

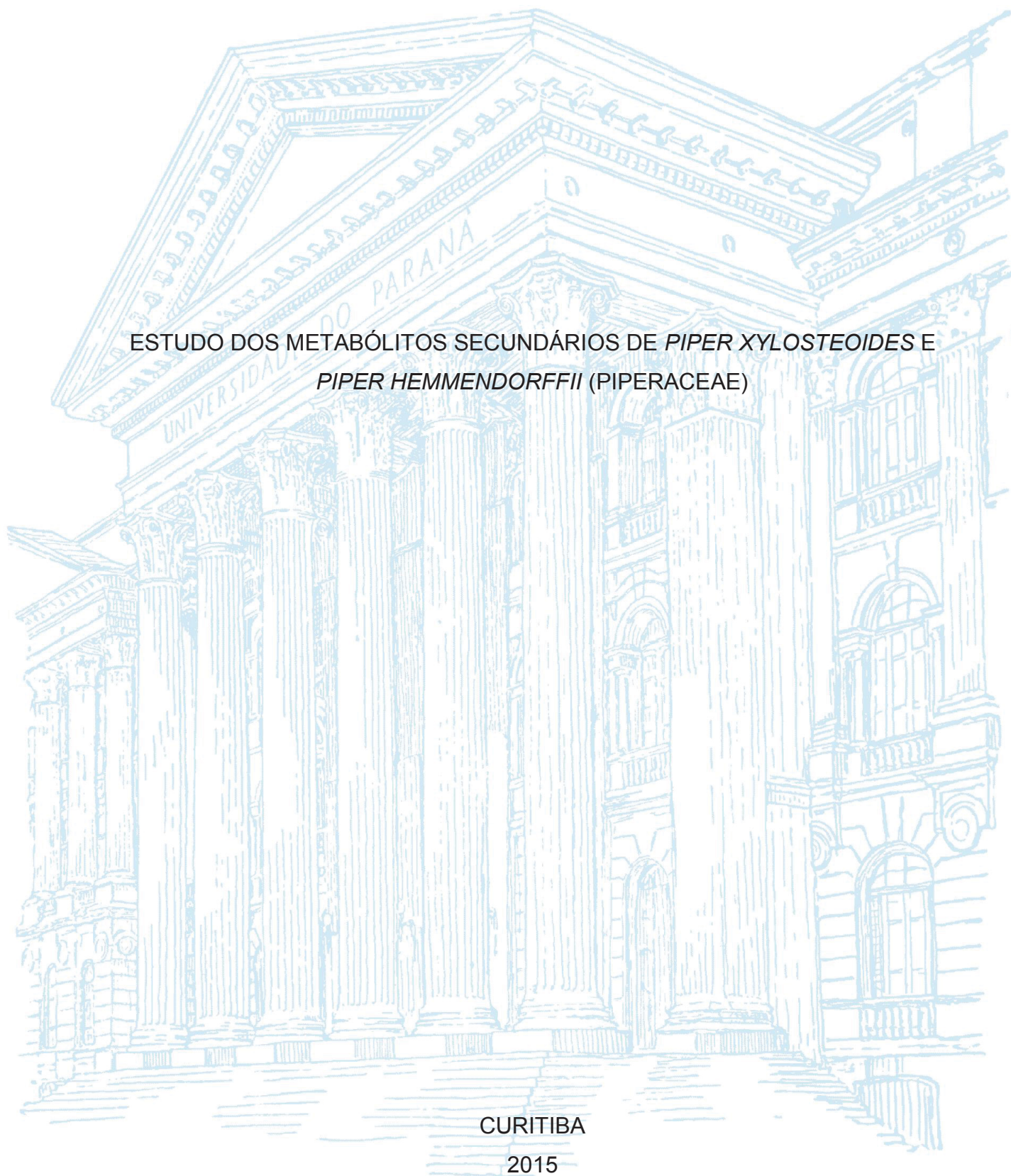
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAHLIL SCHWANKA SALOMÉ

ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *PIPER XYLOSTEOIDES* E  
*PIPER HEMMENDORFFII* (PIPERACEAE)

CURITIBA

2015



KAHLIL SCHWANKA SALOMÉ

ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *PIPER XYLOSTEOIDES* E  
*PIPER HEMMENDORFFII* (PIPERACEAE)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

CURITIBA

2015

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S173e

Salomé, Kahlil Schwanka

Estudo dos metabólitos secundários de *Piper xylosteoides* e *Piper hemmendorffii* (Piperaceae) [recurso eletrônico] / Kahlil Schwanka Salomé. – Curitiba, 2015.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

Orientador: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia .

1. Fitoquímica. 2. Piperaceae. 3. Cromatografia a gás. I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. III. Título.

CDD: 615.32

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *PIPER XYLOSTEOIDES* E *PIPER  
HEMMENDORFFII* (PIPERACEAE)**

por

**KAHLIL SCHWANKA SALOMÉ**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,  
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof.ª Dr.ª Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia  
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago  
Dep. de Ciências Exatas e da Terra – UNIFESP



Prof.ª Dr.ª Ana Luisa Lacava Lordello  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2015.

## AGRADECIMENTOS

*“Many places I have been  
Many sorrows joys I have seen  
But I don’t regret  
Nor will I forget  
All who took that road with me.”*

Aos meus pais Jorge Moisés Salomé e Josélia Schwanka Salomé que me acompanharam durante esses 25 anos e a todos aqueles que se fizeram pais e mães, padrinhos e madrinhas, família, durante este período;

À professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia por estes dois anos de discussões, orientações, amizade e confiança;

Aos professores Francisco de Assis Marques e Ana Luísa Lacava Lordello pelas contribuições no relatório de qualificação e defesa;

Ao professor João Henrique Ghilardi Lago pelas contribuições na banca de defesa;

Ao professor Massuo Jorge Kato pelo fornecimento das plantas;

Aos professores Andersson Barison e Guilherme Sasaki do centro de RMN da UFPR;

Aos professores (as), técnicos (as) e secretários (as) do DQ-UFPR com os quais tive contato durante aproximadamente 7 anos e que formaram todo o conhecimento que tenho hoje;

Aos amigos e amigas do DQ-UFPR com os quais tive a oportunidade de conviver:

alunos e alunas do Lapneq: Angelita, Allan, Cassiano, Edi, Ina, Manu, Maria, Regi e Tânia e também aos “ex-Lapneq” Anderson, Thalita e Sirlei pelas dicas, trocas de conhecimento e principalmente risadas.

alunos e alunas do Lecosin: Dila, Jonata, Marina, Lai, Ricardo, Vinicius e aos “ex-Lecosin” Celso, Diego e Gustavo pelos *boardgames*, *cheriquitas*, churrascos, risadas e eventuais análises nos CGs e discussões de resultados.

professores, alunos e alunas do LaSQuE, LabPol, LTEB, CEPESQ... DQ-UFPR, pelos cafés, momentos de discussão e descontração.

Paulinha, que não se encaixa em nenhuma das categorias anteriores, mas é amiga;

Ao laboratório Louis Guillotin da UNICAMP, do professor Fábio Augusto, pelas análises de cromatografia bidimensional;

Lydia Fumiko Yamaguchi da USP pelas análises de LC/MS;

Órgãos de fomento: CAPES, FINEP, CNPq e Fundação Araucária

A todos que me ajudaram de alguma forma, muito obrigado.

*“We came all this way*

*But now comes the day*

*To bid you ~~farewell~~ “see y’all”.*”

Billy Boyd – The Last Goodbye

*“Try not. Do, or do not. There is no try.”*  
Não tente. Faça, ou não faça. Não existe “tentar”.

*Master Yoda*

## RESUMO

Neste trabalho foram estudados os compostos voláteis de folhas e caules de *Piper hemmendorffii* e folhas e galhos de *Piper xylosteoides* e ainda, os extratos em éter de petróleo das raízes e caules da espécie *P. xylosteoides* foram estudados fitoquimicamente. Os óleos essenciais foram extraídos por meio de hidrodestilação em aparelho de Clevenger e a identificação dos principais componentes foi feita por cromatografia de fase gasosa mono e bidimensional acoplada a espectrometria de massas resultando em 8 (CG 1D) e 40 (CG 2D) compostos identificados nas folhas e 4 (CG 1D) e 40 (CG 2D) nos caules de *P. hemmendorffii*; 9 (CG 1D) e 61 (CG 2D) constituintes nas folhas e 7 (CG 1D) e 36 (CG 2D) nos galhos de *P. xylosteoides*. Do total de 105 compostos diferentes identificados, dos quais 4 são monoterpenos, 3 álcoois alifáticos, 2 ésteres alifáticos, 8 monoterpenos oxigenados, 9 hidrocarbonetos alifáticos, 34 sesquiterpenos, 34 sesquiterpenos oxigenados, 2 aldeídos alifáticos e 9 arilpropanoides. O estudo fitoquímico dos caules e raízes de *Piper xylosteoides* resultou na identificação de 15 compostos sendo quatro arilpropanoides, um aldeído aromático, dois flavonoides, um ácido carboxílico aromático, um sesquiterpeno, cinco neolignanas e uma lignana. As estruturas dos compostos foram determinadas utilizando técnicas espectroscópicas de RMN 1D e 2D e todos os compostos identificados são descritos pela primeira vez para esta espécie vegetal, sendo que das seis neolignanas identificadas, quatro são inéditas e uma possui apenas um relato na literatura. Os extratos em éter de petróleo de caules, raízes, galhos e folhas de *P. xylosteoides* foram comparados quanto à composição química utilizando cromatografia de fase líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos e concluiu-se que os extratos de caules e galhos possuem cromatogramas sobreponíveis, indicando que a composição química dos extratos é semelhante. Por outro lado, o extrato das folhas apresenta um perfil diferente dos outros e o extrato das raízes é o que apresenta o maior número de compostos.

Palavras-chave: Fitoquímica. Piperaceae. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente.

## ABSTRACT

This work contemplates the results from study of the essential oil from leaves and stem of *Piper hemmendorffii* and leaves and branches of *Piper xylosteoides*, and also results from the phytochemical investigation of the petroleum ether extract of roots and stem of *P. xylosteoides*. The essential oils were extracted by hidrodestillation using a Clevenger and the identification of the main components was performed using mono and two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry resulting in 8 (1D GC) and 40 (2D GC) substances in the leaves and 4 (1D GC) and 40 (2D GC) in the stem of *P. hemmendorffii*; 9 (1D GC) and 61 (2D GC) substances in the leaves and 7 (1D GC) and 36 (2D GC) in the branches of *P. xylosteoides*. Of 105 different components, 4 of them are monoterpenes, 3 are aliphatic alcohois, 2 aliphatic esters, 8 oxigenated monoterpenes, 9 aliphatic hydrocarbons, 34 sesquiterpenes, 34 oxigenated sesquiterpenes, 2 aliphatic aldehydes and 9 arylpropanoids. The phytochemical study of roots and stem of *P. xylosteoides* lead to the identification of 15 substances: four arylpropanoids, one aromatic aldehyde, two flavonoids, one aromatic carboxylic acid, one sesquiterpene, five neolignans and one lignan. The structures were determined using 1D and 2D NMR techniques and all the identified substances are being described for the first time in this species, four neolignans are reported for the first time and one was reported only one time in the literature. The petroleum ether extracts of stem, roots, branches and leaves of *P. xylosteoides* were compared with each other regarding the chemical composition using high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector and was observed that the stem and branches extracts have very similar chromatogram, which indicates that the chemical composition of both extracts is very alike. On the other hand, the leaves extract exhibited a different profile from the others and the roots extract is the one with most components.

Key-words: Phytochemistry. Piperaceae. Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: alguns fármacos isolados no século XIX.....	1
Figura 2: estrutura dos compostos salicina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico .....	2
Figura 3: Purificação do extrato em éter de petróleo das raízes de <i>Piper xylosteoides</i> (EEPRPx). .....	11
Figura 4: Cromatograma do EEPCPx analisado por CLAE .....	12
Figura 5: Purificação do extrato em éter de petróleo de caules de <i>P. xylosteoides</i> (EEPCPx). .....	13
Figura 6: Cromatograma bidimensional do óleo essencial das folhas de <i>Piper xylosteoides</i> . .....	15
Figura 7: Cromatograma bidimensional do óleo essencial dos galhos de <i>Piper xylosteoides</i> . .....	15
Figura 8: Cromatograma bidimensional do óleo essencial das folhas de <i>Piper hemmendorffii</i> . .....	16
Figura 9: Cromatograma bidimensional do óleo essencial dos caules de <i>Piper hemmendorffii</i> . .....	16
Figura 10: Representação do modulador de 2 jatos com loop. ....	21
Figura 11: Representação do cromatograma do óleo essencial dos galhos de <i>P. xylosteoides</i> . .....	22
Figura 12: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da subfração 29-35.3, composto Px-1. ....	23
Figura 13: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ da fração 29-35.3, composto Px-1. ....	24
Figura 14: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ da fração 29-35.3, composto Px-1. ....	25
Figura 15: Estrutura do composto Px-1, subfração 29-35.3. ....	25
Figura 16: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 29-35.5, compostos Px-2, Px-3 e Px-4. ....	26
Figura 17: Expansões relevantes do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 29-35.5, compostos Px-2, Px-3 e Px-4 respectivamente, ilustrando as constantes de acoplamento. ....	27
Figura 18: Simulação da multiplicidade dos sinais em $\delta$ 6,65 e $\delta$ 6,49 de Px-2.....	28
Figura 19: Simulação da multiplicidade dos sinais em $\delta$ 6,09 e $\delta$ 5,78 de Px-3.....	28
Figura 20: Simulação da multiplicidade do sinal em $\delta$ 5,96 de Px-4.....	28
Figura 21: Simulação da multiplicidade do sinal em $\delta$ 5,02 de Px-4.....	29

Figura 22: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ da fração 29-35.3, compostos Px-2, Px-3 e Px-4.....	29
Figura 23: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ da fração 29-35.3, compostos Px-2, Px-3 e Px-4.....	30
Figura 24: Estrutura do composto Px-2, identificado como $\alpha$ -asarona, indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de gHMBC.....	31
Figura 25: Estrutura do composto Px-3, identificado como $\beta$ -asarona indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de gHMBC.....	31
Figura 26: Estrutura do composto Px-4, identificado como $\gamma$ -asarona indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de gHMBC.....	31
Figura 27: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) das frações 29-35.6 e 24.28-3, compostos Px-5 e Px-6 .....	32
Figura 28: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) das frações 29-35.6 e 24.28-3, compostos Px-5 e Px-6.....	32
Figura 29: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ das frações 29-35.6 e 24-28.3, compostos Px-5 e Px-6. ....	33
Figura 30: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ das frações 29-35.6 e 24-28.3, compostos Px-5 e Px-6. ....	34
Figura 31: Estrutura dos compostos Px-5 e Px-6, presentes nas frações 29-35.6 e 24-28.3. ....	35
Figura 32: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (MeOD) da fração 45-49, composto Px-7.....	36
Figura 33: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (MeOD) da fração 45-49, composto Px-7. ....	36
Figura 34: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em MeOD da fração 45-49, composto Px-7.....	37
Figura 35: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em MeOD da fração 45-49, composto Px-7.....	37
Figura 36: Estrutura do composto Px-7, inédito na literatura, ilustrando a correlação do H-2' com o C-7'.....	39
Figura 37: Neolignanas identificadas por Cao e colaboradores .....	39
Figura 38: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 1_org, composto Px-8.....	40
Figura 39: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 1_org, composto Px-8. ....	41
Figura 40: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ da fração 1_org, composto Px-8.....	41
Figura 41: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ da fração 1_org, composto Px-8.....	42

Figura 42: Estrutura do composto Px-8, identificado como 4'-7-dimetilapigenina.....	43
Figura 43: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 4_org, composto Px-9. ....	44
Figura 44: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 4_org, composto Px-9. ....	45
Figura 45: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ da fração 4_org, composto Px-9.....	45
Figura 46: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ da fração 4_org, composto Px-9. ....	46
Figura 47: Estrutura do composto Px-9, fração 4_org, inédito na literatura. ....	47
Figura 48: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 5_org, composto Px-10. ....	48
Figura 49: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 5_org, composto Px-10. ....	48
Figura 50: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ dos compostos Px-10 e Px-11, fração 5_org. ....	49
Figura 51: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ dos compostos Px-10 e Px-11, fração 5_org. ....	49
Figura 52: Expansão (em f1) do mapa de correlações a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ dos compostos Px-10 e Px-11, fração 5_org. ....	50
Figura 53: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ dos compostos Px-10 e Px-11, fração 5_org. ....	50
Figura 54: Estrutura do composto Px-10, fração org_5, inédito na literatura. ....	51
Figura 55: Lignanas identificadas por Sartorelli e colaboradores. ....	52
Figura 56: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 5_org, composto Px-11. ....	53
Figura 57: Estrutura do composto Px-11, fração org_5, inédito na literatura. ....	55
Figura 58: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 11_org, compostos Px-12 e Px-13. ....	56
Figura 59: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração 11_org, composto Px-12. ....	56
Figura 60: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ evidenciando as correlações do composto Px-12, fração 11_org. ....	57
Figura 61: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ evidenciando as correlações do composto Px-12, fração 11_org. ....	57
Figura 62: Estrutura do composto Px-12, fração 11_org, identificado como ciclocoloronona. ....	58
Figura 63: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração 11_org, composto Px-13. ....	60
Figura 64: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ evidenciando as correlações do composto Px-13, fração 11_org. ....	60

Figura 65: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ evidenciando as correlações do composto Px-13, fração 11_org. ...	61
Figura 66: Estrutura do composto Px-13, fração 11_org. ....	63
Figura 67: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 13_aq, composto Px-14. ....	64
Figura 68: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 13_aq, composto Px-14. ....	64
Figura 69: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ do composto Px-14, fração 13_aq. ....	65
Figura 70: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ do composto Px-14, fração 13_aq. ....	65
Figura 71: Estrutura do composto Px-14 identificado como 3,5-diidroxi-4',7-dimetoxiflavona. ....	66
Figura 72: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 14_org, composto Px-15. ....	67
Figura 73: Expansões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 14_org, composto Px-15. ....	68
Figura 74: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação (gHSQC) em $\text{CDCl}_3$ do composto Px-15, fração 14_org. ....	68
Figura 75: Mapa de correlações de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância (gHMBC) em $\text{CDCl}_3$ do composto Px-15, fração 14_org. ....	69
Figura 76: Estrutura do composto Px-15. ....	69
Figura 77: Cromatograma do EEPGPx (max plot). ....	72
Figura 78: Cromatograma do EEPCPx (max plot). ....	72
Figura 79: Cromatograma do EEPFPx (max plot). ....	73
Figura 80: Cromatograma do EEPRPx (max plot). ....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento dos extratos de <i>P. xylosteoides</i> .....	10
Tabela 2: Índices de retenção e proposta estrutural de cada substância dos óleos essenciais.....	17
Tabela 3: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para Px-1, subfração 29-35.3. ....	24
Tabela 4: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para os compostos Px-2, 3 e 4 ( $\alpha$ -, $\beta$ - e $\gamma$ -asarona, respectivamente).....	30
Tabela 5: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para as frações 29-35.6 e 24-28.3.....	34
Tabela 6: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{MeOD}$ ) para o composto Px-7 (inédito na literatura), fração 45-49.....	38
Tabela 7: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para a fração 1_org, composto Px-8.....	42
Tabela 8: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-9, fração 4_org (inédito na literatura).....	46
Tabela 9: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-10, fração 5_org, (inédito na literatura).....	51
Tabela 10: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-11 (inédito na literatura). ....	54
Tabela 11: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-12, fração 11_org..	58
Tabela 12: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-13, fração 11_org..	62
Tabela 13: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-14, fração 13_aq...	66
Tabela 14: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-15, fração 14_org..	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
$\delta$	Deslocamento químico
<i>d</i>	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddt</i>	Duplo duplo tripleto
<i>dddd</i>	Duplo duplo duplo dupleto
EEPCPx	Extrato em éter de petróleo de caules de <i>Piper xylosteoides</i>
EEFPx	Extrato em éter de petróleo de folhas de <i>Piper xylosteoides</i>
EEGPx	Extrato em éter de petróleo de galhos de <i>Piper xylosteoides</i>
EEPRPx	Extrato em éter de petróleo de raiz de <i>Piper xylosteoides</i>
EMCPx	Extrato em metanol de caules de <i>Piper xylosteoides</i>
EMFPx	Extrato em metanol de folhas de <i>Piper xylosteoides</i>
EMGPx	Extrato em metanol de galhos de <i>Piper xylosteoides</i>
EMRPx	Extrato em metanol de raiz de <i>Piper xylosteoides</i>
EP	Éter de Petróleo
<i>gHMBC</i>	<i>gradient Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy</i>
<i>gHSQC</i>	<i>gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipeto
MeOH	Metanol
NOE	Efeito Nuclear Overhauser
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H}	Ressonância Magnética Nuclear de carbono desacoplado do núcleo de hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto
<i>s/</i>	Simpleto Largo
TMS	Tetrametilsilano

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 PRODUTOS NATURAIS .....	1
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	3
1.3 PIPERACEAE .....	3
1.4 PIPER .....	4
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
2.1 GERAIS .....	6
2.2 ESPECÍFICOS .....	6
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
3.1 SUPORTES PARA CROMATOGRAFIA .....	6
3.1.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC) .....	6
3.1.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP) .....	7
3.1.4 REVELADORES .....	7
3.2 EQUIPAMENTOS .....	7
3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO .....	8
3.3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA .....	8
3.3.2 SECAGEM E MOAGEM .....	8
3.3.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES .....	8
3.3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>P. xylosteoides</i> .....	9
3.3.5 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS .....	10
3.3.5.1 Extrato em éter de petróleo da raiz de <i>P. xylosteoides</i> .....	10
3.2.6.1 Extrato em éter de petróleo do caule de <i>P. xylosteoides</i> .....	12
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>14</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	14
4.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS .....	22
4.2.1 ANÁLISE DAS FRAÇÕES DO EEPRPX .....	23
4.2.1.2 Subfração 29-35.3 .....	23
4.2.1.3 Subfração 29-35.5 .....	25

4.2.1.1 Subfrações 29-35.6 e 24-28.3.....	31
4.2.1.4 Fração 45-49.....	35
<b>4.3 ANÁLISE DAS FRAÇÕES DO EEPCPX.....</b>	<b>39</b>
4.3.1 Fração 1_org .....	40
4.3.2 Fração 4_org .....	43
4.3.3 Fração 5_org .....	47
4.3.2 Fração 11_org .....	55
4.3.3 Fração 13_aq.....	63
4.3.4 Fração 14_org .....	66
<b>4.4 COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS EM ÉTER DE PETRÓLEO DE <i>P.</i> <i>XYLOSTEOIDES</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>74</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 PRODUTOS NATURAIS

Há muito tempo a química e a medicina traçam caminhos paralelos em diversas áreas, uma delas a pesquisa em produtos naturais. Durante o século XIX diversas plantas medicinais foram estudadas quimicamente resultando em fármacos como: emetina (em 1817) que possui propriedades antiamebianas, colchicina (em 1820) utilizada para tratamento de gota, quinina (em 1820) que é antitérmica, antimalárica e analgésica, o analgésico morfina (em 1832) e seu derivado metilado com atividade analgésica reduzida em 10 vezes, codeína (em 1848) (figura 1), entre vários outros (YUNES, 2012).

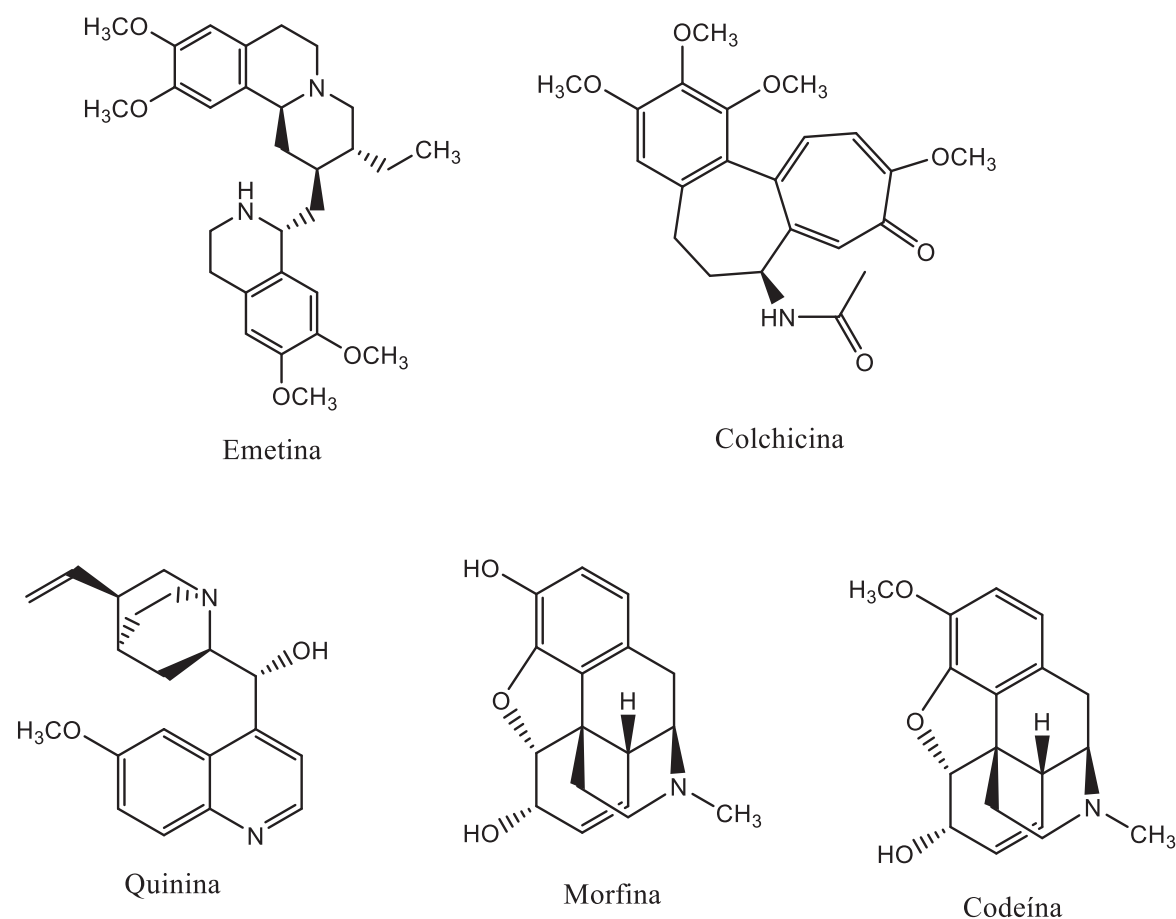


Figura 1: alguns fármacos isolados no século XIX

Alguns fármacos isolados também foram precursores de outros medicamentos, agora obtidos por meio de síntese total ou semi-síntese, que são produzidos no intuito de otimizar o efeito principal e diminuir os efeitos adversos. Um exemplo é a pesquisa com a planta *Salix alba*. Suas raízes eram utilizadas no combate à febre e à dor e em 1828 foi

isolada a salicina (figura 2). Trinta e dois anos mais tarde, foi feita a síntese do ácido salicílico (figura 2), utilizado como medicamento durante muito tempo, porém o caráter ácido da molécula resultava em efeitos adversos severos no corpo humano. Assim, Hofman em 1898, diminuiu a acidez do medicamento acetilando o grupo ácido, resultando no ácido acetilsalicílico (figura 2), conhecido como aspirina, que atualmente é o fármaco mais utilizado no mundo (BARREIRO, 1998).

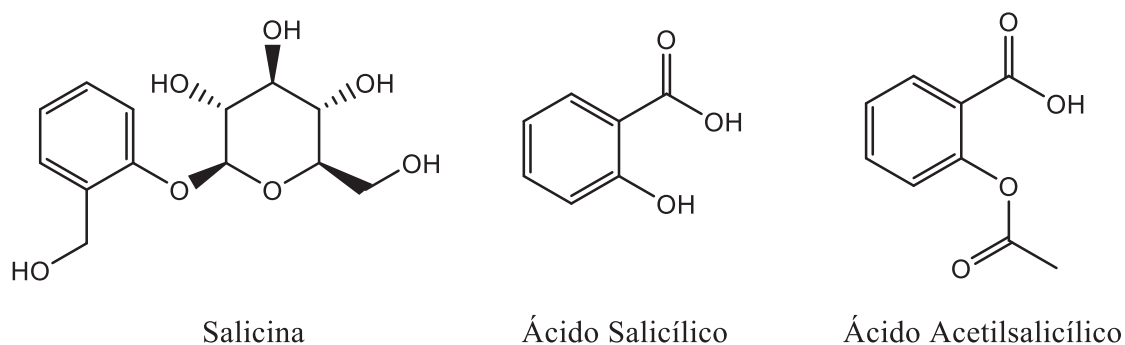


Figura 2: estrutura dos compostos salicina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico

Mais recentemente, em 2001 aproximadamente 25% dos fármacos empregados nos países industrializados advinham, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores (YUNES, 2012). Sendo que, das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo de drogas sintéticas são obtidas dos precursores naturais (RATES, 2001; ZAKA, 2002).

David Newman, chefe da Divisão de Produtos Naturais no Instituto Nacional do Câncer dos EUA, e Gordon Cragg, chefe do Instituto Nacional do Câncer dos EUA de 1989 até 2004 e hoje colaborador voluntário desta agência, publicaram no ano de 2012 uma revisão com relação ao número de drogas aprovadas nos últimos 30 anos (1981-2010). Observando as novas drogas aprovadas no período de 2000 a 2010, a área de produtos naturais é responsável pela produção de aproximadamente 50% de todas as 1073 moléculas pequenas utilizadas com algum fim medicinal. Ainda, 79 de 99 vacinas e produtos “não biológicos” são baseados em produtos naturais ou compostos derivados destes (NEWMAN, 2012).

Apesar da grande utilidade das plantas no desenvolvimento de fármacos, o aproveitamento dos vegetais pela raça humana é bastante baixo. Estima-se que de aproximadamente 300 mil espécies de plantas superiores, 15% (54 mil) foram investigadas fitoquimicamente e foi verificado o potencial farmacológico de apenas 6% (18 mil) (NEWMAN, 2012).

Estes resultados comprovam a importância da pesquisa em produtos naturais e da investigação de novas moléculas com efeito terapêutico.

## 1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Dentro dos produtos naturais, os óleos essenciais são bastante utilizados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos e produtos domissanitários, além de terapias naturais como aromaterapia. (BURT, 2004).

De acordo com a farmacopeia europeia, um óleo essencial é definido como um produto fabricado a partir de matérias-primas puras de material vegetal, obtido por destilação, processos mecânicos ou ainda destilação seca, que é o aquecimento de um sólido na ausência de solvente (FARMACOPEIA EUROPEIA<sup>1</sup>, 2008 citado por DO, 2014). Estas substâncias podem ser extraídas de qualquer tipo de estrutura vegetal, porém são mais comuns em folhas, flores e frutos e menos comuns em raízes, rizomas, lenhos, córtex e sementes. As substâncias isoladas e os óleos brutos possuem diversas atividades farmacológicas já comprovadas como: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anticolinesterásica, anti-helmíntica, antiparasitária, analgésica, sedativa, antitumoral, entre outras (YUNES, 2012).

Os óleos voláteis são constituídos de misturas de compostos que possuem estruturas químicas heterogêneas (BRENNAN, 2003) e de baixa massa molecular, na maioria, arilpropanoides e terpenoides de até 20 átomos de carbono (diterpenos). Os terpenos possuem maior diversidade estrutural e maior número de compostos, se comparados aos arilpropanoides, devido ao seu mecanismo de formação e normalmente os compostos majoritários são os monoterpenos e os sesquiterpenos, oxigenados ou não.

Além desses, hidrocarbonetos alifáticos, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres, lactonas e outros compostos com nitrogênio e enxofre já foram encontrados em óleos essenciais (BELL, 1981).

## 1.3 PIPERACEAE

Quanto à família das plantas pesquisadas neste estudo, as Piperaceas são da subclasse Magnoliidae e da ordem Piperales. Compreendem cinco gêneros: *Peperomia*, *Manekia*, *Zippelia*, *Verhuellia* e *Piper* (SCHUBERT, 2012).

Nessa família ocorrem cerca de 2400 a 3600 espécies divididas em ambos os hemisférios, principalmente em zonas tropicais e subtropicais. No Brasil, mais de 500 espécies dos gêneros *Peperomia*, *Manekia* e *Piper* estão distribuídas principalmente nas

---

<sup>1</sup> Farmacopeia europeia: Óleos essenciais (2008), Conselho da Europa, Diretório Europeu da Qualidade de Medicamentos (EDQM). Estrasburgo, 2008.

Florestas Amazônica e Atlântica, que possuem clima adequado para o crescimento (JARAMILLO, 2004).

Diversas espécies de piperaceas são ricas em metabólitos secundários bioativos como alcaloides, flavonoides, terpenos e amidas, possuindo assim importância econômica e medicinal. Dentre as piperaceas estão exemplos como a pimenta do reino (*Piper nigrum*) que é utilizada como condimento, a pariparoba (*P. umbellatum*) que possui diversos efeitos como anti-inflamatório e diurético e a kava-kava (*P. methysticum*), que é uma alternativa aos benzodiazepínicos, pois não induz à dependência química dentre outros efeitos adversos.

#### 1.4 PIPER

O gênero *Piper* é o maior da família Piperaceae, agregando mais de 1000 espécies (DYER, 2004) sendo que no Brasil, ocorrem cerca de 260 espécies (GUIMARÃES, 2004).

Os estudos de espécies desse gênero indicam que a diversidade estrutural do gênero é grande. Dos estudos fitoquímicos de plantas do gênero *Piper* foram isolados flavonoides e alcaloides de *P. aleyreanum* (FACUNDO, 2012), neolignanas e arilpropanoides de *P. taiwanense* (CHEN, 2013), derivado de ácido benzoico de *P. cumanense* (PARRA, 2013) e o mais recente, flavanonas com o anel B não aromático de *P. carniconectivum* (FREITAS, 2014), dentre diversas outras publicações. Dados mais antigos mostram que até 2004, somente 112 espécies de *Piper* possuíam estudo fitoquímico e estes estudos revelaram que essas espécies produzem 667 compostos diferentes sendo 190 alcaloides ou amidas, 97 terpenos, 70 neolignanas, 49 lignanas, 39 propenilfenóis, 18 kavapironas, 17 chalconas ou diidrochalconas, 16 flavonas, 6 flavanonas, 4 piperolídeos e 146 outros compostos (DYER, 2004).

Dentre as plantas do gênero *Piper*, os óleos essenciais são bastante estudados. Andrade e colaboradores relataram a identificação de 141 componentes do óleo essencial de *P. dilatatum*, onde a maior parte é constituída de mono ou sesquiterpenos (ANDRADE, 2011). Matasyoh e colaboradores, por sua vez, estudaram a atividade larvicida do óleo essencial de *P. capense*, composto principalmente por mono e sesquiterpenos, contra o vetor da malária e relataram que o óleo essencial dessa planta pode ser utilizado como larvicida que não prejudica a natureza, podendo inclusive ser utilizado pelos moradores que cultivam a planta para a prevenção da doença (MATASYOH, 2011).

