

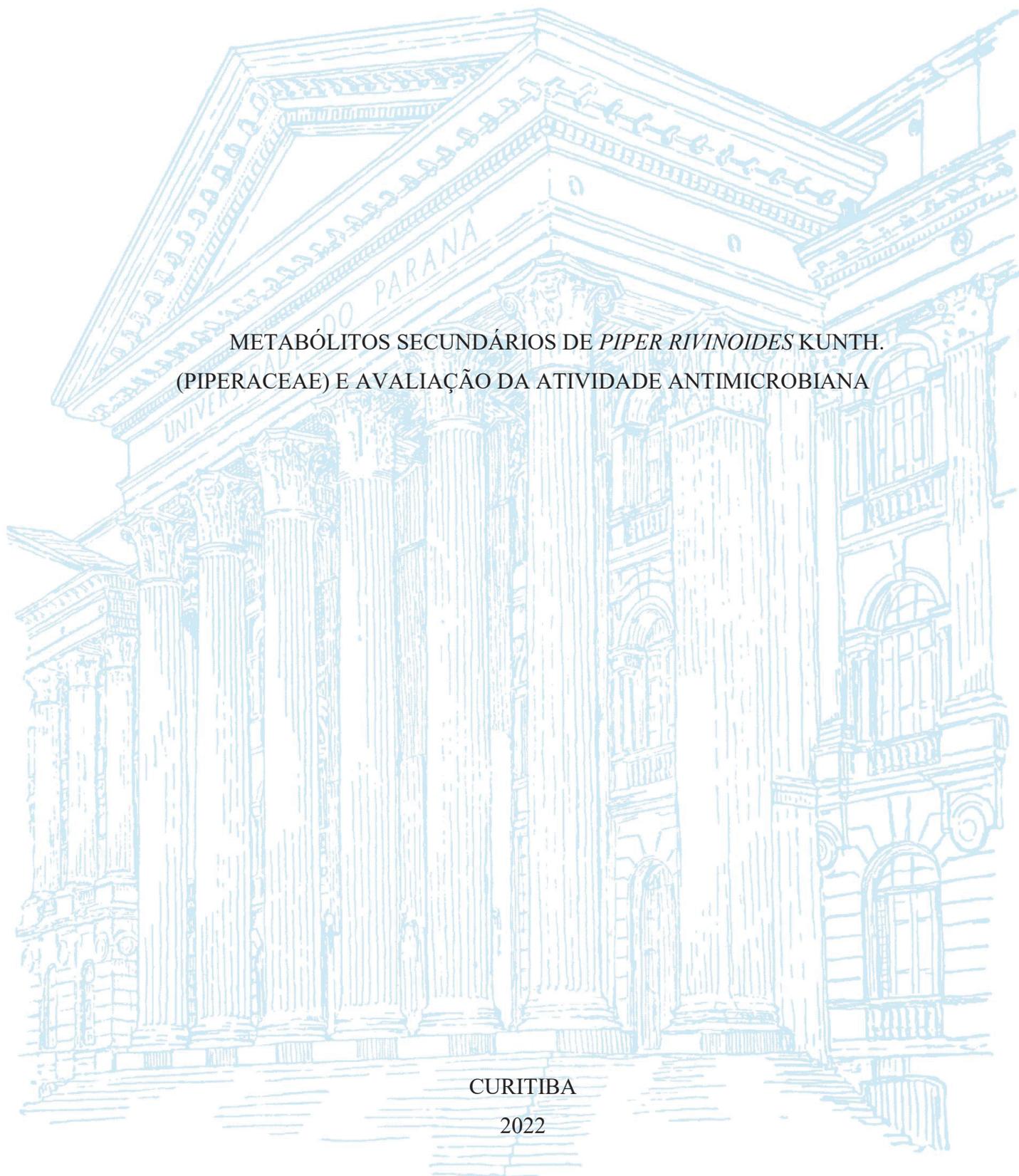
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA DE MACEDO AZEVEDO

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *PIPER RIVINOIDES* KUNTH.
(PIPERACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

CURITIBA

2022



CAROLINA DE MACEDO AZEVEDO

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *PIPER RIVINOIDES* KUNTH. (PIPERACEAE) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

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
Co-orientadora: Dr.^a Aurea Portes Ferriani

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Azevedo, Carolina de Macedo

Metabólitos secundários de *Piper rivinoides* (Kunth) C. DC. (Piperaceae) e avaliação da atividade antimicrobiana / Carolina de Macedo Azevedo. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

Coorientadora: Aurea Portes Ferriani

1. Metabólitos. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Piper. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. IV. Ferriani, Aurea Portes. V. Título.

Bibliotecário: Leticia Priscila Azevedo de Sousa CRB-9/2029

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINA DE MACEDO AZEVEDO** intitulada: **Metabólitos Secundários de *Piper rivinoides* (Kunth) C. DC. (Piperaceae) e Avaliação da Atividade Antimicrobiana**, sob orientação da Profa. Dra. BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 15 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

19/12/2022 17:12:11.0

BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/01/2023 10:58:47.0

IEDA MARIA BEGNINI

Avaliador Externo (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU)

Assinatura Eletrônica

03/01/2023 10:18:20.0

FRANCISCO DE ASSIS MARQUES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe que me apoiou durante todos esses anos e me deu todo o suporte para realizar meus sonhos;

Aos meus amigos que tornaram essa caminhada mais tranquila e divertida;

À minha orientadora, professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, e coorientadora, Dr.^a Aurea Portes Ferriani, por todas as discussões e conhecimento transmitidos;

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

À professora Ieda Maria Begnini pelas contribuições na banca de defesa;

Aos membros do LAPNEQ, Fernanda, Inaiara, Rafael, Rebeca e Sara, por toda ajuda, dicas e parceria;

Ao programa de pós-graduação em química da UFPR, pela estrutura e oportunidade;

À CAPES, pelo incentivo financeiro;

Aos membros dos laboratórios do DQ-UFPR, pela ajuda com materiais, equipamentos e troca de conhecimento;

À Universidade Federal do Paraná, pela estrutura;

A todos que participaram deste trabalho de forma direta ou indireta.

“Na vida, não existe nada, mas a entender”

Marie Curie

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates

RESUMO

Piper rivinoides Kunth é uma das 3600 espécies da família *Piperaceae*, em que o gênero *Piper*, devido a sua grande diversidade química e alta atividade biológica, vem sendo alvo de muitos estudos. O óleo essencial das folhas de *P. rivinoides* foi obtido por hidrodestilação e os extratos brutos das raízes e folhas foram preparados em diferentes polaridades de solventes, hexano, acetato de etila e metanol. O objetivo desse estudo foi a análise fitoquímica dos compostos voláteis e fixos, e avaliação da atividade antimicrobiana. Foram identificadas 99,44% das substâncias presentes no óleo essencial pela técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-EM) sendo o arilpropanoide elemicina o composto majoritário (61,44%), seguido do sesquiterpeno α -muuroleno (10,98%). Os demais constituintes ocorreram em menores concentrações. No teste antimicrobiano o óleo essencial apresentou atividade significativa contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *S. epidermides*, *Escherichia coli* e, também atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Entre os extratos brutos o patógeno *S. aureus* se mostrou mais sensível na presença dos extratos em hexano e acetato de etila, os melhores resultados de concentração mínima inibitória foi do extrato das folhas em hexano sobre as bactérias *S. aureus*, *S. epidermides* e *E. coli*. O fracionamento do extrato das raízes em hexano ocorreu por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna semi-preparativa. Foi possível isolar os arilpropanoídeos miristicina e elemicina que foram identificados por CG-EM. As técnicas de RMN e DRX de monocristal foram utilizadas na identificação da neolignana grandisina, sendo essenciais da determinação na estereoquímica do anel tetra hidrofurânico como *trans*, *cis*, *trans*.

Palavra-chave: *Piper rivinoides*; metabólitos secundários; atividade antimicrobiana; CLAE; DRX de monocristal.

ABSTRACT

Piper rivinoides Kunth is one of the 3600 species from the *Piperaceae* family, in which the genus *Piper*, given its great chemical diversity and high biological activity, has been the target of many studies. The essential oil from the leaves of *P. rivinoides* was obtained through hydrodistillation, the crude extracts from the roots, and leaves were prepared in different solvent polarities, hexane, ethyl acetate and methanol. The objective of this study was to perform the phytochemical analysis of volatile and fixed compounds, as well as antimicrobial activity. In the essential oil, 99.44% of the substances analyzed by the technique of gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) were identified, being the arylpropanoid elemicine as the majority compound (61.44%) and of the sesquiterpene, α -muurolene (10.98%). The other constituents occur in lower concentrations. In the antimicrobial test, the essential oil presented significant activity against the microorganisms *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, and antifungal activity against *Candida albicans*. Among the crude extracts, the pathogen *S. aureus* was more sensitive in the presence of the extracts in hexane and ethyl acetate. The best results of minimum inhibitory concentration were the extracts of the leaves in hexane over the bacteria *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli*. The fractionation of the extract of the roots in hexane was done using high performance liquid chromatography (HPLC) on a semi-preparative column and it was possible to isolate the arylpropanoids myristicin and elemicin, which were identified by GC-MS. The neolignan grandisin was identified by NMR and the single crystal XRD techniques, and configuration of the tetrahydrofuran ring was determined as *trans*, *cis*, *trans*.

Keywords: *Piper rivinoides*; secondary metabolites; antimicrobial activity; HPLC; single crystal XRD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Categorias dos 1881 medicamentos aprovados de 01-Jan-81 a 30-Set-2019.	16
Figura 1.2: Composição Química de óleos essenciais de algumas espécies do gênero <i>Piper</i> .	18
Figura 1.3: Estrutura do dilapiol.	18
Figura 1.4: Substâncias encontradas na espécie <i>Piper betle</i> .	19
Figura 1.5: Estrutura das substâncias encontradas na espécie <i>Piper mikanianum</i> .	20
Figura 1.6: Foto da espécie <i>Piper rivinoides</i> Kunth, tirada na reserva biológica Bom Jesus, PR	21
Figura 1.7: Estrutura da fenilalanina.	22
Figura 1.8: Estrutura da lignana cubebina.	22
Figura 1.9: Estrutura da neolignana conocarpana.	22
Figura 4.1: Cromatograma dos extratos brutos das raízes e folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	33
Figura 4.2: Cromatograma dos extratos em hexano das raízes e folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	34
Figura 4.3: Cromatograma dos extratos em acetato de etila das raízes e folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	34
Figura 4.4: Cromatograma dos extratos em metanol das raízes e folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	35
Figura 4.5: Espectros no infravermelho dos extratos brutos de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. em placas de KBr.	36
Figura 4.6: Cromatograma em CLAE do extrato de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. das raízes em hexano.	38
Figura 4.7: Comparação dos tempos de retenção dos cromatogramas em CLAE do extrato de <i>P. rivinoides</i> Kunth. das raízes em hexano, amostra rica em miristicina e asaricina e padrão de safrol.	38
Figura 4.8: Espectro UV-Vis em 250 nm.	39
Figura 4.9: Cromatograma do extrato das raízes em hexano dopada com safrol e miristicina.	39
Figura 4.10: Cromatograma de CG/EM da amostra PRHR-SPF3.1.	41
Figura 4.11: Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃) da fração PRHR-SPF4.	42
Figura 4.12: Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃) da fração PRHR-SPF4.	43

