilex species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1237-1245.

De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson, J.H., 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410, 577-580.

Dicke, M., 1999. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomol. Exp. Appl.* 91, 131-142.

Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D., Posthumus, M.A., 1999. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *J. Chem. Ecol.* 25, 1907-1922.

- Dixon, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.
- Duportet, X., Aggio, R.B.M., Carneiro, S., Villas-Boas, S.G., 2011. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics* 8, 410-421.
- Ebrahim, S., Usha, K., Singh, B., 2011. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism, in: A.Méndez-Vilas (Ed.), *Science against microbial pathogens:communicating current research and technological advances* Badajoz, pp. 1043-1054.
- Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H., 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1781-1785.
- Farmer, E.E., 2001. Surface-to-air signals. *Nature* 411, 854-856.
- Felippe, L.G., Baldoqui, D.C., Kato, M.J., Bolzani, V.D., Guimaraes, E.F., Cicarelli, R.M.B., Furlan, M., 2008. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry* 69, 445-450.
- Felton, G.W., Tumlinson, J.H., 2008. Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 457-463.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48, 155-171.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotech* 18, 1157-1161.
- Frederich, M., Jansen, C., de Tullio, P., Tits, M., Demoulin, V., Angenot, L., 2009. Metabolomic analysis of *Echinacea* spp. by ¹H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate data analysis technique. *Phytochemical Analysis* 21, 61-65.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grun, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K., Gierl, A., 1997. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277, 696-699.
- Fukusaki, E., Kobayashi, A., 2005. Plant metabolomics: potential for practical operation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100, 347-354.
- Gatehouse, J.A., 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol.* 156, 145-169.
- Gomi, K., Yamasaki, Y., Yamamoto, H., Akimitsu, K., 2003. Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C6-volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in Citrus. *J. Plant Physiol.* 160, 1219-1231.

- Gromova, M., Roby, C., 2010. Toward *Arabidopsis thaliana* hydrophilic metabolome: assessment of extraction methods and quantitative ^1H NMR. *Physiologia Plantarum* 140, 111-127.
- Guimarães, E.F., Costa, C.G., 1980. Nota sobre Piperaceae. *Novos Sinônimos. Rodriguésia*, 7-14.
- Halitschke, R., Schittko, U., Pohnert, G., Boland, W., Baldwin, I.T., 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiology* 125, 711-717.
- Heil, M., 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol.* 178, 41-61.
- Heil, M., Ton, J., 2008. Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science* 13, 264-272.
- Howe, G.A., Jander, G., 2008. Plant immunity to insect herbivores, *Annu. Rev. Plant Biol. Annual Reviews*, Palo Alto, pp. 41-66.
- Hummelbrunner, L.A., Isman, M.B., 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 715-720.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Karban, R., Baldwin, I.T., 1997. *Induced Responses to Insect Herbivory*. Univ. Chicago Press, Chicago.
- Kessler, A., Baldwin, I.T., 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291, 2141-2144.
- Kessler, A., Baldwin, I.T., 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 299-328.
- Kessler, A., Halitschke, R., Baldwin, I.T., 2004. Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defenses and insect populations. *Science* 305, 665-668.
- Kim, H.K., Choi, Y.H., Erkelens, C., Lefeber, A.W.M., Verpoorte, R., 2005. Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using ^1H -NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53, 105-109.
- Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2011. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in Biotechnology* 29, 267-275.
- Kim, H.K., Verpoorte, R., 2009. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis* 21, 4-13.
- Kitamura, R.O.S., Romoff, P., Young, M.C.M., Kato, M.J., Lago, J.H.G., 2006. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). *Phytochemistry* 67, 2398-2402.

Kombrink, E., Somssich, I.E., 1997. Pathogenesis-Related Proteins and Plant Defense, Plant Relationships. Springer Berlin Heidelberg, pp. 107-128.

Kost, C., Heil, M., 2006. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology* 94, 619-628.

Koulman, A., Cao, M., Faville, M., Lane, G., Mace, W., Rasmussen, S., 2009a. Semi-quantitative and structural metabolic phenotyping by direct infusion ion trap mass spectrometry and its application in genetical metabolomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 2253-2263.

Koulman, A., Lane, G.A., Harrison, S.J., Volmer, D.A., 2009b. From differentiating metabolites to biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 663-670.

Li, N., Wu, J.L., Hasegawa, T., Sakai, J., Wang, L.Y., Kakuta, S., Furuya, Y., Tomida, A., Tsuruo, T., Ando, M., 2006. Bioactive dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. *Journal of Natural Products* 69, 234-239.

Li, N., Wu, J.L., Xu, S., Zhang, G.L., Ando, M., Wang, M.W., 2008. Research Progress on Medicinal Plants of *Peperomia* genus, in: L.L.C, S.P. (Ed.), *Recent Progress in Medicinal Plants Phytopharmacology and Therapeutic Values II*, pp. 419-431.