Em 2012, Lima e colaboradores extraíram o óleo essencial de *P. aleyreanum*, composto principalmente de mono e sesquiterpenos, e verificaram que o óleo possui atividade antinociceptiva (relacionada com a capacidade de percepção da dor), anti-

inflamatória e propriedades gastroprotetoras (LIMA, 2012). Potzernheim e colaboradores estudaram os óleos de quatro populações de *P. aduncum* L. para verificar a variabilidade da composição do óleo essencial das folhas dessa planta e observaram que em algumas regiões, o óleo essencial possui 46 constituintes enquanto em outras, possui 65 constituintes identificados, o que implica que para a comercialização desse óleo essencial, é necessário um controle sobre o crescimento da planta para que a composição química do óleo vendido seja sempre a mesma (POTZERNHEIM, 2012). Ainda em 2012, Sauter e colaboradores extraíram o óleo essencial de *P. hispidinervum*, composto também principalmente por mono e sesquiterpenos, e relataram que o óleo possui atividade amebicida contra *Acanthamoeba polyphaga*, causadora da ceratite (SAUTER, 2012). Neste mesmo ano, Magalhães e colaboradores publicaram que o óleo essencial de *P. cubeba*, composto principalmente de monoterpenos (88,38%) é eficaz contra larvas de *Schistosoma mansoni* (MAGALHÃES, 2012).

No ano seguinte, Sperotto e colaboradores extraíram o óleo essencial de *P. gaudichaudianum*, que é utilizada popularmente como anti-inflamatória, e relataram que o óleo essencial não é mutagênico, mas apresentou um efeito citotóxico contra o fungo *Saccharomyces cerevisiae* (SPEROTTO, 2013).

Em se tratando mais especificamente da espécie *Piper xylosteoides*, seu óleo essencial já foi previamente estudado por, pelo menos, quatro vezes, porém cada autor relata um resultado diferente. Em 2006, no primeiro estudo, Potzernheim e colaboradores relataram a presença de principalmente monoterpenos (31% de mirceno, 26,1% de  $\gamma$ -terpineno, 12,4% de *p*-cimeno e 11,3% de  $\alpha$ -terpineno) nas folhas dessa espécie (POTZERNHEIM, 2006a). Nesse mesmo ano, a autora publicou outro artigo com o estudo mais detalhado dessa mesma espécie com os mesmos resultados. (POTZERNHEIM, 2006b).

Em 2010, Ferraz e colaboradores estudaram a composição do óleo essencial das partes aéreas de *P. xylosteoides* e de outras duas espécies *P. amalago* e *P. mikanianum*, e concluíram que o óleo da *P. xylosteoides* é composto majoritariamente por arilpropanoides como safrol (47,83%), monoterpenos (16,98%) e sesquiterpenos (23,65%), diferente do relato anterior. Nesse mesmo trabalho, também foi estudada a atividade desses óleos contra a larva do carrapato de boi, concluindo que o óleo de *P. mikanianum*, constituído de 67,89% de arilpropanoides, foi o mais ativo com um valor de LC<sub>50</sub> de 2,33  $\mu$ L/mL (controle positivo, Amitraz®, LC<sub>50</sub> de 2,00  $\mu$ L/mL) (FERRAZ, 2010).

Dois anos mais tarde, Dognin e colaboradores relataram a composição química do óleo essencial das folhas de *P. xylosteoides* coletadas em dois lugares diferentes no estado de Santa Catarina, Orleans e São Bonifácio. Em ambos os casos, o componente majoritário foi o safrol, o único arilpropanoide presente, totalizando 84,1% e 75,8%,

respectivamente. Além desse componente, ambos os óleos são compostos por uma mistura de monoterpenos (11,2% para o de Orleans e 19,4% para o de São Bonifácio) (DOGNINI, 2012).

Comparando esses estudos é possível perceber a variabilidade da composição do óleo essencial de *P. xylosteoides*. Sendo assim, o estudo apresentado aqui visa também contribuir com a literatura referente a composição química desse óleo, utilizando a técnica de cromatografia em fase gasosa bidimensional (GC×GC/MS)<sup>2</sup>, que é uma metodologia que proporciona maior resolução quando comparada à cromatografia em fase gasosa monodimensional e portanto maior potencial para detecção dos componentes presentes no óleo.

Da espécie *P. hemmendorffii*, não foram encontrados relatos na literatura com relação aos estudos dos óleos essenciais ou fitoquímico desta planta.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAIS

Este trabalho tem como objetivo ampliar o conhecimento acerca da composição química de óleos essenciais e substâncias isoladas de plantas do gênero *Piper*, especialmente *P. xylosteoides* e *P. hemmendorffii*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Isolamento dos óleos essenciais das partes aéreas de *P. xylosteoides* e *P. hemmendorffii*;
- Extração, fracionamento e isolamento dos metabólitos secundários fixos das partes aéreas de *P. xylosteoides*;
- Identificação dos constituintes isolados utilizando os métodos espectrométricos e espectroscópicos (CG/EM, GC×GC/MS, RMN, EM, IV e UV);
- Comparação dos extratos em éter de petróleo de diferentes órgãos de *P. xylosteoides* por CLAE.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 SUPORTES PARA CROMATOGRAFIA

#### 3.1.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC).

Para a cromatografia em coluna (CC) foi utilizada uma coluna de vidro contendo fase estacionária de sílica gel 60, de partículas de tamanho entre 0,040 e 0,063 mm (230-

---

<sup>2</sup> A nomenclatura adotada neste trabalho para os termos, abreviações e símbolos da cromatografia em fase gasosa bidimensional segue a recomendação da literatura: **Quim Nova**, vol. 30, No 3, p. 682-687, 2007.

350 mesh). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser submetido à cromatografia. Foram utilizados 16 centímetros de fase estacionária, independente do tamanho da coluna conforme recomendado pela literatura. (STILL, 1978).

### 3.1.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP)

As purificações em camada delgada em escala preparativa (CCDP) foram desenvolvidas em placas de vidro de tamanho 20 cm x 20 cm ou 10 cm x 10 cm, com espessura de 1 mm de sílica com indicador de fluorescência  $F_{254}$ . A recuperação das amostras foi efetuada utilizando solventes como: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol.

### 3.1.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA (CCDA)

As análises em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio, que contém como fase estacionária sílica gel 60 com partículas de 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência  $F_{254}$ . As eluições dos compostos foram acompanhadas com o auxílio de reveladores.

### 3.1.4 REVELADORES

A revelação das substâncias foi feita sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, solução de anisaldeído, solução de dragendorff e solução etanólica de  $H_2SO_4$  (5% v/v).

## 3.2 EQUIPAMENTOS

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX 200 (com uma sonda QNP de 5 mm), Avance III (com sondas multinucleares de observação direta (BBO) e inversa (BBI) de 5 mm) e Avance III HD (com uma sonda multinuclear QXI de 5 mm), operando a 4,7, 9,4 e 14,1 Tesla respectivamente e observando o núcleo de hidrogênio a 200, 400 e 600 MHz, e o núcleo de carbono-13 a 50, 100 e 150 MHz, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ( $CDCl_3$ ) contendo TMS e uma folha de prata. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm ( $\delta$ ) e referenciados em relação ao TMS (0,00 ppm). As constantes de acoplamentos ( $J$ ) foram registradas em Hertz (Hz).

As análises monodimensionais dos óleos essenciais e os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 utilizando He como gás de arraste, acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP2010 Plus.

Para as análises por meio da cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente dos óleos essenciais, realizadas em parceria com o professor Fábio Augusto da UNICAMP, foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010, utilizando hidrogênio como gás de arraste, equipado com um modulador criogênico (utilizando nitrogênio líquido) desenvolvido em laboratório e acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP2010 Plus.

Para separação por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE), foi utilizado um cromatógrafo Waters com uma bomba quaternária e injeção automática. A detecção foi feita com um detector de arranjo de fotodiodos modelo 2998. As análises dos perfis dos extratos foram conduzidas utilizando uma coluna analítica fase reversa Waters X-Terra C18, 250 x 4,6 mm, com partículas de 4 µm. Para as fases móveis foram utilizados solventes orgânicos grau CLAE, filtrados em membrana de nylon (0,45 µm) e desgaseificados por 30 min em um banho de ultrassom. Foi utilizada água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q. As amostras foram filtradas em filtro Millex®HV (0,45 µm) da Millipore® (Cork, Ireland). As separações das frações por CLAE foram conduzidas utilizando uma coluna Waters semipreparativa X-Terra C18, 10 µm, 300 x 7,8 mm e um coletor automático de frações.

### 3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

#### 3.3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material botânico de *P. xylosteoides* foi coletado na Serra do Corvo Branco, na cidade de Urubici, em Santa Catarina. O material botânico de *P. hemmendorffii* foi coletado no Campus da Universidade de São Paulo (USP – SP). As espécies foram coletadas e identificadas pelo professor Doutor Massuo Jorge Kato (IQ-USP). Uma exsicata de cada espécie está depositada no herbário da USP – SP sob o código K-1491 para a *P. xylosteoides* e K-1736 para a *P. hemmendorffii*.

#### 3.3.2 SECAGEM E MOAGEM

Depois de coletado, o material botânico das espécies em estudo foi pré-seco à sombra, à temperatura ambiente e depois colocado em estufa de ar circulante a 40 °C, sendo em seguida triturado em moinho de quatro facas Marconi TE340.

#### 3.3.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES

As folhas e galhos secos de *P. xylosteoides* e as folhas e caules secos de *P. hemmendorffii* foram submetidos à hidrodestilação (30 g em 400 mL de água destilada) em aparelho de Clevenger modificado por 4h em duplicata. Após a extração, o óleo

essencial foi coletado e extraído do hidrolato (3 x 3 mL) com hexano ultra puro. Em seguida o óleo foi seco com sulfato de sódio anidro.

Nas análises por CG/EM cada amostra foi diluída a 1% (m/v) em hexano ultra puro e caracterizada utilizando as seguintes condições de análise: coluna capilar de sílica fundida (Rtx-5MS) composta por 5% de difenil + 95% de dimetil polisiloxano e medindo 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ . Como gás de arraste foi empregado hélio com vazão de 1,02 mL  $\text{min}^{-1}$ , em modo *split* 1:20, estando o injetor à 250°C. Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60°C (0') até 250 °C, com aquecimento de 3°C. $\text{min}^{-1}$ .

O intervalo de detecção de massas utilizado foi de 40-350 m/z, a temperatura na linha de transferência foi de 300°C, a temperatura na fonte de íons foi de 300°C e o sistema de ionização por impacto de elétrons a 70eV.

Para as análises por GCxGC/MS a amostra foi diluída a 1% (m/v) em diclorometano ultra puro e caracterizada utilizando na primeira dimensão uma coluna capilar de sílica fundida (HP-5) composta por 5% de difenil + 95% de dimetil polisiloxano e medindo 26 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ . Na segunda dimensão foi utilizada uma coluna capilar polar (DB-Wax) composta por polietilenoglicol e medindo 1,0 m x 0,10 mm x 0,10  $\mu\text{m}$ . Foi empregado hidrogênio como gás de arraste com vazão de 1,5 mL  $\text{min}^{-1}$ , em modo *split* 1:10, estando o injetor à 250°C. O modulador utilizado foi o de 2 jatos com tempo de modulação de 5 segundos. Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  de cada amostra e foi empregada a mesma rampa de aquecimento utilizada para a análise monodimensional.

O intervalo de detecção de massas utilizado para as análises foi de 40-350 m/z, a temperatura na linha de transferência foi de 250°C, a temperatura na fonte de íons foi de 280°C e o sistema de ionização de impacto de elétrons a 70 eV.

Os componentes dos óleos essenciais foram identificados com base no índice de aritmético (IA), determinados através da utilização de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados de nove a vinte e dois átomos de carbono, injetados nas mesmas condições cromatográficas. Além da comparação do índice aritmético, os espectros de massas dos constituintes detectados foram comparados com os espectros existentes nas bibliotecas de massas NIST05, NIST21, NIST107, WILEY139 e SHIM2205 por meio do programa interpretativo automático, e também com a literatura (ADAMS, 2007).

#### 3.3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *P. xylosteoides*.

Os materiais vegetais secos e triturados (folhas, galhos, caules e raízes) foram submetidos individualmente à extração a frio com solventes em ordem crescente de polaridade (éter de petróleo e metanol), com renovação de solvente em intervalos de 24 horas até a observação do esgotamento do material vegetal, verificado por CCDA. O

resíduo remanescente foi desprezado. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida, à temperatura de 40°C e em seguida mantidos em dessecador. Os rendimentos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Rendimento dos extratos de *P. xylosteoides*.

Parte da planta	Massa (g)	Extrato em Éter de Petróleo		Extrato em Metanol	
		Código	Rendimento g (%)	Código	Rendimento g (%)
Caule	32,4422	EEPCPx	0,3857 (1,19%)	EMCPx	3,3243 (10,25%)
Folha	389,9394	EEPFPx	9,8834 (2,54%)	EMFPx	42,4615 (10,90%)
Galho	366,2064	EEGPx	2,0605 (0,56%)	EMGPx	29,0120 (7,92%)
Raiz	38,1992	EEPRPx	0,2869 (0,75%)	EMRPx	2,1426 (5,61%)

**E** = Extrato; **EP** = Éter de Petróleo; **M** = Metanólico; **C** = Caule; **F** = Folha; **G** = Galho; **R** = Raiz; **Px** = *P. xylosteoides*.

### 3.3.5 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

#### 3.3.5.1 Extrato em éter de petróleo da raiz de *P. xylosteoides*.

A totalidade do extrato (286,9 mg) foi submetida ao fracionamento por meio de uma coluna cromatográfica flash (CC, diâmetro interno = 15 mm) de sílica gel (0,040 e 0,063 mm, 16 cm) eluída com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 74 frações. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com os seus respectivos fatores de retenção ( $R_{fs}$ ) resultando em 19 frações. As frações que apresentaram quantidade suficiente foram purificadas conforme figura 3.

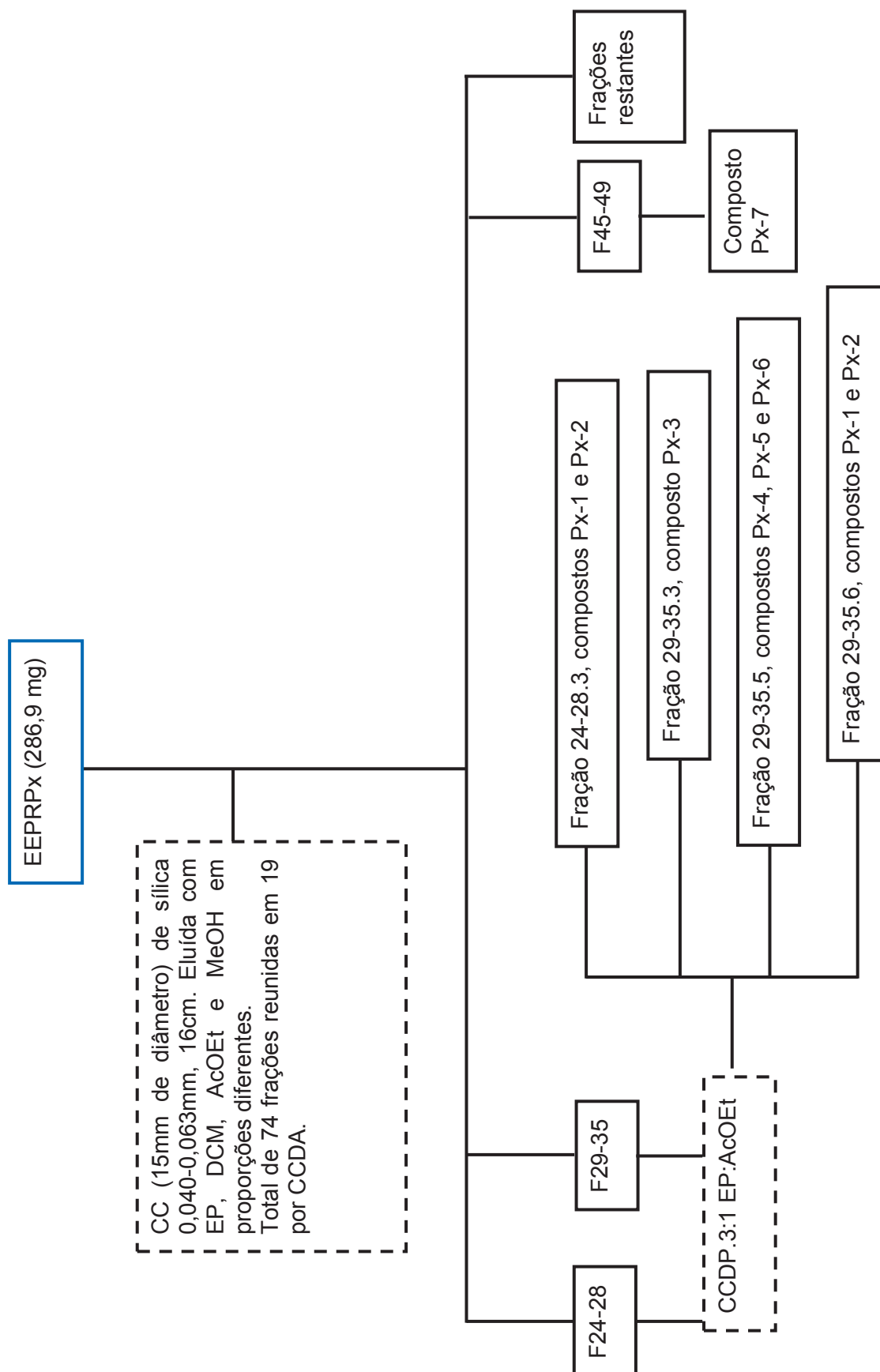


Figura 3: Purificação do extrato em éter de petróleo das raízes de *Piper xylosteoides* (EEPRPx).

### 3.2.6.1 Extrato em éter de petróleo do caule de *P. xylosteoides*.

Novamente, a totalidade do extrato (385,7 mg) foi submetida à separação, desta vez utilizando a cromatografia de fase líquida de alta eficiência (CLAE) a fim de evitar a perda de massa, devido à diversas etapas de purificação em coluna ou placa preparativa, das substâncias presentes no extrato.

Primeiramente foi feita a otimização do gradiente de solventes utilizado para a separação. Após diversos testes, a melhor condição foi observada no seguinte gradiente de ACN e H<sub>2</sub>O: 0 minutos, 50% de ACN; 0-10 minutos, gradiente linear com a variação de 50 para 66% de ACN; 10-21 minutos, gradiente linear de ACN variando de 66 para 69% de ACN. Foram observados mais de 40 picos no cromatograma e os 15 de maior intensidade (figura 4) foram coletados utilizando o coletor de frações automático. Após a coleta, cada fração foi congelada e separada em fase orgânica e fase aquosa, resultando em 30 frações (figura 5).

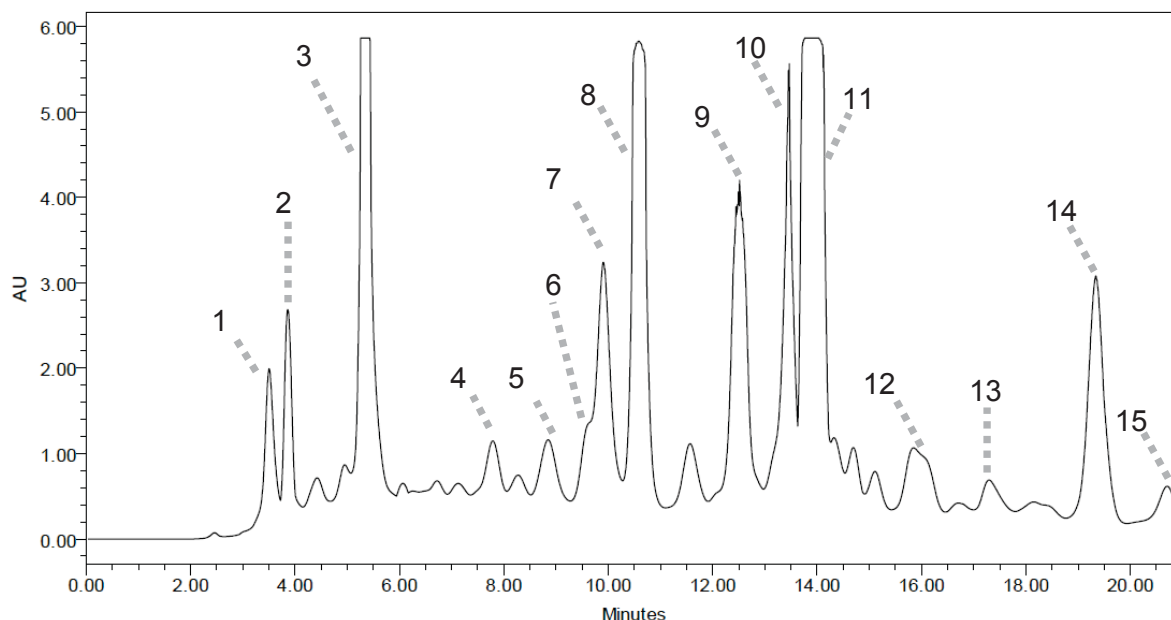


Figura 4: Cromatograma do EEPCPx analisado por CLAE

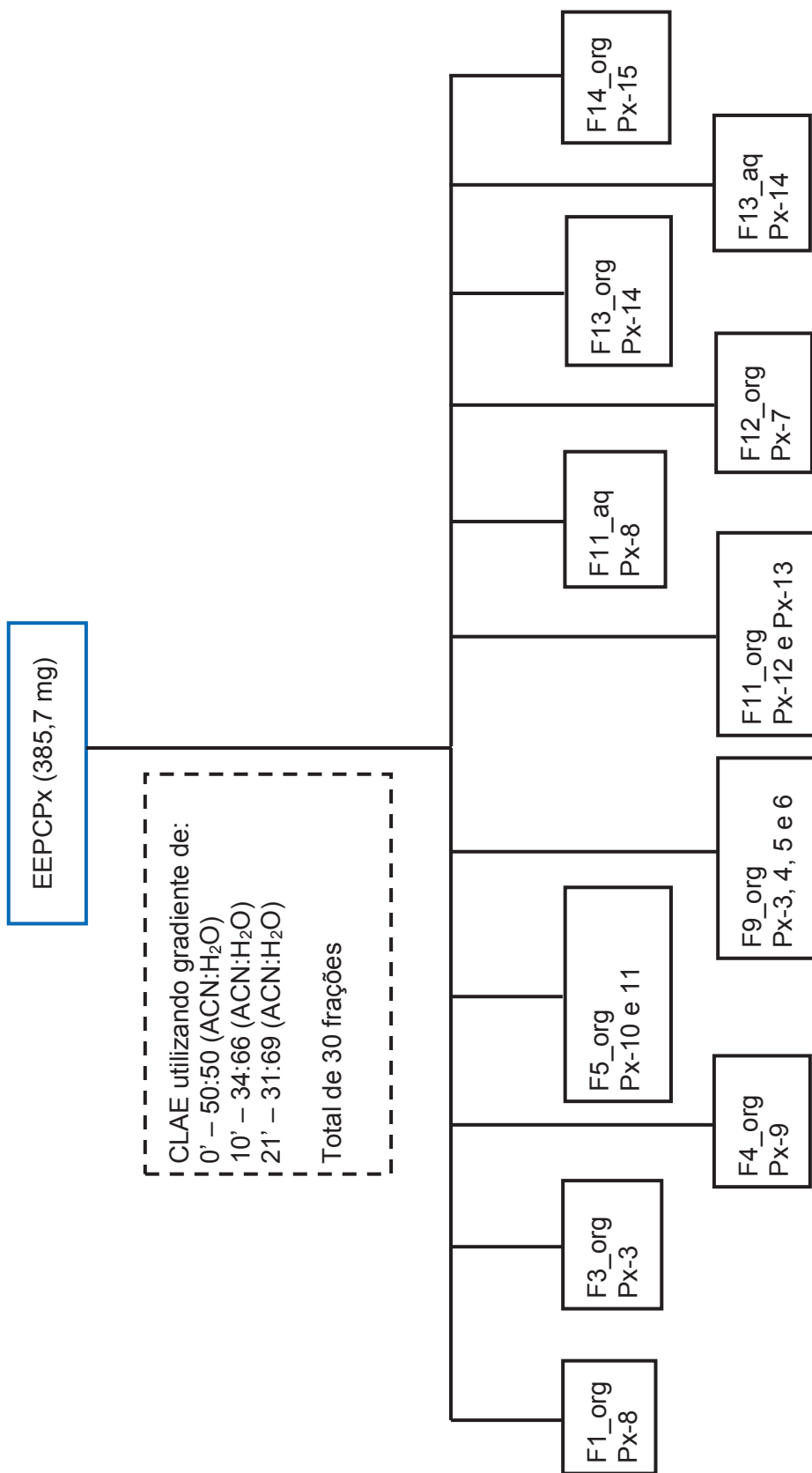


Figura 5: Purificação do extrato em éter de petróleo de caules de *P. xylosteoides* (EEPCPx).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Após a extração dos óleos essenciais, foi calculado o rendimento de cada extração (massa de material / volume de óleo) (tabela 1, caderno de apêndices, apêndice 3, página 5) e então, preparada uma solução de 1mg/mL em hexano (ultra puro) de cada óleo obtido. Essa solução foi submetida primeiramente à CG/EM e em seguida à GC×GC/MS e com os tempos de retenção, foram calculados os índices de retenção baseados na equação [1]. Para a identificação dos compostos da mistura, o espectro de massas de cada substância juntamente com o índice aritmético foram comparados com a literatura (ADAMS, 2007) e com as bibliotecas de massas NIST05, NIST21, NIST107, WILEY139 e SHIM2205 por meio do programa interpretativo automático.

$$[1] \text{Índice Aritmético} = 100 \times (C_n - C_{n-1}) \times \left( \frac{T_x - T_{n-1}}{T_n - T_{n-1}} \right) + 100 \times C_{n-1}$$

Onde  $C_n$  é o número de carbonos do alcano cujo tempo de retenção é imediatamente superior ao tempo de retenção do analito;

$C_{n-1}$  é o número de carbonos do alcano cujo tempo de retenção é imediatamente inferior ao tempo de retenção do analito;

$T_x$  é o tempo de retenção do analito;

$T_n$  é o tempo de retenção do alcano  $C_n$ ;

$T_{n-1}$  é o tempo de retenção do alcano  $C_{n-1}$ .

Na análise em uma dimensão, foram identificados 9 constituintes majoritários nas folhas e 7 nos galhos de *P. xylosteoides*. Já nas folhas de *P. hemmendorffii*, foram identificados 8 constituintes majoritários e somente 4 nos caules. Após a obtenção dos cromatogramas por meio da cromatografia bidimensional abrangente (figuras 6, 7, 8 e 9), verificaram-se diferenças na quantidade de compostos identificados. Nas folhas de *P. xylosteoides* foram identificados 61 compostos sendo a grande maioria representada por 25 sesquiterpenos e 19 sesquiterpenos oxigenados. Nos galhos dessa planta foram identificados 36 compostos, sendo 15 sesquiterpenos e 12 sesquiterpenos oxigenados. Quanto aos óleos de *P. hemmendorffii* foram identificados 40 compostos nos caules, sendo 12 sesquiterpenos e 14 sesquiterpenos oxigenados, e 40 compostos nas folhas, sendo 22 sesquiterpenos e 14 sesquiterpenos oxigenados.

Dentre todos os constituintes caracterizados, 4 são monoterpenos, 3 são álcoois alifáticos, 2 são ésteres alifáticos, 8 são monoterpenos oxigenados, 9 são hidrocarbonetos alifáticos, 34 compostos são sesquiterpenos, 34 são sesquiterpenos

oxigenados, 2 pertencem à classe dos aldeídos alifáticos e 9 são arilpropanoides. Os resultados estão expostos na tabela 2 a seguir, ordenados de acordo com o índice aritmético.

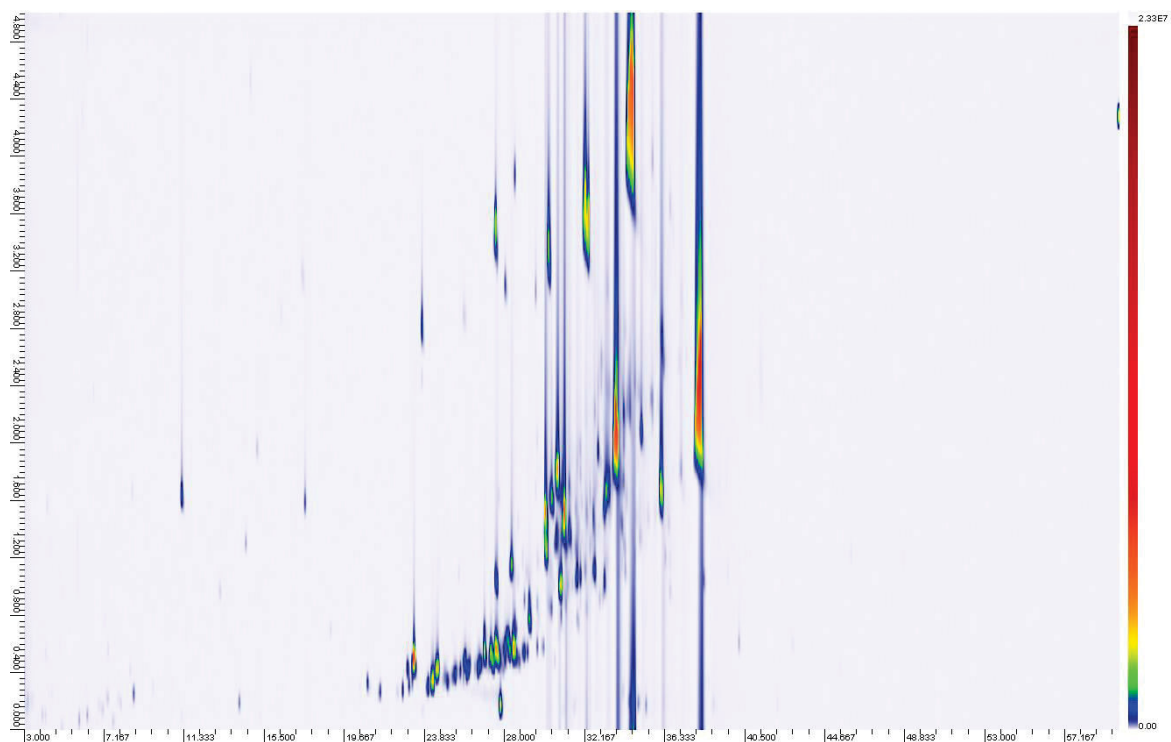


Figura 6: Cromatograma bidimensional do óleo essencial das folhas de *Piper xylosteoides*.

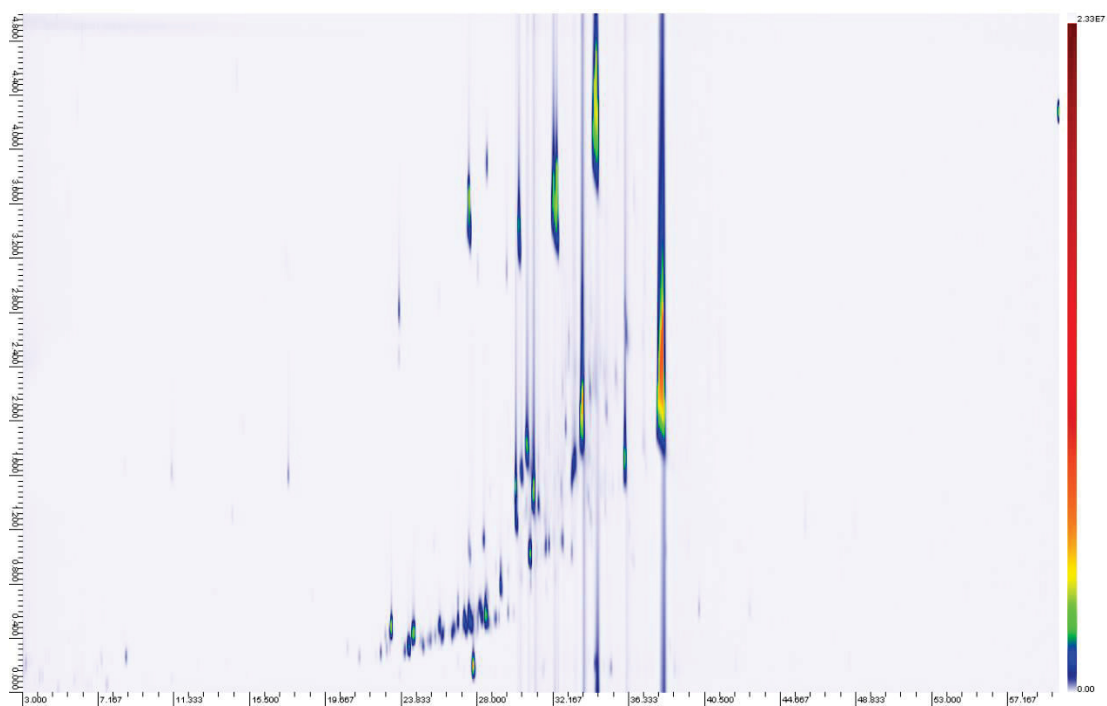


Figura 7: Cromatograma bidimensional do óleo essencial dos galhos de *Piper xylosteoides*.

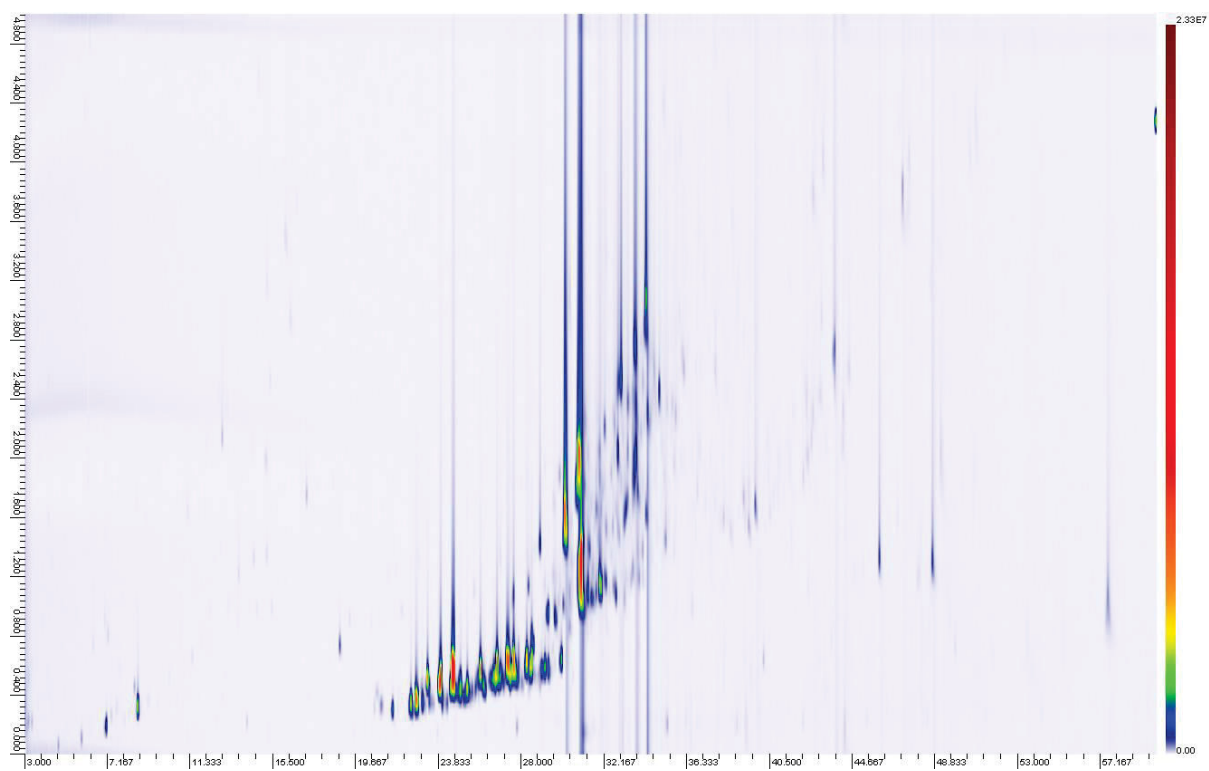


Figura 8: Cromatograma bidimensional do óleo essencial das folhas de *Piper hemmendorffii*.