Figura 4.13: Mapa de correlações de ^1H - ^{13}C a uma ligação (gHSQC) em CDCl_3 da fração PRHR-SPF4.	43
Figura 4.14: Mapa de correlações de ^1H - ^1H a três ligações (COSY) em CDCl_3 da fração PRHR-SPF4.	44
Figura 4.15: Mapa de correlações de ^1H - ^{13}C a longa distância (gHMBC) em CDCl_3 da fração PRHR-SPF4.	44
Figura 4.16: Estrutura determinada por RMN da fração PRHR-SPF4.	44
Figura 4.17: Estrutura da substância PRHR-SPF4.	45
Figura 4.18: Estereoquímica relativa das lignanas tetra-hidrofurânicas.	45
Figura 4.19: DRX de monocristal da substância PRHR-SPF4: vista do fragmento crescente da molécula $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$.	46
Figura 4.20: Estrutura elemicina e isoelemicina.	48
Figura 4.21: Estrutura da miristicina e do δ -3-Careno.	48
Figura 4.22: Estrutura do α -muuroleno.	48
Figura 4.23: Atividade fungicida do óleo essencial de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	50
Figura 4.24: Fluxograma das frações do extrato de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. em acetato de etila das folhas.	52
Figura 4.25: Fracionamento do óleo essencial das folhas de <i>P. rivinoides</i> Kunth.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	21
Tabela 3.1: Metodologia utilizada para Impressão Cromatográfica em CLAE dos extratos de raízes e folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	26
Tabela 4.1: Massa e rendimento dos extratos brutos de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. raízes e folhas.	32
Tabela 4.2: Atividade antimicrobiana dos extratos brutos das raízes (R) e folhas (F) da planta de <i>P. rivinoides</i> Kunth.	37
Tabela 4.3: Fracionamento e isolamento por CLAE em coluna semi-preparativa do extrato das raízes de <i>P. rivinoides</i> Kunth. em hexano.	40
Tabela 4.4: Dados obtidos por CG/EM da amostra PRHR-SPF3.1.	40
Tabela 4.5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3) para amostra PRHR-SPF4	41
Tabela 4.6: Principais constituintes presentes no óleo essencial das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. coleta 2019.	47
Tabela 4.7: Principais constituintes presentes no óleo essencial das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. coleta 2022.	47
Tabela 4.8: Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas da planta de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	49
Tabela 4.9: Massa das sub-frações que apresentaram características semelhantes em CCD: <i>Piper rivinoides</i> Kunth. extrato em acetato de etila das folhas.	52
Tabela 4.10: Massa das frações do extrato das raízes de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. em metanol.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1D – Uma dimensão
- 2D – Duas dimensões
- ACN – Acetonitrila
- AcOEt Acetato de Etila
- CBM – Concentração bactericida mínima
- CC – Cromatografia em coluna
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa
- CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
- CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- COSY – *Correlation spectroscopy*
- δ – Deslocamento químico
- d* – Duplete
- DCM – Diclorometano
- DRX – Difractometria de raios X
- EM – Espectrômetro de massas
- FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier
- gHMBC – *gradiente Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy*
- gHSQC – *gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence*
- HR Dop – Hexano raiz dopado
- Hz – Hertz
- IA – Índice aritmético
- IV – Infravermelho
- J* – Constante de acoplamento
- KBr – Brometo de potássio
- m* – Multiplete
- mAU – Área de pico
- MeOH – Metanol
- MF – Metanol fração
- PDA – *Photodiode Array*

PRAF-Part.HF – *Piper rivinoides* acetato folhas – partição hexano fração

PRAF-Part.MF – *Piper rivinoides* acetato folhas – partição metanol fração

PRHR-SPF – *Piper rivinoides* hexano raiz - semi-preparativa fração

PRMR-CF – *Piper rivinoides* metanol raiz - coluna fração

PROEF-PF – *Piper rivinoides* óleo essencial folhas - preparativa fração

PTFE - Politetrafluoretileno

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C {1 H} – Ressonância Magnética Nuclear de carbono desacoplado do núcleo de hidrogênio

s – Simpleto

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 PRODUTOS NATURAIS	15
1.2 FAMÍLIA PIPERACEAE E GÊNERO <i>Piper</i>	17
1.3 <i>Piper rivinoides</i> KUNTH.	20
1.4 ARILPROPANOIDES, LIGNANAS E NEOLIGNANAS	22
1.5 TESTES BIOLÓGICOS	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 COLETA	25
3.1.1 Coleta e processamento do material vegetal	25
3.2 EXTRAÇÃO	25
3.2.1 Preparo dos extratos brutos por gradiente de polaridade dos solventes	25
3.2.2 Preparo do óleo essencial das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	25
3.2.2.1 Hidrodestilação para a obtenção dos óleos essenciais das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	25
3.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS E ÓLEO ESSENCIAL	26
3.3.1 Cromatograma em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos.	26
3.3.2 Espectrograma em infravermelho dos extratos (FTIR)	26
3.3.3 Análise antimicrobiana dos extratos brutos e do óleo essencial de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	26
3.3.4 Análise antifúngica do óleo essencial de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	28
3.3.4.1 Isolados fúngicos.	28
3.3.4.2 Avaliação do efeito fungicida	28
3.4 PURIFICAÇÃO	29
3.4.1 Fracionamento dos extratos brutos de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.....	29
3.4.1.1 Fracionamento do extrato da raiz em hexano por CLAE.	29
3.4.1.2 Fracionamento por Cromatografia de coluna (CC) a vácuo.	29
3.4.2 Fracionamento do óleo essencial das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	30
3.5 IDENTIFICAÇÃO	30

3.5.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	30
3.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM)	30
3.5.3 Difractometria de raios X (DRX) de monocristal	31
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	32
4.1 ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	32
4.1.1 Cromatograma em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	32
4.1.2 Espectrograma em FTIR dos extratos brutos	35
4.1.3 Atividades antimicrobianas dos extratos brutos	36
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	37
4.2.1 Fracionamento do extrato de <i>P. rivinoides</i> Kunth em hexano	40
4.2.1.1 Identificação da amostra PRHR-SPF3.1 e PRHR-SPF3.2	40
4.2.1.2 Identificação da amostra PRHR-SPF4	41
4.3 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	46
4.3.1 Teste antimicrobiano do óleo essencial das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. coletadas em 2022	49
4.3.2 Avaliação do efeito fungicida do óleo essencial das folhas de <i>Piper</i> <i>rivinoides</i> Kunth. coletadas em 2022	50
4.4 FRACIONAMENTOS DOS EXTRATOS E DO ÓLEO ESSENCIAL	51
4.4.1 Fracionamento do extrato das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth. em acetato de etila	51
4.4.2 Fracionamento do extrato da raiz de <i>Piper rivinoides</i> Kunth em metanol	53
4.4.3 Fracionamento do óleo essencial das folhas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth.	53
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6 REFERÊNCIAS	56
7 APÊNDICES	61

1 INTRODUÇÃO

A química dos produtos naturais (PN) tem como um dos objetivos extrair, separar e identificar as substâncias presentes nos organismos vivos. Conhecer cada uma dessas substâncias permite uma série de estudos em uma ampla área de pesquisa (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Desde muito tempo as pessoas procuram produtos naturais para melhorar a sua qualidade de vida, muitos desses produtos estão associados a tratamentos fitoterápicos, principalmente em países em desenvolvimento onde esses produtos são usados de forma empírica no tratamento de doenças, a exemplo dos índios no Brasil que usam seu conhecimento e experiência com plantas para o tratamento de suas enfermidades (MENDES et al., 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população desses países utiliza plantas na atenção primária à saúde (ROSA et al., 2016).

O estudo mais aprofundado de plantas vem crescendo nos últimos anos principalmente com o desenvolvimento de técnicas analíticas como a cromatografia e a espectroscopia. A partir do avanço tecnológico, através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em fase gasosa (CG), ressonância magnética nuclear (RMN) entre outras, nos permite um estudo mais detalhado sobre os metabólitos secundários dos seres vivos (BERLINK et al., 2017).

A espécie *Piper rivinoides* Kunth. ainda é muito pouco estudada comparada a outras do gênero *Piper*, que possui em torno de 2000 espécies distribuídas por todo Brasil (SILVA et al., 2017). Estudos mostram a diversidade química presente nas espécies desse gênero, além de resultados promissores em diversas modalidades de atividade biológica, como efeitos antiviral, antimicrobiano, antifúngico, anti-helmíntico, além da presença de propriedades antioxidantes, antitumorais, antidiabéticas e anti-inflamatórias (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; BERNUCCI et al., 2016; SILVA et al., 2017).

1.1 PRODUTOS NATURAIS

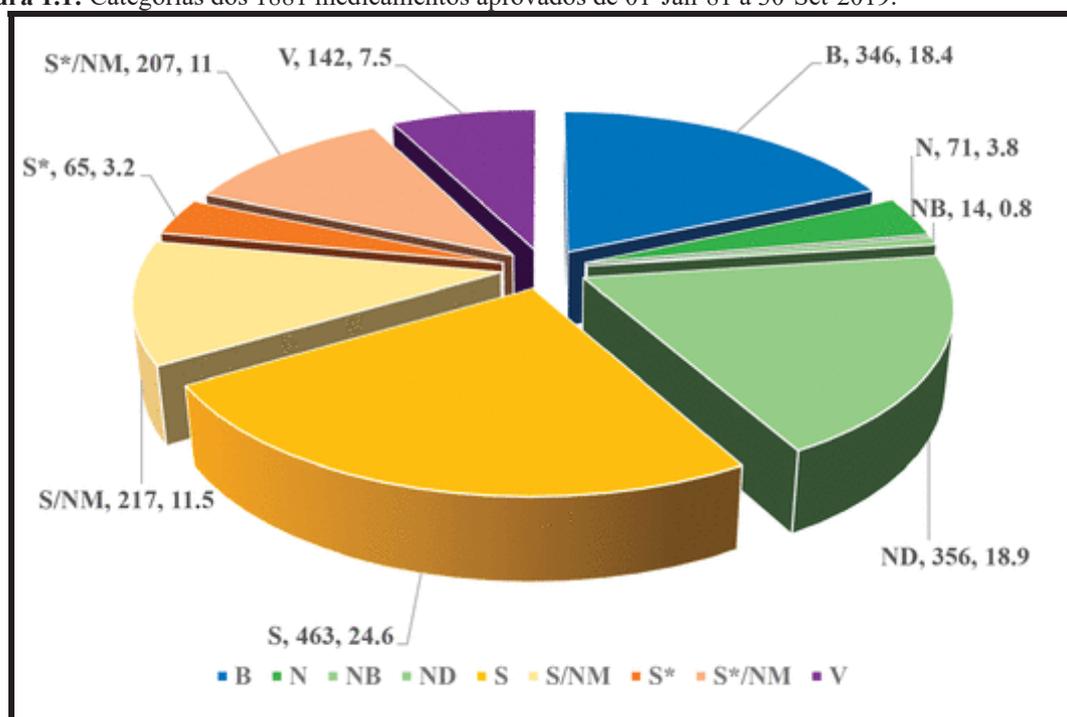
Em um estudo de quase quatro décadas, NEWMAN E CRAGG (2020) ressaltaram a importância de produtos naturais em medicamentos. Os produtos naturais e seus derivados, representam a maioria dos compostos usados no desenvolvimento de novos fármacos (37,7%). Esses mesmos autores enfatizaram também a importância da pesquisa nesta área.

Esse estudo abrangeu uma série de artigos, demonstrou a importância dos produtos naturais na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. Entre os trabalhos citados estão: triagem de extratos de PN; micróbios como fonte de PN; descoberta de

substâncias na biodiversidade; fármacos antitumorais de origem marinha; métodos para identificar compostos a base de PN; entre outros.

A figura 1.1 apresenta a importância dos produtos naturais na descoberta de fármacos aprovadas nos últimos 39 anos. Das 1881 substâncias aprovadas, 713 estão diretamente relacionadas aos compostos naturais (N), e nas categorias de produtos naturais botânicos (NB) e derivados de produtos naturais (ND), ou indiretamente, como os sintéticos possuindo o farmacóforo de origem natural (S*). Os dados obtidos indicam que ainda hoje os produtos naturais oferecem as melhores opções na descoberta de novas estruturas de atividade biológica relevante no tratamento de doenças (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Figura 1.1: Categorias dos 1881 medicamentos aprovados de 01-Jan-81 a 30-Set-2019.