Lopez, S.N., Lopes, A.A., Batista, J.M., Flausino, O., Bolzani, V.D., Kato, M.J., Furlan, M., 2010. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). *Bioresour. Technol.* 101, 4251-4260.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarum, 512.

Maffei, M., Bossi, S., Spiteller, D., Mithofer, A., Boland, W., 2004. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiology* 134, 1752-1762.

Maffei, M.E., Mithofer, A., Arimura, G.I., Uchtenhagen, H., Bossi, S., Berteaux, C.M., Cucuzza, L.S., Novero, M., Volpe, V., Quadro, S., Boland, W., 2006. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III. Membrane depolarization and involvement of hydrogen peroxide. *Plant Physiology* 140, 1022-1035.

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

Mattiacci, L., Dicke, M., Posthumus, M.A., 1995. Beta-glucosidase - An elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2036-2040.

- McCall, P.J., Turlings, T.C.J., Loughrin, J., Proveaux, A.T., Tumlinson, J.H., 1994. Herbivore-induced volatile emissions from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *J. Chem. Ecol.* 20, 3039-3050.
- Mewis, I., Appel, H.M., Hom, A., Raina, R., Schultz, J.C., 2005. Major signaling pathways modulate Arabidopsis glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiology* 138, 1149-1162.
- Milliken, W., 1997. Plants for Malaria, Plants for Fever: Medicinal species in Latin America. A bibliography survey. The Royal Botanic Gardens, 116.
- Mithofer, A., Boland, W., 2008. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiology* 146, 825-831.
- Mithofer, A., Wanner, G., Boland, W., 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiology* 137, 1160-1168.
- Moco, S., Vervoort, J., Bino, R.J., De Vos, R.C.H., Bino, R., 2007. Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 855-866.
- Monteiro, D., Guimarães, E.F., 2008. Flora do Parque Nacional de Itatiaia - Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). *Rodriguésia*, 161-195.
- Moreira, D.L., de Souza, P.O., Kaplan, M.A.C., Guimaraes, E.F., 1999. Essential oil analysis of four *Peperomia* species (Piperaceae), in: Caffini, N., Bernath, J., Craker, L., Jatisatienr, A., Gilberti, G. (Eds.), *Proceedings of the 2nd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants*. International Society Horticultural Science, Leuven 1, pp. 65-69.
- Mota, J.D., Leite, A.C., Kato, M.J., Young, M.C.M., Bolzani, V.D., Furlan, M., 2011. Isoswertisin flavones and other constituents from *Peperomia obtusifolia*. *Nat. Prod. Res.* 25, 1-7.
- Mota, J.d.S., Leite, A.C., Batista Junior, J.M., Lopez, S.N., Ambrosio, D.L., Passerini, G.D., Kato, M.J., Bolzani, V.d.S., Barretto Cicarelli, R.M., Furlan, M., 2009. In vitro trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. *Planta Medica* 75, 620-623.
- Mota, J.d.S., Pessoa, C.d.Ó., Bergamo, D.C.B., Silva, G.H., Kato, M.J., Young, M.C.M., Bolzan, V.d.S., Furlan, M., 2006. Estudo fitoquímico das folhas de *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). Avaliação das atividades antitumoral e antifúngica., 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia - São Paulo.
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., 2008. Systems biology - Metabonomics. *Nature* 455, 1054-1056.
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., Holmes, E., 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181-1189.

Orozco-Cardenas, M.L., Narvaez-Vasquez, J., Ryan, C.A., 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13, 179-191.

Orozco-Cardenas, M.L., Ryan, C.A., 2002. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiology* 130, 487-493.

Paiva, N.L., 2000. An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication. *J. Plant Growth Regul.* 19, 131-143.

Pare, P.W., Tumlinson, J.H., 1998. Cotton volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. *Phytochemistry* 47, 521-526.

Pare, P.W., Tumlinson, J.H., 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* 121, 325-331.

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

Paschold, A., Halitschke, R., Baldwin, I.T., 2006. Using 'mute' plants to translate volatile signals. *Plant J.* 45, 275-291.

Pechan, T., Ye, L.J., Chang, Y.M., Mitra, A., Lin, L., Davis, F.M., Williams, W.P., Luthe, D.S., 2000. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other lepidoptera. *Plant Cell* 12, 1031-1040.

Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M.P., Krishnamurthy, V., Dicke, M., Farmer, E.E., 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* 16, 3132-3147.

Reymond, P., Farmer, E.E., 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 404-411.

Rhodes, J.D., Thain, J.F., Wildon, D.C., 1999. Evidence for physically distinct systemic signalling pathways in the wounded tomato plant. *Ann. Bot.* 84, 109-116.