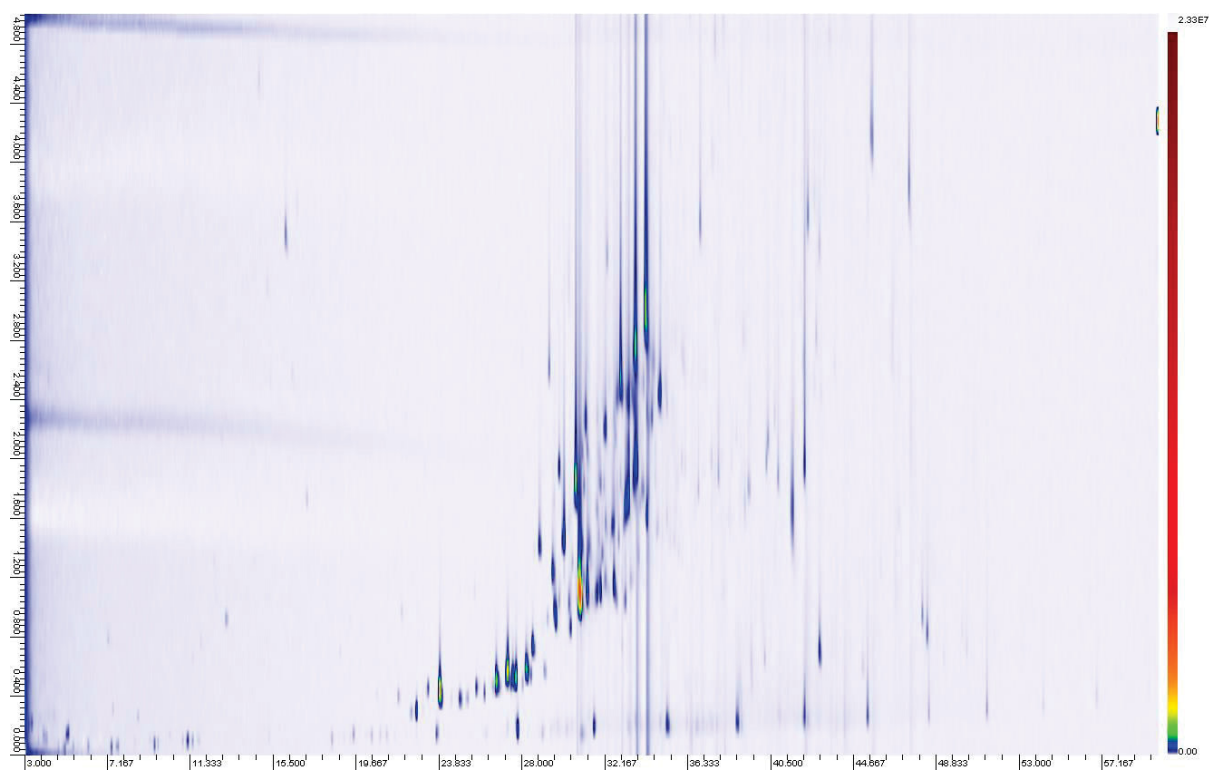


Figura 9: Cromatograma bidimensional do óleo essencial dos caules de *Piper hemmendorffii*.

Tabela 2: índices de retenção e proposta estrutural de cada substância dos óleos essenciais.

Substância	IR <sup>1</sup>	<i>P. xylosteoides</i>				<i>P. hemmendorffii</i>			
		Folhas		Galhos		Folhas		Caule	
		IR	% <sup>2</sup>	IR	% <sup>2</sup>	IR	% <sup>2</sup>	IR	% <sup>2</sup>
Rendimento %		7,0%		3,5%		1,7%		1,0%	
$\alpha$ -pineno	932	934	0,09			934	0,90	934	3,62
canfeno	946	950	0,02						
$\beta$ -pineno	974					986	1,65	979	7,02
3-octanol	988							993	
limoneno	1024	1030		1024		1030	5,76		
isobutanoato de pentila	1049							1053	
óxido de $\alpha$ -pineno	1099	1101							
<i>n</i> -undecano	1100							1100	
cânfora	1141	1149							
óxido de <i>E</i> -linalool	1173	1173							
neo-verbanol	1182	1182							
$\alpha$ -terpineol	1187	1197							
Z-carveol	1226							1221	
piperitona	1252	1255		1255					
acetato de isobornila	1283					1285			
$\gamma$ -elemeno	1335	1332							
$\alpha$ -cubebeno	1345	1348							
ciclosativeno	1369					1370			
longiciclono	1371					1380	0,96		
$\alpha$ -copaeno	1374	1374		1374		1378		1376	
$\beta$ -panasinseno	1381	1382							
$\beta$ -bourboneno	1387	1384				1384			
$\beta$ -elemeno	1389	1390		1389		1390			
<i>n</i> -tetradecano	1400							1401	
metileugenol	1403	1401		1403					
Z-cariofileno	1408	1408		1408		1406	2,20	1404	18,82
<i>E</i> -cariofileno	1417	1414	8,61	1417	0,19	1423	31,89		
4,8-epoxicariofilano	1423	1421		1421					

$\beta$ -copaeno	1430				1431	1429
<i>E</i> -bergamoteno	1432	1433		1433		
aromadendreno	1439	1443		1443	1439	
6,9-guaiadieno	1442	1449		1449		1449
humuleno	1452	1455		1455	1455	
dehidro aromadendrano	1460	1459		1459	1459	1459
9- <i>epi-E</i> -cariofileno	1464	1474		1474		1474
$\alpha$ -neocallitropseno	1472				1472	
$\gamma$ -muuroleno	1478				1476	
widdra- 2,4(14)dieno	1481	1480		1480	1480	
<i>E</i> -eudesma-6,11- dieno	1489	1488		1488		1488
$\delta$ -selineno	1492				1490	
<i>Z</i> -guaieno	1492	1495		1494	1492	1494
asaricina	1495			1495		
viridifloreno	1496	1496			1498	1498
pentadecano	1500	1500		1503		1503
<i>E,E</i> - $\alpha$ -farneseno	1505	1509				
$\delta$ -amorfenno	1511	1513		1513	1513	1511
$\gamma$ -cadineno	1513	1516		1518		
<i>Z</i> - $\gamma$ -bisaboleno	1514	1518			1527	1,21
miristicina	1517	1521				
$\delta$ -cadineno	1522				1520	1520
<i>Z</i> -nerolidol	1530				1531	1529
$\gamma$ -cupreneno	1532	1533	3,33		1533	
$\alpha$ -cadineno	1537	1537			1537	
$\alpha$ -copaen-11-ol	1539				1541	
$\alpha$ -calacoreno	1544				1542	
epoxido de italiceno	1547	1539		1539		1550
decano-1,10-diol	1547				1550	1546
elimicina	1555	1549				
'germacreno b	1559	1559			1559	
<i>E</i> -nerolidol	1561	1561	1,38	1561	0,21	1561
maaliol	1566	1563		1566		

longipinanol	1567	1570		1570				
Z-isoelmicina	1568	1567		1567				
tridec-2-en-1-al	1567							1570
Z-hidroapofarnesol	1571					1568		
espatulenol	1577	1577	1,47	1577	0,42	1583	12,91	1577
hidrato de <i>E</i> - sesquisabineno	1577	1579						
óxido de cariofileno	1582	1583		1583				1581
1-hexadeceno	1588							1590
allohedecariol	1589	1588				1587		
<i>E</i> -dihidro- apofarnesol	1590							1592
viridiflorol	1592	1594						
<i>n</i> -hexadecano	1600							1600
ledol	1602	1605		1588	0,59			1605 18,66
$\beta$ -asarona	1616	1617	2,41	1618	0,80			
2,(7Z)- bisaboladien-4-ol	1618					1612		
dillapiol	1620	1622	2,27	1622	3,26			
eremoligenol	1629	1628						1628
$\alpha$ -acorenol	1632	1630						
$\beta$ -acorenol	1636	1635						
epóxido de alloaromadendreno	1639					1637		1637
cariophila-4,8-dien- 5-ol	1639					1640		
$\alpha$ -muurolol	1644	1644		1646				1644
cubenol	1645							1648
agarospirol	1646	1646				1646		
diidro-eudesmol	1661	1660		1660		1660		
neo-intermedeol	1658					1660		
14-hidroxi-9-epi- <i>E</i> - cariofileno	1668							1658
<i>n</i> -tetradecanol	1671							1672
$\alpha$ -asarona	1675	1684	19,26	1682	24,40			
cadaleno	1675							1673
acetato de	1680					1676		

elemoila				
germacra-4,5,10-trien-1-ol	1685			1692
<i>n</i> -heptadecano	1700			1700
acetato de <i>E</i> -nerolidila	1716	1724	1724	
$\gamma$ -curcumen-15-al	1766	1782	1783	
<i>n</i> -octadecano	1800			1800
acetato de khusinolila	1823			1831
<i>n</i> -nonadecano	1900			1900
5 <i>E</i> ,9 <i>E</i> -farnesil	1913			1901
acetona				
hexadecanoato de metila	1921			1924
<i>n</i> -eicosano	2000			2000

<sup>1</sup>Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2007). <sup>2</sup>Porcentagem obtida do cromatograma monodimensional

O grande contraste observado na quantidade de compostos identificados entre as duas técnicas de análise utilizadas pode ser atribuído primeiramente à adição da segunda coluna, neste caso mais polar que a primeira, que faz com que compostos de polaridades diferentes, mas que possuam a mesma pressão de vapor na temperatura de análise, sejam separados. Isso pode ser demonstrado comparando as análises mono e bidimensional de um mesmo óleo. Com a segunda dimensão foi possível a identificação de diversos componentes a mais que possuem o mesmo  $t_R^1$  ou seja, coeluem na mesma coluna do espaço cromatográfico, e só são separados em linhas diferentes devido a interação com a coluna polar.

A diferença principal entre as duas análises é o modulador do cromatógrafo bidimensional. Nesta região do equipamento, que fica entre a primeira e a segunda coluna, um jato de nitrogênio líquido faz com que ocorra um resfriamento rápido de uma pequena porção da coluna, retendo os compostos. Após o tempo de resfriamento, neste caso programado para 3750 ms, um jato quente faz com que os compostos sejam liberados, primeiramente para o *loop* e depois para a segunda coluna como pode ser visto na figura 10. Este processo auxilia também na detecção de compostos de concentração mais baixa, uma vez que o uso de um sistema de criogenia retarda os analitos e refoca as bandas, tornando-as mais finas antes da injeção na segunda coluna.

A quantificação dos constituintes foi feita baseada na área dos picos em relação à área total do cromatograma obtido por CG/EM, uma vez que o modulador utilizado para as análises bidimensionais encontrava-se com problemas de funcionamento, resultando em picos com rastros muito grandes o que impossibilita a integração correta de cada sinal. Essa análise será refeita para quantificar os principais componentes.

Outra vantagem da GC×GC é de formar cromatogramas estruturados. Na figura 11, os compostos do óleo essencial dos galhos de *Piper xylosteoides* foram separados em grupos de acordo com os índices de retenção, que estão relacionados às estruturas dos componentes. Percebe-se que os componentes de maior polaridade apresentam maior tempo de retenção na segunda dimensão, como era esperado devido à maior interação com a coluna da segunda dimensão, que é polar.

Com os cromatogramas estruturados, após a identificação dos componentes de um dos óleos, a identificação dos outros se torna mais fácil. Por exemplo, comparando os cromatogramas de uma espécie com a outra, percebe-se que nos cromatogramas da espécie *Piper hemmendorffii* (figuras 8 e 9) existem poucos sinais com  $t_R^2$  acima de 3 segundos, que na espécie *P. xylosteoides* foram identificados como arilpropanoides (figura 11). Sendo assim, é possível concluir que nos óleos de *P. hemmendorffii* a concentração de arilpropanoides é baixa, uma vez que os resultados foram obtidos sob as mesmas condições de análise.

Este é o primeiro relato da utilização da GC×GC/MS para caracterizar óleos essenciais de *P. xylosteoides* e o primeiro relato da caracterização do óleo essencial de *P. hemmendorffii* tanto por uni como bidimensional. Estes resultados estão condizentes com estudos de óleos essenciais de outras espécies da família Piperaceae, que é conhecida por apresentar espécies ricas em óleos voláteis compostos principalmente de sesquiterpenos (SIMOES 2003; BANDONI; CZEOAK, 2008; SANTOS, 2013).

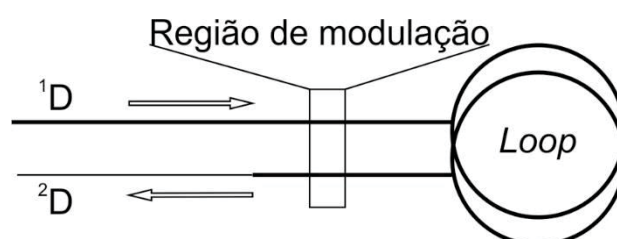


Figura 10: Representação do modulador de 2 jatos com *loop*.

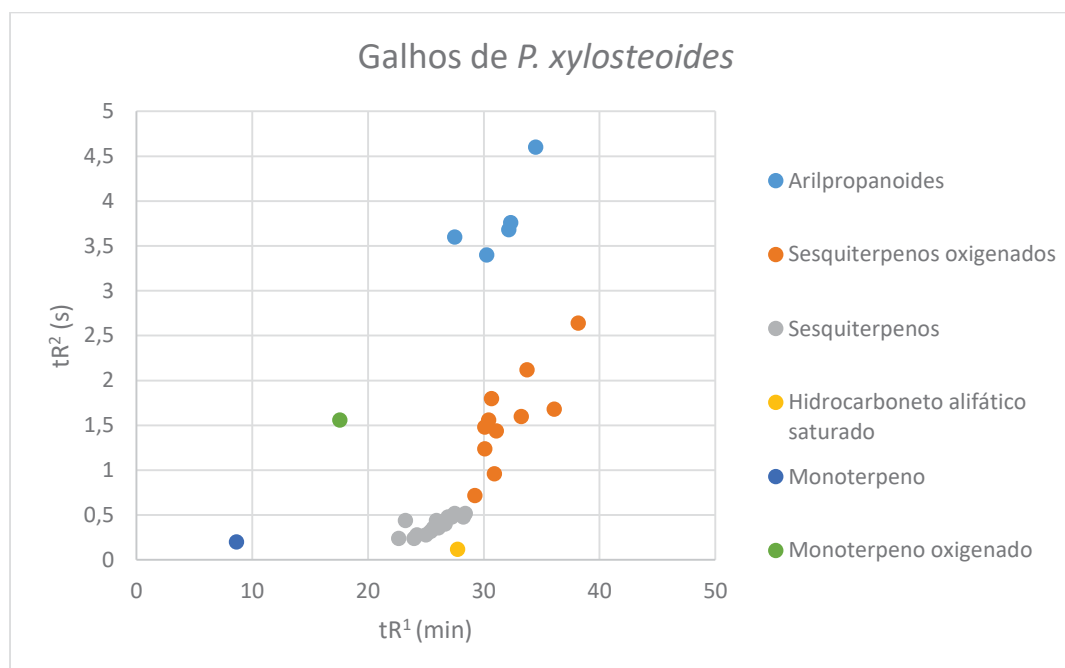


Figura 11: Representação do cromatograma do óleo essencial dos galhos de *P. xylosteoides*.

Os resultados apresentados da espécie *P. xylosteoides* possuem semelhanças com os publicados anteriormente por Ferraz e colaboradores, que trabalhou com partes aéreas frescas. Apesar de a classe dos arilpropanoïdes ser a majoritária (próximo de 50% do óleo com 47,83% de safrol) no trabalho de Ferraz, grande parte dos sesquiterpenos identificados por ele, como  $\gamma$ -cadineno, espatulenol, globulol, aromadendreno,  $\beta$ -elemeno, também estão presentes no nosso trabalho. Porém, estes resultados não se assemelham aos resultados obtidos por Potzernheim e colaboradores, que publicaram a identificação de 77,7% de monoterpenos, principalmente mirceno (31%), e 22,3% de sesquiterpenos em folhas secas de *P. xylosteoides* (FERRAZ, 2010; POTZERNHEIM, 2006b). Essa diferença composicional pode ser atribuída a diversos fatores que influenciam o crescimento da planta como condições climáticas, luz, temperatura, disponibilidade de água, localização geográfica, condições do solo e período de colheita (BARROS, 2009; PAULI, 2001).

#### 4.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

O estudo dos extratos em éter de petróleo das raízes e caules de *P. xylosteoides* forneceu, até o momento, quinze compostos identificados. Desses quinze compostos, quatro são da classe dos arilpropanoïdes, um aldeído aromático, uma flavona, um flavonol, um ácido carboxílico aromático, um sesquiterpeno, uma lignana inédita na literatura e cinco neolignanas sendo três inéditas na literatura e uma delas apresentada como segundo relato na literatura

## 4.2.1 ANÁLISE DAS FRAÇÕES DO EEPRPX

### 4.2.1.2 Subfração 29-35.3

Do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 12), foi possível observar 3 sinais próximos de  $\delta$  3,90, referentes a 3 grupos metoxila, dois simpletos em  $\delta$  7,34 e em  $\delta$  6,50 referentes a hidrogênios ligados a um anel benzênico tetrassubstituído e um simpleto em  $\delta$  10,33, referente a um hidrogênio ligado a carbonila. Sendo assim, foram adquiridos os espectros de *g*HSQC e *g*HMBC (figuras 13 e 14) onde as correlações observadas de maior importância foram do hidrogênio em  $\delta$  10,33 com um sinal em  $\delta$  188,0 a uma ligação, referente a uma carbonila, e com os carbonos 1 e 6 pelo mapa de correlações a longa distância. Com isso, foi possível a elucidação completa do composto Px-1 (tabela 3), descrito na literatura como asaronaldeído (figura 15) (LEE, 2007 e FURUTA, 2010). De acordo com pesquisas recentes, este é o segundo relato do isolamento desta substância em Piperaceae sendo que o primeiro foi feito por LIKHITWITAYAWUID e colaboradores em 1988 de uma fração não polar dos frutos de *Piper sarmentosum* (LIKHITWITAYAWUID, 1988).

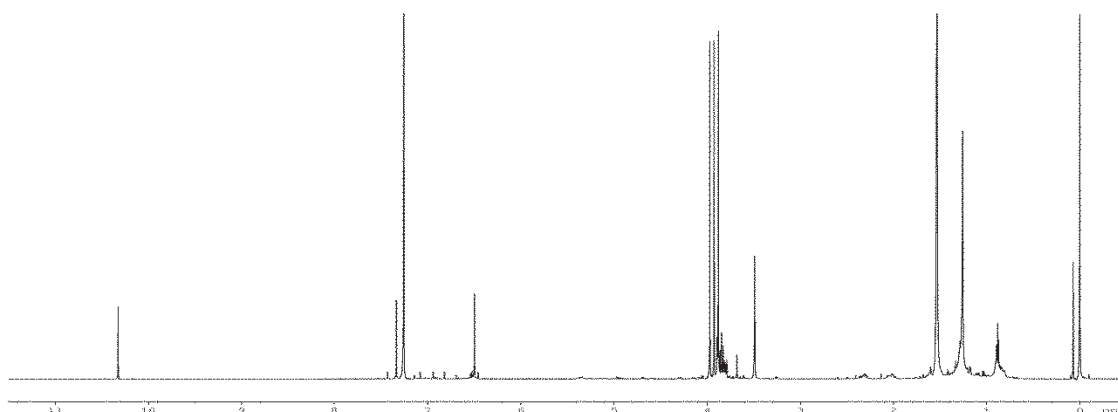


Figura 12: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da subfração 29-35.3, composto Px-1.

Tabela 3: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para Px-1, subfração 29-35.3.

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	$\delta_{^{13}\text{C}}^*$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)*
1	117,4			118,03	
2	155,8			158,17	
3	96,3	6,50 s (1H)	1, 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 5, CHO	97,59	6,50 s (1H)
4	158,6			160,77	
5	143,7			144,92	
6	109,3	7,34 s (1H)	2, 4, 5 <sup>a</sup> , CHO	110,25	7,33 s (1H)
OMe	56,4	3,92 s (3H)	4	56,84	3,98 s (3H)
OMe	56,25	3,97 s (3H)	2	56,70	3,98 s (3H)
OMe	56,35	3,88 s (3H)	5	56,72	3,93 s (3H)
CHO	188,0	10,33 s (1H)	1 <sup>a</sup> , 6	189,47	10,30 s (1H)

<sup>a</sup> Correlação fraca. \* Dados da literatura

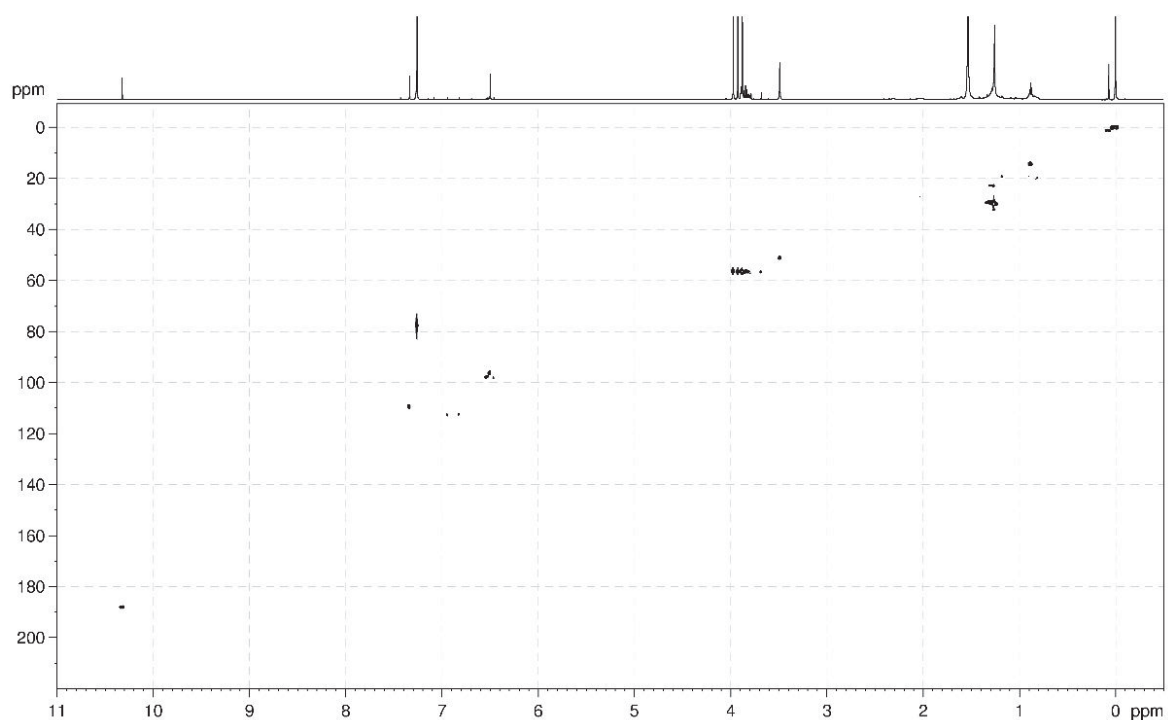


Figura 13: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  da fração 29-35.3, composto Px-1.

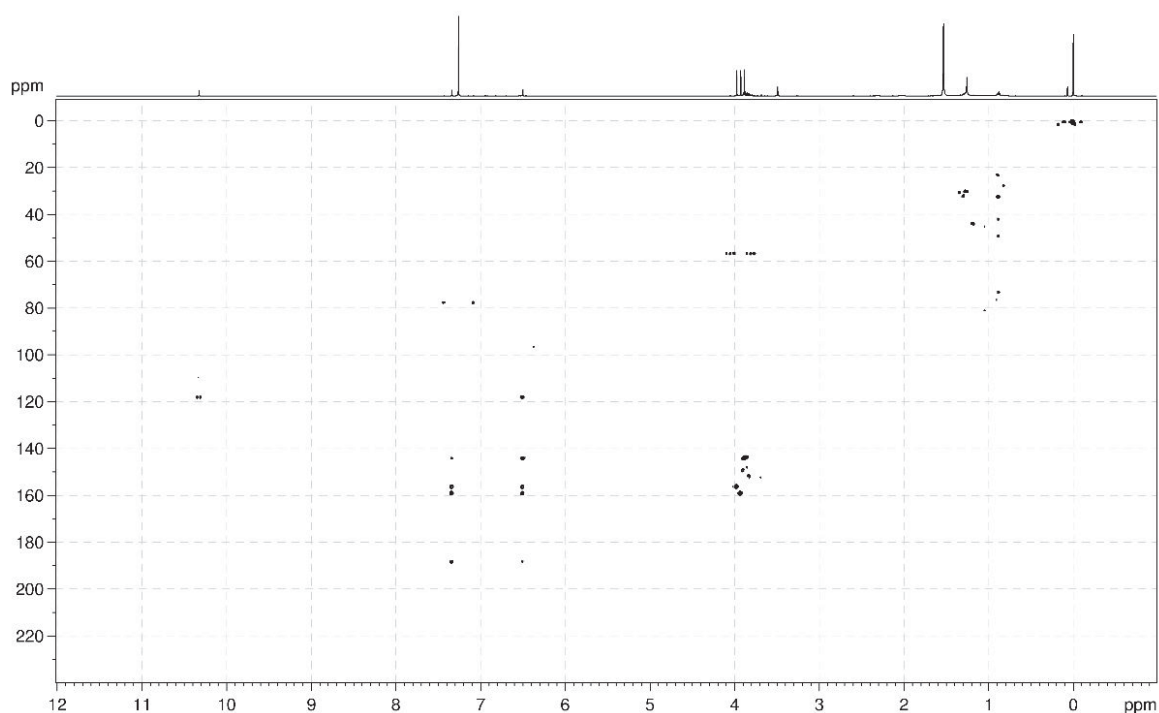


Figura 14: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em  $\text{CDCl}_3$  da fração 29-35.3, composto Px-1.

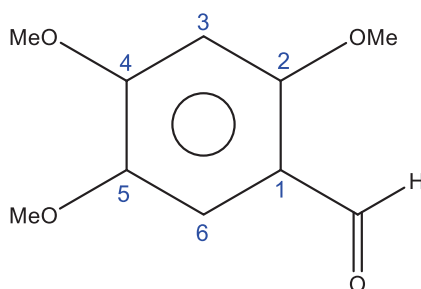


Figura 15: Estrutura do composto Px-1, subfração 29-35.3.

#### 4.2.1.3 Subfração 29-35.5

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração 29-35.5 (figura 16), foi possível observar a presença de diversos sinais, indicando que se tratava de uma mistura de três compostos e pela semelhança entre os sinais, de possíveis isômeros. Simpletos em  $\delta$  6,95, 6,84, 6,69, 6,54, 6,53 e 6,50 típicos de hidrogênios ligados a anel benzênico oxigenado, um duplo duplo duplete em  $\delta$  3,32 ( $J = 6,6:1,6:1,4$  Hz), duplos quartetos em  $\delta$  6,65 ( $J = 15,8:1,7$ ) e 6,09 ( $J = 15,8: 6,6$ ) referentes à hidrogênios ligados a carbonos de ligação dupla *E* vizinhos a uma metila, outros dois duplos quartetos em  $\delta$  6,49 ( $J = 11,7: 1,6$ ) e 5,78 ( $J = 11,7: 7,1$ ) referentes aos hidrogênios ligados a carbonos de ligação dupla *Z* vizinhos a uma metila. Observou-se ainda duplos duplos duplos dupletos em  $\delta$  5,02 ( $J = 10,4: 1,6: 1,4: 0,3$ ) e 5,03 ( $J = 16,8: 1,6: 1,4: 0,3$ ) e um duplo duplo triplete em  $\delta$  5,96 ( $J = 16,8: 10,4: 6,6$ ) característicos de ligação dupla terminal. Na região dos hidrogênios

alifáticos, foram observados nove simpletos entre  $\delta$  3,80-3,92 referentes a grupos metoxila, um duplo duplo duplete em  $\delta$  3,32 ( $J = 6,6:1,6:1,4$ ) e dois duplos dupletos em  $\delta$  1,89 ( $J = 6,7:1,7$ ) e 1,84 ( $J = 7,1:1,6$ ) referentes a dois grupos metila ligados a ligação dupla (figura 17). Sendo assim, foram feitos os experimentos de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (*g*HSQC e *g*HMBC) para elucidar completamente as três moléculas. O resultado está expresso nas tabela 4.

A atribuição dos sinais, feita com base nos experimentos de RMN de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a curta e longa distância, pode ser confirmada analisando as estruturas de ressonância possíveis para estas moléculas. Ainda, os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  concordam com os dados da literatura, tanto para a  $\alpha$ -asarona (composto Px-2, figura 24) (CABRERA, 2012) como para a  $\beta$ - (composto Px-3, figura 25) (LIM, 2014) e a  $\gamma$ -asarona (composto Px-4, figura 26) (PATRA, 1981).

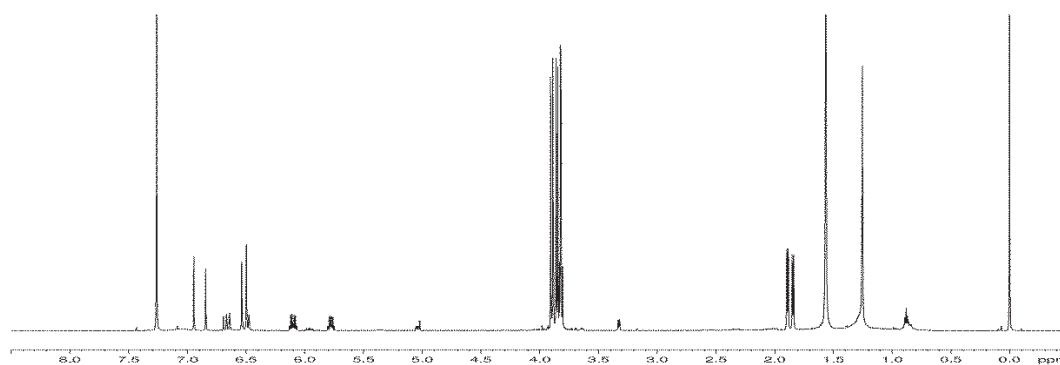
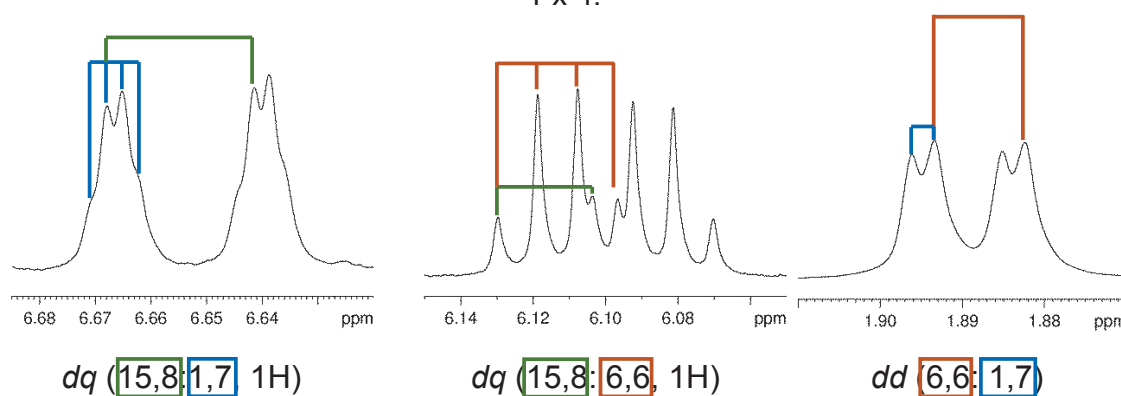


Figura 16: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 29-35.5, compostos Px-2, Px-3 e Px-4.



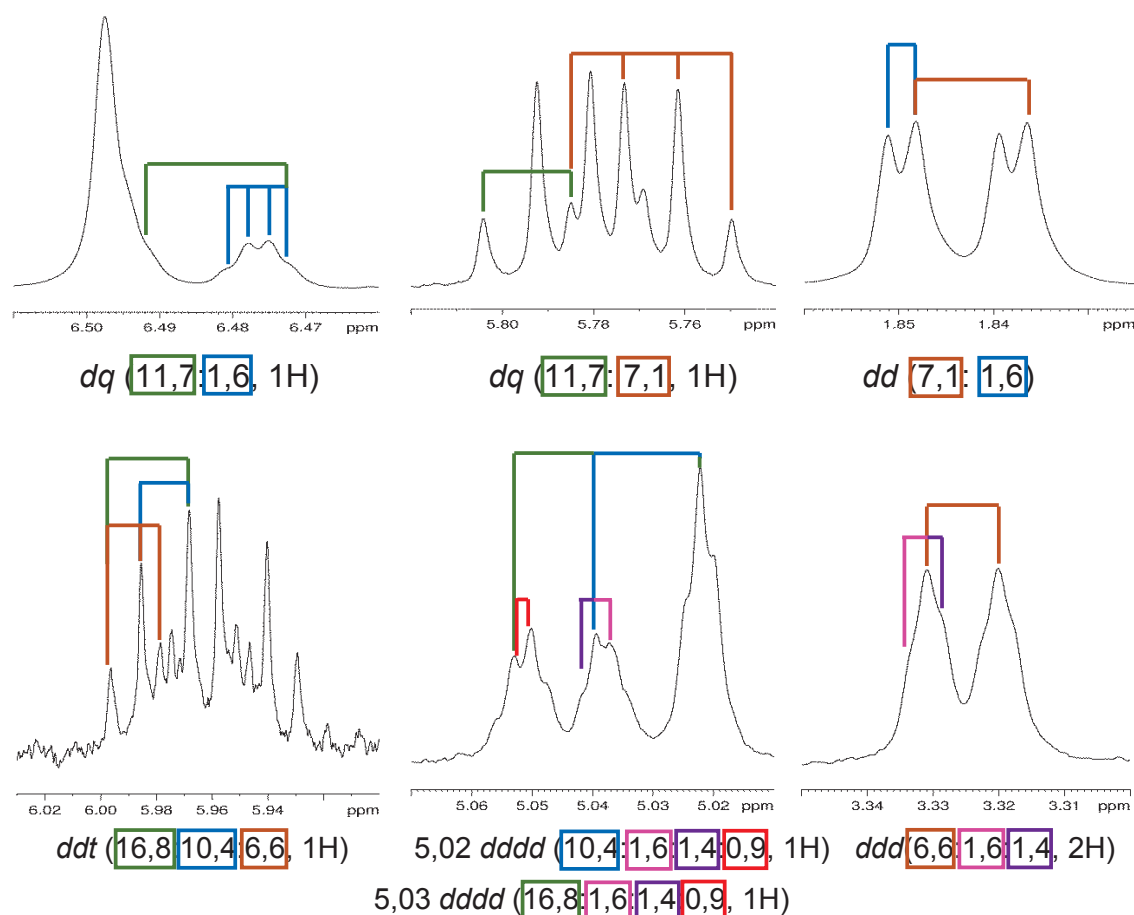


Figura 17: Expansões relevantes do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>) da fração 29-35.5, compostos Px-2, Px-3 e Px-4 respectivamente, ilustrando as constantes de acoplamento.

As multiplicidades dos sinais dos grupos propeno dos compostos Px-2, Px-3 e Px-4 podem ser melhor visualizadas quando monta-se o triângulo de pascal referente ao desdobramento do *spin* de cada hidrogênio. No caso dos compostos Px-2 e Px-3 ( $\alpha$ - e  $\beta$ -asarona) os duplo quartetos em  $\delta$  6,65 e  $\delta$  6,49 (figura 17), assim como os duplo quartetos em  $\delta$  6,08 e  $\delta$  5,78 (figura 18), possuem um desdobramento muito semelhante, diferenciando apenas nas constantes de acoplamento. Então para estes casos, o triângulo de pascal possui a mesma forma. Para Px-4 os sinais em 5,96 e 5,02 estão com sua simulação apresentadas nas figuras 19 e 20. É possível observar nas figuras 18, 19, 20 e 21 que o formato do sinal simulado é igual ao sinal obtido experimentalmente, confirmando a atribuição feita.