Fonte: adaptado de NEWMAN e CRAGG, 2020

O Brasil apresenta grande potencial no estudo de produtos naturais, possuindo entre 15 e 20% da biodiversidade mundial, da qual 24% referem-se às plantas superiores (MENDES et al., 2017). A diversificação de fontes naturais de metabólitos secundários permite a exploração de moléculas para o preparo de novos compostos químicos bioativos (BERLINK et al., 2017).

Para BERLINK et al. (2017) químicos de produtos naturais devem estar associados a profissionais da área de química analítica no uso de técnicas hífenadas, ou seja, com a associação de técnicas, a fim de proporcionar uma investigação mais completa do

metabolismo secundário. Da mesma forma a integração da química medicinal e de síntese orgânica na descoberta de novos produtos, atendendo à necessidade da sociedade.

Além disso, sob o ponto de vista ambiental, são as espécies herbáceas e arbustivas, classificadas como produtos florestais não madeiráveis (PFNM), que representam novas fontes de recursos, além de promoverem a conservação de áreas, o fortalecimento da agricultura familiar no caso de cultivos direcionados (CORADIN *et al.*, 2011) e o controle biológico (RESTELLO *et al.*, 2009).

1.2 FAMÍLIA Piperaceae E GÊNERO *Piper*:

A família Piperaceae teve destaque em seu uso medicinal popular em países como Brasil (SILVA *et al.*, 2017), Malásia (NAIM *et al.*, 2020) e México (MARTÍNEZ-BAUTISTA *et al.*, 2019). Distribuída em regiões tropicais e subtropicais nos hemisférios norte e sul, possui 10 gêneros e cerca de 3600 espécies no mundo (BERNUCI *et al.*, 2016). A família *Piperaceae* é uma das mais importantes na região de Osaca no México, sendo muito popular entre os indígenas da região (MARTÍNEZ-BAUTISTA *et al.*, 2019). NAIM (2020) destaca a importância do estudo dessas plantas, não só por haver um aumento no consumo e fabricação de suplementos alimentares, mas também, assim como na Malásia, curandeiros usam o extrato bruto dessas plantas para o tratamento de algumas enfermidades, reiterando que o uso indiscriminado de certas substâncias pode causar mal-estar e até ser fatal. Como mostra, RAMOS *et al.* (2020) algumas plantas desta família possuem uma grande capacidade inseticida atribuída à presença de amidas naturais.

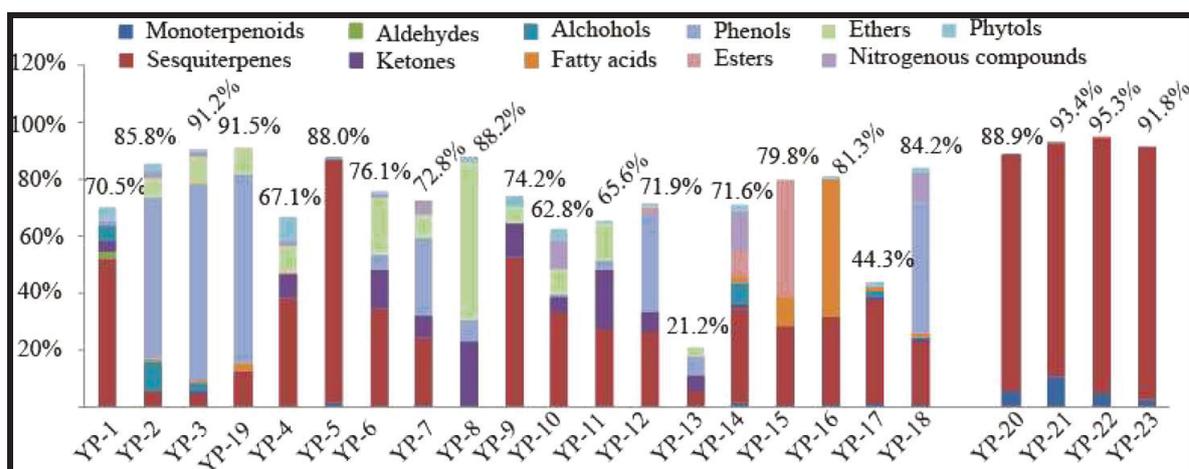
Dentro da família Piperaceae, o gênero *Piper* é o mais representativo possuindo em torno de 2000 espécies e um número significativo de pesquisas científicas em áreas como agricultura, culinária, farmácia, medicina, além de ser usado há muito tempo em rituais culturais e na medicina popular (SILVA *et al.*, 2017).

Na figura 1.2 pode-se observar a diversidade na composição química de alguns óleos essenciais da espécie *Piper*, em um estudo que analisou o poder inibidor das espécies *Piper* sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE) que está associada à doenças neurais como Alzheimer. Das 23 espécies analisadas foram detectados um total de 106 compostos entre folhas, caules e frutos dessas amostras. Os métodos de detecção aplicados foram a cromatografia em fase gasosa (CG-DIC) e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) (XIANG *et al.*, 2017).

O interesse pelo estudo de óleos essenciais da espécie se justifica por resultados promissores em diversas modalidades de atividade biológica, como efeitos antiviral,

antimicrobiano, antifúngico, anti-helmíntico, além da presença de propriedades antioxidantes, antitumorais, antidiabéticas e anti-inflamatórias (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; BERNUCCI et al., 2016; SILVA et al., 2017).

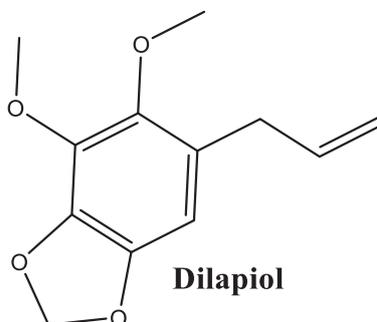
Figura 1.2: Composição Química de óleos essenciais de algumas espécies do gênero *Piper*. Em que: YP-1 *P. austrosinense* Tseng.; YP-2 *P. Sarmentosum* Roxb.; YP-3 *P. hancei* Maxim.; YP-4 *P. wallichii* DC.; YP-5 *P. lactispicum* C. DC.; YP-6 *P. austrosinense* Y. Q. Tseng.; YP-7 *P. bavinum* C. DC.; YP-8 *P. puberulatum* (Benth.) Maxim.; YP-9 *P. hancei* Maxim.; YP-10 *P. betle* I.; YP-11 *P. senporeiense* Yaman.; YP-12 *P. aduncum* I.; YP-13 *P. hainanense* Hemsl.; YP-14 *P. thomsonii* Hook f.; YP-15 *P. boehmeriacifolium* Miq.; YP-16 *P. flaviflorum* C. DC.; YP-17 *P. nigrum* L.; YP-18 *P. betle* L.; YP-19 *P. hispidinervium* C. DC.; YP-20 *P. nigrum* L.; YP-21 *P. nigrum* L.; YP-22 *P. nigrum* L.; YP-23 *P. nigrum* L.



Fonte: Adaptado de XIANG et al., 2017

Óleos essenciais extraídos de flores e folhas da espécie *Piper aduncum* apresentaram uma alta atividade contra *Sclerotinia sclerotiorum*, patógeno fúngico que atinge plantas de interesse econômico. Sua atividade fungicida se dá pela presença do arilpropanoide dilapiol (figura 1.3) em sua composição (VALADARES et al., 2018).

Figura 1.3: Estrutura do dilapiol, substância encontrada na espécie *Piper aduncum*.

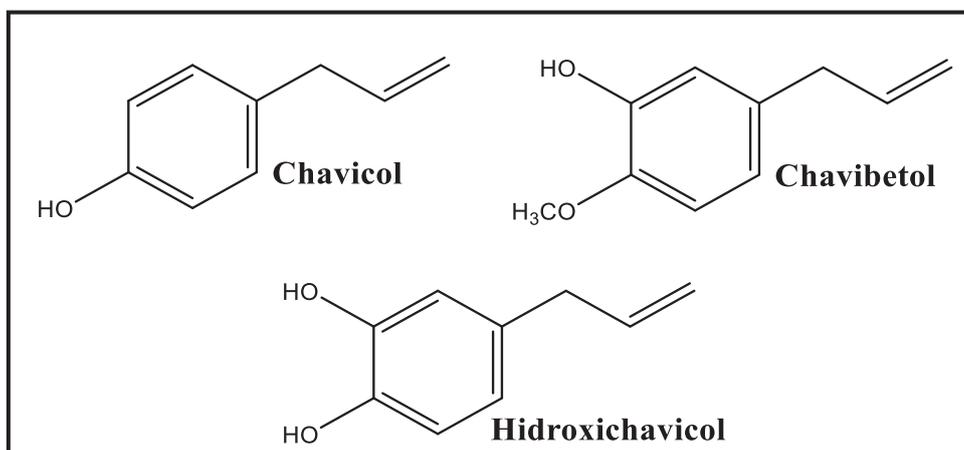


A composição dos óleos essenciais não é dependente somente das características genéticas da planta, fatores ambientais também podem influenciar sua qualidade. Este conjunto de condições é chamado de fatores edafoclimáticos (tipo e qualidade do solo,

altitude, regime pluviométrico, temperatura e radiação solar) (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Além disso, alguns desses fatores apresentam flutuações entre as diferentes estações do ano, o que acarreta variação no teor e na qualidade de óleos essenciais, justificando a realização dos estudos com caracterização específica da(s) fonte(s) vegetal(is) utilizada(s) no estudo.

Como exemplo, dois estudos dos óleos essenciais da espécie *Piper betle* demonstraram que a diferença nas condições de cultivo alterou sua composição química. O primeiro estudo apresentou chavicol (figura 1.4 A), chavibetol (figura 1.4 B) e acetatos como componentes principais, enquanto o segundo revelou hidroxichavicol (figura 1.4 C) como componente mais abundante identificado (LIU et al., 2015).

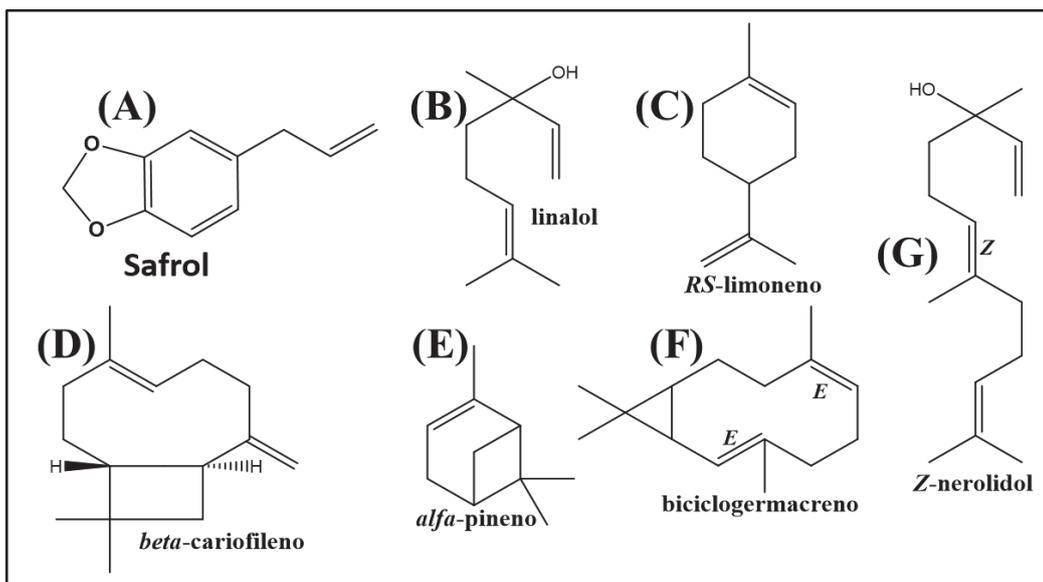
Figura 1.4: Substâncias encontradas na espécie *Piper betle*: A- chavicol; B- chavibetol; C- hidroxichavicol.