Robertson, D.G., 2005. Metabonomics in toxicology: A review. *Toxicological Sciences* 85, 809-822.

Ryan, D., Robards, K., 2006. Metabolomics: the greatest omics of them all? *Analytical Chemistry* 78, 7954-7958.

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

Schmelz, E.A., Carroll, M.J., LeClere, S., Phipps, S.M., Meredith, J., Chourey, P.S., Alborn, H.T., Teal, P.E.A., 2006. Fragments of ATP synthase mediate

plant perception of insect attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 8894-8899.

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

Shoenhoven, L., Jermy, T., van Loon, J., 1998. *Insect-Plant Biology: From Physiology to Evolution*. Chapman & Hall, London.

Singh, Y.N., 1992. KAVA - An overview. *Journal of Ethnopharmacology* 37, 13-45.

Staswick, P.E., 2008. JAZing up jasmonate signaling. *Trends in Plant Science* 13, 66-71.

Tanaka, T., Asai, F., Iinuma, M., 1998. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. *Phytochemistry* 49, 229-232.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G.H., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., Browse, J., 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661-U662.

Tian, D., Traw, M.B., Chen, J.Q., Kreitman, M., Bergelson, J., 2003. Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 423, 74-77.

Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., Lewis, W.J., 1990. Exploitation of herbivore-induced odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250, 1251-1253.

Tyagi, S., Raghvendra, Singh, U., Kalra, T., Munjal, K., 2010. Applications of metabolomics - a systematic study of the unique chemical fingerprints: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3, 83-86.

Vandendool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* 11, 463-471.

Veloza, L.S.M., Ferreira, M.J.P., Santos, M.I.S., Moreira, D.L., Guimarães, E.F., Emerenciano, V.P., Kaplan, M.A.C., 2009. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. *Fitoterapia* 80, 119-122.

Verpoorte, R., Choi, Y.H., Kim, H.K., 2009. Metabolomics: will it stay? *Phytochemical Analysis* 21, 2-3.

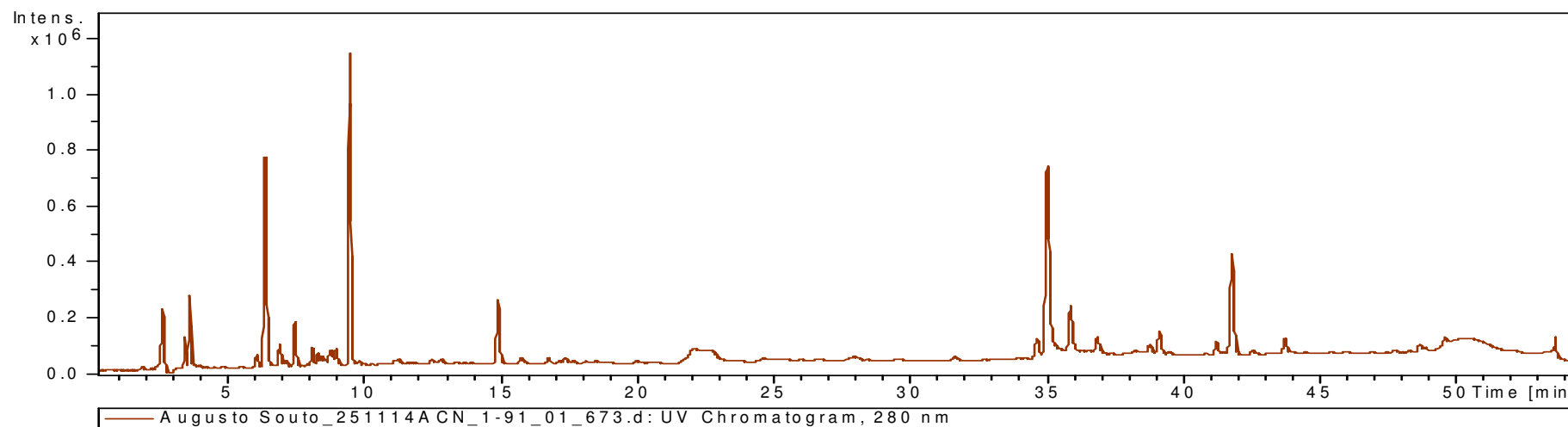
Verpoorte, R., Choi, Y.H., Kim, H.K., 2010. Metabolomics: what's new? *Flavour and Fragrance Journal* 25, 128-131.

Vuckovic, D., 2012. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 1523-1548.