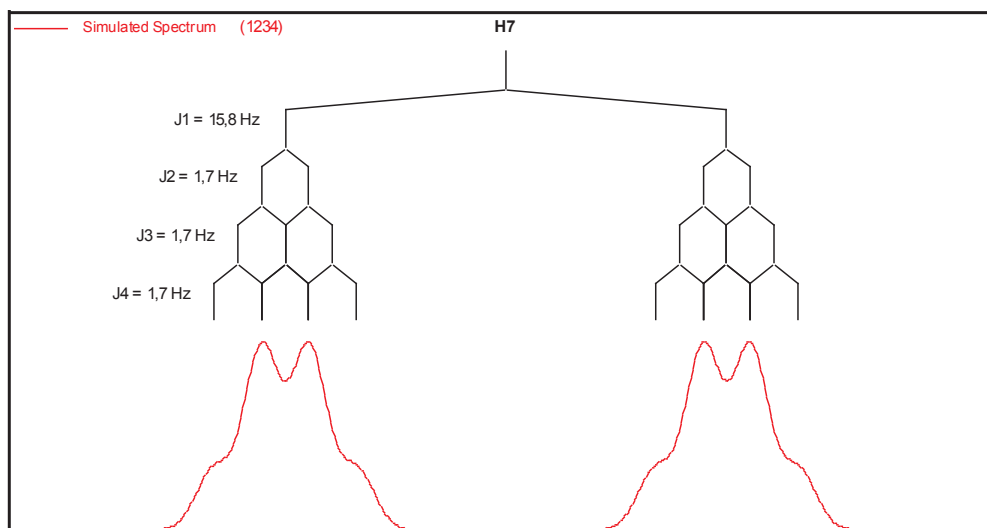


Figura 18: Simulação da multiplicidade dos sinais em  $\delta$  6,65 e  $\delta$  6,49 de Px-2.

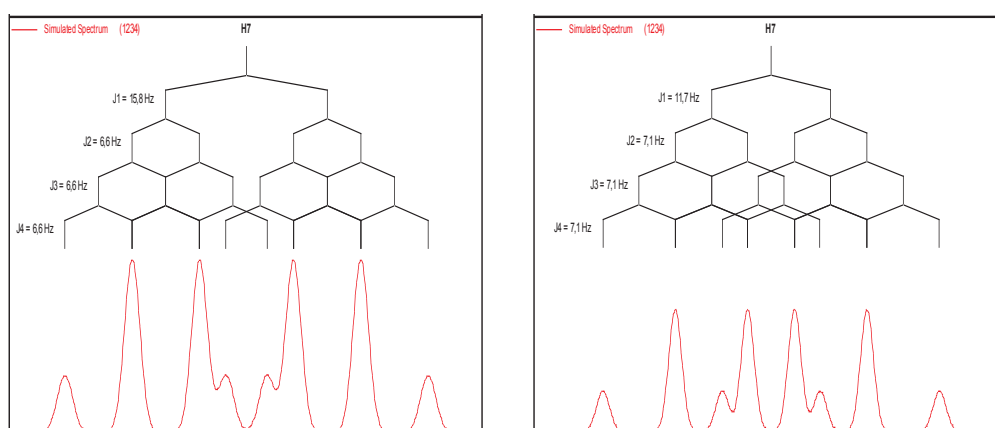


Figura 19: Simulação da multiplicidade dos sinais em  $\delta$  6,09 e  $\delta$  5,78 de Px-3.

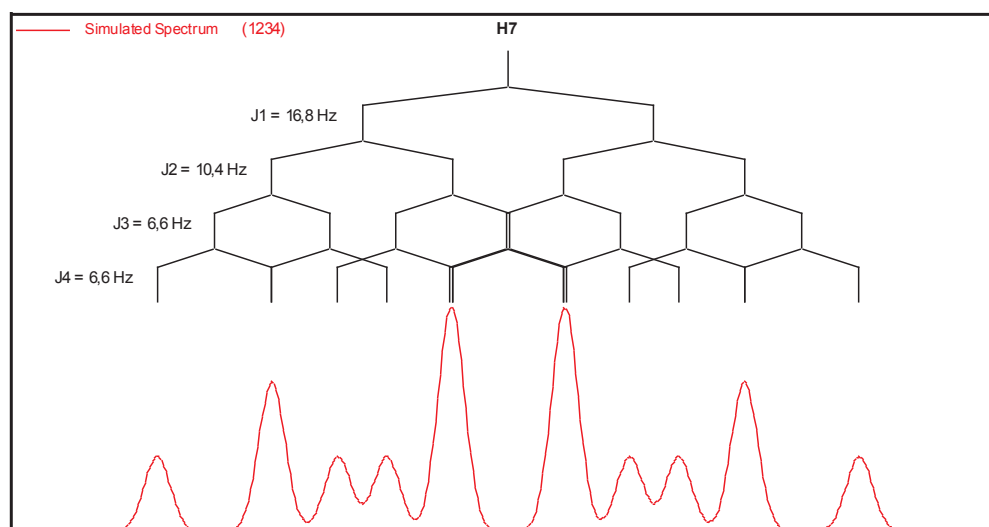


Figura 20: Simulação da multiplicidade do sinal em  $\delta$  5,96 de Px-4.

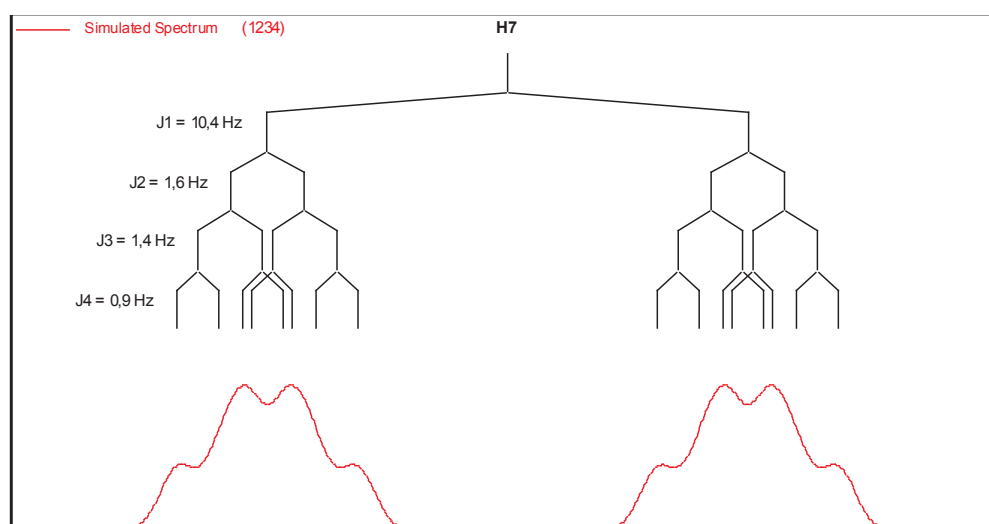


Figura 21: Simulação da multiplicidade do sinal em  $\delta$  5,02 de Px-4.

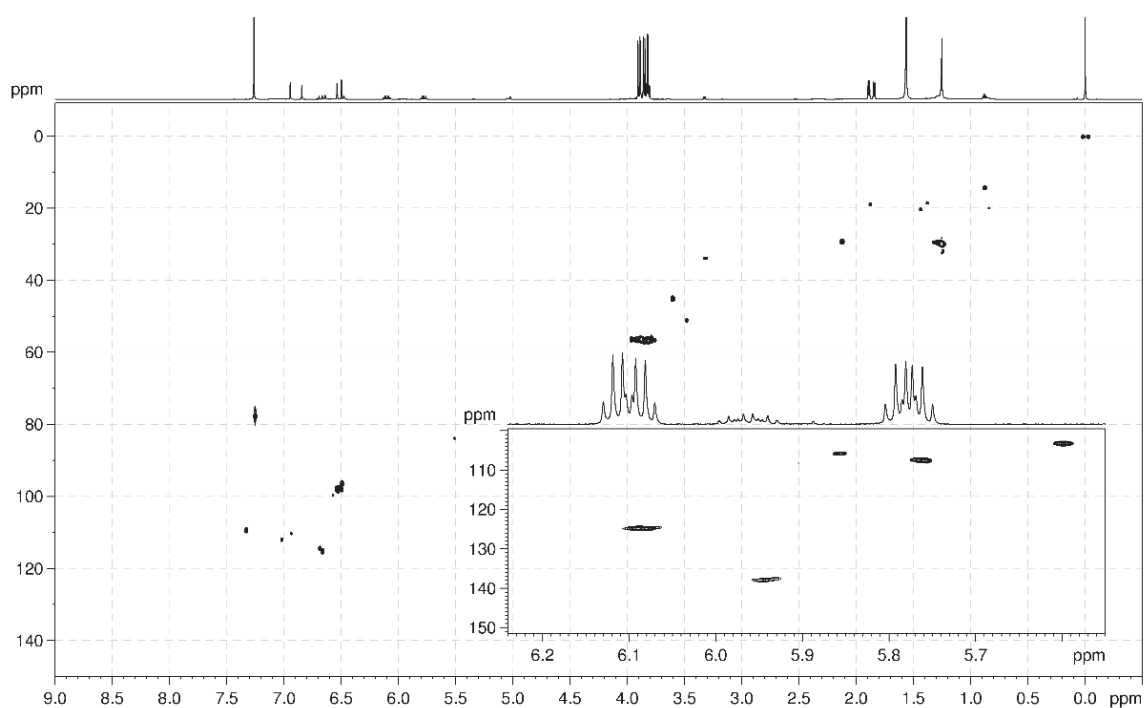


Figura 22: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  da fração 29-35.3, compostos Px-2, Px-3 e Px-4.

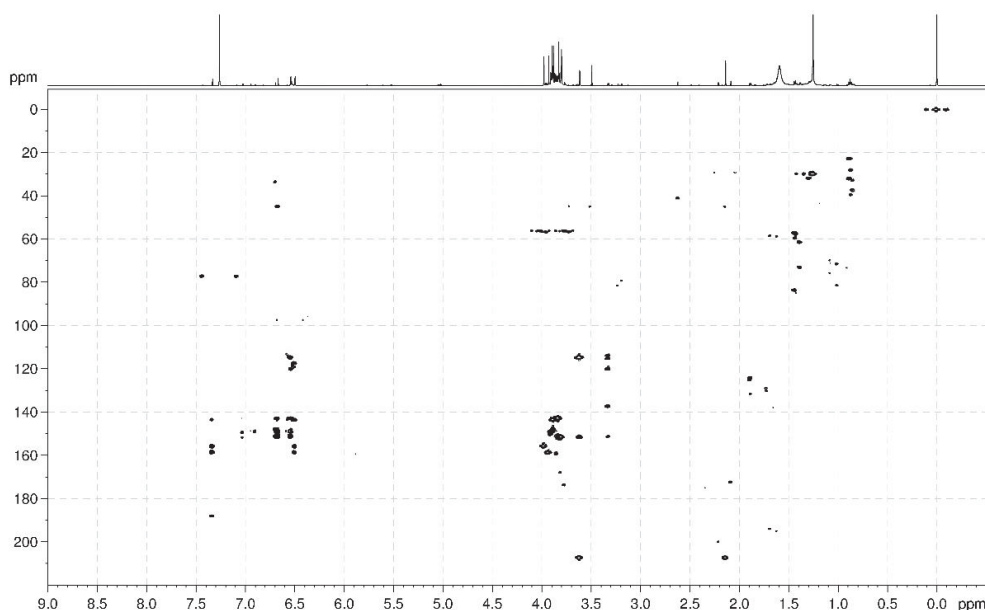


Figura 23: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em  $\text{CDCl}_3$  da fração 29-35.3, compostos Px-2, Px-3 e Px-4.

Tabela 4: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para os compostos Px-2, 3 e 4 ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -asarona, respectivamente).

Posição	$\alpha$ -asarona		$\beta$ -asarona		$\gamma$ -asarona	
	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)
1	118,6		118,1		120,0	
2	148,2		148,2		151,4	
3	98,3	6,50 s (1H)	96,7	6,54 s (1H)	97,7	6,53 s (1H)
4	150,5		151,8		147,9	
5	143,0		143,0		142,8	
6	110,1	6,94 s (1H)	110,8	6,84 s (1H)	114,3	6,69 s (1H)
1'	125,1	6,65 dq (15,8:1,7, 1H)	126,1	6,49 dq (11,7:1,6, 1H)	33,8	3,32 ddd (6,6:1,6:1,4, 2H)
2'	124,5	6,09 dq (15,8: 6,7, 1H)	123,5	5,78 dq (11,7: 7,1, 1H)	137,7	5,96 ddt (16,8:10,4:6,6:6,6, 1H)
3'	18,9	1,89 dd (6,7: 1,7, 3H)	14,7	1,84 dd (7,1: 1,6, 3H)	115,8	5,02 dddd (10,4:1,6:1,4:0,9, 1H)
OMe	56,8	3,82 s (3H)	56,7	3,81 s (3H)	56,3	3,80 s (3H)
OMe	56,3	3,88 s (3H)	56,2	3,90 s (3H)	56,5	3,88 s (3H)
OMe	56,6	3,85 s (3H)	56,7	3,86 s (3H)	56,6	3,82 s (3H)

<sup>a</sup> Correlação fraca. \* Dados da literatura.

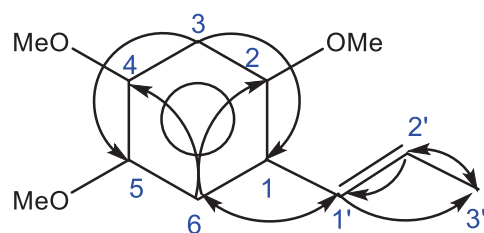


Figura 24: Estrutura do composto Px-2, identificado como  $\alpha$ -asarona, indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de gHMBC.

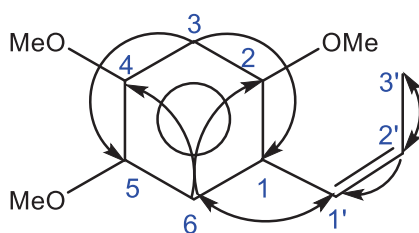


Figura 25: Estrutura do composto Px-3, identificado como  $\beta$ -asarona indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de gHMBC.

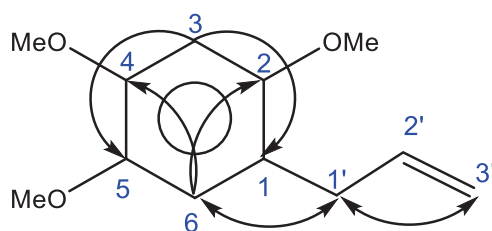


Figura 26: Estrutura do composto Px-4, identificado como  $\gamma$ -asarona indicando as correlações mais importantes obtidas pelo experimento de gHMBC.

Estes compostos já foram identificados anteriormente em plantas do gênero *Acorus*, mais recentemente em *Acorus tatarinowii* por Wang e colaboradores (WANG, 2012). Na família Piperaceae, estes compostos foram relatados em estudos de óleos essenciais.

#### 4.2.1.1 Subfrações 29-35.6 e 24-28.3

Estas sub-frações do extrato apresentaram um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com poucos sinais (figura 27), sendo um simpleto em  $\delta$  6,36 com integral para 1 hidrogênio, indicando a presença de um anel benzênico pentassubstituído, um duplo duplo duplete em  $\delta$  3,31 ( $J = 6,6, 1,4$  e  $1,3$  Hz) juntamente com três duplo duplo duplo dupletos em  $\delta$  5,05 ( $J = 16,9:1,6:1,3:0,3$  Hz),  $\delta$  5,06 ( $J = 10,3:1,6:1,4:0,3$  Hz) e  $\delta$  5,91 ( $J = 16,8, 11,5, 6,8$  e  $6,7$  Hz) (figura 28), sugerindo um grupo alila ligado no anel benzênico, como visto

anteriormente para o composto Px-4. Além destes, outros três sinais (duplo dupletos alargados em  $\delta$  7,49 ( $J = 8,0$  e  $7,5$  Hz) e  $\delta$  7,81 ( $J = 8,0$  e  $1,1$  Hz) e um duplo duplo duplo duplete em  $\delta$  7,60 ( $J = 8,1, 8,0, 1,3$  e  $1,1$  Hz) indicam um anel benzênico monossustituído.

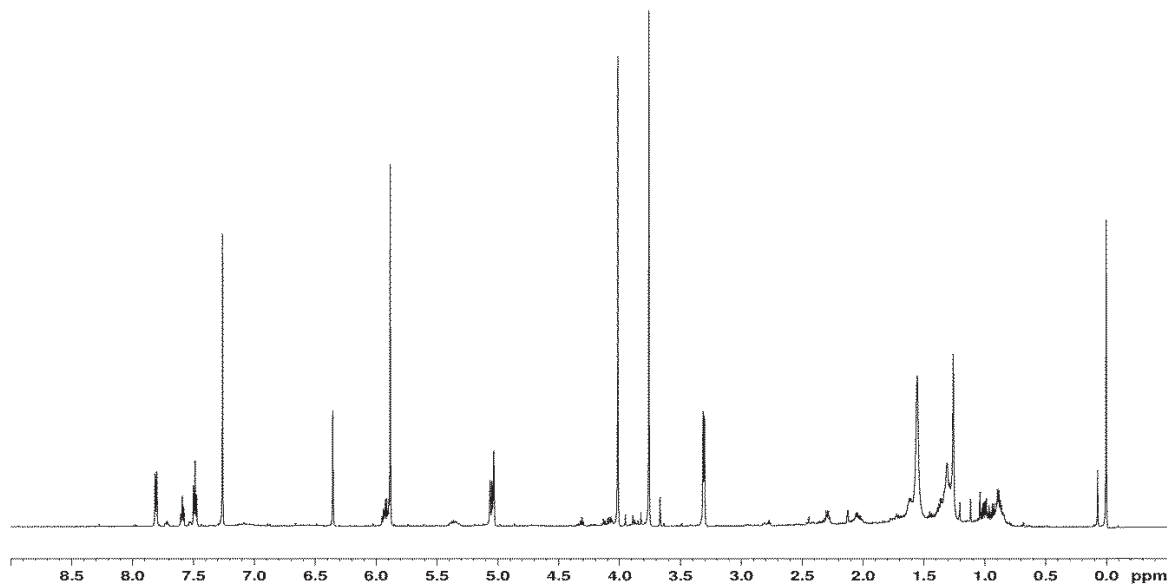


Figura 27: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>) das frações 29-35.6 e 24.28-3, compostos Px-5 e Px-6

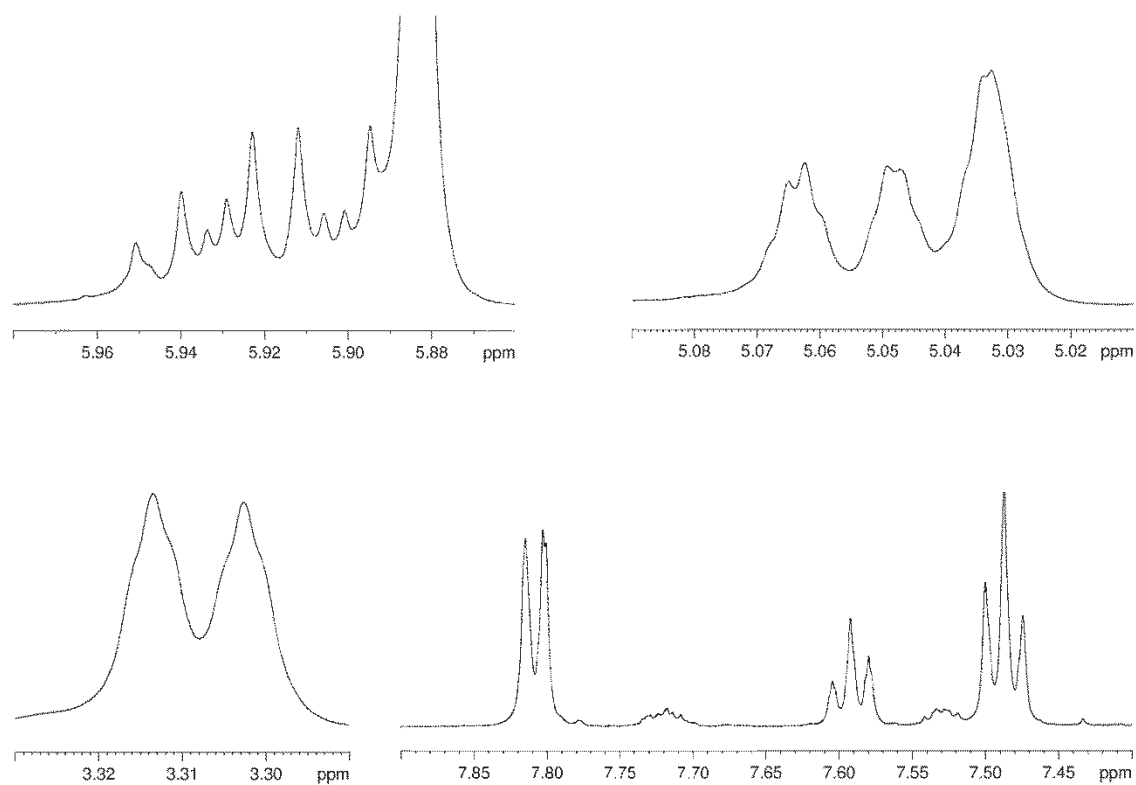


Figura 28: Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>) das frações 29-35.6 e 24.28-3, compostos Px-5 e Px-6.

Sendo assim foram feitos os experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC. Com estes dados (tabela 5), foi possível observar as correlações diretas de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  para atribuir os deslocamentos de carbono e as correlações a longa distância. Destacam-se as correlações do hidrogênio em  $\delta$  6,36, ligado ao anel benzênico, que faz a conexão deste anel com o substituinte alila e ainda com as metoxilas e o anel metilenodioxí. Observa-se também a correlação dos hidrogênios em  $\delta$  7,81, pertencentes à segunda molécula, que confirmam a presença de uma carbonila.

Assim, na mesma amostra, foi possível elucidar os compostos Px-5 e Px-6, denominados de apiol e ácido benzóico respectivamente (figura 31).

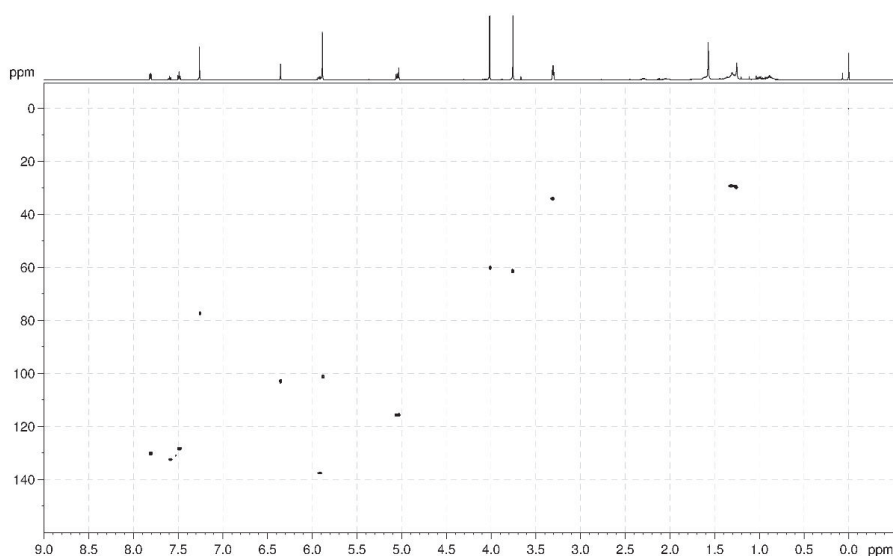


Figura 29: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (*g*HSQC) em  $\text{CDCl}_3$  das frações 29-35.6 e 24-28.3, compostos Px-5 e Px-6.

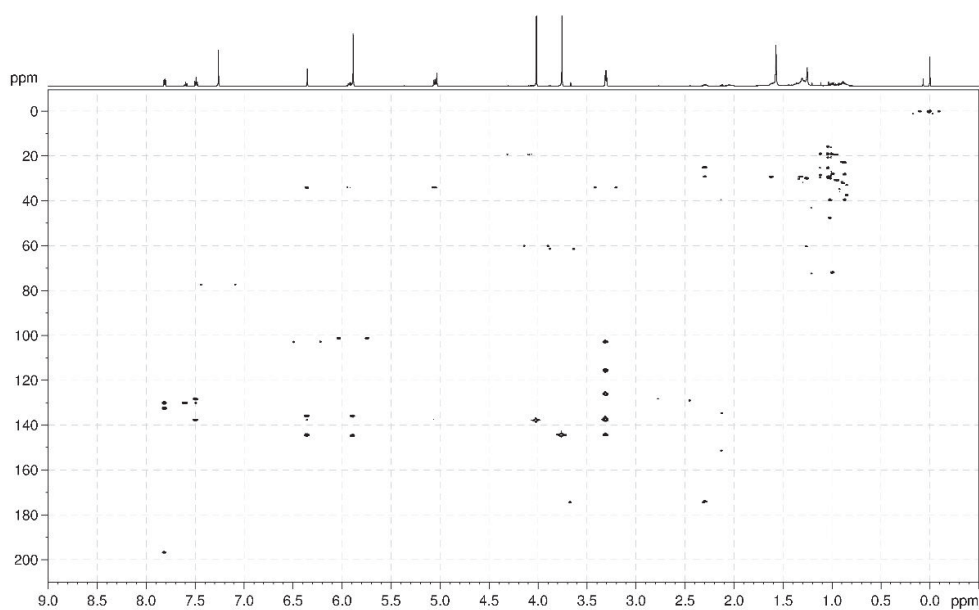


Figura 30: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (*g*HMBC) em  $\text{CDCl}_3$  das frações 29-35.6 e 24-28.3, compostos Px-5 e Px-6.

Tabela 5: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para as frações 29-35.6 e 24-28.3.

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	<i>g</i> HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1	126,1		
2	144,7		
3	135,9		
4	144,2		
5	144,4		
6	102,8	6,36 s (1H)	2, 4, 1'
1'	33,9	3,31 <i>ddd</i> (6,5; 1,4; 1,3, 2H)	1, 2, 6, 2', $\text{CH}_2$
2'	137,4	5,91 <i>dddd</i> (16,9:10,3:6,5:6,5, 1H)	1'
$\text{CH}_2\text{-a}$	115,5	5,06 <i>dddd</i> (10,3:1,6:1,4:0,3, 1H)	1'
$\text{CH}_2\text{-b}$	115,5	5,05 <i>dddd</i> (16,9:1,6:1,3:0,3, 1H)	1'
OMe	61,3	3,76 s (3H)	4
OMe	59,9	4,01 s (3H)	5
$\text{OCH}_2\text{O}$	101,1	5,89 s (2H)	2, 3

Posição	$\delta_{13C}$	$\delta_{1H}$ (J)	gHMBC ( $^1H$ - $^{13}C$ )
1 e 5	130,1	7,81 <i>dd</i> (8,3; 1,3, 2H)	3, 1'
2 e 4	128,3	7,49 <i>dd</i> (8,3, 7,5, 2H)	6
3	132,4	7,60 <i>dddd</i> (7,5; 7,4; 1,3; 1,2, 1H)	1, 5
6	137,6		
1'	196,7		



Figura 31: Estrutura dos compostos Px-5 e Px-6, presentes nas frações 29-35.6 e 24-28.3.

#### 4.2.1.4 Fração 45-49

Esta fração do extrato apresentou no espectro de RMN de  $^1H$  sinais em uma faixa grande de deslocamento químico indicando um composto aromático e alifático (figura 32). Dois simpletos em  $\delta$  6,96 e  $\delta$  6,67 referentes a hidrogênios ligados a carbonos de anel benzênico tetrassubstituído oxigenado, dois dupletos em  $\delta$  5,92,  $\delta$  5,90 que apresentam correlações no experimento de gHSQC com o carbono em 101,4 indicando a presença de um grupo metilenodioxí. Um simpleto em  $\delta$  5,50, com integral referente a 2 hidrogênios e correlação direta com um carbono em 99,18 confirma a presença de um segundo grupo metiledioxí na molécula. O último simpleto em  $\delta$  5,71, integrando para um hidrogênio e ligado a um carbono em 99,16 é indicativo de hidrogênio ligado a carbono de ligação dupla conjugada.

Dois conjuntos de sinais referentes a grupos alila (dois duplo duplo duplo dupletos em  $\delta$  5,83 e  $\delta$  5,56 referentes aos hidrogênios dos carbonos C-9 e C-9' da ligação dupla, multipletos em  $\delta$  4,98 e 4,96 referentes aos hidrogênios dos carbonos C-10 e C-10' da ligação dupla terminal, outros dois duplo duplo duplo dupletos em  $\delta$  3,25 e  $\delta$  3,21 referentes aos hidrogênios do carbono C-8 e dois multipletos em  $\delta$  2,54 e  $\delta$  2,20 referentes aos hidrogênios do carbono C-8'. Observa-se também dois duplos dupletos em  $\delta$  2,88 e 1,97 referentes a outro grupo  $CH_2$  atribuído ao C-6' do anel benzênico reduzido (figura 33).

Com os experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC, verificou-se a presença de um anel benzênico, dois grupos alila, dois grupos metilenodióxi e um anel de 6 membros alifático que provavelmente se originou de um anel benzênico que foi reduzido. A posição dos substituintes nos anéis de 6 membros foi determinada a partir das correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância, principalmente pela correlação fraca do hidrogênio 2' com o carbono 7' (figuras 34 e 35). Este composto, identificado como uma 2,2'-oxineolignana, não possui relatos de sua identificação em plantas na literatura.

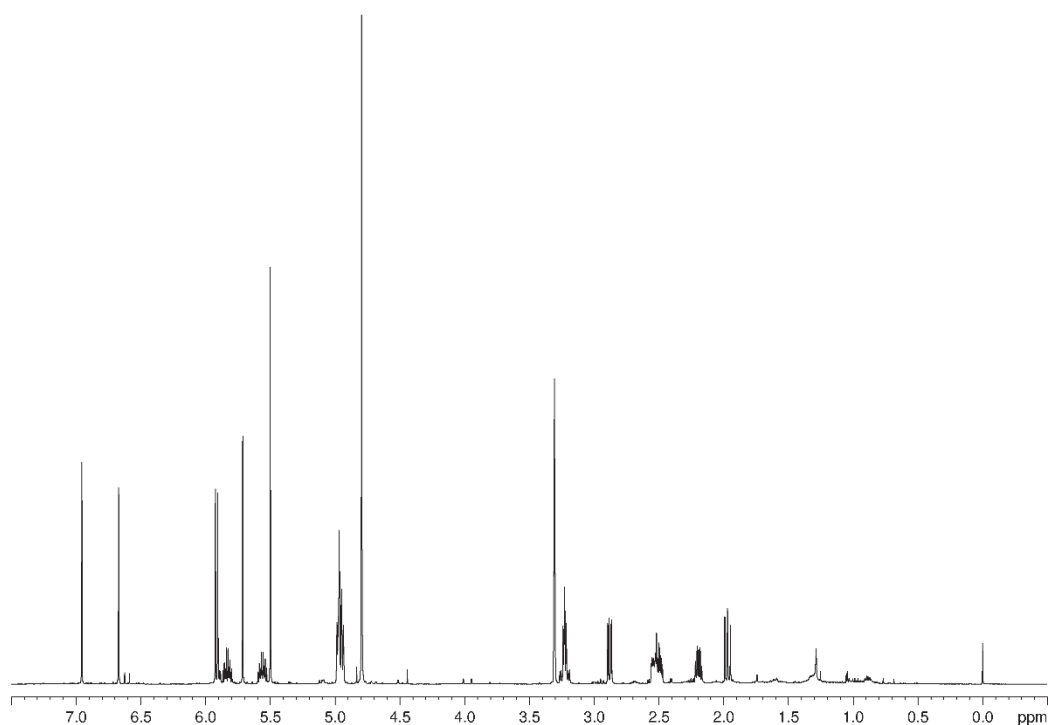


Figura 32: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (MeOD) da fração 45-49, composto Px-7.

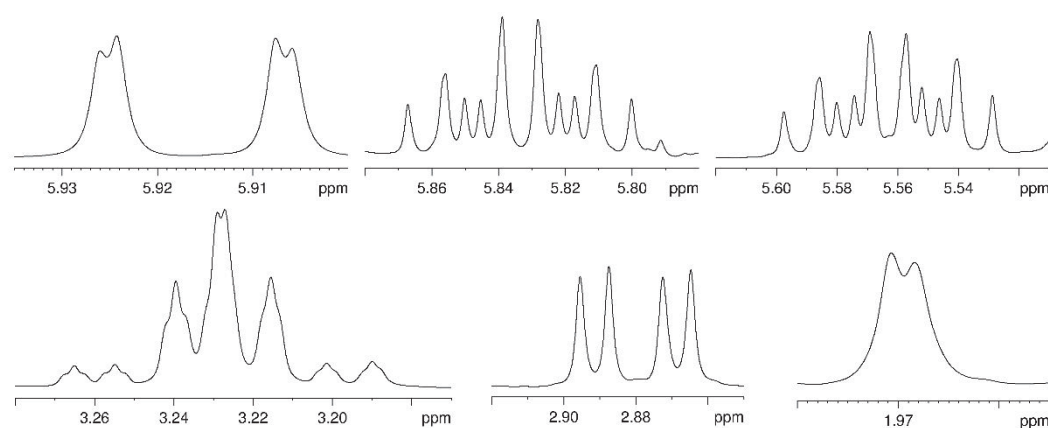


Figura 33: Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (MeOD) da fração 45-49, composto Px-7.

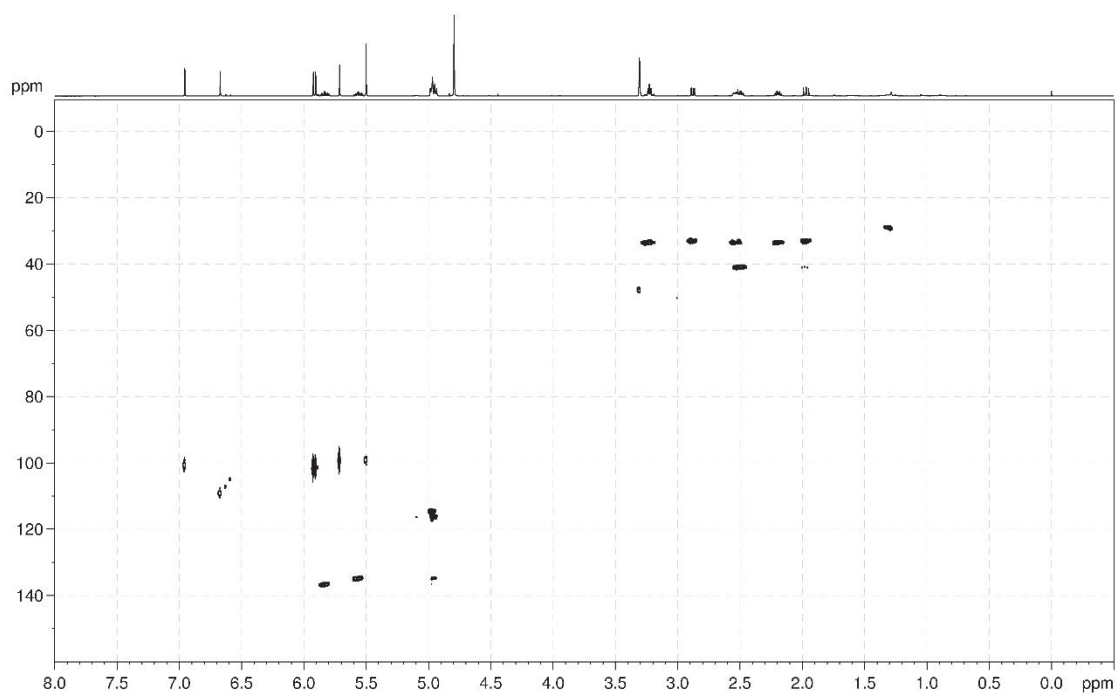


Figura 34: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em MeOD da fração 45-49, composto Px-7.