A espécie *Piper cubeba* L. F. é usada na culinária como tempero e através de análises por CLAE foram detectadas lignanas em sua composição, que apresentaram atividades citotóxicas, anti-inflamatórias e antiparasitárias (ARRUDA et al., 2019).

Outra técnica muito utilizada na identificação dos compostos voláteis é a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), na qual pelo índice de retenção é possível a identificação dos constituintes de uma amostra, e associado a um detector por ionização de chama (DIC) permite a quantificação dos constituintes. Em amostras de óleos essenciais de *Piper mikanianum* foram identificados em sua composição 82% do arilpropanoide safrol (figura 1.5 A), 2,2% de linalol (figura 1.5 B), 1,8% limoneno (figura 1.5 C), 1,7% β -cariofileno (figura 1.5 D), 1,4% α -pineno (figura 1.5 E), 1,2% biciclogermacreno (figura 1.5 F) e 1,3% de Z-nerolidol (figura 1.5 G) (CARNEIRO et al., 2020).

Figura 1.5: Estrutura das substâncias encontradas na espécie *Piper mikanianum*: (A)- safrol; (B)- linalol; (C)- *R,S*-limoneno; (D)- β -cariofileno; (E)- α -pineno; (F)- biciclogermacreno; (G)- *Z*-nerolidol.



Já em *Piper tuberculatum*, através da técnica de CG/EM, foram identificados de seus extratos diferentes amidas, que apresentaram propriedades inseticidas para algumas espécies de insetos (RAMOS et al., 2020).

1.3 *Piper rivinoides* KUNTH.:

A espécie *Piper rivinoides* Kunth (figura 1.6) também conhecida como “ruão” é nativa do Brasil (SOUZA et al., 2014) e no estudo de óleos essenciais dessa espécie, LEAL et al. (2019) relata a atividade fúngica das folhas atribuída à presença das classes dos monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanoídeos. Os principais componentes são *E*-isoelemicina (arilpropanoide, 40,81%) e δ -3-careno (monoterpeno, 16,88%) com e os outros componentes identificados podem ser observados na tabela 1.1. SOUZA et al (2014) estudaram os óleos essenciais das folhas frescas de *P. rivinoides* e *P. mollicomun* e avaliaram a atividade antinoceptiva. Foram identificados como principais compostos o α -pineno e o β -ocimeno, respectivamente.

Figura 1.6: Foto da espécie *Piper rivinoides* Kunth, na reserva biológica Bom Jesus, PR.



Tabela 1.1: Composição química do óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.

<i>Piper rivinoides</i>	Composição	RI Calculado	%
	δ -3-Careno	1013	16,88
	(E)- Cariofileno	1425	4,5
	Germacreno D	1487	1,56
	β -Cacrocipeno	1504	2,66
	α -Muuroleno	1507	12,45
	(Z)-Carpacina	1532	8,13
	(E)-Isoelemicina	1565	40,81
TOTAL			86,99

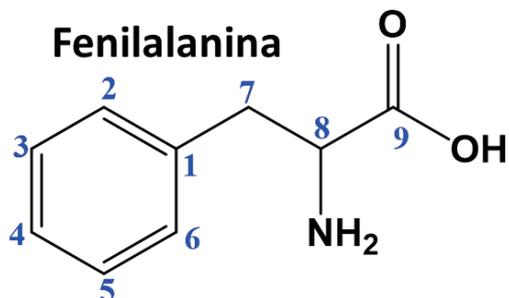
Fonte: Adaptado de LEAL et al., 2019.

Sobre metabólitos não voláteis foram encontrados estudos descrevendo neolignanas isoladas do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. rivinoides* Kunth. (MOREIRA et al., 2016). A neolignana conocarpana foi a mais ativa contra *Candida albicans*, *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*. Em estudo mais recente, SANTOS et al. (2021), isolaram neolignanas que foram testadas na inibição de enzimas monooxigenases do citocromo P450 (CYP1A), provando serem potentes inibidores dessas enzimas.

1.4 ARILPROPANOIDES, LIGNANAS E NEOLIGNANAS:

Os arilpropanoides são metabólitos secundários biossintetizados via a rota do ácido chiquímico, o qual após algumas reações leva a formação da fenilalanina (figura 1.7).

Figura 1.7: Estrutura da fenilalanina, representando a unidade C6C3.



A eliminação de amônia na cadeia lateral forma o ácido cinâmico, o qual pode ser reduzido aos correspondentes álcoois que são os precursores das lignanas (figura 1.8) e neolignanas (figura 1.9) através de acoplamento oxidativo (DEWICK, 2009).

Figura 1.8: Estrutura da lignana cubebina, representando duas unidades C6C3.

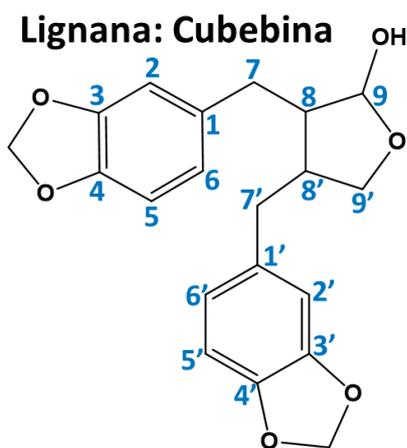
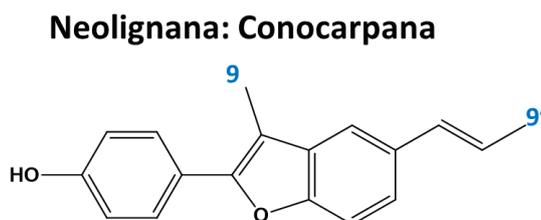


Figura 1.9: Estrutura da neolignana conocarpana, representando duas unidades C6C3



As espécies *Piper* são ricas em lignanas e neolignanas bioativas (MACEDO et al., 2017). Apesar da relevância econômica e medicinal desse gênero (FRANÇOIS et al.,

2009), ainda há espécies com carência de estudos científicos que demonstrem seu potencial biológico de uso. Diante do exposto, o objetivo dessa pesquisa foi analisar o potencial do extrato e do óleo essencial da espécie *Piper rivinoides* Kunth.

1.5 TESTES BIOLÓGICOS:

Os testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos são usados para medir sua atividade contra um determinado isolado bacteriano, sendo avaliado o crescimento do microrganismo mediante a concentração do agente, esse cálculo é chamado de concentração inibitória mínima (CIM). Outro cálculo avaliado é a concentração capaz de provocar a morte desses microrganismos, ou seja, concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM e CFM) (TSUKATANI, 2012).

Nos estudos das substâncias presentes em uma planta, o teste pode ser feito com os extratos, óleos essenciais ou compostos isolados. Quando um extrato ou óleo essencial é analisado e possui atividade antimicrobiana não significa que seus compostos isolados terão a mesma atividade, pois, pode ocorrer um sinergismo, ou seja, a combinação das substâncias presentes nessas amostras é que podem estar causando o efeito antimicrobiano. No entanto, o antagonismo também pode ocorrer, isso ocorre quando a junção das substâncias inibe a ação de um composto isolado (RODRIGUES, 2015).

As espécies de *Piper*, incluindo *Piper rivinoides* Kunth., possuem uma grande diversidade química, que pode estar ligada a propriedades fisiológicas e físico-químicas. Conhecer essas propriedades e entender o funcionamento dessas substâncias em organismos vivos é primordial para descoberta de novos fármacos.

2 OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL:

Realizar o estudo fitoquímico das raízes e folhas da espécie *Piper rivinoides* Kunth. e avaliar sua atividade antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1 Extração, fracionamento, isolamento dos metabólitos secundários não voláteis das raízes e folhas de *Piper rivinoides* Kunth.;

2.2.2 Identificação dos compostos isolados utilizando métodos espectrométricos e espectroscópicos (RMN de ^1H e ^{13}C , EM, IV e UV).

2.2.3 Extração dos óleos essenciais e identificação dos constituintes voláteis por CG/EM das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.;

2.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais através do método de micro diluição em caldo para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 COLETA:

3.1.1 Coleta e processamento do material vegetal:

Folhas e raízes de *Piper rivinoides* Kunth. foram coletadas em março de 2019 e 2022, no município de Antonina, Paraná, Brasil, coordenadas - 25° 23' 19,94" S, 48° 33' 21,7" W, sob supervisão do botânico Wanderlei do Amaral. O material vegetal foi desidratado à temperatura ambiente e depois colocado em estufa de ar circulante a 40 °C, sendo em seguida triturado em moinho de facas até obtenção de partículas uniformes.

3.2 EXTRAÇÃO:

3.2.1 Preparo dos extratos brutos por gradiente de polaridade dos solventes:

A partir do material obtido da moagem foi feita a obtenção dos extratos brutos, o material vegetal foi submetido à extração com solventes de diferentes polaridades previamente purificados. Primeiro foi realizado o extrato das raízes, 319,1 g, com hexano, sendo esse renovado a cada 24h durante até que não houvesse alteração na extração. A cada troca o extrato foi filtrado sob pressão reduzida, em seguida concentrado em evaporador rotatório. O extrato obtido foi guardado em frasco previamente pesado, rotulado e mantido no dessecador.

Após o hexano o solvente utilizado para extração foi o acetato de etila seguido por metanol. Após a obtenção dos extratos brutos das raízes o processo foi repetido para as folhas de *Piper rivinoides* Kunth., 467,8 g, com os mesmos solventes hexano, acetato de etila e o metanol.

Os extratos brutos foram armazenados em dessecador para a secagem do solvente restante e em seguida foram pesados.

3.2.2 Extração do óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.:

3.2.2.1 Hidrodestilação para a obtenção dos óleos essenciais das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.:

Para os óleos essenciais o método utilizado foi de hidrodestilação, nesse processo foi utilizado o aparelho de Clevenger, no laboratório de ecofisiologia vegetal –UFPR, campus agrárias, prof. Cicero Deschamps e técnico responsável: Roger Raupp Cipriano.

Em um balão de fundo redondo foram colocados aproximadamente 55 g de folhas de *Piper rivinoides* Kunth., trituradas grosseiramente, em 1000 mL de água destilada, e a

hidrodestilação ocorreu durante 3 h. Os óleos foram coletados do Clevenger, secos e armazenados no freezer. A extração foi em triplicata. As soluções dos óleos (0,1% em hexano) foram analisadas em cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM).

3.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS E ÓLEO ESSENCIAL:

3.3.1 Cromatograma em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos:

Soluções dos extratos das raízes e folhas de *Piper rivinoides* Kunth, de concentração de 3 mg mL⁻¹ em metanol grau espectroscópico foram preparadas e filtradas em filtro de seringa PTFE hidrofóbico 25 mm x 0,22 µm. As amostras foram analisadas em CLAE marca WATERS®, dotado de uma bomba quaternária e um injetor automático, detector PDA 2998, utilizando uma coluna de fase reversa Kinetex 5 µm, C18 (250 x 4,5 mm), em fluxo de 0,8 mL min⁻¹ com fase móvel inicial de água e acetonitrila (60:40) e final 100% acetonitrila, como mostrado na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Metodologia utilizada para o cromatograma em CLAE dos extratos de raízes e folhas de *Piper rivinoides* Kunth.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min.)	H ₂ O MilliQ(%)	ACN (%)
	0,8	60	40
1	0,8	56	44
11	0,8	48	52
46	0,8	0	100
49	0,8	0	100

3.3.2 Espectrograma em infravermelho dos extratos (FTIR):

Foram pesados aproximadamente 2,0 mg de cada extrato e adicionados a 100 mg aproximadamente de brometo de potássio (KBr) para obtenção de uma pastilha, em seguida foram analisados em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), modelo Vertex 70 da Bruker®. Os espectros de infravermelho foram obtidos em uma faixa espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ no laboratório multiusuário de espectrometria no Infravermelho (LAMIV), no departamento de química da UFPR.