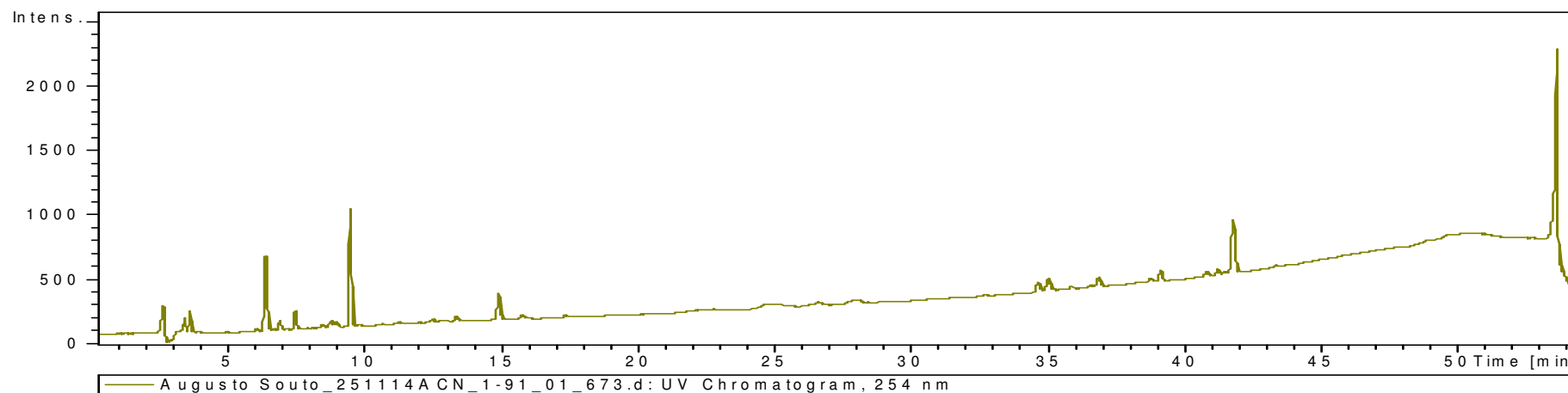
Walling, L.L., 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 19, 195-216.

- Wanke, S., Jaramillo, M.A., Borsch, T., Samain, M.S., Quandt, D., Neinhuis, C., 2007. Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 477-497.
- Wanke, S., Samain, M.S., Vanderschaeve, L., Mathieu, G., Goetghebeur, P., Neinhuis, C., 2006. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). *Plant Biol.* 8, 93-102.
- Wu, J.L., Li, N., Hasegawa, T., Sakai, J., Kakuta, S., Tang, W.X., Oka, S., Kiuchi, M., Ogura, H., Kataoka, T., Tomida, A., Tsuruo, T., Ando, M., 2005. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. *Journal of Natural Products* 68, 1656-1660.
- Wu, J.L., Li, N., Hasegawa, T., Sakai, J., Mitsui, T., Ogura, H., Kataoka, T., Oka, S., Kiuchi, M., Tomida, A., Tsuruo, T., Li, M.J., Tang, W.X., Ando, M., 2006. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. *Journal of Natural Products* 69, 790-794.
- Wu, J.Q., Baldwin, I.T., 2009. Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant Cell Environ.* 32, 1161-1174.
- Wu, J.Q., Hettenhausen, C., Meldau, S., Baldwin, I.T., 2007. Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell* 19, 1096-1122.
- Yuncker, T.G., 1974. The Piperaceae of Brazil-III: *Peperomia* taxa of uncertain status. *Hoehnea*, 71-413.
- Zavala, J.A., Patankar, A.G., Gase, K., Baldwin, I.T., 2004. Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1607-1612.

Apêndice A – Cromatogramas do extrato bruto de *P. obtusifolia* obtidos por LC-MS

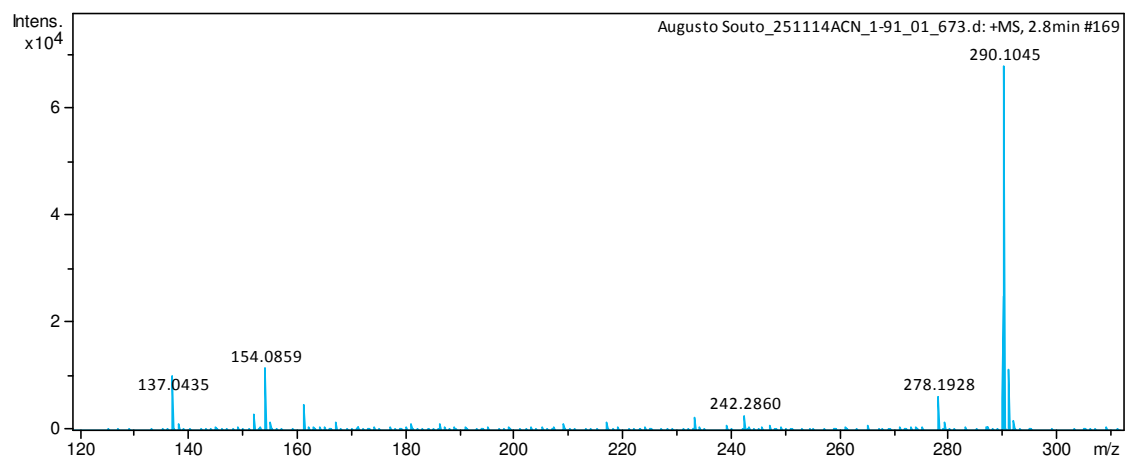


Cromatograma do extrato bruto de *Peperomia obtusifolia*, obtido pelo LC-MS (280 nm)