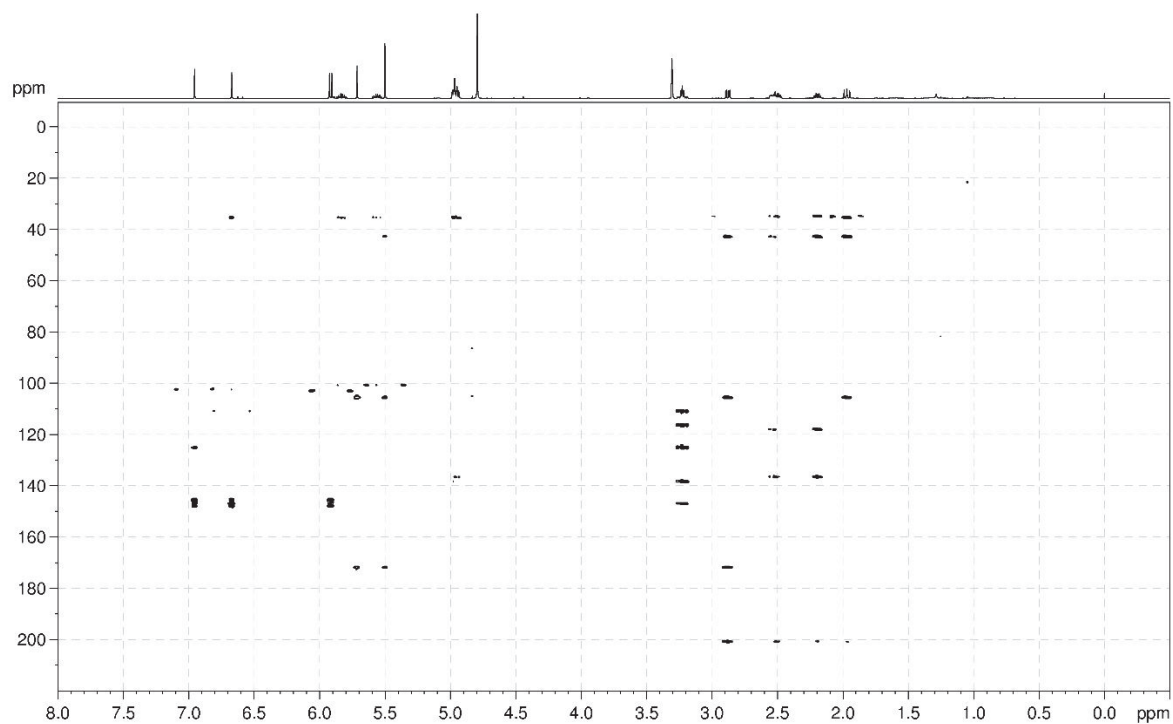


Figura 35: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em MeOD da fração 45-49, composto Px-7.

Tabela 6: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (MeOD) para o composto Px-7 (inédito na literatura), fração 45-49.

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1	123,5		
2	145,3		
3	100,8	6,96 s (1H)	1, 2 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> , 7 <sup>a</sup>
4	146,3		
5	143,8		
6	109,2	6,67 s (1H)	2, 3 <sup>a</sup> , 4, 5 <sup>a</sup> , 7
7a		3,25 dddd (15,4: 6,2: 1,6: 1,5, 1H)	1 <sup>a</sup> , 2, 6, 8 <sup>a</sup> , 9
	33,60		
7b		3,21 dddd (15,4: 6,9: 1,5: 1,4, 1H)	
8	136,7	5,83 dddd (16,9: 10,2: 6,8: 6,2, 1H)	1, 7
9	114,8	4,98 m (2H)	7, 8
1'	41,0	2,50 m (1H)	5', 6', 7'
2'	104,0		
3'	170,5		
4'	99,16	5,71 s (1H)	2', 3'
5'	199,3		
6'a		2,88 dd (13,8: 4,8, 1H)	1', 2', 3', 5'
	33,1		
6'b		1,97 dd (13,8: 12,2, 1H)	1', 2'
7'a		2,54 m (1H)	1', 6', 8', 9'
	33,58		
7'b		2,20 m (1H)	1', 2', 3', 5'
8'	134,9	5,56 dddd (17,1: 10,5: 7,1: 6,6, 1H)	7'
9'	116,0	4,96 m (2H)	7', 8'
OCH <sub>2</sub> O	101,4	5,92 d (1,0, 1H)	4, 5
OCH <sub>2</sub> O		5,90 d (1,0, 1H)	
OCH <sub>2</sub> O'	99,18	5,50 s (2H)	1' <sup>a</sup> , 2', 3', 5' <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Correlação fraca.

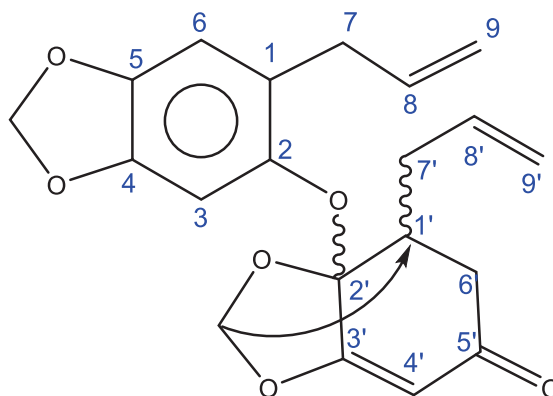


Figura 36: Estrutura do composto Px-7, inédito na literatura, ilustrando a correlação do H-2' com o C-7'.

A ocorrência de lignanas e neolignanas em Piperaceae é bastante comum, porém este é o primeiro relato na família de uma neolignana, formada pelo acoplamento de dois monômeros, onde ocorre uma redução de um dos anéis benzênicos. Existem relatos de neolignanas deste tipo identificadas por Cao e colaboradores (figura 37) em *Didymochlaena truncatula* (Dryopteridaceae), porém este é o primeiro relato na literatura da identificação do composto Px-7. Esta neolignana possui dois estereocentros ainda não definidos que serão determinados posteriormente.

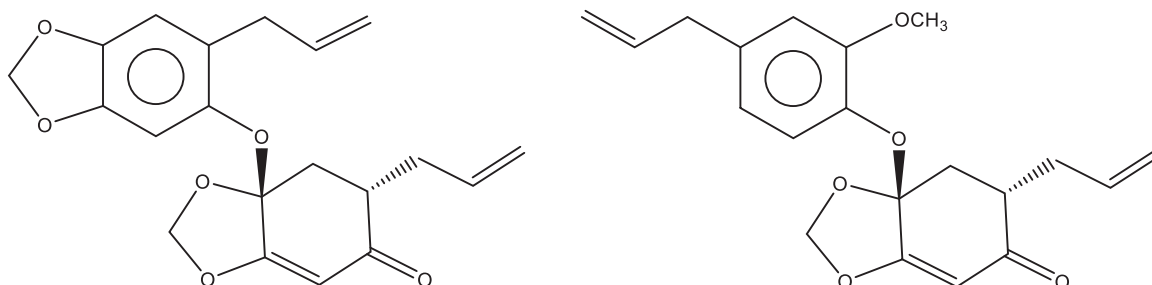


Figura 37: Neolignanas identificadas por Cao e colaboradores

#### 4.3 ANÁLISE DAS FRAÇÕES DO EEPX

O fracionamento deste extrato foi feito utilizando a técnica de CLAE, uma vez que esta técnica é mais utilizada quando a quantidade de amostra é pequena em relação à quantidade de compostos para purificar. Ainda, as análises por CLAE foram obtidas com a finalidade de comparar um extrato com outro para obter informações sobre suas composições.

Com o auxílio desta técnica, foram coletados em balões de fundo redondo os 15 picos de maior área no cromatograma e cada um dos balões foi resfriado a temperaturas abaixo de 0°C para que o líquido congelasse e assim fosse possível separar as fases orgânica e aquosa, dando origem a 30 frações (figura 5). Destas frações foram

identificados 12 compostos, sendo 8 novos neste estudo e desses 8, 3 inéditos na literatura.

#### 4.3.1 Fração 1\_org

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  desta amostra (figura 38), foi possível observar a presença de 1 simpleto largo em  $\delta$  12,81 que indica a presença de um hidrogênio de hidroxila quelado à uma carbonila, dois simpletos em  $\delta$  3,88 e 3,89 referentes aos grupos metoxila, 1 duplete em  $\delta$  6,37 ( $J = 3,4$  Hz) e outro em  $\delta$  6,48 ( $J = 3,4$  Hz) indicando um anel benzênico tetrassubstituído com hidrogênios em *meta* e outros dois dupletos em  $\delta$  7,02 ( $J = 8,8$ , 2H) e  $\delta$  7,85 ( $J = 8,8$ , 2H) indicando um anel benzênico parassubstituído (figura 39). Os sinais no espectro de  $^1\text{H}$  relatados aliados a presença de 1 simpleto em  $\delta$  6,58, indicam o esqueleto de uma flavona.

Com os experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC verificaram-se diversas correlações (figuras 40 e 41). Destacam-se o simpleto em  $\delta$  12,81 que apresentou uma correlação a longa distância com um carbono em  $\delta$  162,5, confirmando a presença de uma hidroxila ligada a um anel benzênico. O simpleto em  $\delta$  6,58 que apresentou correlação direta com um carbono em  $\delta$  104,4, típico de H-3 de flavonas, e correlação a duas ligações com carbonos em 164,7 e 182,7 e a três ligações com carbonos em 106,2, 124,1, referentes aos carbonos 2, 4, 10 e 1' respectivamente, confirmando as presenças da carbonila e dos anéis A e B de uma flavona.

Após comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com a literatura (tabela 7), a estrutura do composto Px-8 foi identificada como 4', 7-dimetilapigenina (figura 42) (ÇITOĞLU, 2004). Este composto já foi isolado anteriormente de *Piper khasiana*, *P. manii* e *P. peepuloides* (PARMAR, 1998).

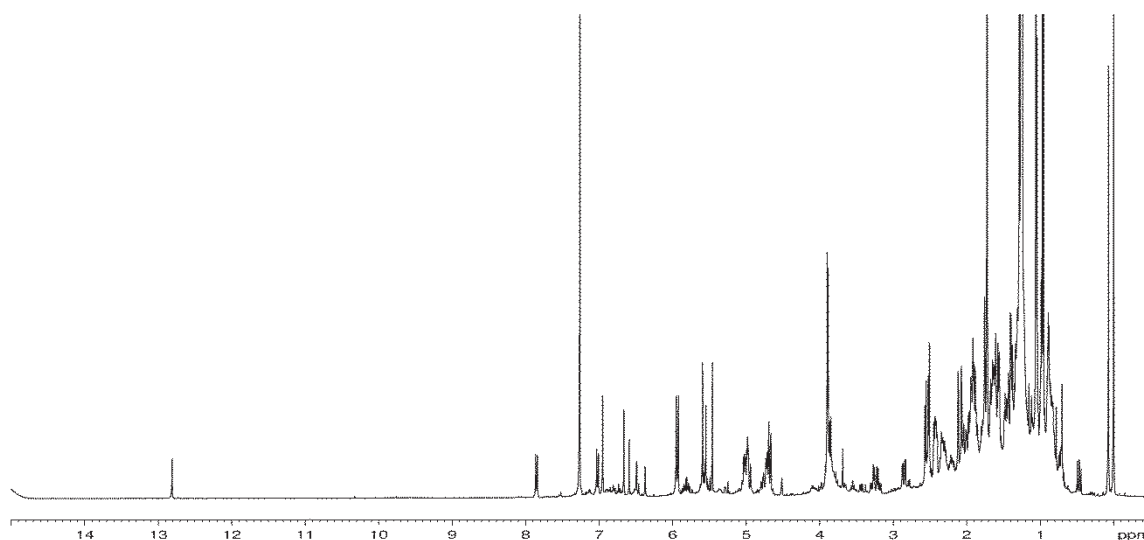


Figura 38: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 1\_org, composto Px-8.

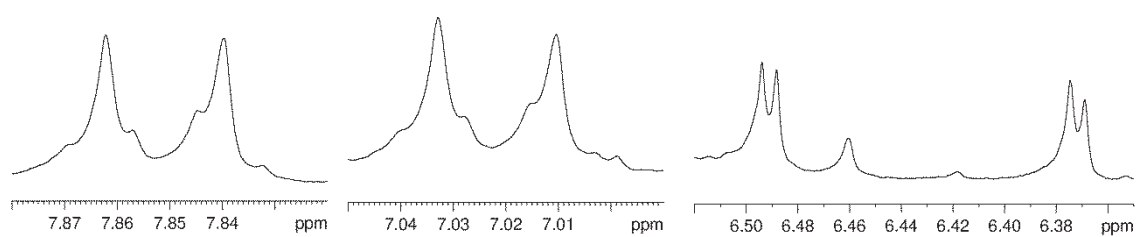


Figura 39: Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 1\_org, composto Px-8.

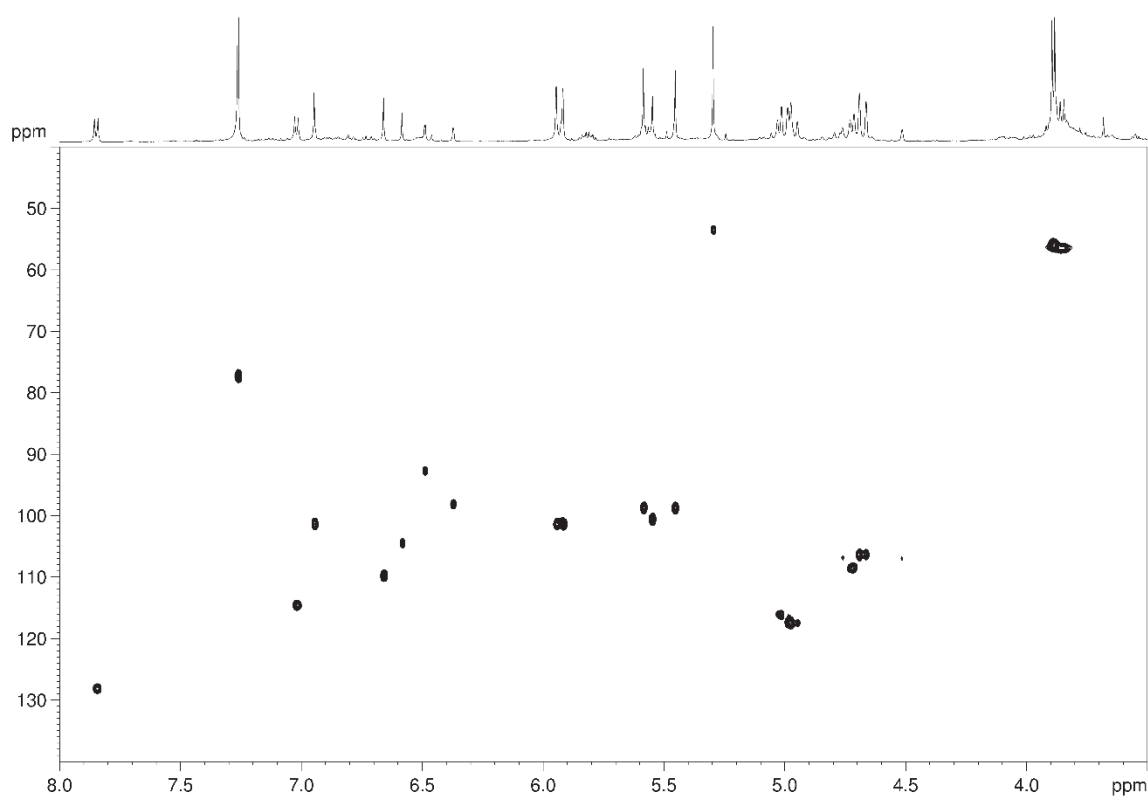


Figura 40: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  da fração 1\_org, composto Px-8.

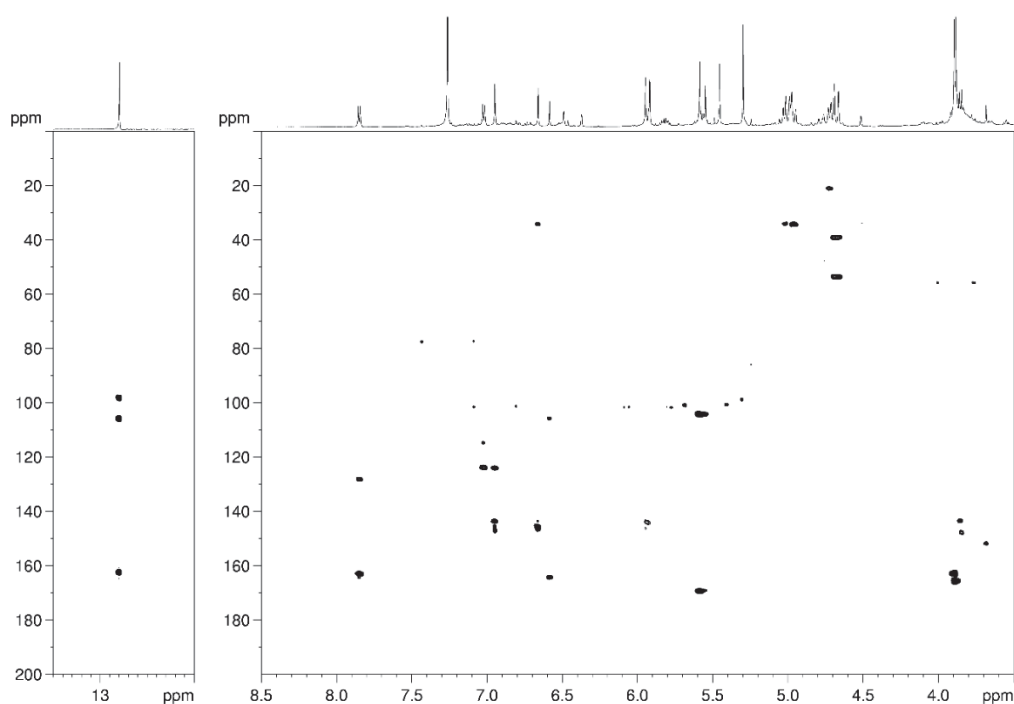


Figura 41: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  da fração 1\_org, composto Px-8.

Tabela 7: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para a fração 1\_org, composto Px-8.

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	$\delta_{^{13}\text{C}}^*$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)*
1					
2	164,7			163,9	
3	104,4	6,58 s (1H)	2, 4 <sup>a</sup> , 1' <sup>a</sup> , 10	104,2	6,55 s (1H)
4	182,7			182,3	
5	162,5	12,81 s/ (1H)	5, 6, 10	162,1	
6	98,3	6,37 d (3,4, 1H)	5 <sup>a</sup> , 7 <sup>a</sup> , 8, 10	97,9	6,35 d (2, 1H)
7	165,9			165,3	
8	92,9	6,48 d (3,4, 1H)	6 <sup>a</sup> , 8, 9, 10	92,5	6,46 d (2, 1H)
9	157,9			157,6	
10	106,2			105,0	
1'	124,1			123,4	
2'	128,2	7,85 d (8,8, 2H)	2, 2', 4'	127,9	7,82 d (7,5, 2H)
3'	114,9	7,02 d (8,8, 2H)	1', 4' <sup>a</sup> , 6'	114,4	7,0 d (7,5, 2H)
4'	163,2			162,5	
OMe	56,1	3,89 s (3H)	4'	55,7	3,89 s (3H)
OMe	56,1	3,88 s (3H)	7	55,4	3,88 s (3H)
C5-OH		12,81 s/ (1H)	5		12,85 s (1H)

<sup>a</sup> Correlação fraca. \* Dados da literatura.

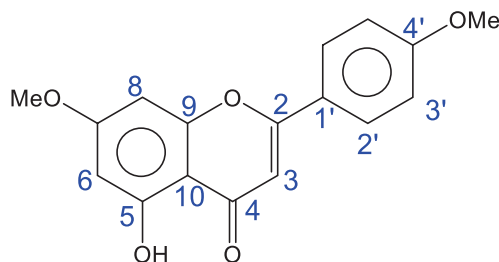


Figura 42: Estrutura do composto Px-8, identificado como 4'-7-dimetilapigenina.

#### 4.3.2 Fração 4\_org

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 43) desta fração foi possível observar 5 sinais na região de hidrogênios aromáticos, pertencentes a dois anéis benzênicos. Um anel com 3 hidrogênios em  $\delta$  6,92 (*d*,  $J = 1,4$ ),  $\delta$  6,87 (*dd*,  $J = 7,9: 1,4$ ) e  $\delta$  6,776 (*d*,  $J = 7,9$ ) nas posições 1, 4 e 5 respectivamente e o outro anel contendo dois hidrogênios em  $\delta$  6,777 (*s*) e  $\delta$  6,75 (*s*) acoplado em *meta* entre si. Foram observados também um duplete em  $\delta$  5,09 ( $J = 8,9$ ), um multiplete em  $\delta$  3,40 e um duplete em  $\delta$  1,38 ( $J = 6,8$ ) referente a uma metila. Além destes sinais, notou-se a presença de dois duplos quartetos em  $\delta$  6,35 ( $J = 15,6: 1,3$ ) e  $\delta$  6,09 ( $J = 15,6: 6,5$ ) e um duplo duplete referente a uma metila em  $\delta$  1,86 ( $J = 6,5: 1,3$ ) caracterizando um grupo propenila de configuração *E* devido aos valores de  $J = 15,6$  Hz.

Com os experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC (figuras 45 e 46) foi possível verificar as correlações do hidrogênio em  $\delta$  6,776 (H-4) com os carbonos em  $\delta$  108,1 (J1),  $\delta$  144,3 (J3) e  $\delta$  134,3 (J3), do hidrogênio em  $\delta$  6,92 (H-1) com os carbonos em  $\delta$  106,9 (J1),  $\delta$  147,7 (J3),  $\delta$  120,3 (J3) e 93,5 (J3), evidenciando a presença de dois carbonos do anel benzênico ligados a oxigênio além de um carbono oxigenado ligado a este anel. O simpleto em  $\delta$  3,89 com integral para 3 hidrogênios e correlação com o carbono em  $\delta$  144,3 é referente a um grupo metoxila. O duplete em  $\delta$  5,09 (H-7) apresentou correlações com os carbonos em  $\delta$  93,5 (J1),  $\delta$  45,7 (J2), 18,0 (J3),  $\delta$  106,9 (J3) e 120,3 (J3), confirmando a presença de um carbono oxigenado ligado ao anel benzênico. O duplete em  $\delta$  1,38 apresentou correlação direta com o carbono em  $\delta$  18,0, a duas ligações com o carbono em  $\delta$  45,7 e a três com os carbonos em  $\delta$  133,0 e  $\delta$  93,5. Por sua vez, o hidrogênio em  $\delta$  3,40 (H-8), ligado ao carbono em  $\delta$  45,7, apresentou correlações a longa distância com os carbonos em  $\delta$  134,3,  $\delta$  133,0,  $\delta$  93,5 e  $\delta$  18,3. No outro anel benzênico, o hidrogênio em  $\delta$  6,777 (H-1') apresentou correlação com carbonos em  $\delta$  109,5 (J1),  $\delta$  132,4 (J2),  $\delta$  146,7 (J3),  $\delta$  131,2 (J3) e  $\delta$  113,4 (J3), esta última indicando a relação *meta* entre os hidrogênios deste anel. O outro hidrogênio deste mesmo anel, em  $\delta$  6,75 (H-5'), apresentou correlações com os carbonos em  $\delta$  113,4 (J1),  $\delta$  132,4 (J2),  $\delta$  146,7 (J3),  $\delta$

131,2 (J3),  $\delta$  45,7 (J3) e  $\delta$  109,5 (J3), confirmando que estes hidrogênios estão em *meta* entre si. Neste anel, foram observados dois carbonos em aproximadamente  $\delta$  147, o que indica novamente um anel benzênico com duas oxidações, confirmados por meio das correlações com estes carbonos de um simpleto em  $\delta$  5,94, com integral para dois hidrogênios que por sua vez estão ligados em um carbono em  $\delta$  100,9, típico de anel metilenodióxi (tabela 8).

Com isso, foi elucidado o composto Px-9 (figura 47), uma 8,3'-neolignana ainda sem relatos na literatura. Este composto possui dois estereocentros que serão determinados posteriormente. O tipo de acoplamento entre os monômeros para a formação desta neolignana ainda não foi observado na família Piperaceae de acordo com pesquisas recentes, mas já foi identificado em outras plantas como *Aniba lancifolia* (Lauraceae) por Diaz e colaboradores (DIAZ, 1980)

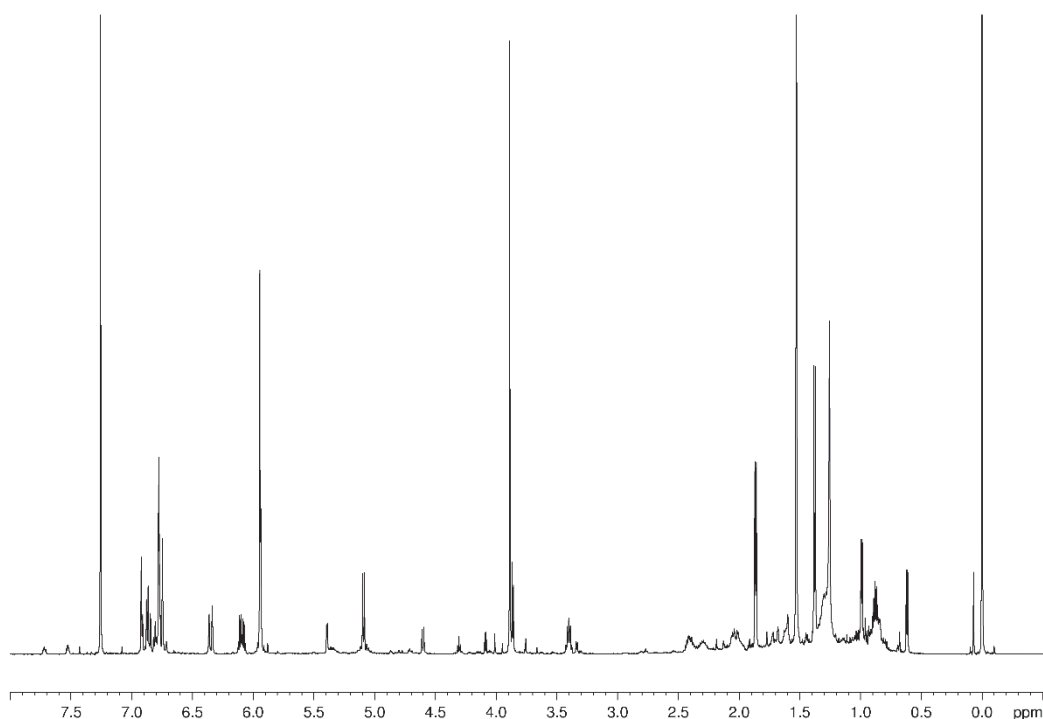


Figura 43: Espectro de RMN de 1H (CDCl<sub>3</sub>) da fração 4<sub>org</sub>, composto Px-9.

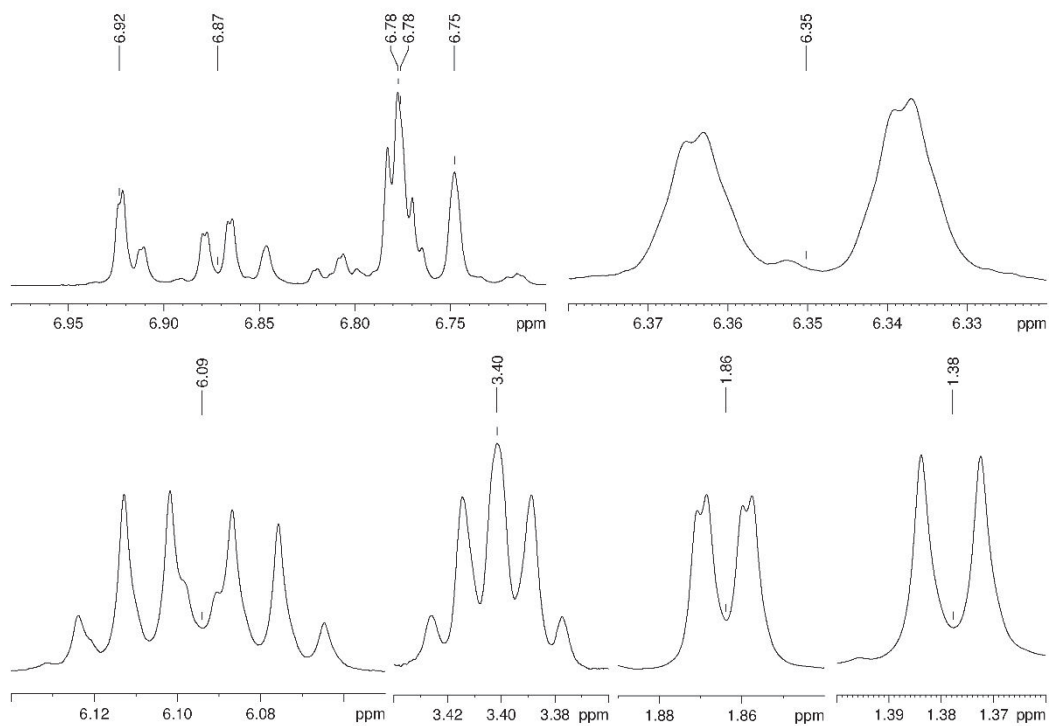


Figura 44: Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 4\_org, composto Px-9.

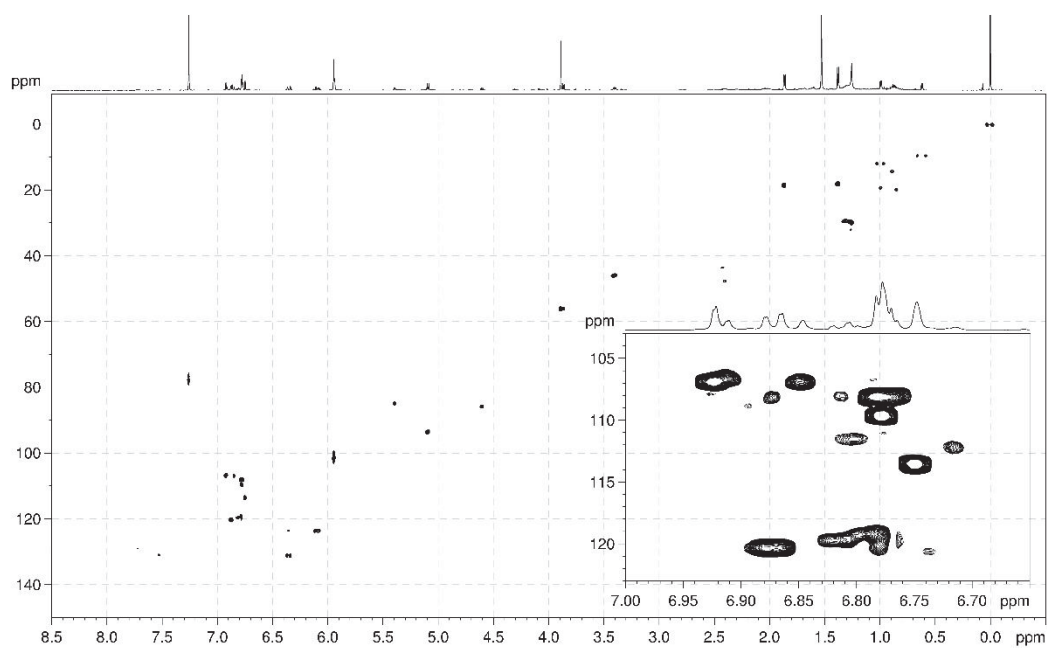


Figura 45: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  da fração 4\_org, composto Px-9.

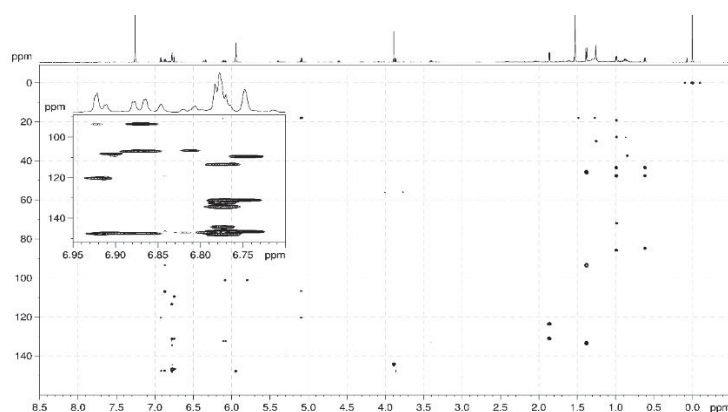


Figura 46: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em  $\text{CDCl}_3$  da fração 4\_org, composto Px-9.

Tabela 8: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-9, fração 4\_org (inédito na literatura).

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1	134,3		
2	106,9	6,92 <i>d</i> (1,4, 1H)	4, 6, 7
3	144,3		
4	147,7		
5	108,1	6,776 <i>d</i> (7,9, 1H)	1, 3
6	120,3	6,87 <i>dd</i> (7,9: 1,4, 1H)	2, 4, 7
7	93,5	5,09 <i>d</i> (8,9, 1H)	2, 6, 8 <sup>a</sup> , 9
8	45,7	3,40 <i>m</i> (1H)	1, 7, 9, 5'
9	18,0	1,38 <i>d</i> (6,8, 3H)	7, 8, 5'
1'	132,4		
2'	113,4	6,75 <i>sl</i> (1H)	8, 4', 6', 7'
3'	133,0		
4'	146,7		
5'	147,9		
6'	109,5	6,777 <i>sl</i> (1H)	1' <sup>a</sup> , 2', 4', 7'
7'	131,2	6,35 <i>dq</i> (15,6: 1,3, 1H)	2', 6'
8'	123,7	6,09 <i>dq</i> (15,6: 6,5, 1H)	
9'	18,5	1,86 <i>dd</i> (6,5: 1,3, 1H)	7', 8'
-OCH <sub>3</sub>	56,1	3,89 <i>s</i> (3H)	3
-OCH <sub>2</sub> O-	100,9	5,94 <i>s</i> (3H)	3', 4'

<sup>a</sup> Correlação fraca.

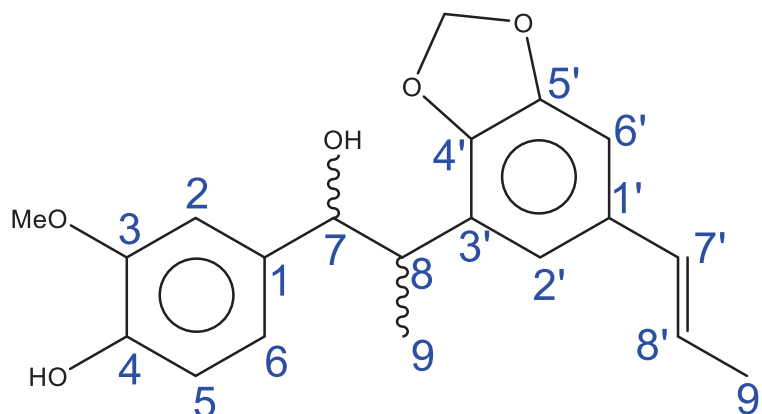


Figura 47: Estrutura do composto Px-9, fração 4\_org, inédito na literatura.