3.3.3 Análise antimicrobiana dos extratos brutos e do óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth.:

Os extratos brutos das raízes, das folhas e o óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. foram enviados para divisão de microbiologia do Centro Pluridisciplinar

de Pesquisas Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) da UNICAMP para Dra. Marta Cristina Teixeira e foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana contra seis microrganismos: *Candida albicans* (CCT 776), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388).

Os microrganismos foram cultivados durante a noite a 36 °C em meios de cultura específicos (ágar nutriente para as bactérias e ágar Sabouraud Dextrose para *C. albicans*). Os inóculos para os ensaios foram preparados diluindo a massa celular raspada em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85% e ajustando a escala de McFarland no 0,5. As suspensões celulares foram então diluídas para 10^4 UFC mL⁻¹ para serem utilizadas nos bioensaios.

Testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados em triplicata, de acordo com CLSI (2012, 2008), utilizando microplacas de cultura de tecidos de 96 poços contendo 100 µL do meio de cultura específico (caldo Muller-Hinton para a bactéria e RPMI-1640 para *C. albicans*). As soluções estoques dos extratos brutos foram diluídas para obter concentrações que variaram de 1,0 a 0,015 mg mL⁻¹. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico cloranfenicol para as bactérias com solução de 0,5 mg mL⁻¹ e para levedura foi utilizado o antibiótico nistatina com concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Os inóculos bacterianos e fúngicos foram adicionados aos poços e as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibia o crescimento microbiano visível, o que foi confirmado pela adição de 20 µL de solução de 0,5% de cloreto de trifetil tetrazólio 32 (TTC) para bactérias e pela alteração na cor do meio RPMI-1640, de rosa para amarelo, para *C. albicans*.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada por meio de plaqueamento de 10 µL do material contido no poço correspondente ao de CIM e de todos os poços subsequentes de maior concentração, no meio de cultura específico para cada micro-organismo. Posteriormente, as placas foram incubadas a 36 °C por 24 a 48 h para as bactérias. A CBM foi definida como as concentrações mínimas capazes de inibir o crescimento bacteriano em meios de cultura sólidos específicos (CLSI, 2005). A CBM foi definida como a menor concentração capaz de causar a morte de 99,9% do microrganismo.

3.3.4 Análise antifúngica do óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth:

3.3.4.1 Isolados fúngicos:

Os isolados de *Aspergillus niger* e *Aspergillus nomius* foram obtidos a partir da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense Taxonline da Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doença – UFPR Coordenador: Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte, análises: Doutorando Rubens Candido Zimmermann, Dr. Edson José Mazarotto e Dra. Carolina Gracia Poitevin, sendo multiplicados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA). As espécies *Fusarium culmorum* e *F. graminearum* foram isoladas de grãos de trigo (TRALAMAZZA et al., 2016), sendo multiplicados em meio de cultura Ágar Nutriente Sintético (SNA). Todos os isolados foram incubados em *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ e 12 h de fotofase, por 7 dias (ZIMMERMANN et al., 2022)

3.3.4.2 Avaliação do efeito fungicida

Foi conduzido um experimento para avaliar o potencial efeito fungicida do óleo essencial de *Piper rivinoides* contra os isolados de *A. niger*, *A. nomius*, *F. culmorum* e *F. graminearum* pelo método por contato. Os tratamentos foram o óleo essencial na concentração final de 1,5% e o meio de cultura RPMI1640 como controle negativo. A análise foi realizada no laboratório de epidemiologia para manejo integrado de doença da UFPR, coordenada pelo prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte e analisado pelo doutorando Rubens Candido Zimmermann, Dr, Edson José Mazarotto e a Dra. Carolina Garcia Poitevin.

Foi adotada a metodologia proposta por Zimmermann et al. (2022), com modificações. Os isolados de cada espécie foram diluídos em meio de cultura RPMI1640 até a concentração final padronizada em 4×10^4 conídios mL^{-1} . O óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth foi diluído no meio de cultura RPMI1640 até a concentração de 3%. Todos os tratamentos foram diluídos em microtubos com capacidade para 2 mL. Posteriormente, foram pipetados 100 μL de cada tratamento em placas de microtitulação de 96 poços com fundo chato, obtendo as concentrações finais em 2×10^4 conídios mL^{-1} para os isolados fúngicos e 1,5% para o óleo essencial. Em seguida, as placas foram mantidas em BOD $28 \pm 1^\circ \text{C}$ e 12 h de fotofase, por 48 h.

A avaliação do crescimento fúngico foi determinada pelo método de absorbância a 600 nm utilizando o espectrofotômetro de microplacas EPOCH® (Biotek Instrument Inc,

Winooski, EUA). Em seguida, os dados de inibição foram calculados em relação ao controle negativo através da fórmula proposta por VILELA et al. (2009):

$$\text{Inibição(\%)} = \frac{(C-T)}{C} \cdot 100$$

Em que:

C = Absorbância do controle negativo

T = Absorbância do controle positivo e dos OEs

3.4 PURIFICAÇÃO:

3.4.1 Fracionamento dos extratos brutos de *Piper rivinoides* Kunth.:

3.4.1.1 Fracionamento do extrato das raízes em hexano por CLAE:

O extrato das raízes em hexano foi fracionado através da CLAE marca WATERS®, dotado de uma bomba quaternária e um injetor automático, detector PDA 2998, utilizando uma coluna semi-preparativa de fase reversa Kinetex®, C18 (150 x 10 mm), em fluxo de 3,6 mL min⁻¹ com fase móvel inicial de água e acetonitrila (60:40) e final 100% acetonitrila.

Para realização das análises foram coletadas quatro frações de interesse (PRHR-SPF3.1; PRHR-SPF3.2; PRHR-SPF4; PRHR-SPF6).

3.4.1.2 Fracionamento por Cromatografia de coluna (CC) a vácuo:

Para a cromatografia em coluna (CC) foi utilizado um funil de placa porosa de 150 mL com porosidade 4, conectado à uma bomba de vácuo, contendo fase estacionária de sílica gel 60, de partículas de tamanho entre 0,063 a 0,200 mm da Merck®. A coluna a vácuo foi realizada com os extratos das folhas em acetato de etila e das raízes em metanol.

a. Extrato das folhas em acetato de etila:

O extrato das folhas em acetato de etila foi submetido à filtração à vácuo para a remoção da clorofila, foram utilizados 7,6 g do extrato e solubilizado em 100 mL de metanol destilado, em seguida foi acrescentado aos poucos água destilada (aproximadamente 15 mL) até que houvesse a floculação da clorofila. Essa suspensão foi filtrada em funil de placa porosa preenchido com sílica gel 60 para coluna cromatográfica 0,2-0,5 mm, algodão e papel filtro e eluída com metanol:H₂O (20%).

A amostra sem clorofila foi submetida à extração por partição, sendo colocado em um funil de separação, adicionado mais 100 mL de metanol e extraído com hexano (2 x

100 mL), após agitação as fases foram separadas. Obteve-se 20,3 mg da fração de hexano (FH) e 330,2 mg da fração hidroalcoólica (FM).

As frações FH e FM do extrato em acetato de etila foram submetidas a uma cromatografia em coluna líquida a vácuo e eluídas com gradiente de diclorometano e acetato de etila. Foram coletadas 17 sub frações de 50 mL cada.

b. Extrato das raízes em metanol:

Foi fracionado 5 g do extrato das raízes em metanol através de coluna cromatográfica à vácuo, sendo eluída em um gradiente de diclorometano, acetado de etila e metanol, sendo coletadas 26 sub-frações de 100 mL cada.

3.4.2 Fracionamento do óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.:

Para o fracionamento do óleo essencial (20 mg) foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), em placas de vidro de tamanho 20 cm x 20 cm, com espessura de 1 mm de gel de sílica. A fase móvel utilizada foi hexano e diclorometano (1:1). A recuperação das amostras foi efetuada utilizando os mesmos solventes.

3.5 IDENTIFICAÇÃO:

3.5.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN):

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 0,2% de tetrametilsilano (TMS) e uma folha de prata. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ) e relacionadas em relação ao TMS (0,00 ppm). As constantes de acoplamentos (J) foram registradas em Hertz (Hz).

3.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM):

As análises dos óleos e os espectros de massas foram obtidos em um sistema de Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), marca

SHIMADZU® modelo GCMS-TQ8040, utilizando as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Como gás de arraste foi empregado hélio com vazão de 1,02 mL min⁻¹, em modo split 1:90, estando o injetor à 250°C e o sistema de ionização 70 eV. Foi injetado 1 µL de solução 1% de óleo essencial em hexano na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60 °C (0') até 250 °C, com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹.

3.5.3 Difratomia de raios x (DRX) de monocristal:

Os cristais obtidos de uma das frações do extrato das raízes em hexano (PRHR-SPF5) foram obtidos por difusão lenta em acetonitrila. Os dados do cristal foram processados no programa APEX3 (1) e a estrutura foi determinada pela rotina de fase intrínseca no programa SHELXT (2A), e refinada pelo método de mínimos quadrados de matriz completa, sobre F2, no SHELXL (2B). Todos os átomos, exceto os de hidrogênio, foram refinados em parâmetros anisotrópicos térmicos. Em relação ao tratamento dos átomos de hidrogênio, foram localizados em mapas de diferenças e foram refinados isotropicamente e livremente, todos foram incluídos em posições calculadas U(iso) ajustado em 1.2*U(eq), para os hidrogênios dos grupos metila, e U(iso) ajustado em 1.5*U(eq) para os demais. No final do refinamento R1= 0,144 e wR2 = 0,095 (2B) para todas as 75644 reflexões ponderadas e somente R1 = 0.048 para os dados observados.

Os dados cristalográficos completos estão no apêndice 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Piper rivinoides* KUNTH.:

A quantidade de *Piper rivinoides* Kunth. seca obtida para extração foi de 319,1 g das raízes e de 467,78 g das folhas. A secagem ocorre a 40 °C, a ação do calor promove a desnaturação proteica impedindo a ação enzimática da planta, evitando assim a alteração dos compostos químicos (BORGES, 2020). O material seco também facilita a moagem, que tem como objetivo uma melhor extração desses compostos. Uma vez que os tecidos das raízes são compactos e rígidos, a moagem permite que as partículas tenham maior superfície de contato com o solvente.

Para obtenção dos extratos brutos, o material vegetal foi submetido à sucessivas extrações, com solventes de diferentes polaridades. Esse processo permite a coleta do maior número de substâncias possíveis para um estudo fitoquímico mais completo da planta. A troca de solventes ocorreu aumentando a polaridade, assim nos primeiros extratos obtidos com hexano espera-se a presença dos compostos apolares, já no extrato de acetato de etila compostos de polaridade intermediária, enquanto no extrato de metanol compostos mais polares (SIMÕES et al., 2000).

Tabela 4.1: Massas dos extratos brutos de *Piper rivinoides* Kunth. raízes e folhas.