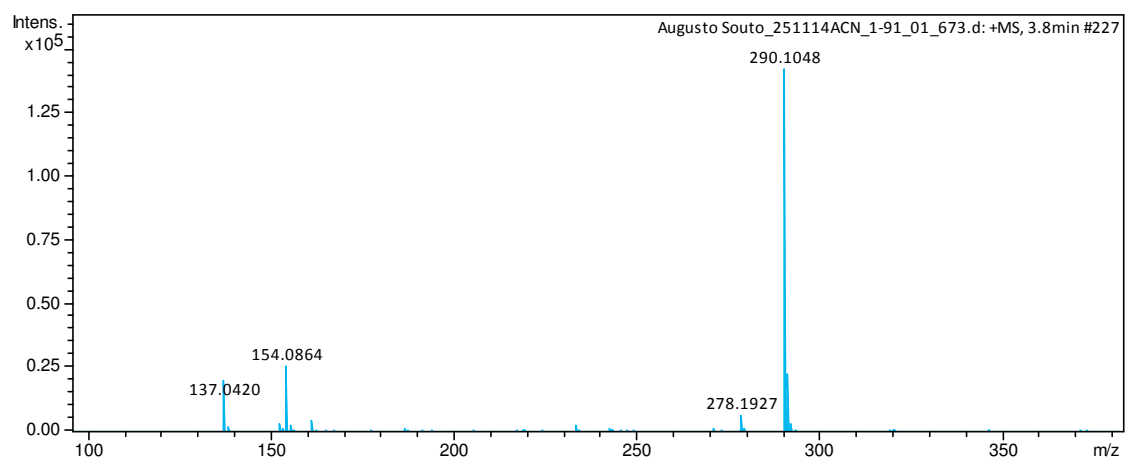


Cromatograma do extrato bruto de *Peperomia obtusifolia*, obtido pelo LC-MS (254nm)

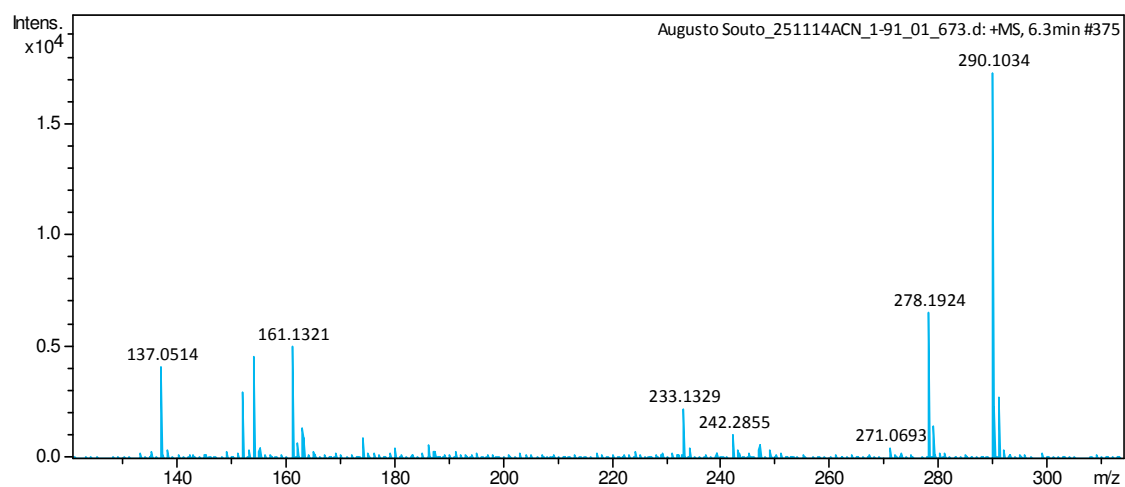
Apêndice B – Espectros de Massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* obtidos por LC-MS