#### 4.3.3 Fração 5\_org

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 5\_org exibiu diversos sinais em dois conjuntos de intensidades diferentes (figura 48). O conjunto majoritário é formado por dois anéis benzênicos, duas metilas, duas metoxilas e quatro carbonos alifáticos enquanto que o conjunto minoritário possui diversos sinais na região de hidrogênios benzênicos e de hidrogênios alifáticos sem identificação.

Quanto ao primeiro conjunto, foi observado um sistema contendo um duplete em  $\delta$  7,04 ( $J = 1,4$ ), um duplo duplete em  $\delta$  6,99 ( $J = 8,1: 1,4$ ) e outro duplete em  $\delta$  6,92 ( $J = 8,1$ ) indicando um anel benzênico substituído nas posições 2, 3 e 6. Para o outro anel benzênico foi observado o mesmo sistema de sinais, com deslocamentos químicos diferentes: um duplete em  $\delta$  6,92 ( $J = 7,9$ ), um duplo duplete em  $\delta$  6,82 ( $J = 7,9: 1,7$ ) e um duplete em  $\delta$  6,85 ( $J = 1,7$ ) indicando novamente um anel benzênico substituído nas posições 2, 3 e 6. A cadeia alifática que une os dois anéis benzênicos é composta por dois grupos metilas detectadas como dupletos em  $\delta$  1,06 ( $J = 6,6$ ) e  $\delta$  0,66 ( $J = 7,0$ ), acopladas a hidrogênios metínicos em  $\delta$  2,23 e  $\delta$  1,78 e ainda observa-se dois hidrogênios em  $\delta$  5,11 ( $J = 8,7$ ) e  $\delta$  4,40 ( $J = 9,1$ ) como dois dupletos cujos deslocamentos indicam ligação com oxigênio. A partir dos mapas de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a curta (*g*HSQC) e longa distância (*g*HMBC) (figuras 50, 51, 52 e 53) foi possível verificar que ambos os anéis benzênicos possuem o mesmo padrão de substituição: um grupo metoxila no carbono 2, um grupo hidroxila no carbono 3 e um carbono em aproximadamente 85 ppm ligado ao carbono 6 do anel. Os dupletos em  $\delta$  5,11 e  $\delta$  4,40 apresentaram correlações a longa distância bastante semelhantes: com os carbonos 1 e 5 de um anel benzênico, confirmando a posição destes hidrogênios em um carbono ligado ao anel. Em relação à correlação a uma ligação, o hidrogênio em  $\delta$  4,40 se

mostrou ligado a um carbono em  $\delta$  87,4 enquanto o hidrogênio em  $\delta$  5,11 a um carbono em  $\delta$  83,1 confirmando também a hipótese de que esses carbonos eram oxigenados e por isso deveriam ter um deslocamento químico mais elevado.

Com a análise completa dos dados dos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC (tabela 9), foi possível determinar a estrutura do composto Px-10, inédito na literatura (figura 54).

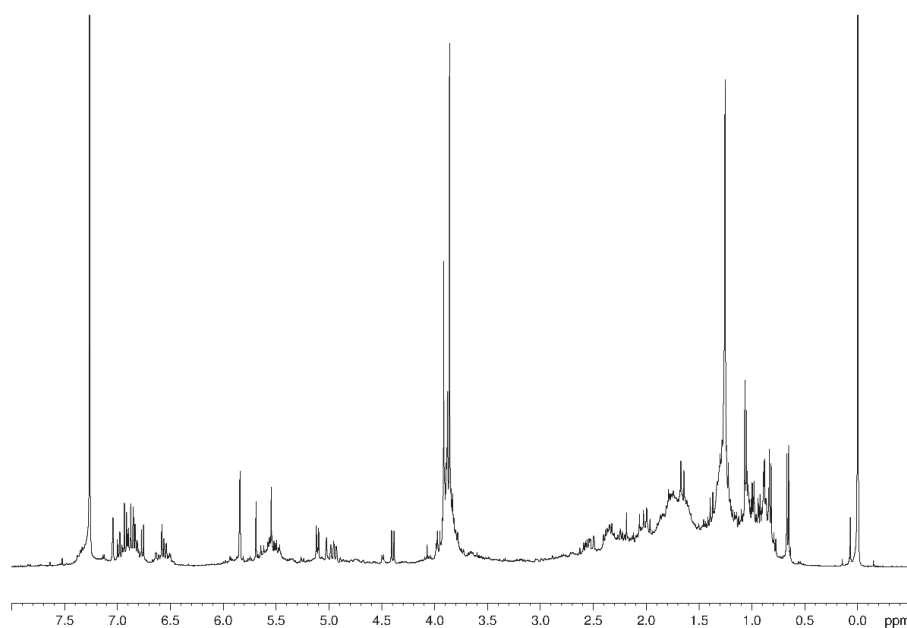


Figura 48: Espectro de RMN de 1H (CDCl<sub>3</sub>) da fração 5<sub>org</sub>, composto Px-10.

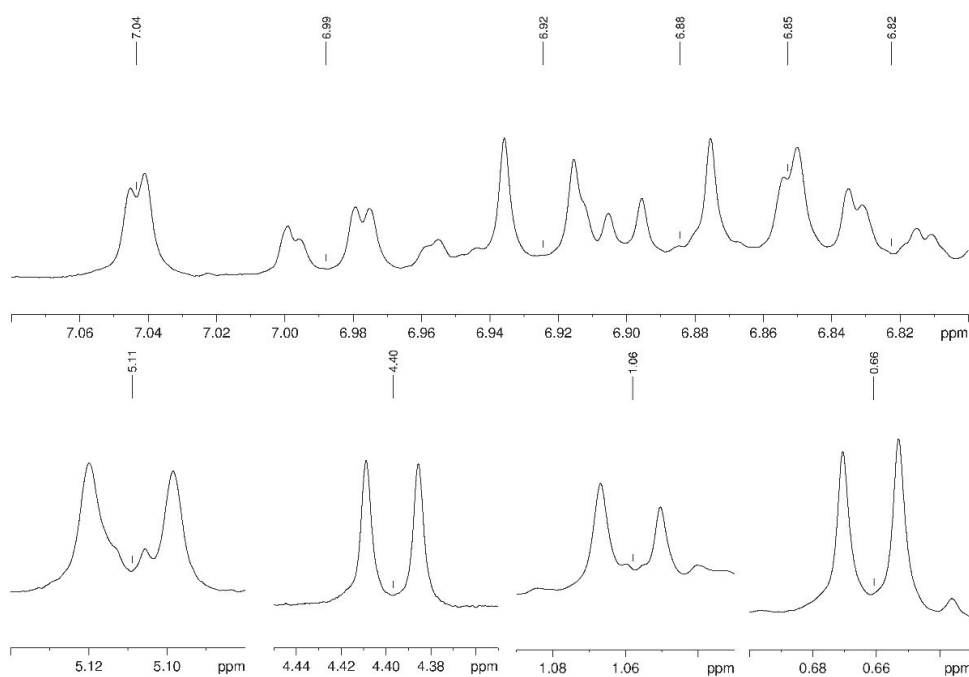


Figura 49: Expansões do espectro de RMN de 1H (CDCl<sub>3</sub>) da fração 5<sub>org</sub>, composto Px-10.

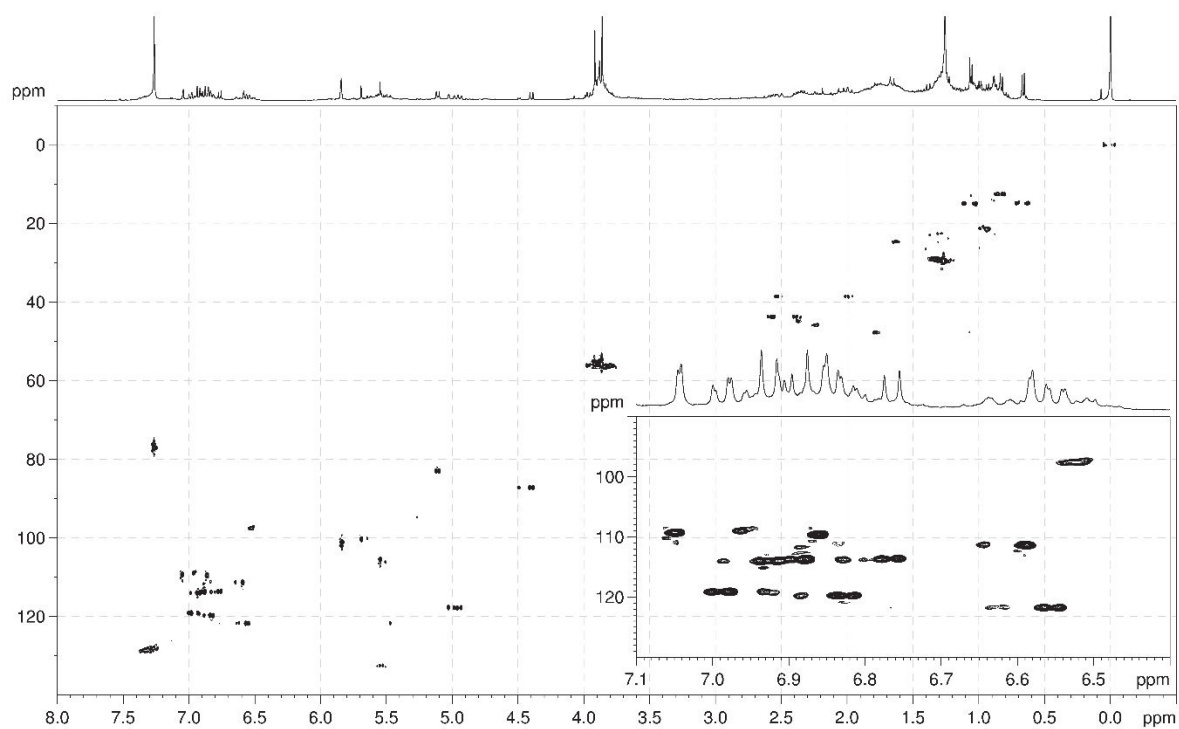


Figura 50: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  dos compostos Px-10 e Px-11, fração 5\_org.

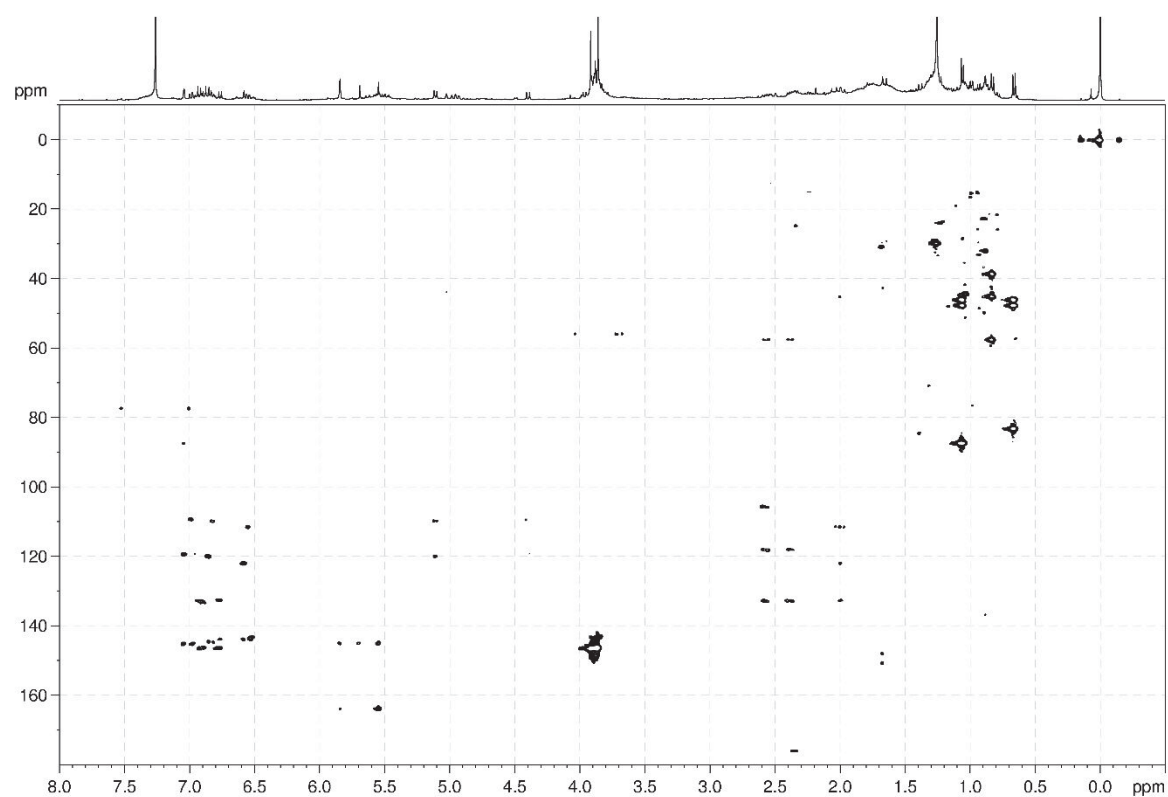


Figura 51: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em  $\text{CDCl}_3$  dos compostos Px-10 e Px-11, fração 5\_org

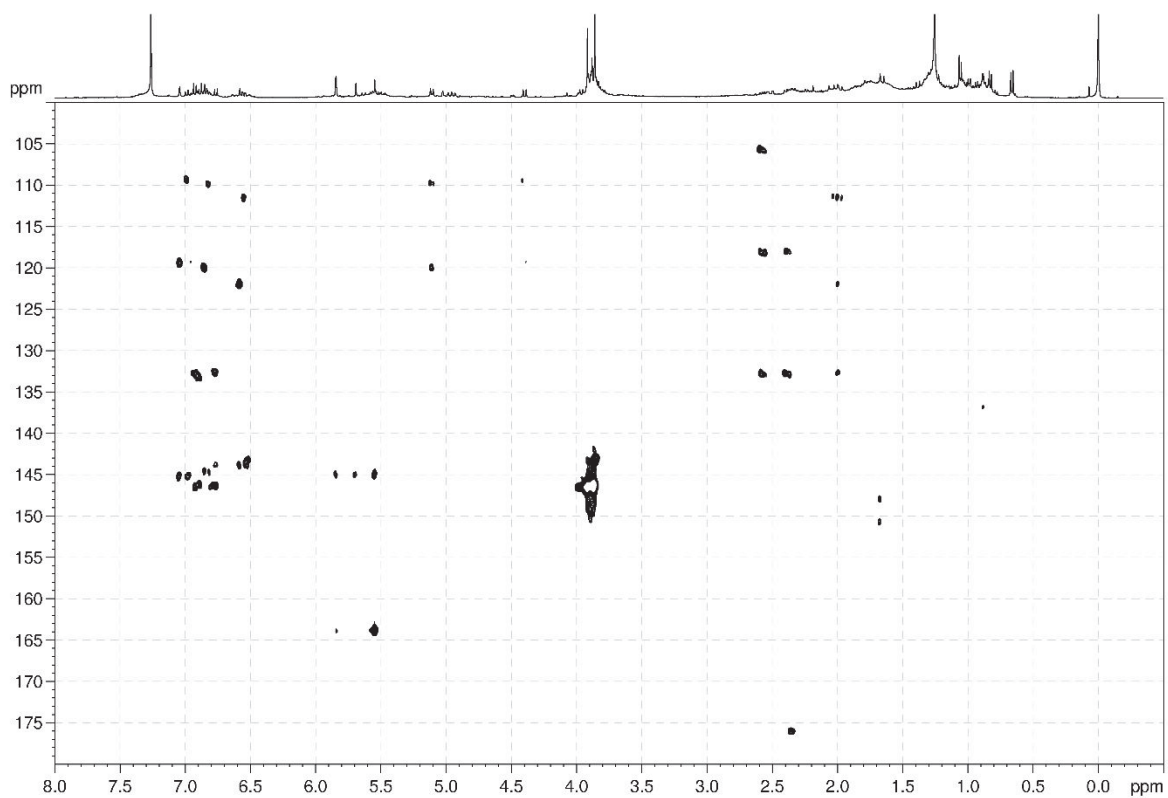


Figura 52: Expansão (em f1) do mapa de correlações a longa distância (gHMBC) em CDCl<sub>3</sub> dos compostos Px-10 e Px-11, fração 5\_org.

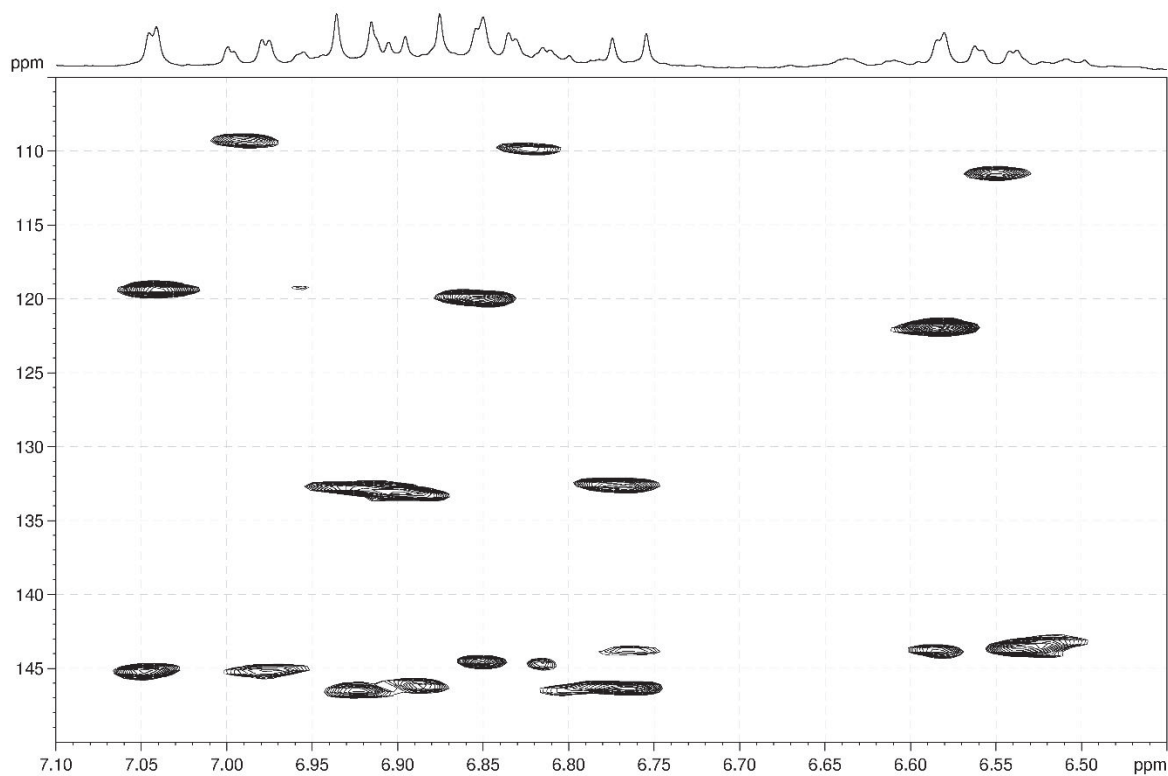


Figura 53: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações a longa distância (gHMBC) em CDCl<sub>3</sub> dos compostos Px-10 e Px-11, fração 5\_org.

Tabela 9: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-10, fração 5\_org, (inédito na literatura).

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1	132,8		
2	109,3	7,04 <i>d</i> (1,4, 1H)	4, 6, 7
3	146,6		
4	145,1		
5	114,1	6,92 <i>d</i> (8,1, 1H)	1, 3
6	119,1	6,99 <i>dd</i> (8,1: 1,4, 1H)	2, 4, 7
7	87,4	4,40 <i>d</i> (9,1, 1H)	2, 6
8	47,7	1,78 <i>m</i> (1H)	7
9	14,7	1,06 <i>d</i> (6,6, 3H)	7, 8, 8'
1'	132,6		
2'	109,8	6,85 <i>d</i> (1,7, 1H)	4', 6', 7'
3'	146,3		
4'	144,6		
5'	113,0	6,88 <i>d</i> (7,9, 1H)	1', 3'
6'	119,9	6,82 <i>dd</i> (7,9: 1,7, 1H)	2', 4', 7'
7'	83,1	5,11 <i>d</i> (8,7, 1H)	2', 6'
8'	46,1	2,23 <i>m</i> (1H)	9'
9'	14,9	0,66 <i>d</i> (7,0, 3H)	8, 7', 8'
-OCH <sub>3</sub>		3,91 <i>s</i> (3H)	3
-OCH <sub>3</sub>		3,86 <i>s</i> (3H)	3'

<sup>a</sup> Correlação fraca.

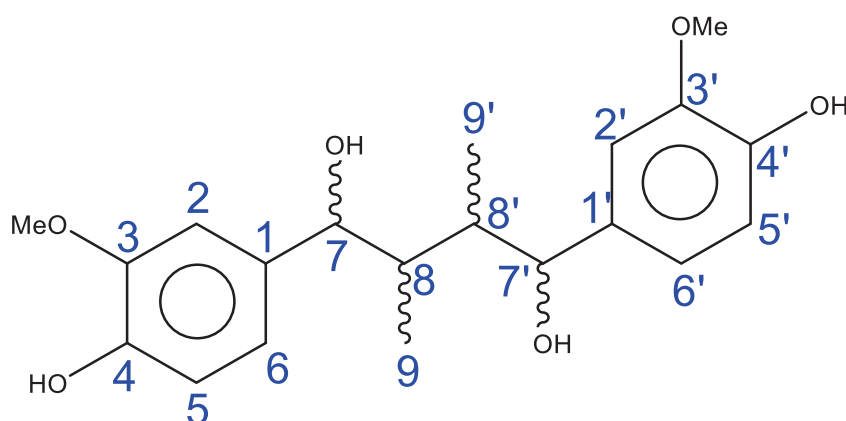


Figura 54: Estrutura do composto Px-10, fração org\_5, inédito na literatura.

Este composto possui quatro estereocentros que serão determinados posteriormente, porém espera-se que a configuração do par de carbonos 7 e 8 seja diferente do par de carbonos 7' e 8', uma vez que os sinais dos monômeros que formam este dímero não estão sobrepostos no RMN, caracterizando uma assimetria na molécula.

O tipo de acoplamento para a formação desta lignana é novo na família Piperaceae de acordo com pesquisas recentes, mas compostos semelhantes (figura 55) já foram identificados em outras plantas como *Virola oleifera* (Myristicaceae) por Sartorelli e colaboradores (SARTORELLI, 1998).

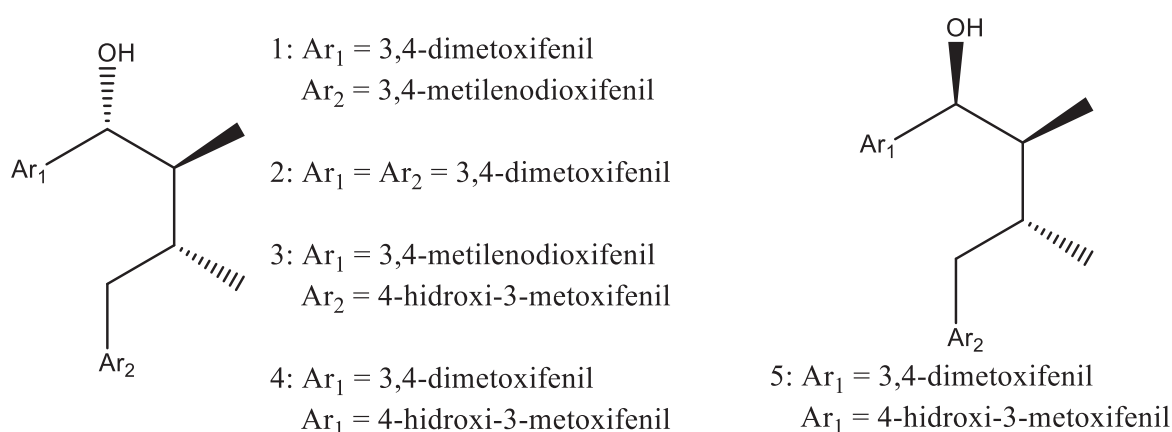


Figura 55: Lignanas identificadas por Sartorelli e colaboradores.

O conjunto minoritário de sinais é bastante parecido com os sinais da fração 45-49 (Px-9). Um anel benzênico com 3 hidrogênios em  $\delta$  6,76 (*d*,  $J = 8,1$ ),  $\delta$  6,58 (*d*,  $J = 1,8$ ) e  $\delta$  6,55 (*dd*,  $J = 8,1: 1,8$ ) nas posições 1, 4 e 5. Duas metoxilas em  $\delta$  3,91 e  $\delta$  3,88 e um anel metilenodioxí com os hidrogênios em  $\delta$  5,85 (*s*) e  $\delta$  5,84 (*s*), um duplo duplete em  $\delta$  2,00 ( $J = 13,3: 11,6, 1H$ ), um duplete em  $\delta$  0,83 ( $J = 6,8, 3H$ ), dois simpletos em  $\delta$  5,69 e  $\delta$  5,55 e diversos multipletos (figura 56).

Novamente com o auxílio dos experimentos de correlação direta e a longa distância de  $^1H-^{13}C$ , foi possível confirmar a presença de um anel benzênico com duas metoxilas vicinais nos carbonos 2 e 3, além de um carbono secundário em  $\delta$  38,6 ligado ao anel. Neste carbono C-7, os hidrogênios apresentaram correlação com um carbono terciário C-8 e uma metila indicando que essa cadeia é o resultado de uma redução do grupo alila. O simpleto em 5,69 apresentou correlações com carbonos em  $\delta$  100,3 ( $J_1$ ), 145,0 ( $J_2$ ) e 163,8 ( $J_3$ ), enquanto o simpleto em  $\delta$  5,55 apresentou correlações com os carbonos  $\delta$  105,6 ( $J_1$ ),  $\delta$  145,0 ( $J_3$ ), 163,8 ( $J_2$ ) e 203,5 ( $J_2$ ). Essas correlações evidenciam a presença de uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $\delta$  203,5) e de carbonos  $sp^2$  oxigenados ( $\delta$  163,8 e  $\delta$  145,0), além dos carbonos  $sp^2$  de cada hidrogênio.

Após análise de todo o mapa de correlações (tabela 10), a estrutura pode ser determinada pela primeira vez na literatura como uma 2oxo-8,1'-neolignana<sup>3</sup> (figura 57).

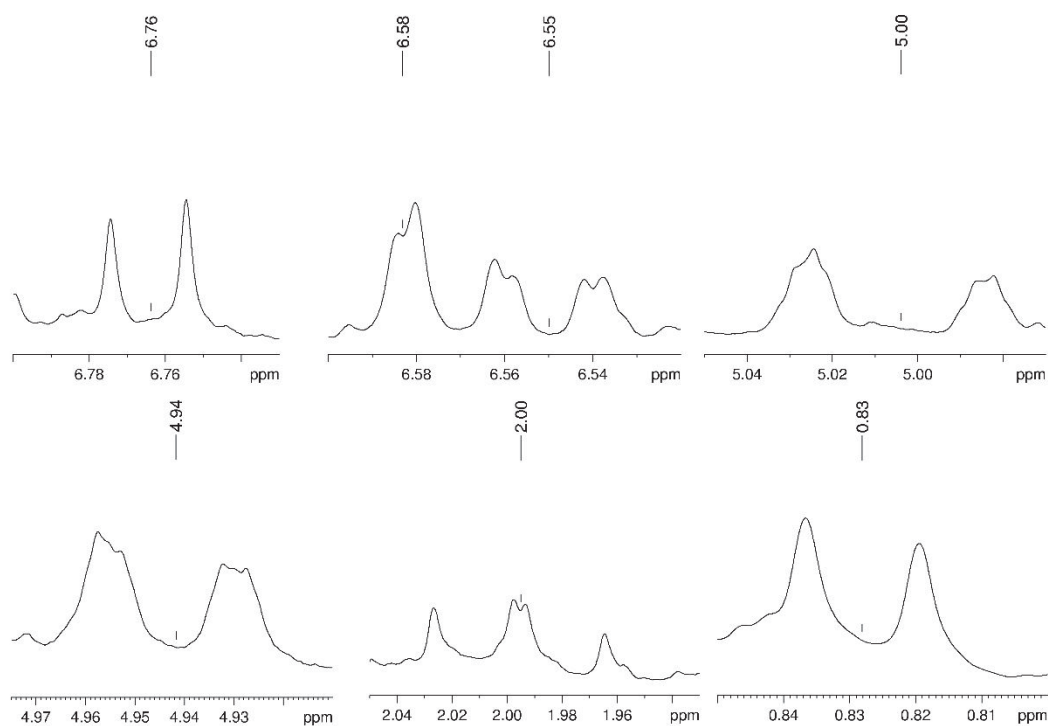


Figura 56: Expansões do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) da fração 5\_org, composto Px-11.

<sup>3</sup> Para neolignanas unidas pelo carbono 1 ou 1', a nomenclatura oficial da IUPAC recomenda a indicação de onde ocorreu a perda de aromaticidade. Essa indicação é feita pelo número do carbono seguido de um *H* (maiúsculo e itálico) para carbonos saturados.

Tabela 10: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-11 (inédito na literatura).

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1	132,7		
2	111,3	6,58 <i>d</i> (1,8, 1H)	4, 6
3	146,3		
4	143,6		
5	113,5	6,76 <i>d</i> (8,1, 1H)	1, 3, 4 <sup>a</sup>
6	121,6	6,55 <i>dd</i> (8,1: 1,8, 1H)	2, 4
7a		2,53 <i>m</i> (1H)	
7b	38,6	2,00 <i>dd</i> (13,3: 11,6, 1H)	1 <sup>a</sup> , 2, 6, 8 <sup>a</sup>
8	44,9	2,37 <i>m</i> (1H)	1, 1'
9	12,5	0,83 <i>d</i> (6,8, 1H)	7, 8, 1'
1'	57,4		
2'	203,5		
3'	105,6	5,55 <i>s</i> (1H)	2', 4', 5'
4'	163,8		
5'	145,0		
6'	100,3	5,69 <i>s</i> (1H)	4', 5'
7'a		2,56 <i>m</i> (1H)	1', 3', 8', 9'
7'b	43,6	2,38 <i>m</i> (1H)	1', 2', 8', 9'
8'	132,5	5,54 <i>m</i> (1H)	
9'a		5,00 <i>dd</i> (10,3: 1,7, 1H)	7'
9'b	117,7	4,94 <i>dd</i> (16,9: 1,7, 1H)	7'
-OCH <sub>3</sub>	55,9	3,88 <i>s</i> (3H)	3
-OCH <sub>3</sub>	55,8	3,91 <i>s</i> (3H)	4
-OCH <sub>2</sub> O-	101,3	5,84 e 5,85 <i>s</i> (1H)	4', 5'

<sup>a</sup> Correlação fraca.

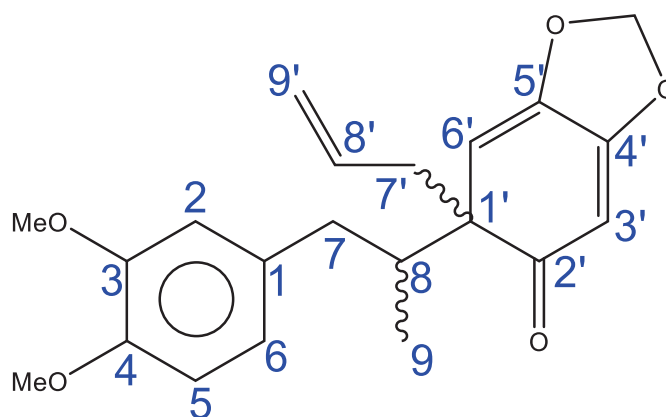


Figura 57: Estrutura do composto Px-11, fração org\_5, inédito na literatura.

Este composto possui dois estereocentros cuja estereoquímica será determinada posteriormente e pertence a classe das neolignananas, e pode-se observar que Px-11 e Px-9 são formadas por monômeros muito semelhantes, sendo que a principal diferença entre eles é a posição do acoplamento dos monômeros. No caso do Px-9, o acoplamento ocorre pelos carbonos C-8 e C-4' enquanto que no Px-11 pelos carbonos C-8 e C-6'.

#### 4.3.2 Fração 11\_org

Esta amostra apresentou dois conjuntos de sinais. Um deles somente com sinais abaixo de 3 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  indicando um perfil de terpeno sem hidrogênios ligados a carbono  $\text{sp}^2$  e outro conjunto de sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos de ligação dupla, acima de 5 ppm e também hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^3$  (figura 58).

Do primeiro conjunto, majoritário, destacam-se os sinais em  $\delta$  2,53 (*dd*,  $J = 18,0: 6,3$ ) e  $\delta$  2,09 (*dd*,  $J = 18,0: 1,9$ ), pertencentes a dois hidrogênios de um mesmo carbono e os sinais das metilas em  $\delta$  1,72 (*d*,  $J = 1,5$ ), 1,24 (*s*), 1,05 (*s*) e 0,96 (*d*,  $J = 6,8$ ). Além destes sinais, os outros hidrogênios apresentaram-se como multipletos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

Foram adquiridos os mapas de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e nestes foi verificado a presença de três carbonos  $\text{sp}^2$  quaternários em  $\delta$  138,6,  $\delta$  176,8 e  $\delta$  207,6 indicando a presença de uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada. Além destes, os hidrogênios da metila em  $\delta$  1,72 (H-15) apresentaram correlação direta com um carbono em  $\delta$  8,3, indicando a presença de algum grupo retirador de elétrons próximo a este carbono, o que foi confirmado pela correlação a longa distância destes hidrogênios com os carbonos 3, 4 e 5.

Após a análise dos espectros de *g*HSQC e *g*HMBC (figuras 60 e 61) foi determinada a estrutura majoritária identificada como ciccolorenona (figura 62). Esta

estrutura já foi identificada em *Drimys angustifolia* e os dados obtidos concordam com os da literatura (tabela 11) diferenciando apenas na atribuição do deslocamento dos carbonos 8 e 9, que foi confirmada pelo mapa de correlações a longa distância (DOGNINI, 2012).

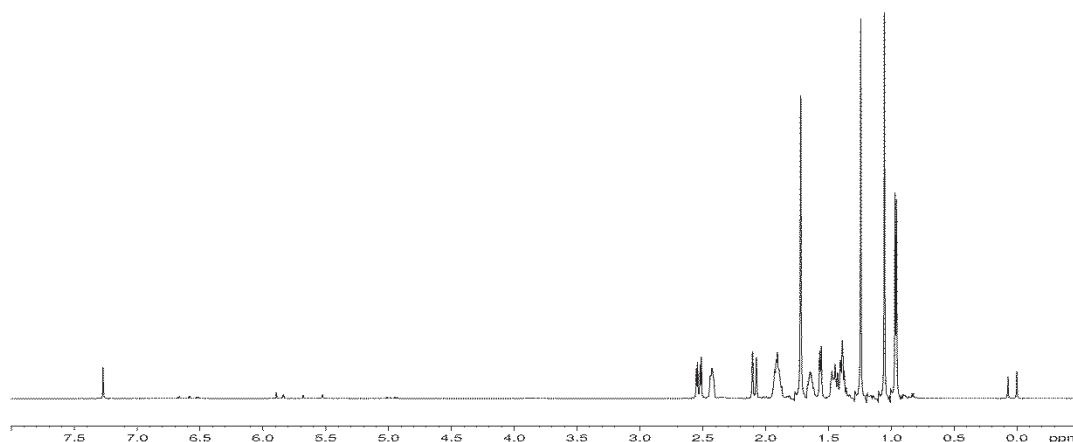


Figura 58: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 11\_org, compostos Px-12 e Px-13.