<i>Piper rivinoides</i> Kunth.	Solvente	Massa (g)	Rendimento
Raízes	Hexano	3,458	1,08 %
	Acetato de etila	2,860	0,90 %
	Metanol	13,443	4,21 %
Folhas	Hexano	8,320	1,78 %
	Acetato de etila	18,523	3,96 %
	Metanol	6,856	4,46 %

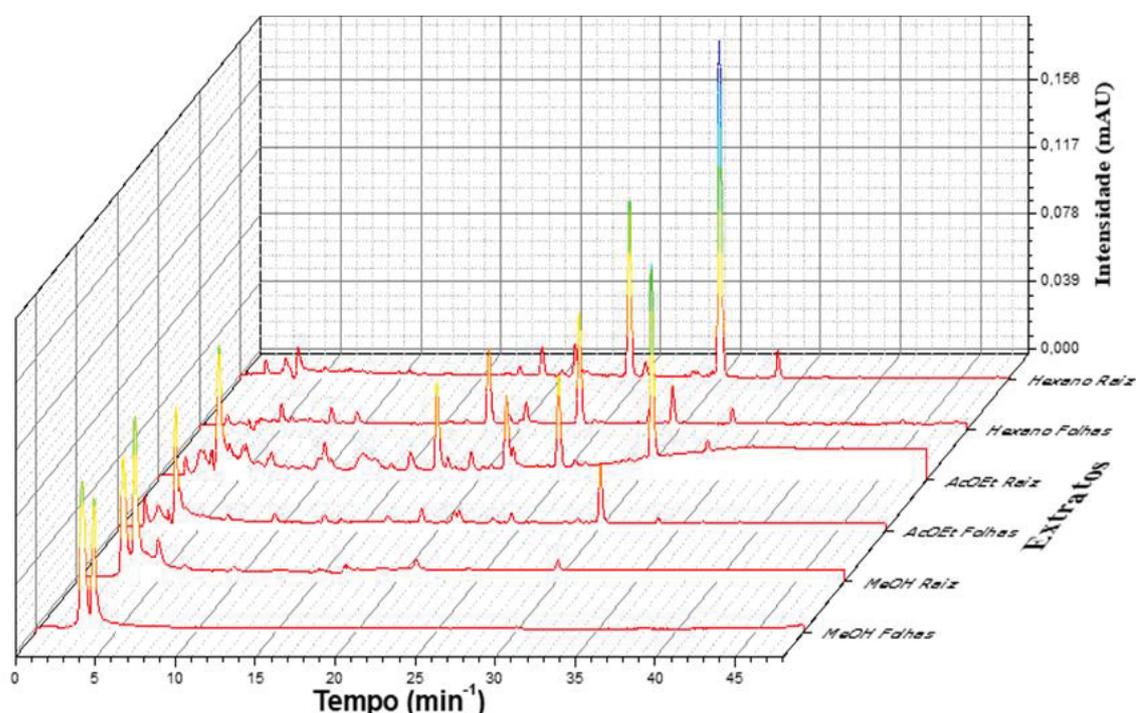
4.1.1 Cromatograma em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

A metodologia para obter o cromatograma dos extratos, foi baseada em estudos de outras espécies desse gênero realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química (LAPNEQ). Dessa forma foi possível observar a diversidade química dos extratos de *Piper rivinoides* Kunth. (figura 4.1).

Todos os extratos foram submetidos à mesma condição e análise, tabela 3.1, assim é possível fazer uma comparação entre o tempo de retenção e os compostos presentes em cada extrato. Como se trata de uma cromatografia de fase reversa, coluna apolar (C18) e fase móvel polar (H₂O:ACN), os compostos apolares possuem uma maior retenção que os

compostos polares, pois interagem mais com a coluna, isso é observado na figura 4.1, na qual os extratos de hexano e acetato de etila apresentam maior número de picos com maior tempo de retenção desses compostos, enquanto nos extratos de metanol os compostos polares, com menor retenção, estão em maior quantidade.

Figura 4.1: Cromatograma dos extratos brutos das raízes e folhas de *Piper rivinoides* Kunth.



Na figura 4.1 também é possível observar uma maior quantidade dos compostos nos extratos das raízes do que nos das folhas, isso é mostrado pelo número e intensidades dos sinais. Como por exemplo, os cromatogramas dos extratos em hexano, que são muito parecidos, ou seja, apresentam praticamente as mesmas substâncias, porém o extrato das raízes em hexano possui picos de maiores intensidades, figura 4.2.

Os cromatogramas dos extratos em acetato de etila mostram uma maior quantidade de sinais, comprovando o que já era esperado para esse extrato, ou seja, uma maior quantidade de substâncias, figura 4.3, já que o solvente acetato de etila possui uma polaridade intermediária entre os solventes hexano e metanol. Enquanto os extratos de metanol quase não apresentam substâncias apolares e as substâncias polares estão concentradas no início do cromatograma, figura 4.4.

Figura 4.2: Cromatograma dos extratos das raízes e folhas de *Piper rivinoides* Kunth em hexano.

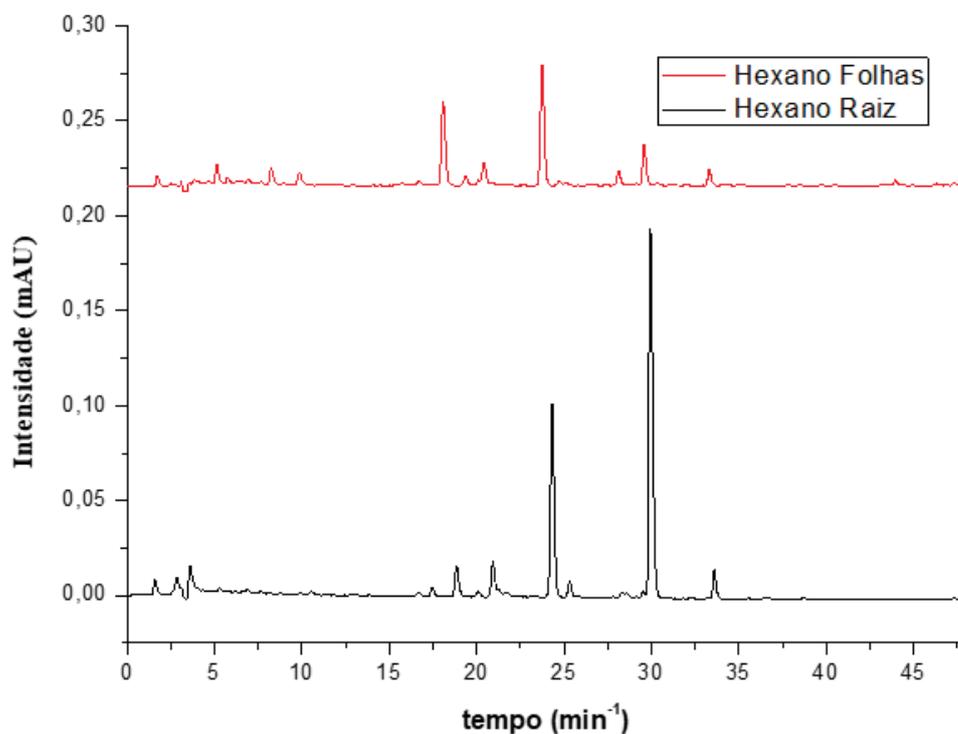


Figura 4.3: Cromatograma dos extratos das raízes e folhas de *Piper rivinoides* Kunth em acetato de etila.

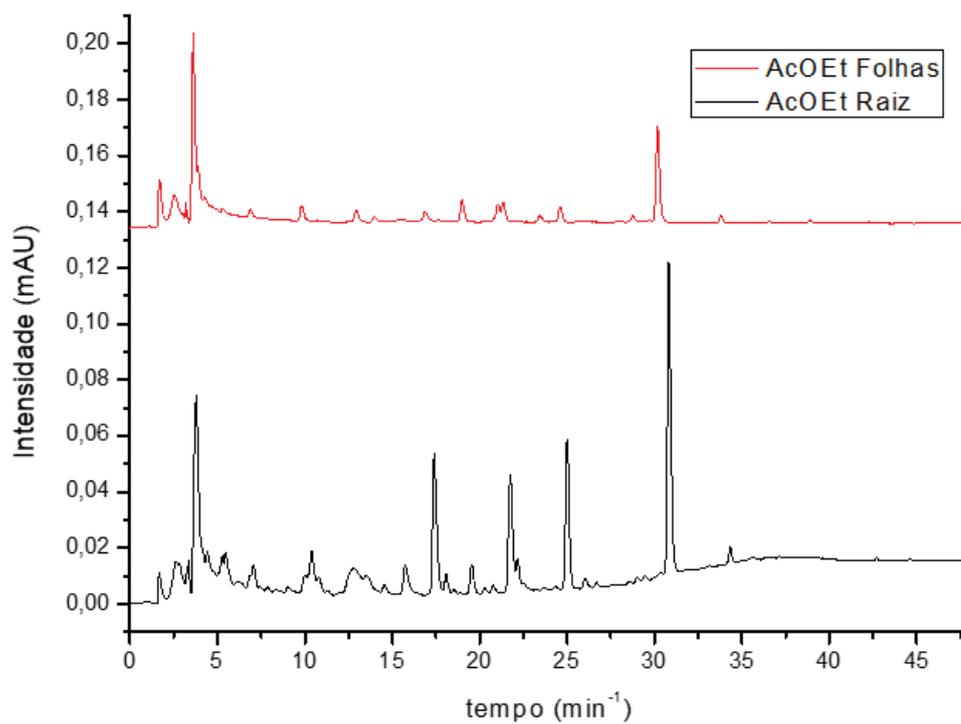
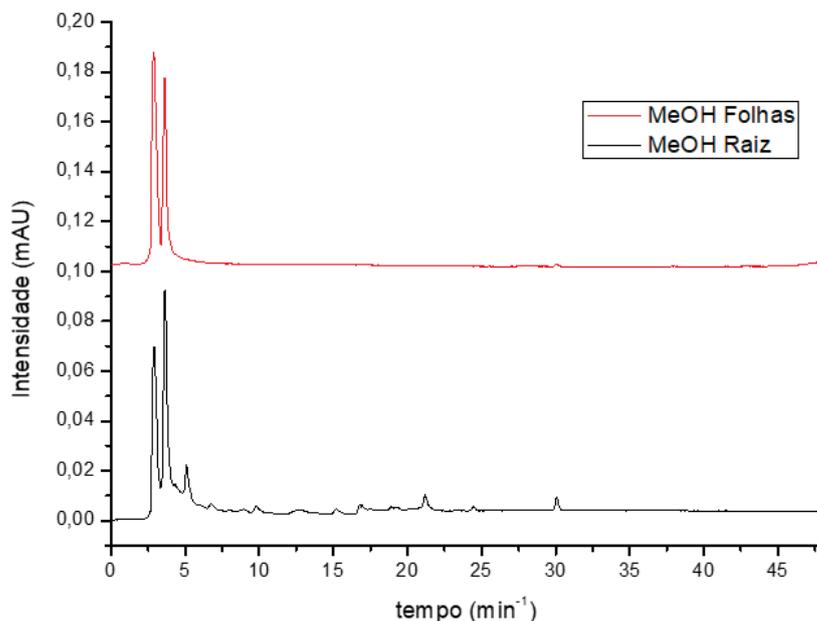


Figura 4.4: Cromatograma dos extratos das raízes e folhas de *Piper rivinoides* Kunth em metanol.