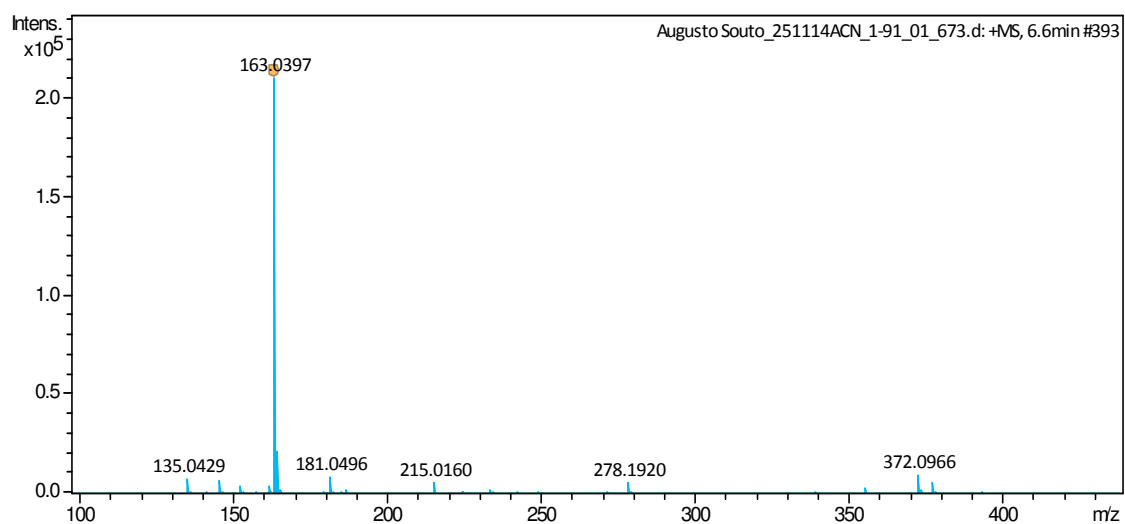
Espectro de massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* (RT=2.8 min, modo positivo)



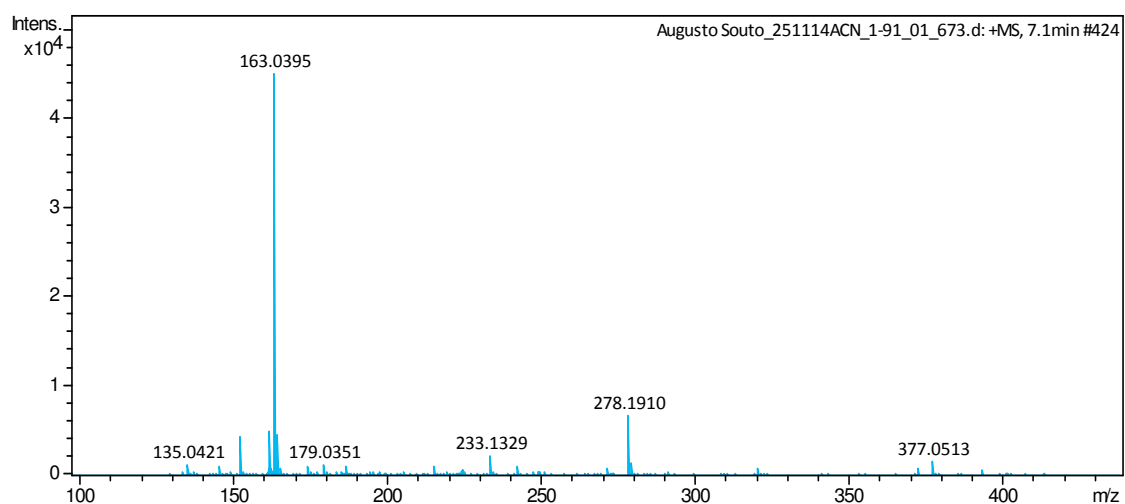
Espectro de massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* (RT=2.8 min, modo positivo)



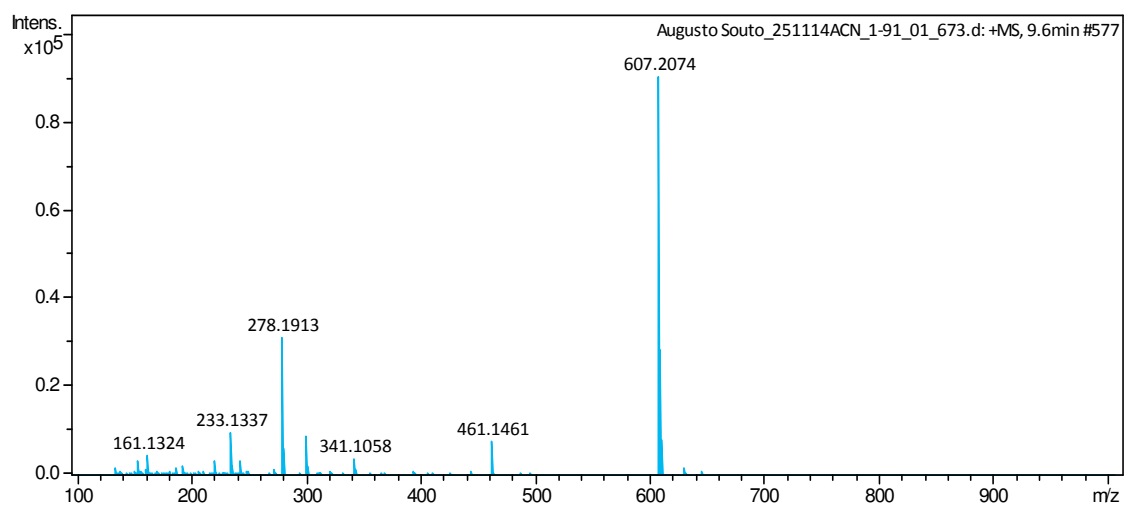
Espectro de massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* (RT=6.3 min, modo positivo)