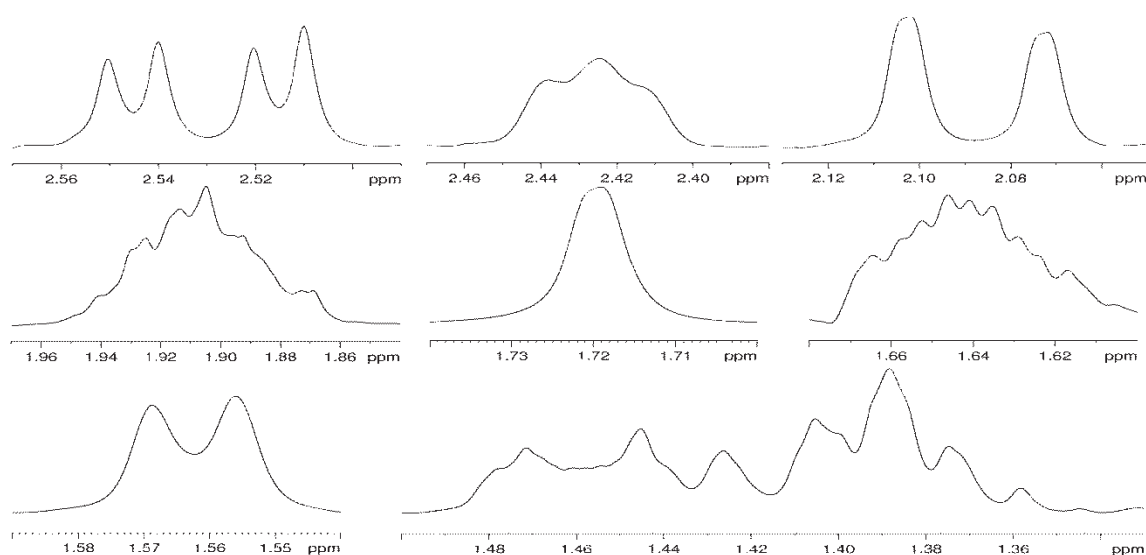


Figura 59: Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 11\_org, composto Px-12.

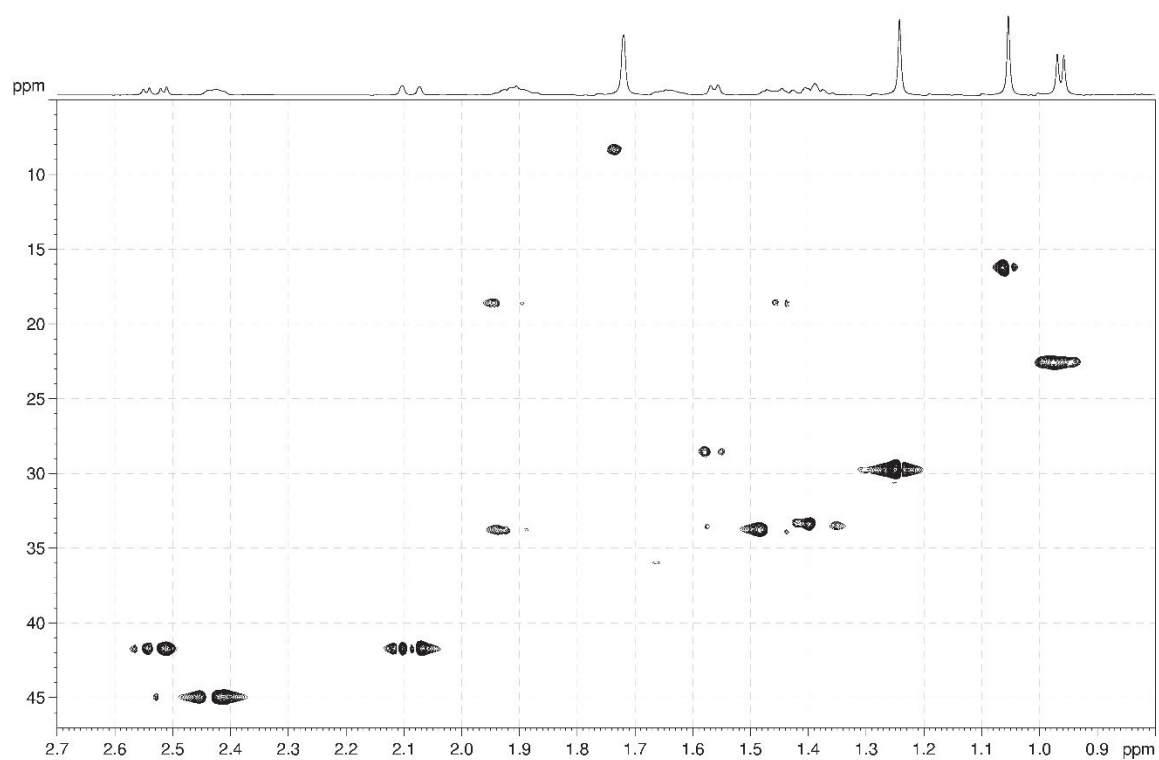


Figura 60: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  evidenciando as correlações do composto Px-12, fração 11\_org.

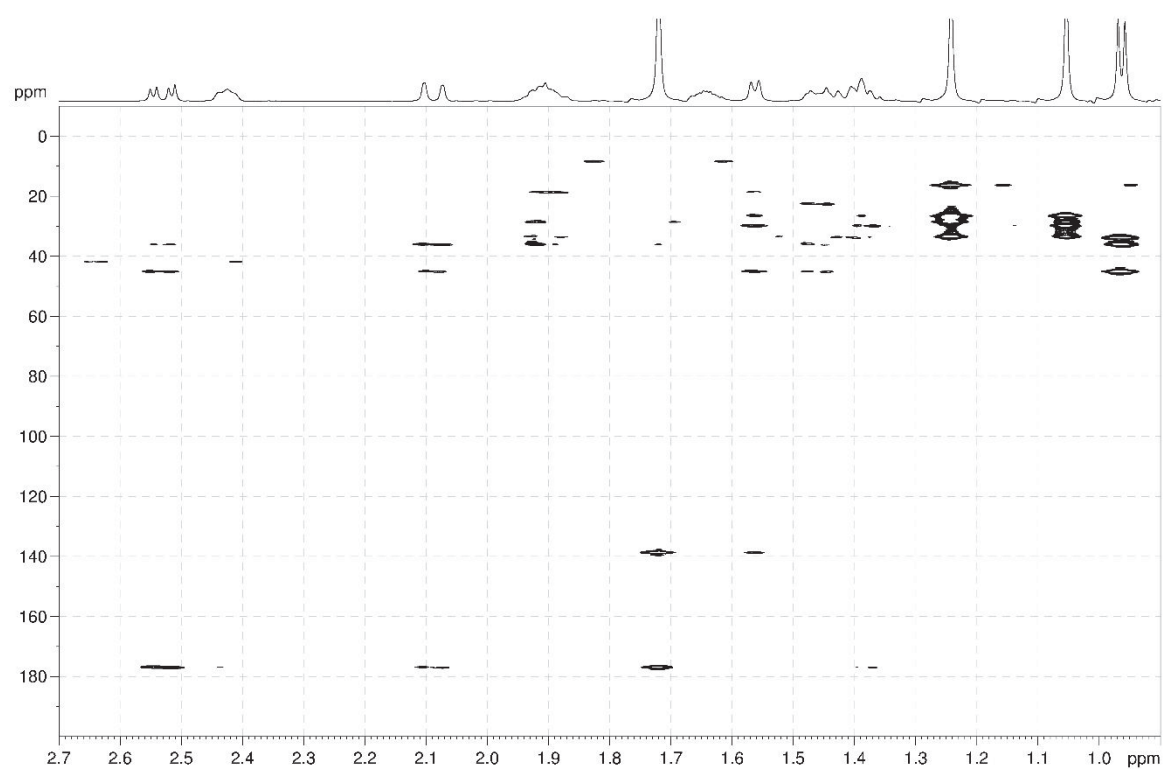


Figura 61: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em  $\text{CDCl}_3$  evidenciando as correlações do composto Px-12, fração 11\_org.

Tabela 11: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-12, fração 11\_org.

Posição	$\delta_{13\text{C}}$	$\delta_{1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	$\delta_{13\text{C}}^*$	$\delta_{1\text{H}}$ (J)*
1	45,0	2,42 <i>m</i> (1H)	2, 5, 10	42,4	2,95 <i>m</i>
2 <sup>a</sup>	41,7	2,09 <i>dd</i> (18,0:1,9, 1H)	1, 3, 5, 10	40,2	2,06 <i>dd</i> (18,4: 2,7, 1H)
2b		2,53 <i>dd</i> (18,0:6,3, 1H)			1, 2, 3, 4, 10
3	207,6			208,3	
4	138,6			140,3	
5	176,8			176,5	
6	28,4	1,56 <i>dl</i> (7,9, 1H)	1, 3, 8, 11, 13	28,5	1,46 <i>d</i> (8,2, 1H)
7	33,4	1,38 <i>m</i> (1H)	5, 6, 11, 13	31,6	1,91~2,06 <i>m</i> (1H)
8a	18,5	1,42 <i>m</i> (1H)	6, 7, 10, 11	32,4	1,41 <i>dt</i> (13,3: 3,1, 1H)
8b		1,92 <i>m</i> (1H)			7, 10, 11
9a	33,7	1,46 <i>m</i> (1H)	1, 8, 10	21,1	1,68 <i>m</i> (1H)
9b		1,88 <i>m</i> (1H)			6, 7, 8, 10
10	36,0	1,64 <i>m</i> (1H)	8, 9, 14	32,3	1,24 <i>m</i> (1H)
11	26,3			26,0	
12	16,2	1,05 <i>s</i> (3H)	6, 7, 11, 13	16,5	1,01 <i>s</i> (3H)
13	29,7	1,24 <i>s</i> (3H)	6, 7, 11, 12	29,5	1,23 <i>s</i> (3H)
14	22,5	0,96 <i>d</i> (6,8, 3H)	1, 9, 10	17,4	0,79 <i>d</i> (7,0, 3H)
15	8,3	1,72 <i>d</i> (1,5, 3H)	3, 4, 5	8,2	1,72 <i>d</i> (2,0, 3H)

<sup>a</sup> Correlação fraca. \* Dados da literatura.

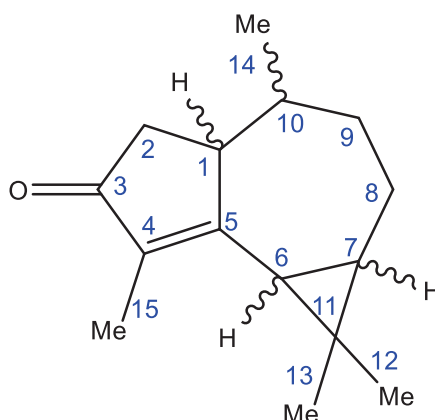


Figura 62: Estrutura do composto Px-12, fração 11\_org, identificado como ciclocolorenona.

Quanto ao conjunto de sinais da substância minoritária desta fração (figura 63), foram observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dois dupletos em  $\delta$  6,67 ( $J = 7,9$ ) e 6,59 ( $J$

= 1,2) e um duplo duplete em  $\delta$  6,52 ( $J = 7,9: 1,2$ ) indicando a presença de um anel benzênico trissubstituído com hidrogênios nas posições 4, 1 e 5, três simpletos em  $\delta$  5,89, 5,68 e 5,53, dois dupletos acoplando entre si em  $\delta$  5,84 e 5,83 ( $J = 1,2$ ), dois dupletos largos em  $\delta$  4,99 ( $J = 10,2$ ) e  $\delta$  4,95 ( $J = 17,0$ ) indicando a presença de um grupo alila, um duplo duplete em  $\delta$  1,99 ( $J = 13,1: 11,7$ ), um duplete de uma metila em  $\delta$  0,83 ( $J = 6,9$ ) e quatro sinais de hidrogênios ligados a carbonos  $sp^3$  que não foi possível determinar a multiplicidade. Este conjunto de sinais é bastante parecido com o conjunto de sinais da substância Px-11.

Com os mapas de correlações direta e a longa distância (figuras 64 e 65), foi possível observar a correlação do hidrogênio em  $\delta$  6,67 (H-4) com carbonos em  $\delta$  107,9 (J1),  $\delta$  134,8 (J3),  $\delta$  145,7 (J2) e  $\delta$  147,4 (J3), indicando a presença de dois carbonos oxigenados no anel benzênico confirmados pela correlação do hidrogênio em  $\delta$  5,89, ligado no carbono em  $\delta$  100,7, deslocamentos típicos de um anel metilenodióxi como substituinte. Os hidrogênios em  $\delta$  6,59 (H-1) e 6,52 (H-5) apresentaram correlação com um carbono em  $\delta$  38,7 indicando a presença de um  $CH_2$  ligado ao anel benzênico. Os hidrogênios ligados a este  $CH_2$  apresentaram correlação com uma metila em  $\delta$  12,6 e com um carbono em  $\delta$  45,0, onde os hidrogênios por sua vez apresentaram correlação com um carbono quaternário em  $\delta$  57,5 pertencente ao outro anel de 6 membros. Neste anel, o simpleto em  $\delta$  5,68 apresentou correlações com o carbono em  $\delta$  100,5 (J1), com carbono 3' (J2) e com o carbono em  $\delta$  163,9 (J3), já o simpleto em  $\delta$  5,53 apresentou correlações com os carbonos em  $\delta$  105,7 (J1),  $\delta$  144,9 (J3),  $\delta$  163,9 (J2) e  $\delta$  203,3 (J2). Finalmente, os hidrogênios H-7' do grupo alila apresentaram correlação com os carbonos em  $\delta$  44,0 (J1),  $\delta$  57,5 (J2),  $\delta$  105,7 (J4),  $\delta$  118,0 (J3),  $\delta$  132,7 (J2) e  $\delta$  203,3 (J3) (tabela 12).

Sendo assim, foi possível confirmar a presença de um anel benzênico trissubstituído com um metilenodióxi nas posições 2 e 3 e um  $CH_2$ -R na posição 6, do grupo alila e de um anel de 6 membros com duas ligações duplas e uma carbonila, possivelmente se tratando de outro anel benzênico reduzido (figura 66). Este é o segundo relato na literatura desta 2oxo-8,1'-neolignana que foi isolada anteriormente de *Piper capaense* (GREEN, 1991). Esta molécula também foi identificada na fração 6\_org e difere do composto Px-11 apenas pela presença de dois anéis metilenodióxi ao invés de um anel e dois grupos metoxila.

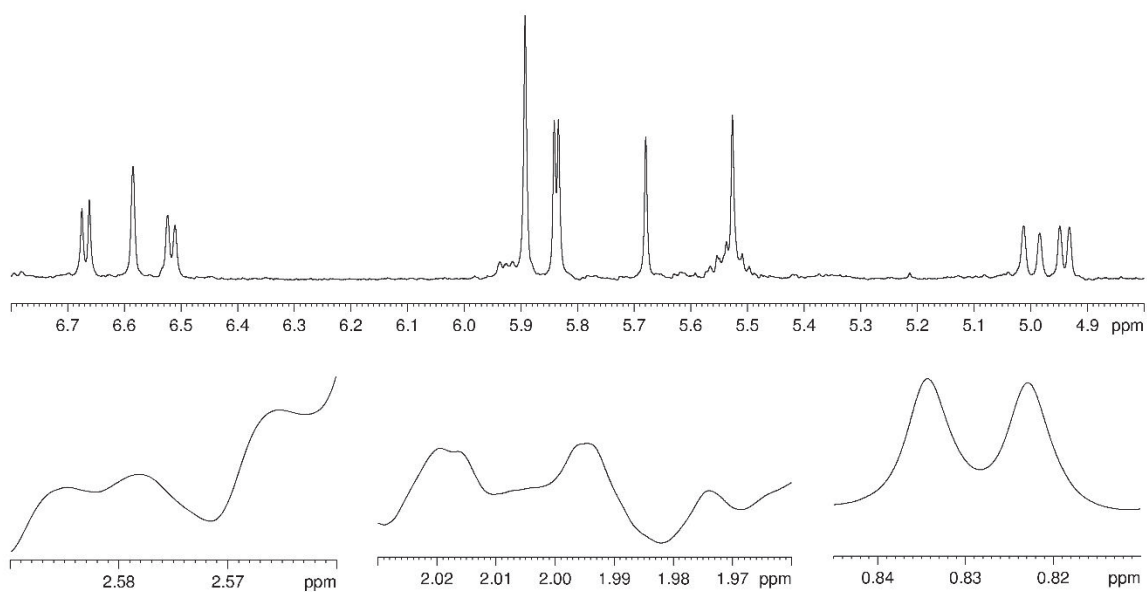


Figura 63: Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 11\_org, composto Px-13.

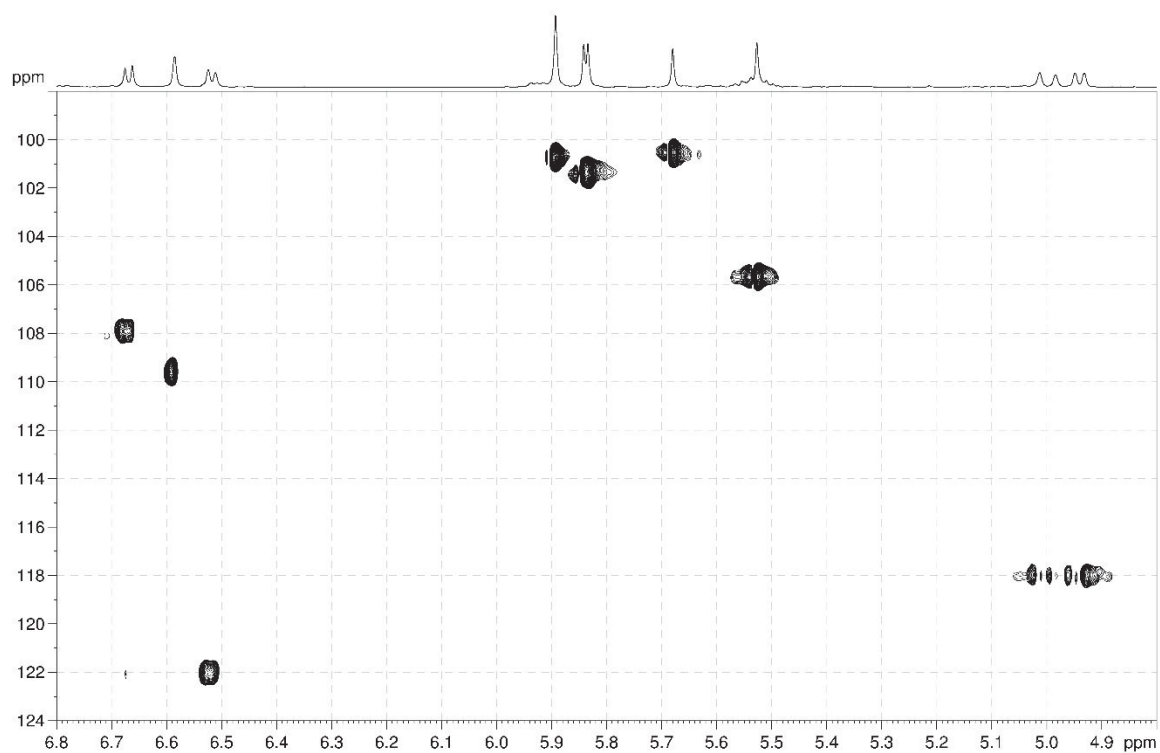


Figura 64: Expansão (em  $f_1$  e  $f_2$ ) do mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  evidenciando as correlações do composto Px-13, fração 11\_org.

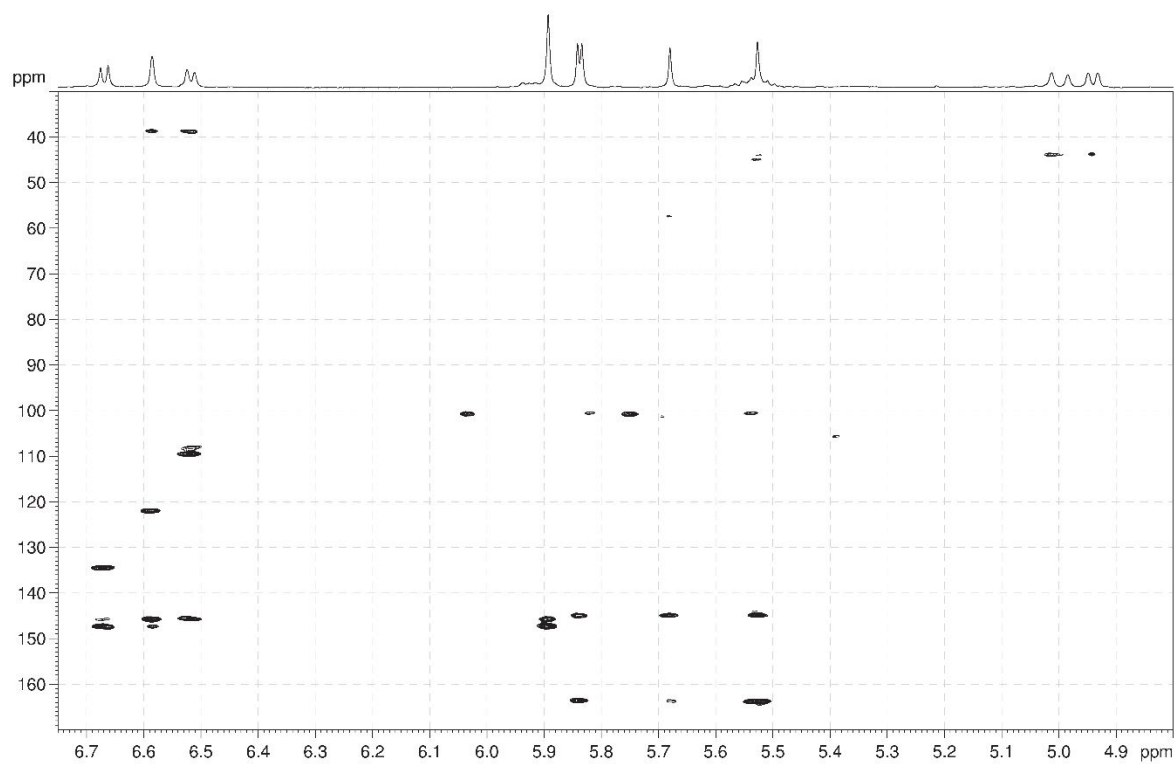


Figura 65: Expansão (em f1 e f2) do mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em  $\text{CDCl}_3$  evidenciando as correlações do composto Px-13, fração 11\_org.

Tabela 12: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-13, fração 11\_org.

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	$\delta_{^{13}\text{C}}^*$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)*
1	134,5			134,5	
2	109,6	6,59 <i>d</i> (1,2, 1H)	3 <sup>a</sup> , 4, 6, 7	109,5	6,56 <i>d</i> (1,7, 1H)
3	147,4			145,7	
4	145,7			147,4	
5	107,9	6,67 <i>d</i> (7,9, 1H)	1, 3, 4 <sup>a</sup>	107,8	6,64 <i>d</i> (7,8, 1H)
6	122,0	6,52 <i>dd</i> (7,9: 1,2, 1H)	2, 4, 7	122,0	6,49 <i>ddl</i> (7,8: 1,7, 1H)
7a		2,50 <i>m</i> (1H)	1		2,3-2,6 <i>m</i> (1H)
7b	38,7	1,99 <i>dd</i> (13,1: 11,7, 1H)	8, 9	38,6	1,97 <i>dd</i> (13,5: 11,5, 1H)
8	45,0	2,56 <i>m</i> (1H)		45,0	2,3-2,6 <i>m</i> (1H)
9	12,6	0,83 <i>d</i> (6,9, 3H)	7, 8, 1'	12,5	0,80 <i>d</i> (6,8, 3H)
1'	57,5			57,4	
2'	100,5	5,53 <i>s</i> (1H)	2', 4', 5' <sup>a</sup>	100,5	5,50 <i>s</i> (1H)
3'	144,9			144,9	
4'	163,9			163,7	
5'	105,7	5,68 <i>s</i> (1H)	1', 4' <sup>a</sup> , 5'	105,6	5,66 <i>s</i> (1H)
6'	203,3				
7'a		2,57 <i>dd</i> (11,7: 4,1, 1H)	1', 2', 3' <sup>a</sup> , 8', 9'		2,3-2,6 <i>m</i> (1H)
7'b	44,0	2,36 <i>m</i> (1H)		43,8	2,3-2,6 <i>m</i> (1H)
8'	132,7	5,52 <i>m</i> (1H)	6' <sup>a</sup> , 7' <sup>a</sup> , 8' <sup>a</sup>	132,7	5,50 <i>m</i> (1H)
9'a		4,99 <i>dl</i> (17,0, 1H)			4,97 <i>dd</i> (16,9: 2, 1H)
9'b	118,0	4,95 <i>dl</i> (17,0, 1H)	7'	118,0	4,92 <i>dd</i> (10: 2, 1H)
OCH <sub>2</sub> O	100,7	5,89 <i>s</i> (2H)	3, 4	101,3	5,87 <i>s</i> (2H)
OCH <sub>2</sub> O'	101,3	5,84 <i>d</i> (1,2, 1H) 5,83 <i>d</i> (1,2, 1H)	4', 5'	100,7	5,82 <i>s</i> (1H) 5,81 <i>s</i> (1H)

<sup>a</sup> Correlação fraca. \* Dados da literatura.

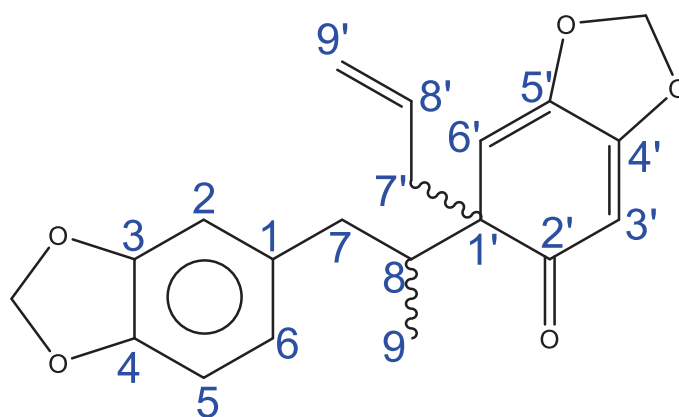


Figura 66: Estrutura do composto Px-13, fração 11\_org.

#### 4.3.3 Fração 13\_aq

A substância Px-14 apresentou um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figuras 67 e 68) e um mapa de correlações de gHSQC e gHMBC (figuras 69 e 70) muito semelhante ao da fração 1\_org, com o mesmo padrão de substituição nos anéis benzênicos. Além da presença do simpleto largo em  $\delta$  11,73 referente a um hidrogênio quelado à uma carbonila, verificou-se um duplete em  $\delta$  8,18 ( $J = 8,9$ ) e outro em  $\delta$  7,04 com a mesma constante de acoplamento, indicando um anel benzênico dissustituído em *para*, outros dois dupletos em  $\delta$  6,50 e  $\delta$  6,38 ( $J = 2,1$ ), sugerindo um anel tetrassustituído com hidrogênios em *meta* e 2 simpletos em  $\delta$  3,894 e  $\delta$  3,891 referentes a uma metoxila cada. Neste espectro percebeu-se também a ausência do H-3 do esqueleto de flavona como simpleto em  $\delta$  6,58, presente na substância da fração 1\_org. Sendo assim, propôs-se o mesmo esqueleto da amostra 1\_org (composto Px-8) para esta substância considerando a presença de uma hidroxila na posição 3, tratando-se então de um derivado do kaempferol, a 3,5-diidroxí-4',7-dimetoxiflavona (figura 71).

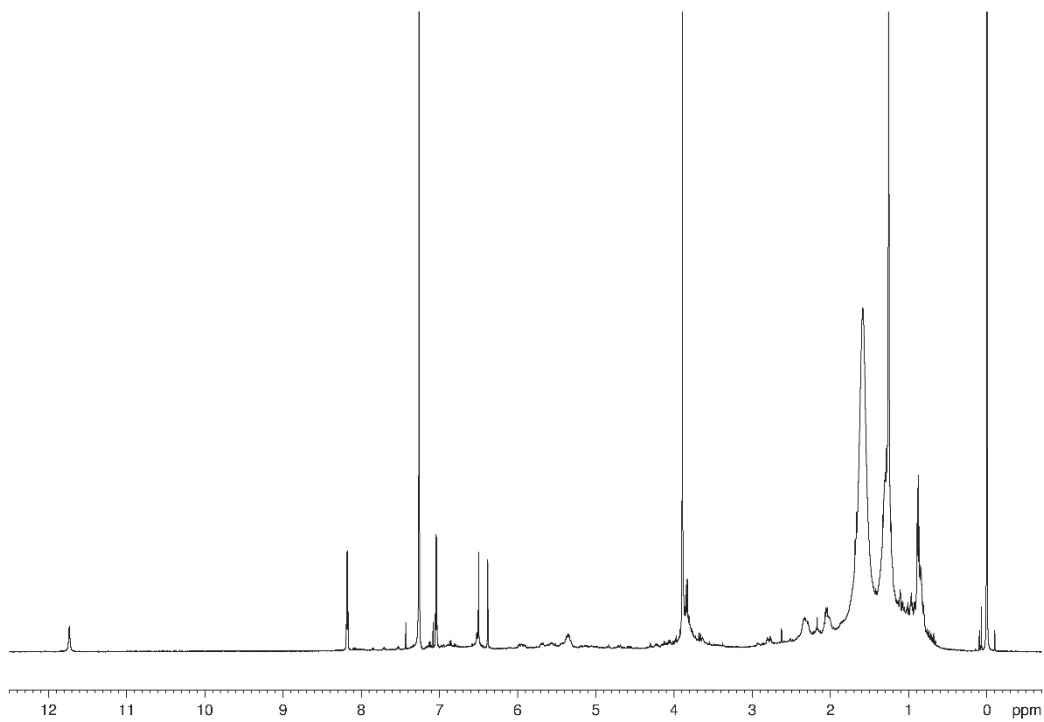


Figura 67: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 13\_aq, composto Px-14.

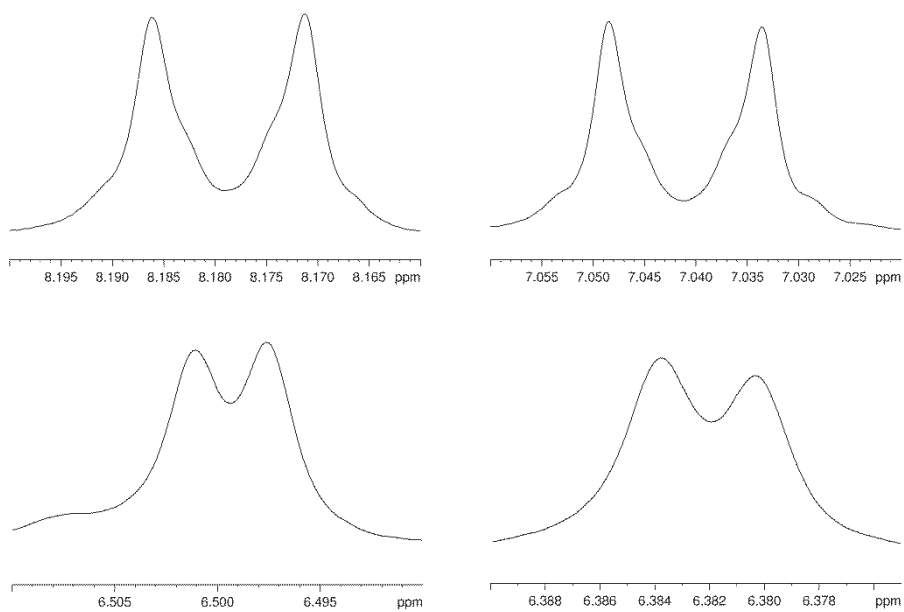


Figura 68: Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 13\_aq, composto Px-14.

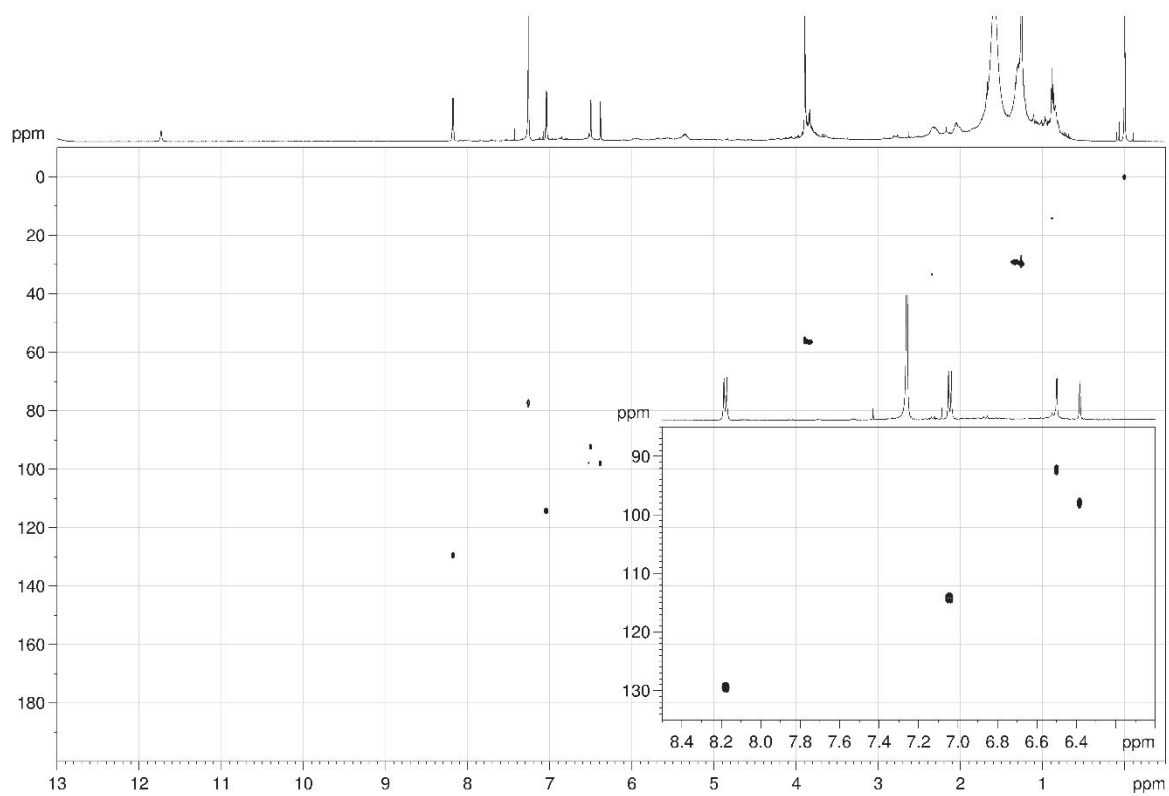


Figura 69: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  do composto Px-14, fração 13\_aq.