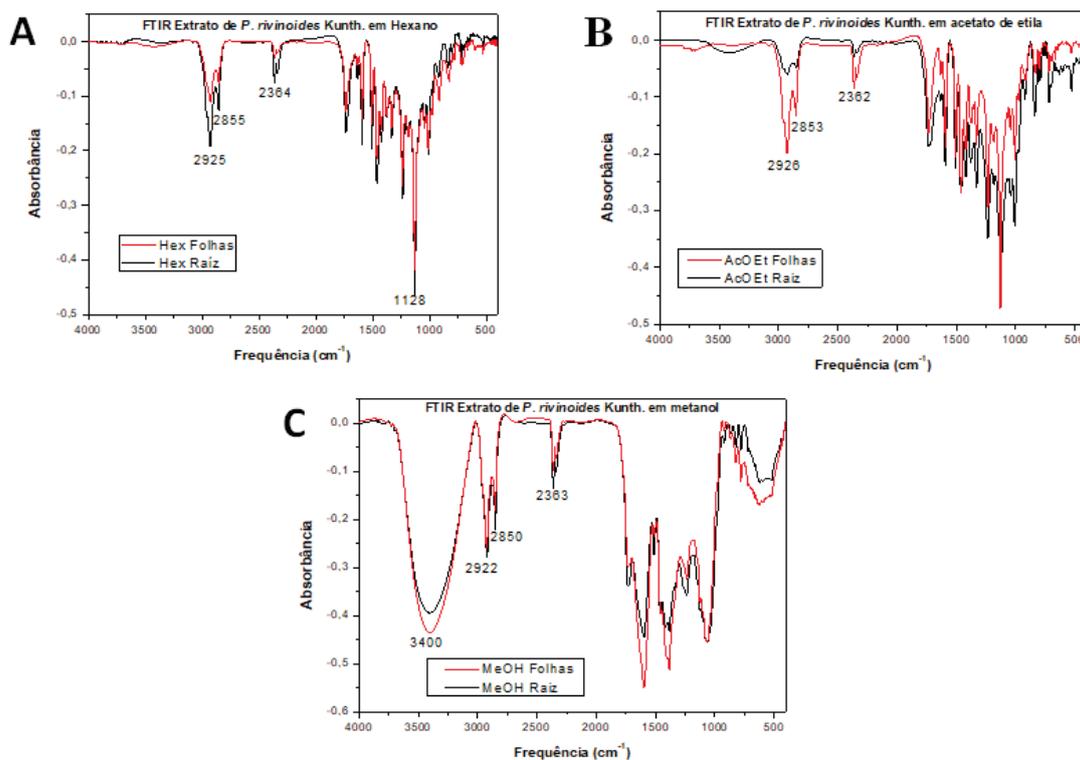


Para uma melhor resolução das bandas presentes nos primeiros minutos dos cromatogramas será necessário procurar uma mistura ideal de solventes, para ser usado em eluição gradiente adequada, isolando assim os componentes para futura identificação ou verificar uma possível troca de coluna.

4.1.2 Espectrograma em FTIR dos extratos brutos:

Os extratos brutos das diferentes partes da planta também foram avaliados no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), figura 4.5 ABC. Na região de vibrações de estiramento, que vai de 1600 a 4000 cm^{-1} , há picos característicos em todas as amostras como: próximo à 2360 cm^{-1} que corresponde a vibração de estiramento $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ indicando presença de CO_2 ; os picos em 2850 e 2920 cm^{-1} aproximadamente correspondem às vibrações de estiramento em C-H de grupos CH_3 ou CH_2 , com hidrogênio ligado a carbono sp^3 ; no entanto em 3400 cm^{-1} só é observado nos extratos em metanol devido à presença do grupo hidroxila, a largura da banda se deve à grande interação entre as ligações de hidrogênio (figura 4.5 C). (SINGH, et. al., 2019)

Figura 4.5: Espectros no infravermelho dos extratos brutos de *Piper rivinoides* Kunth. em placas de KBr: A- FTIR extrato em hexano das raízes e folhas; B- FTIR extrato em acetato de etila das raízes e folhas; C- FTIR extrato em metanol das raízes e folhas.



Quando comparamos os espectros brutos das raízes com seus respectivos extratos brutos das folhas não se percebe a presença de novos picos aparentes, apenas com uma pequena diferença nas intensidades, demonstrando assim que não há muita variedade nos grupamentos químicos verificado nas substâncias presentes nas raízes e nas folhas da planta de *Piper rivinoides* Kunth.

4.1.3 Atividades antimicrobianas dos extratos brutos:

As atividades antimicrobianas dos extratos brutos de *Piper rivinoides* Kunth. foram analisadas pela concentração inibitória mínima (CIM) que é a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo. Os extratos que apresentaram atividade tiveram CIM menor que 2,0 mg mL⁻¹. Foi avaliado também a concentração bactericida mínima (CBM), que é a menor concentração capaz de causar a morte de pelo menos 99,9% do micro-organismo.

Os extratos brutos foram avaliados em seis microrganismos diferentes, os resultados estão expostos na tabela 4.2. Os extratos brutos das raízes e das folhas em metanol não apresentaram atividade contra nenhum dos microrganismos. O fungo *Candida*

albicans e as bactérias *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* não sofreram ação bactericida e fungicida, por esse motivo não estão apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Atividade antimicrobiana dos extratos brutos das raízes (R) e folhas (F) da planta de *Piper rivinoides* Kunth. Concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) valores em mg mL⁻¹:

Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermides</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Hexano R	0,25	0,25	2,0	----	1,0	----
AcOEt R	0,062	2,0	2,0	----	2,0	----
Hexano F	0,25	0,25	1,0	----	0,5	----
AcOEt F	0,50	0,50	2,0	----	2,0	----

A bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* foi a mais sensível frente a ação dos extratos. Ambos os extratos em hexano apresentaram inibição para essa bactéria com mesmo valor de CIM e CBM (0,25 mg mL⁻¹). O melhor resultado de CIM (0,062 mg mL⁻¹) foi com o extrato das raízes em acetato de etila cujo a CBM foi 2,0 mg mL⁻¹. O extrato da folha em acetato de etila também apresentou atividade para essa bactéria CIM e CBM ambos com mesmo valor (0,5 mg mL⁻¹).

Para as bactérias gram-positiva *S. epidermides* e gram-negativa *E. coli* os extratos não apresentaram atividade de controle. O extrato das folhas em hexano apresentou CIM moderada (1,0 mg mL⁻¹) e alta (0,5 mg mL⁻¹) para essas bactérias respectivamente. O extrato das raízes em hexano teve CIM baixa (2,0 mg mL⁻¹) para *S. epidermides* e moderado (1,0 mg mL⁻¹) para *E. coli*. Os extratos de acetato de etila tiveram CIM baixa (2,0 mg mL⁻¹) para ambas as bactérias.

Em geral, os extratos demonstraram maior atividade contra *S. aureus* com destaque para o extrato das raízes em acetato de etila. Porém o extrato das folhas em hexano apresentou melhor resultado para as bactérias *S. epidermides* e *E. coli*.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO:

A análise do extrato das raízes em hexano por CLAE, gerou um cromatograma livre de ruídos, com picos majoritários, identificados por 1, 2, 3 e 4 (figura 4.6). Analisando os tempos de retenção, foi verificado que estavam próximos dos valores de outros arilpropanoides já identificados em nosso grupo com mesma metodologia (tabela 3.1). Por esse motivo foi feito CLAE do extrato em hexano comparando os tempos de retenção com amostras de arilpropanoides, um padrão de safrol e uma fração rica em miristicina e

asaricina, figura 4.7. Os outros picos foram coletados, porém não foi possível identificação.

Figura 4.6: Cromatograma em CLAE do extrato de *Piper rivinoides* Kunth. das raízes em hexano.

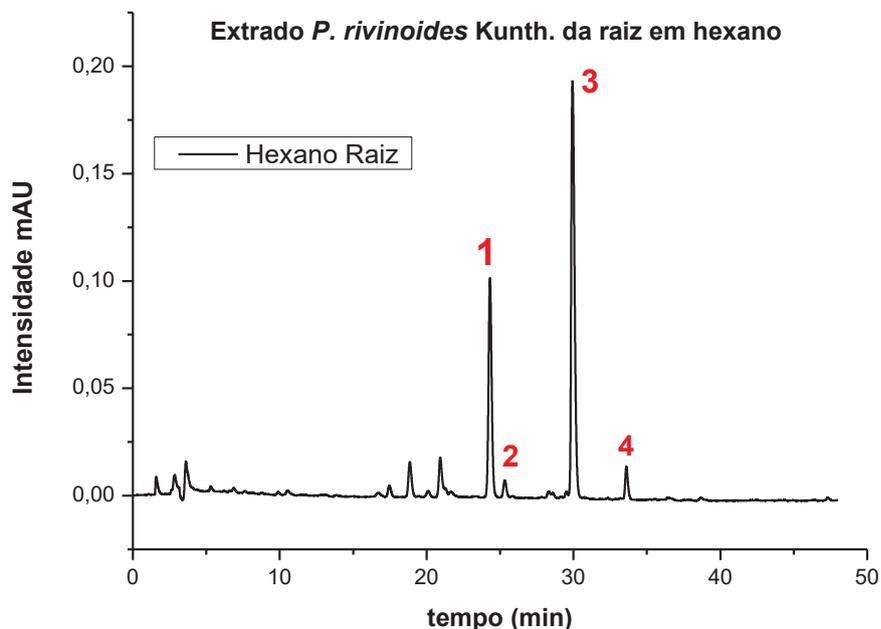
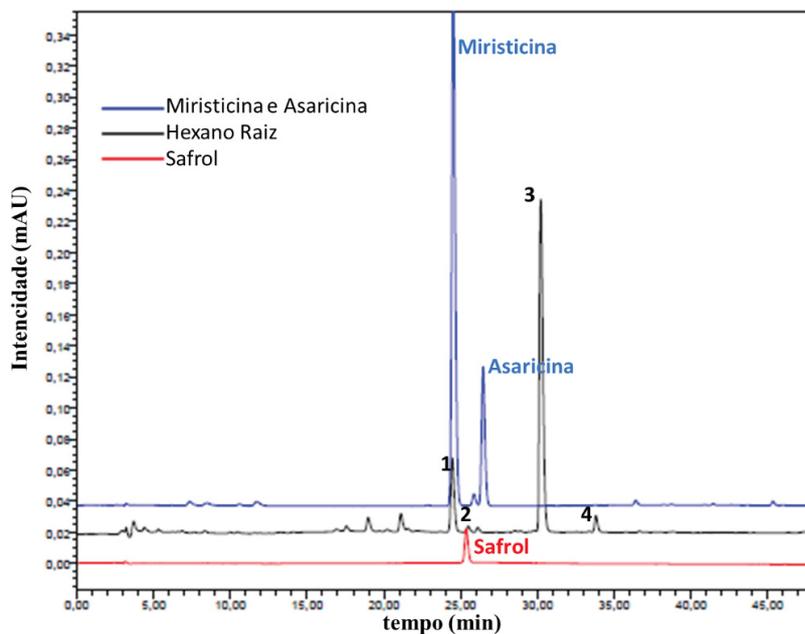


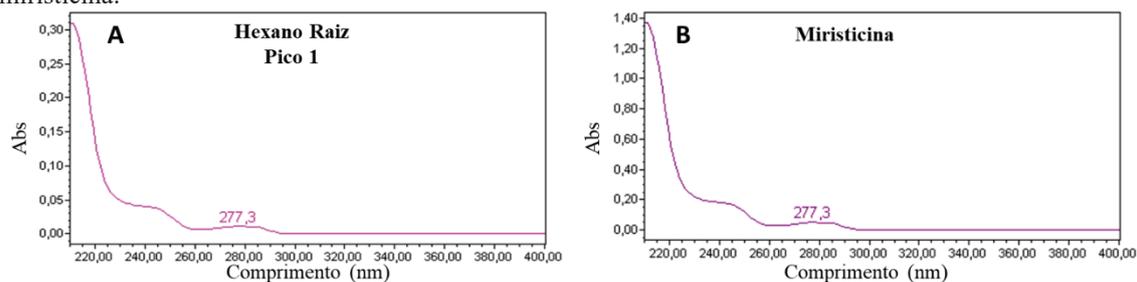
Figura 4.7: Comparação dos tempos de retenção dos cromatogramas em CLAE do extrato de *Piper rivinoides* Kunth. das raízes em hexano, amostra rica em miristicina e asaricina e padrão de safrol:



Comparando os tempos de retenção, em 24,31 min temos o pico 1 e o mesmo é observado para o padrão de miristicina, assim como o pico 2 e o padrão de safrol que