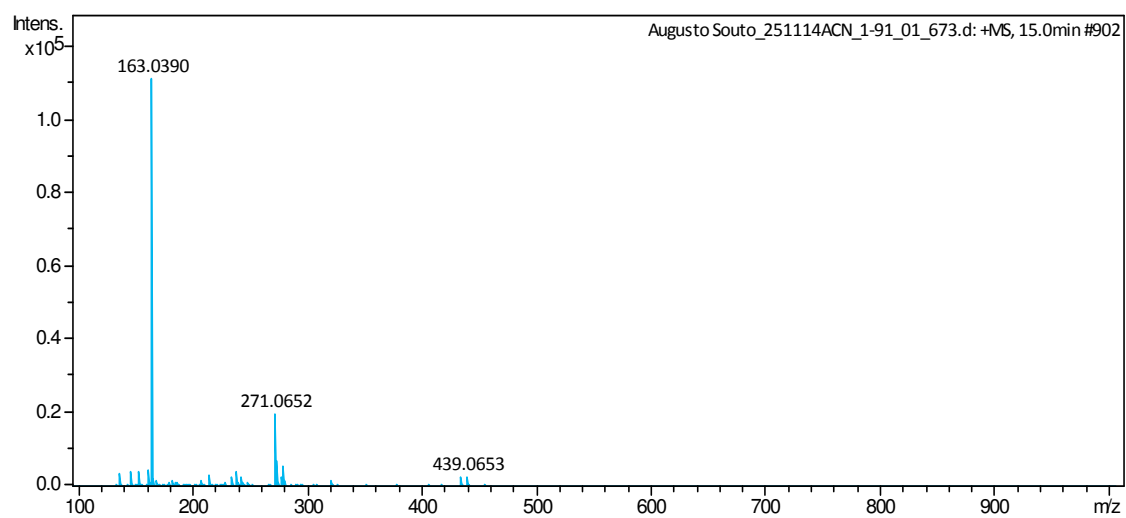
Espectro de massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* (RT=6.6 min, modo positivo)



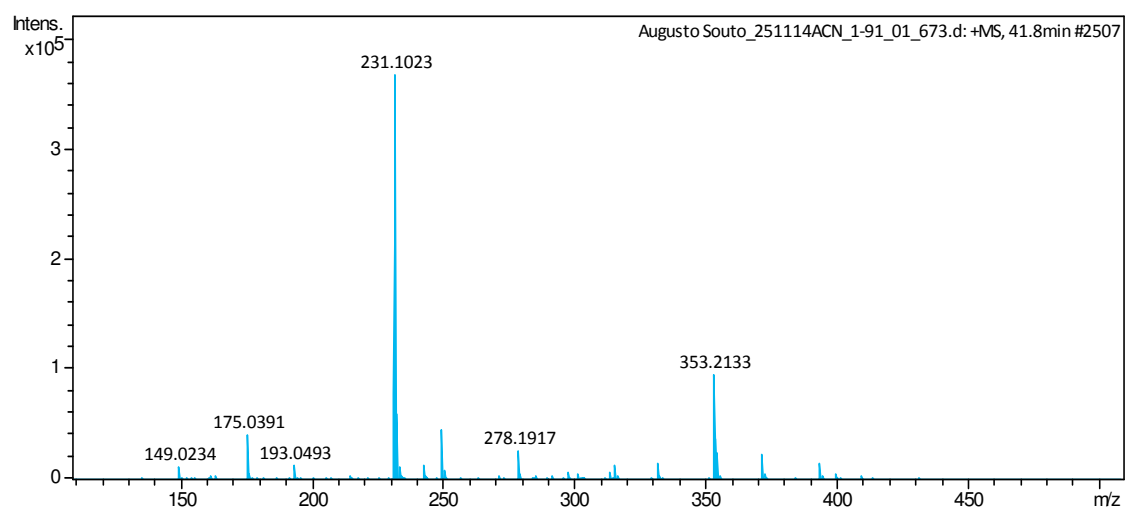
Espectro de massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* (RT=7.1 min, modo positivo)



Espectro de massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* (RT=9.6 min, modo positivo)