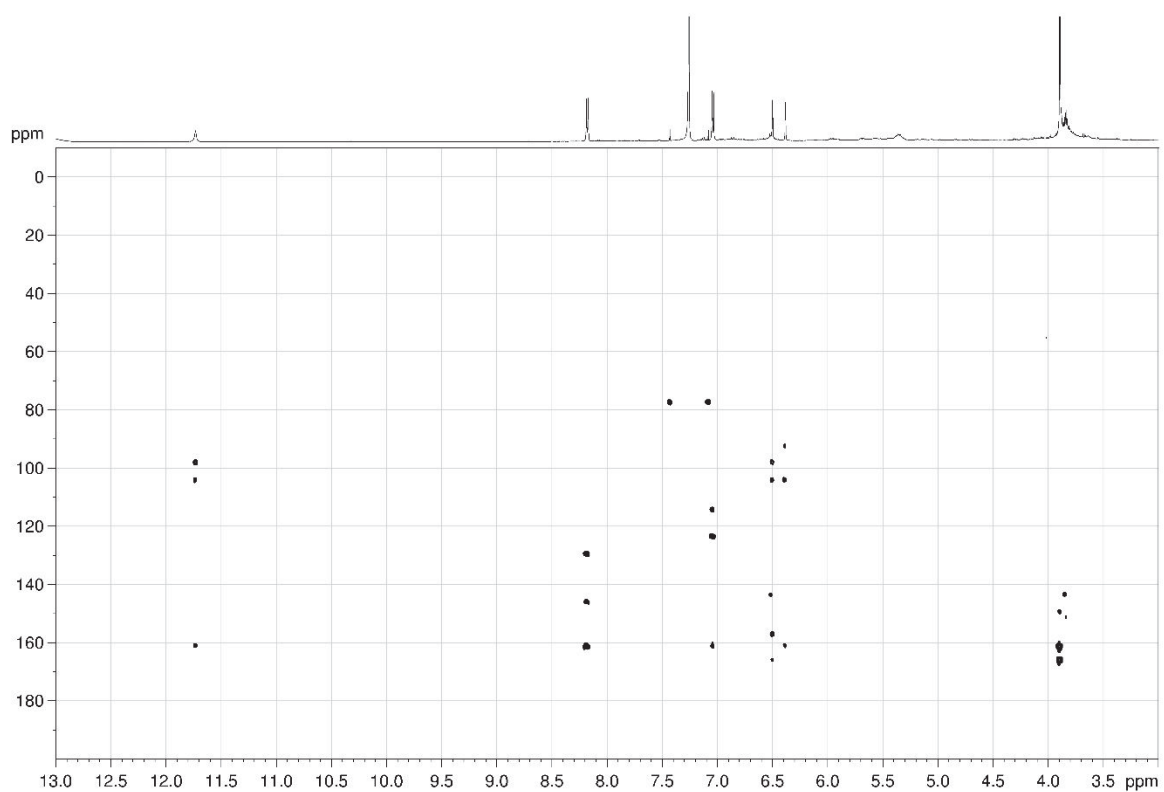


Figura 70: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em  $\text{CDCl}_3$  do composto Px-14, fração 13\_aq.

Tabela 13: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-14, fração 13\_aq.

Posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1			
2	146,0		
3			
4			
5	161,1	11,73 <i>s</i> (1H)	5, 6, 10
6	97,9	6,38 <i>d</i> (2,1, 1H)	5 <sup>a</sup> , 7 <sup>a</sup> , 8, 10
7	165,9		
8	92,3	6,50 <i>d</i> (2,1, 1H)	6 <sup>a</sup> , 8, 9, 10
9	157,0		
10	104,1		
1'	123,4		
2'	129,4	8,18 <i>d</i> (8,9, 2H)	2, 2', 4'
3'	114,2	7,04 <i>d</i> (8,9, 2H)	1', 3', 4' <sup>a</sup>
4'	161,4		
OMe	55,8	3,894 <i>s</i> (1H)	4'
OMe	55,8	3,891 <i>s</i> (1H)	7

<sup>a</sup> Correlação fraca.

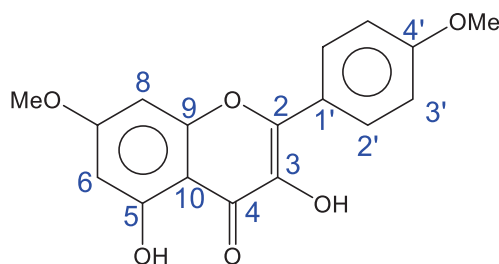


Figura 71: Estrutura do composto Px-14 identificado como 3,5-diidroxi-4',7-dimetoxiflavona.

#### 4.3.4 Fração 14\_org

Esta fração apresentou diversos sistemas de sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figuras 72 e 73). Um deles composto de três sinais em  $\delta$  7,32 (*d*,  $J = 1,8$ ), 7,29 (*dd*,  $J = 8,3: 1,8$ ) e 7,00 (*d*,  $J = 8,3$ ) caracterizando um anel benzênico trissubstituído nas posições 1, 3 e 4. Outro sistema de dois sinais em  $\delta$  7,04 (*d*,  $J = 1,0$ ) e 6,82 (*d*,  $J = 1,0$ ) que apresentam acoplamento em *meta*, típicos de anel benzênico tetra substituído. Um outro

sistema de três sinais, desta vez característicos do grupo *E*-propenila ligado em um anel benzênico, dois duplos quartetos em  $\delta$  6,22 (15,5: 6,7) e  $\delta$  6,49 (15,5: 1,5) e um duplo duplete com integral para três hidrogênios em  $\delta$  1,91 (6,7: 1,5). Por fim três simpletos com integral para três hidrogênios em  $\delta$  4,04, 3,98 e 2,41, os dois primeiros característicos de metoxila e o terceiro atribuído a uma metila ligada a carbono  $sp^2$ .

Por meio dos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC (figuras 74 e 75) foi possível atribuir os hidrogênios, carbonos, a hidroxila em 4' e identificar a molécula, denominada de 4',7-epoxi-8,3'-neolignana (figura 76). Este composto foi identificado em *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (LOPES, 2014) e *Piper regnellii* (GARCIA, 2013) e os dados da literatura (ENRIQUEZ, 1984) concordam com os dados obtidos (tabela 14).

Além destes sinais, foi possível observar também um duplo quarteto minoritário em  $\delta$  5,79 com constantes de acoplamento 11,6 e 7,1 Hz indicando a presença de um grupo *Z*-propenila, o que pode ser um fragmento de um estereoisômero do composto Px-15, ainda sem relatos na literatura. Foram observados também outros dois duplos dupletos em  $\delta$  1,96 ( $J = 7,1: 1,8$ ) e  $\delta$  1,89 ( $J = 6,7: 1,7$ ) que possivelmente pertencem a outros dois grupamentos propenila.

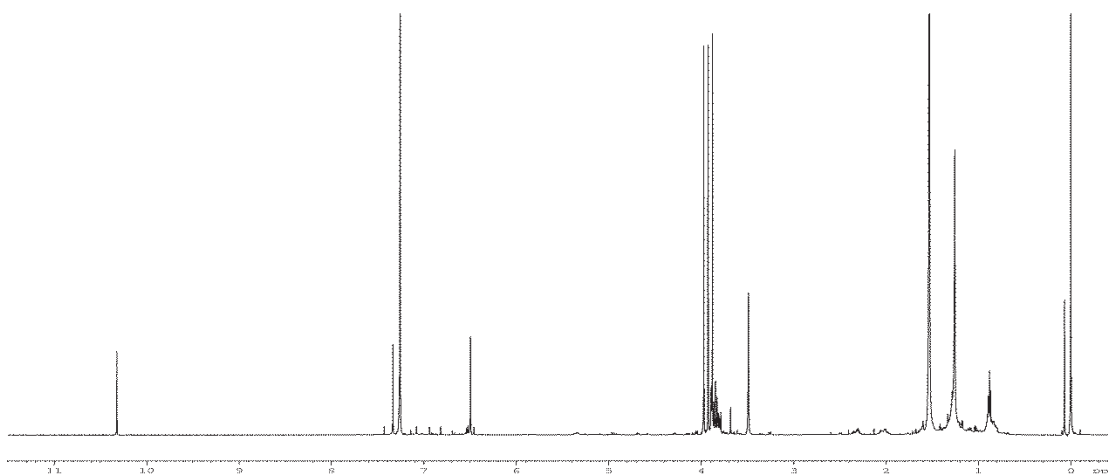


Figura 72: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 14<sub>org</sub>, composto Px-15.

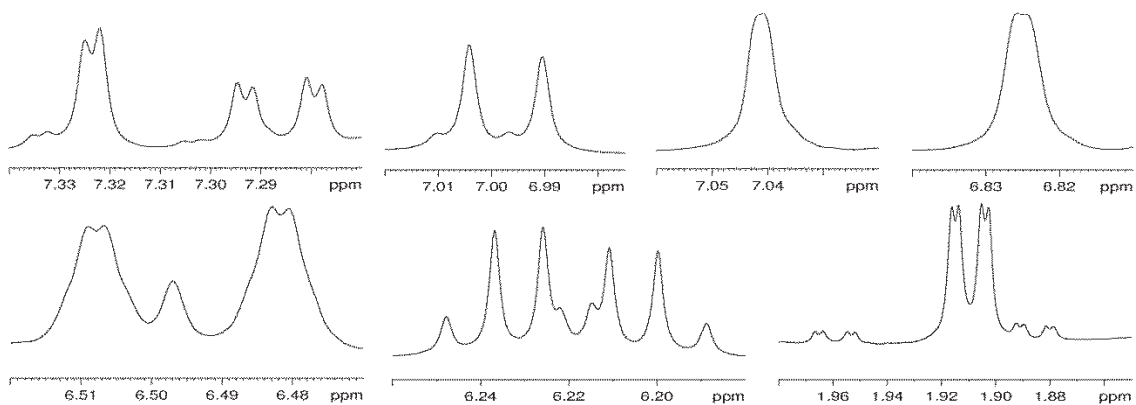


Figura 73: Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da fração 14\_org, composto Px-15.

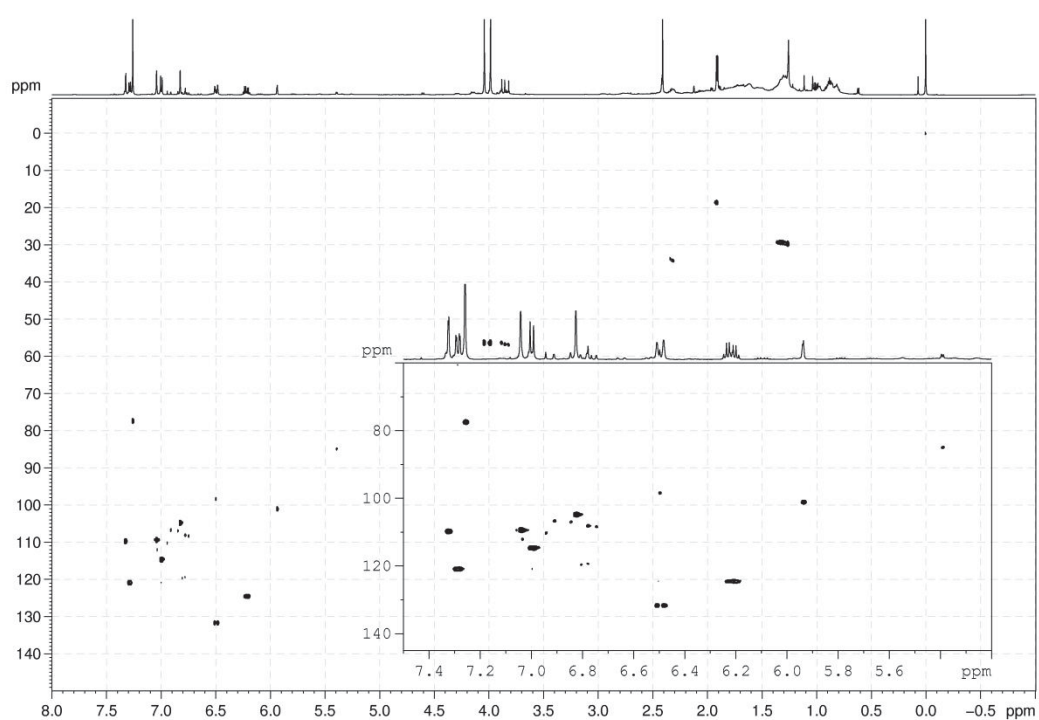


Figura 74: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) em  $\text{CDCl}_3$  do composto Px-15, fração 14\_org.

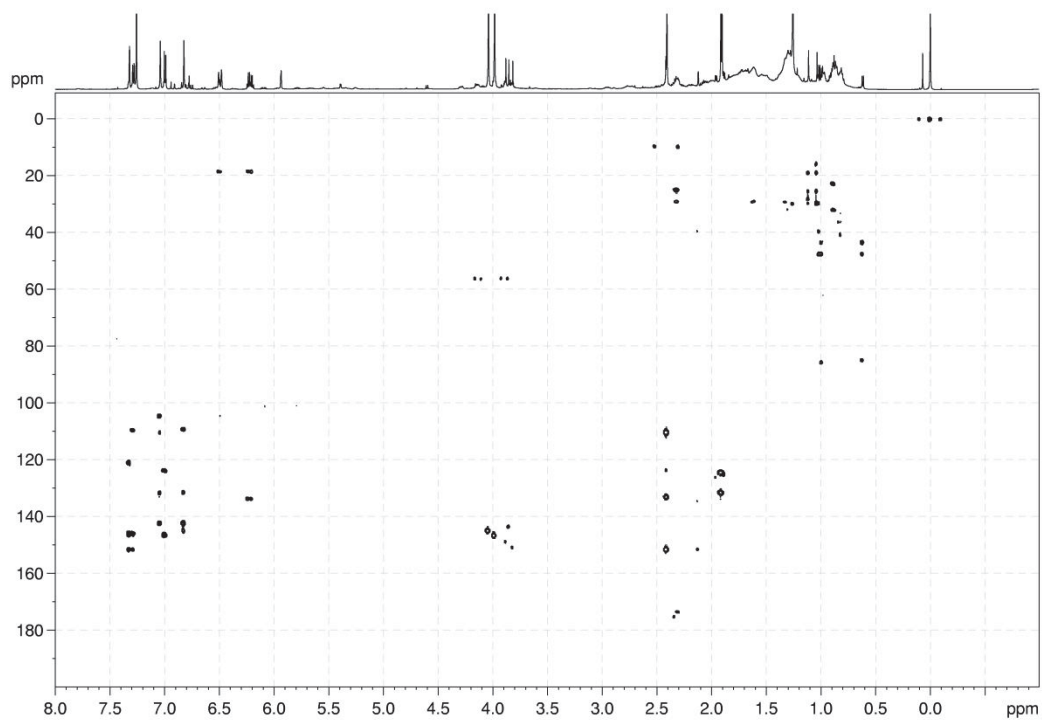


Figura 75: Mapa de correlações de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) em  $\text{CDCl}_3$  do composto Px-15, fração 14\_org.

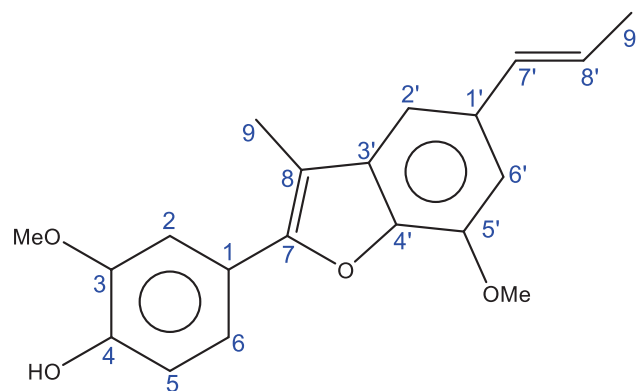


Figura 76: Estrutura do composto Px-15.

Tabela 14: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para o composto Px-15, fração 14\_org.

Posição	$\delta_{13\text{C}}$	$\delta_{1\text{H}}$ (J)	gHMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	$\delta_{13\text{C}}^*$
1	120,9	7,29 <i>dd</i> (8,3: 1,8, 1H)	3, 5, 7	120,59
2	146,5			146,62
3	145,9			145,74
4	114,6	7,00 <i>d</i> (8,3, 1H)	2, 6	114,47
5	109,7	7,32 <i>d</i> (1,8, 1H)	1, 3, 7	109,44
6	123,8			123,69
7	151,6			151,46
8	110,3			110,19
9	9,7	2,41 <i>s</i> (3H)	7, 8, 4'	9,58
1'	104,5	6,82 <i>d</i> (1,0, 1H)	2', 5', 7'	104,47
2'	145,0			144,82
3'	142,3			142,10
4'	133,1			133,07
5'	109,2	7,04 <i>d</i> (1,0, 1H)	3, 8, 1', 3'	109,16
6'	133,8			133,64
7'	131,7	6,49 <i>dq</i> (15,5: 1,5, 1H)	1', 5', 9'	131,51
8'	124,5	6,22 <i>dq</i> (15,5: 6,7, 1H)	6', 9'	124,32
9'	18,6	1,91 <i>dd</i> (6,7: 1,5, 1H)	7', 8'	18,42
OMe	56,34	3,98 <i>s</i> (1H)	2'	56,08
OMe	56,28	4,04 <i>s</i> (1H)	2	56,05

<sup>a</sup> Correlação fraca. \* Dados da literatura.

#### 4.4 COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS EM ÉTER DE PETRÓLEO DE *P. xylosteoides*.

Para verificar se havia diferença entre os quatro extratos em éter de petróleo das folhas, caules, galhos e raízes, foram preparadas quatro soluções de 1,0 mg de cada extrato dissolvidos em 1,0 mL de acetonitrila e cada uma destas soluções foi filtrada e injetada no mesmo aparelho de CLAE onde foi realizada a purificação do EEPCPx. Para comparação dos extratos, foi utilizado um gradiente de fase móvel de 5 a 100% de ACN em H<sub>2</sub>O.

Analisando os cromatogramas dos extratos de galhos e caules (figuras 77 e 78) percebe-se que eles são sobreponíveis e diferenciam-se apenas na altura de alguns picos, o que indica que a composição química destes extratos é bastante parecida contendo um composto majoritário, dois compostos de intensidade média e diversos compostos minoritários. Do extrato de caules foram identificados 13 compostos (Px-3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

O extrato das folhas de *P. xylosteoides* (figura 79) por outro lado, é bastante diferente. Este extrato conta com dois compostos majoritários em 12,7 e 18,4 minutos, quatro picos de intensidade média em 11,5, 16,0, 21,4 e 25,4 minutos e novamente diversos compostos minoritários. Nenhum pico foi coincidente com os compostos isolados dos caules.

Quanto ao cromatograma do extrato das raízes (figura 80), este apresenta pelo menos três picos de intensidade alta em 14,4, 15,4 e 17,3 minutos, seis de intensidade média em 4,8, 9,0, 9,8, 12,4, 13,4 e 20,8 minutos e diversos picos de baixa intensidade. Este foi o extrato mais rico em compostos, porém foi também o de menor massa e por isso foram identificados apenas 7 compostos deste extrato (Px-1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

Todos os extratos apresentam diversos picos de baixa intensidade após 30 minutos, o que confirma que os compostos de polaridade maior não estão presentes neste extrato, mas sim no extrato metanólico.

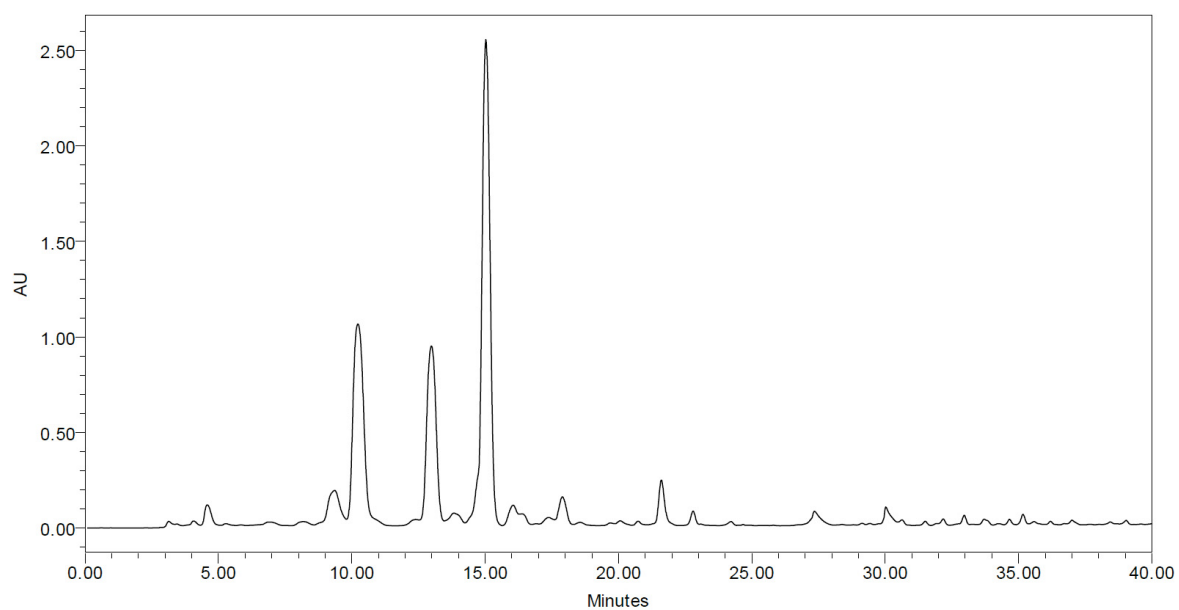


Figura 77: Cromatograma do EEPGPx (max plot).

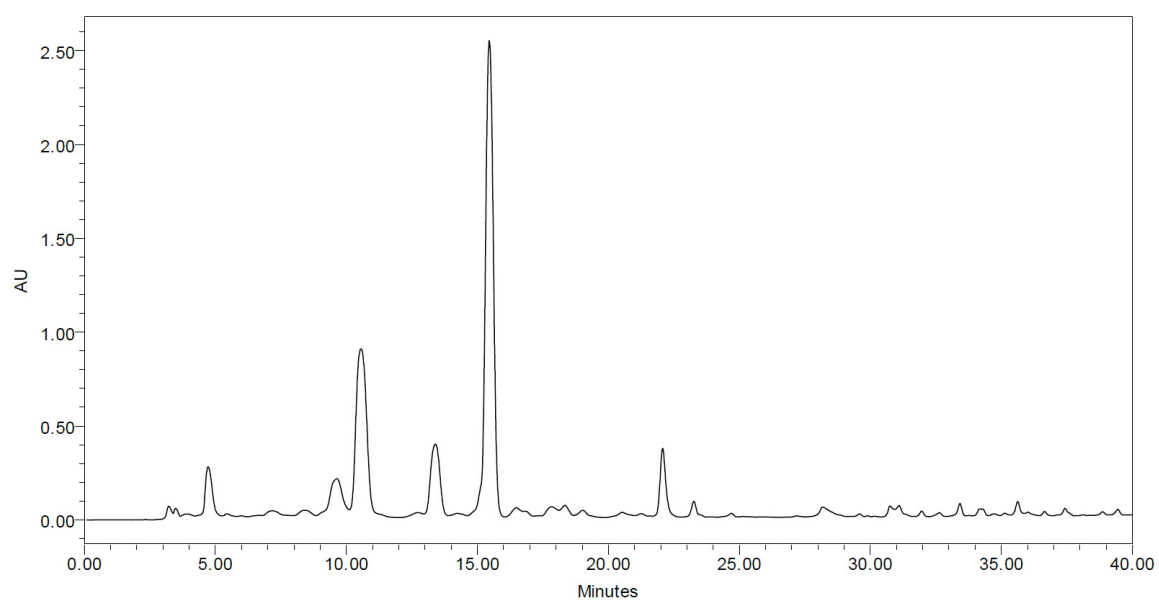


Figura 78: Cromatograma do EEPCPx (max plot).

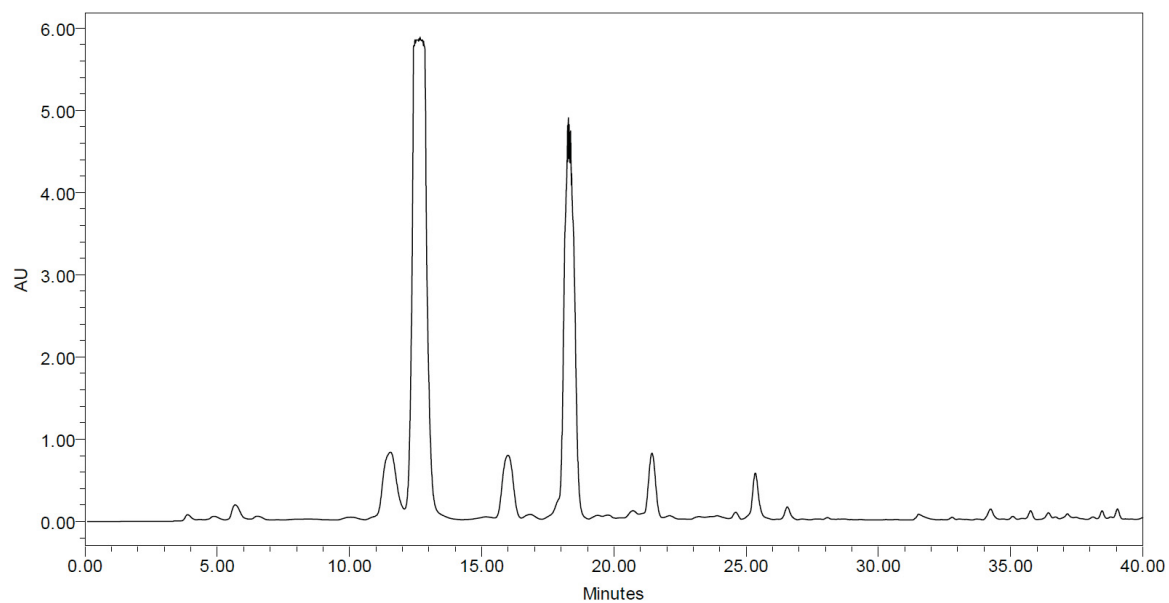


Figura 79: Cromatograma do EEPFPx (max plot).

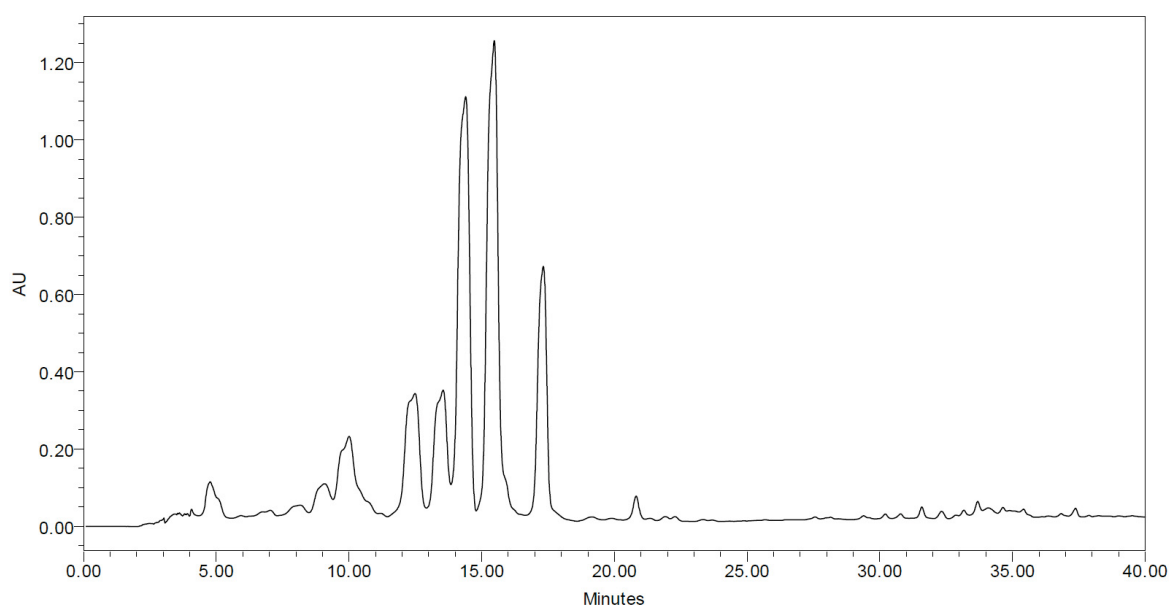


Figura 80: Cromatograma do EEPRPx (max plot).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Realizou-se o estudo dos óleos essenciais de folhas e caules de *P. hemmendorffii* e folhas e galhos de *P. xylosteoides*, cuja análise por GC×GC/MS identificou 105 compostos pertencentes sendo 4 monoterpenos, 3 álcoois alifáticos, 2 ésteres alifáticos, 8 monoterpenos oxigenados, 9 hidrocarbonetos alifáticos, 34 sesquiterpenos, 34 sesquiterpenos oxigenados, 2 aldeídos alifáticos e 9 arilpropanoides.

No estudo dos componentes fixos do extrato em éter de petróleo das raízes de *Piper xylosteoides*, foi possível a identificação completa de 7 compostos, até então não descritos dentro desta família de acordo com pesquisas recentes. Entre os compostos identificados, destacam-se os arilpropanoides que são os componentes majoritários, também encontrados nos óleos essenciais desta planta e uma neolignana inédita na literatura. No extrato em éter de petróleo dos caules de *P. xylosteoides*, foi possível identificar outros 8 compostos, sendo uma lignana inédita, quatro neolignanas sendo duas inéditas e uma relatada pela segunda vez na literatura, dois flavonoides e um sesquiterpeno não relatados na família.

Foram comparados os extratos em éter de petróleo de *P. xylosteoides* utilizando a CLAE e verificou-se que os extratos dos caules e galhos apresentaram perfis sobreponíveis, desta forma constatou-se que estes extratos são semelhantes. Contudo, o extrato das folhas não apresenta um perfil semelhante, indicando que existem compostos diferentes nas folhas desta planta e o perfil cromatográfico do extrato das raízes foi o que apresentou a maior quantidade de metabólitos.

## 6. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>o</sup> edição. Alfred Publishing Corporation, p., 2007.

ANDRADE, E. H. A., et. al. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 4–6, p. 669-675, 2011.

BARREIRO, E. J., et. al. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trimbóticos. **Química nova**, v. 22, n. 5, p. 744-759, 1998.

BARROS, F. M. C., et. al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BELL, E. A. The Physiological Role(s) of Secondary (Natural) Products. In: CONN, E. E. (Ed.). **Secondary Plant Products**. San Diego: Academic Press, v.7, 1981. p.1-19. ISBN 978-0-12-675407-0.

BRENNAN, E., et. al. Enantioselective perception of chiral odorants. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 14, p. 1-42, 2003.

BURT, S. *International Journal of Food Microbiology*. v. 94, p. 223, 2004.

CABRERA, E. V., et. al. Total Synthesis of  $\alpha$ -Asarone. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 44, p. 455-459, 2012.

CAO, S., et. al. Cytotoxic and Other Compounds from *Didymochlaena truncatula* from the Madagascar Rain Forest. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 284-286, 2006.

CELEGHINI, R. M. S., et. al. Evaluation of *Artemisia annua* L. clean-up methods for artemisinin quantification by CLAE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 119-122, 2006.

CHEN, S., et. al. Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. **Phytochemistry**, v. 93, p. 203-209, 2013.

ÇİTOĞLU, G. S. et. al., Antifungal diterpenoids and flavonoids from *Ballota inaequidens*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 659-663, 2004.

DO, T. K. T. et al. Authenticity of essential oils. **Trends in Analytical Chemistry**, manuscrito aceito, 2014.

DOGNINI, J., et. al. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 3, p. 241-244, 2012.

\_\_\_\_\_ Estudo químico e avaliação da atividade antibacteriana de constituintes voláteis de *Drymis angustifolia* e *Piper xylosteoides*. **Dissertação de mestrado**, Blumenau, 2012.

DYER, L. A. Isolation, Synthesis and Evolutionary Ecology of Piper Amides. In: (Ed.). **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology and Evolution**, 2004. p.117-139.

FACUNDO, V. A., et. al. Non-substituted B-ring flavonoids and an indole alkaloid from *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 206-208, 2012.

FERNANDES, A. M. A. P., et. al. A Method to Separate Lignoids from *Virola* Leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 18-21, 1997.

FERRAZ, A. B. F., et. al. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitology Research**, v. 107, p. 243-248, 2010.

FREITAS, G. C., et. al. Cytotoxic non-aromatic B-ring flavanones from *Piper carniconnectivum* C. DC. **Phytochemistry**, v. 97, p. 81-87, 2014.

FURUTA, K. et al. Synthesis and anti-juvenile hormone activity of ethyl 4-[(6-substituted 2,2-dimethyl-2H-chromen-7-yl)metoxy]benzoates. **Journal of Pesticide Science**, v. 35, p. 405-411, 2010.

GREEN, T. P., et. al. Four neolignans ketones from *Piper capaense*. **Phytochemistry**, v. 30, p 3759-3762, 1991.

GUIMARÃES, E. F., et. al. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estudo de Ceará. **Rodriguesia**, v. 55, p. 21-25, 2004.

JARAMILLO, M. A., et. al. Phylogenetic Relationships of the Perianthless Piperales: Reconstructing the Evolution of Floral Development. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, p. 403-416, 2004.

LEE, H. S., et al. Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1324-1328, 2007.

LIKHITWITAYAWUID, K., et al.  $\alpha$ -asarone and asaronaldehyde in *Piper sarmentosum*. **Journal of the Science Society of Thailand**, v. 14, p. 77-79, 1988.

LIM, H. et al.  $\beta$ -asarone (cis-2,4,5-trimethoxy-1-allyl phenyl), attenuates pro-inflammatory mediators by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling and the JNK pathway in LPS activated BV-2 microglia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 265-272, 2014.

LIMA, D. K. S., et. al. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 274-282, 2012.

MAGALHÃES, L. G., et. al. In vitro efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae ) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1747-1754, 2012.

MANIRAKIZA, P., et. al. Single Step Clean-Up and GC-MS Quantification of Organochlorine Pesticide Residues in Spice Powder. **Chromatographia**, v. 52, p. 787-790, 2000.

MATASYOH, J. C., et. al. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, p. 26-28, 2011.

MAZZEU, B. F. Estudo de aspectos estruturais em *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae). **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2014.

NEWMAN, D. J., et. al. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA, R. B., et. al. Efeitos centrais e periféricos das diferentes frações do extrato etanólico das folhas do *Synadenium umbellatum* Pax. (Cola-Nota). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 110-113, 2007.

PARMAR, V. S., et. al. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1069-1078, 1998.

PARRA, J. E., et. al. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 590-592, 2013.

PATRA, A., et. al. Constituents of *Acorus calamus*: structure of acoramone. Carbon-13 nmr spectra of cis- and trans-asarone. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 668-669, 1981.

PAULI, A., et. al. Antimicrobial properties of essential oil constituents. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 11, n. 3, p. 126-133, 2001.

POTZERNHEIM, M. L. C., et. al. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 10-12, 2006a.

\_\_\_\_\_, et. al. Essential Oil of *Piper xylosteoides* (Kunth) Steud. from Federal District, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 523-524, 2006b.

\_\_\_\_\_, et. al. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 25-31, 2012.

RATES, S. M. K., et. al. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

SAUTER, I. P., et. al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 292-295, 2012.

SANTOS, T. G. Estudo Químico e Biológico das espécies *Manekia obtusa* e *Piper cubataonum* (Piperaceae) e síntese de estigmast-4-en-3-ona, (S)-aegelina e (R)-6'-desmetóxi aegelina. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SARTORELLI, P., et. al. Antifungal lignans from the arils of *Virola oleifera*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1003-1006, 1998.

SCHUBERT, H. K., et. al. A Systematic Revision of the Genus *Manekia* (Piperaceae). **Systematic Botany**, v. 37, p. 587-598, 2012.

SPEROTTO, A. R. M., et. al. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57-68, 2013.

STILL, W. C., et. al. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.

WANG, Y., et al. Simultaneous determination of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -asarone in *Acorus tatarinowii* by microemulsion electrokinetic chromatography with [BMIM]PF<sub>6</sub> as oil phase. **Talanta**, v. 101, p. 510-515, 2012.

YUNES, R. A., CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 3 edição. Editora Univali, p. 231, 2012.

ZAKA, R., et. al. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G<sub>6</sub>PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae). **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1979-1987, 2002.

YUNES, R. A. e CECHINEL FILHO, V. **Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna**. In: YUNES, R. A. e CECHINEL FILHO, V. Org(s). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Ed. Univali. 3a ed., 2012, p. 13-36.