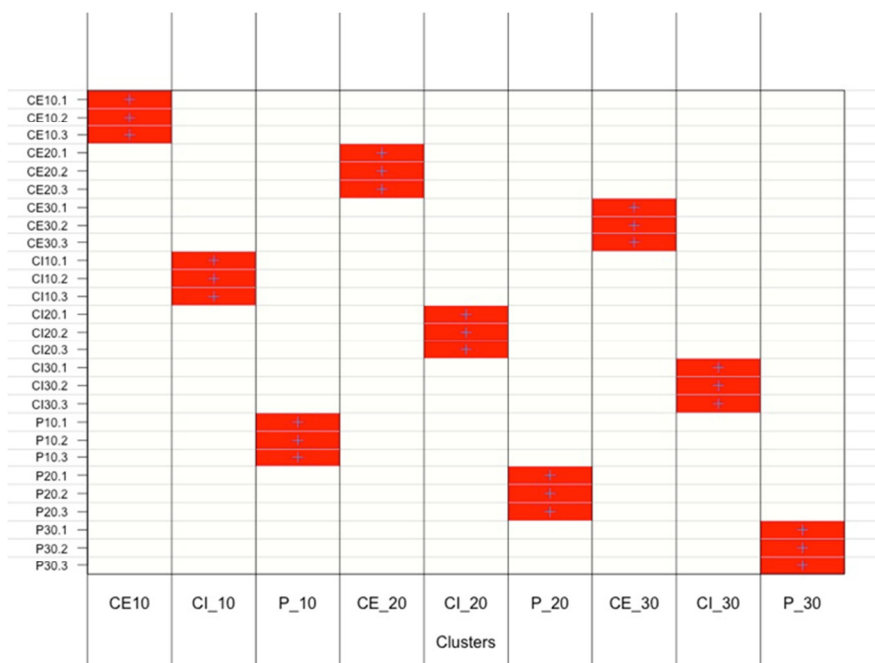


Espectro de massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* (RT=15.0 min, modo positivo)

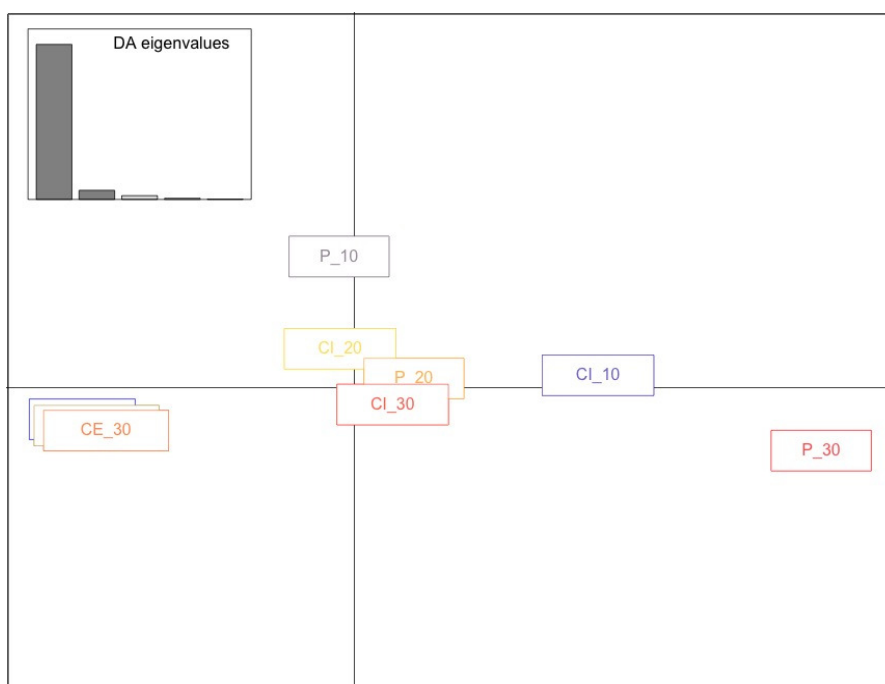


Espectro de massas do extrato bruto de *P. obtusifolia* (RT=41.8 min, modo positivo)

Apêndice C – Análise discriminante de componente principal (DPCA) dos extratos brutos de *Peperomia obtusifolia*, referente aos 3 grupos que foram analisados por RMN de ^1H .



Análise discriminante de componente principal (DPCA) dos extratos brutos de *Peperomia obtusifolia*, referente aos 3 grupos que foram analisados por RMN de ^1H , após 10,20 e 30 dias de experimento (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = predação)



Análise discriminante de componente principal (DPCA) dos extratos brutos de *Peperomia obtusifolia*, referente aos 3 grupos que foram analisados por RMN de ^1H , após 10,20 e 30 dias de experimento (CI = Controle Interno, CE = Controle Externo e P = Predação)