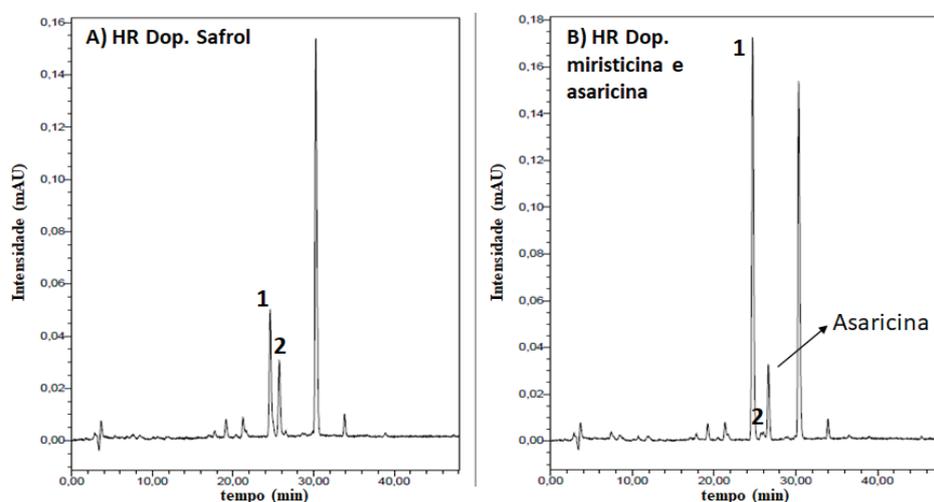
tiveram o tempo de retenção em 25,31 min. O equipamento utilizado determinou durante a mesma análise o espectro UV-Vis em 254 nm da miristicina e do pico 1 que tiveram o mesmo tempo de retenção. Os valores de comprimento de onda máximos (λ_{max}) obtidos para esses dois compostos foram 277,3 nm. A comparação entre os espectros UV-Vis de pico 1 das raízes em hexano e miristicina estão na figura 4.8 A e B respectivamente.

Figura 4.8: Espectro UV-Vis em 250 nm: A- extrato das raízes em hexano referente ao pico 1; B- amostra de miristicina.



Outra técnica utilizada na intenção de identificação do pico 1 e 2, foi a de dopagem do extrato com o mesmo padrão de safrol e a amostra de miristicina e asaricina. Verificando a intensidade dos picos quando há a dopagem com o safrol o pico 2 que no início tem intensidade 0,007 mAU, aumenta para 0,03 mAU (figura 4.9 A), já a dopagem com a miristicina e asaricina foi verificado que o pico 1 aumentou a intensidade de 0,05 mAU para 0,17 mAU (figura 4.9 B) e o aparecimento do pico referente a asaricina, que não havia no extrato sem a dopagem. Com a presença confirmada de safrol e miristicina o próximo passo foi isolar, não só essas duas substâncias como também o pico majoritário denominado 3.

Figura 4.9: CLAE da amostra das raízes em hexano dopada: A) dopagem de padrão safrol; B) dopagem com amostra de miristicina e asaricina.



4.2.1 Fracionamento do extrato das raízes de *Piper rivinoides* Kunth em hexano:

A metodologia utilizada para o fracionamento do extrato das raízes de *Piper rivinoides* Kunth. foi a CLAE em coluna semi-preparativa. O objetivo foi identificar os quatro picos majoritários mostrados na figura 4.6. O cromatograma da semi-preparativa, por possuir um fluxo maior que a analítica, de 0,8 mL min⁻¹ para 3,6 mL min⁻¹, diminuiu o tempo de corrida para 20 min e cada um dos picos foi coletado no devido tempo de retenção, a coleta do pico 1 foi feita em 11,0 min, a amostra foi definida como PRHR-SPF3.1, por estarem muito próximos o pico 2 foi coletado no fim do pico 1 em 11,5 min (PRHR-SPF3.2), ambas as amostras foram concentradas para evaporação da acetonitrila ficando somente a amostra em água, a extração foi feita por partição em hexano obtendo 3,1 mg e 0,5 mg respectivamente. O pico 3 (PRHR-SPF4) foi coletado 12,6 min, concentrada para a evaporação da acetonitrila obtendo água turva, em seguida levado para liofilização até a sublimação da água cujo foi obtido um sólido branco em 30,2 mg. A substância referente ao pico 4 (PRHR-SPF6) foi obtida da mesma forma que o 3, concentrada e em seguida liofilizada, obtendo uma amostra de 1,6 mg. (dados na tabela 4.3).

Tabela 4.3: Fracionamento e isolamento por CLAE em coluna semi-preparativa do extrato das raízes de *Piper rivinoides* Kunth. em hexano.

Pico	Amostra	Tempo retenção	Massa (mg)
1	PRHR-SPF3.1	11,0 min.	3,1
2	PRHR-SPF3.2	11,5 min.	0,5
3	PRHR-SPF4	12,6 min.	30,2
4	PRHR-SPF6	14,4 min.	1,6

4.2.1.1 Identificação da amostra PRHR-SPF3.1 e PRHR-SPF3.2:

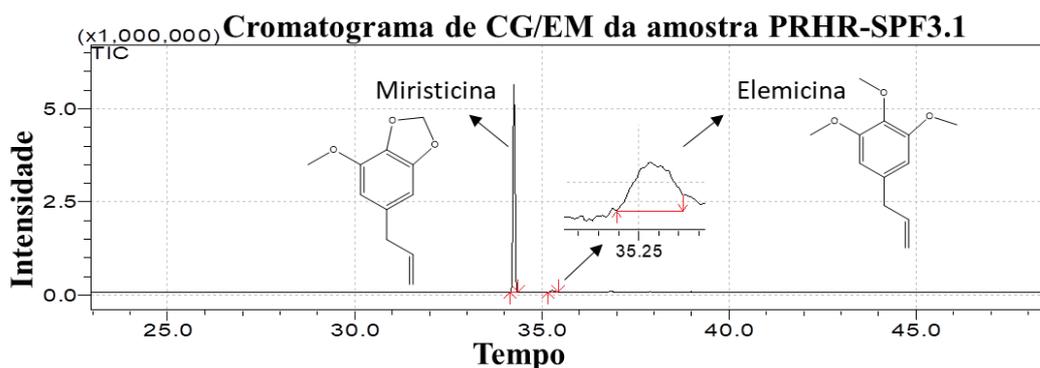
As amostras PRHR-SPF3.1 (pico 1) e PRHR-SPF3.2 (pico 2) foram analisadas em CG/EM, e a partir do tempo de retenção foi calculado o índice aritmético experimental e comparado os espectros de massas com o da literatura (ADAMS, 2017) (tabela 4.4). Para o pico 1 (PRHR-SPF3.1), se observou a miristicina como já era esperado, porém além dessa substância observou outro pico em menor intensidade referente a fragmentação da elemicina, (figura 4.10). Já para o pico 2 (PRHR-SPF3.2), que esperava ser o safrol, não foi possível identificar pois observou apenas ruído no cromatograma.

Tabela 4.4: dados obtidos por CG/EM da amostra PRHR-SPF3.1.

IA	IA teórico*	Composto	%
1521	1517	Miristicina	99,27
1547	1555	Elemicina	0,73

*Índice aritmético teórico ADAMS, 2017.

Figura 4.10: Cromatograma de CG/EM da amostra PRHR-SPF3.1.



4.2.1.2 Identificação da amostra PRHR-SPF4:

A fração PRHR-SPF4 (pico 3) (figura 4.6), é majoritária no extrato das raízes em hexano de *Piper rivinoides* Kunth.e sua estrutura elucidada através das análises de RMN(FERREIRA,2013) e DRX de monocristal.

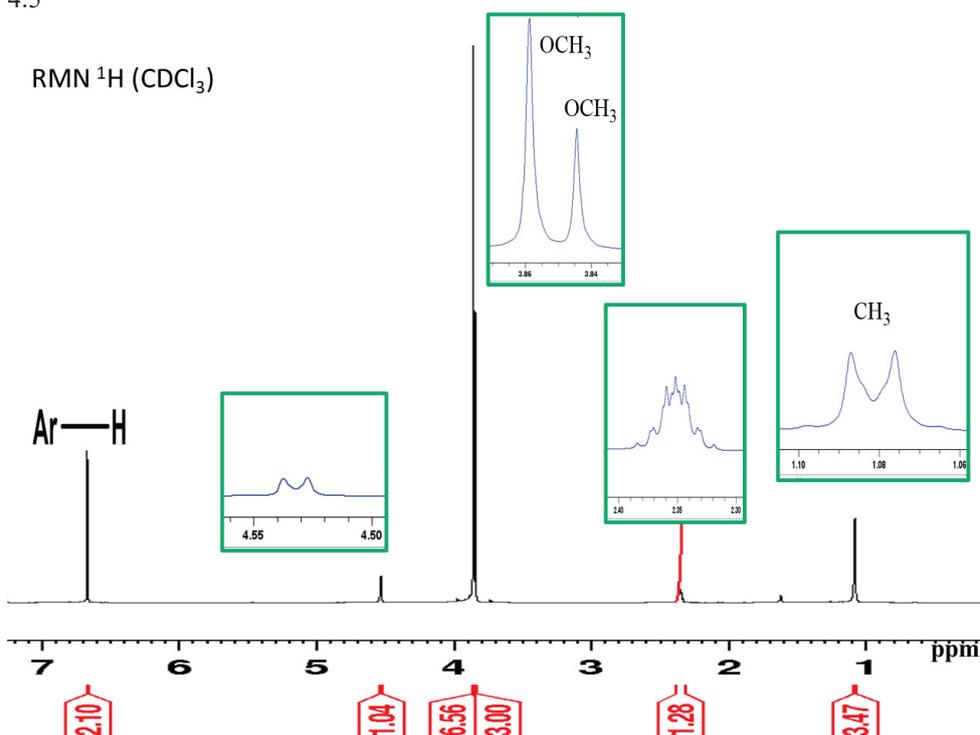
No espectro de RMN de ^1H (figura 4.11) foram observados dois simpletos com integração 6:3 em δ 3,86 e δ 3,85 ppm respectivamente, correspondendo a 3 metoxilas sendo duas delas equivalentes, outro simpleto com integração para 2 hidrogênios em δ 6,67 ppm ligados a anel benzênico tetrasubstituído que, por possuírem mesmo deslocamento, esses dois hidrogênios são equivalentes. Além desses sinais característicos há também em δ 1,08 ppm um sinal referente a metila, um duplete em δ 4,53 ppm e um multiplete simétrico em δ 2,35 ppm.

Tabela 4.5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3) para amostra PRHR-SPF4.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J)	$\delta^{13}\text{C}^*$	$\delta^1\text{H}^*$
1	137,83		137,9	
2 e 6	103,41	6,67 s (2H)	102,8	6,60 (s)
3 e 5	153,20		153,1	
4	137,42		137,9	
$\text{CH}_3\text{-O}$ (p)	60,82	3,85 s (3H)	60,7	3,82 (s)
$\text{CH}_3\text{-O}$ (m)	56,07	3,86 s (6H)	56,0	3,87 (s)
7	87,38	4,53 d (6,4; 1H)	88,4	4,63 (d, J=9,1)
8	44,26	2,35 m (1H)	50,9	1,80 (m)
9	13,08	1,08 d (6,59, 3H)	13,9	1,07 (d, J=5,7)

* Dados da literatura (FERREIRA, 2013)

Figura 4.11: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) para fração PRHR-SPF4. Os deslocamentos estão na tabela 4.5



Foram adquiridos os espectros gHSQC (figura 4.13), COSY (figura 4.14) e gHMBC (figura 4.15), esses espectros que correspondem as correlações entre carbonos e hidrogênios a curta e longa distância ajudaram a elucidar parte da estrutura. Deslocamentos de ^{13}C (figura 4.12) em $\delta 153,20$ ppm e $\delta 137,42$ ppm são referentes a átomos de carbono do anel benzênico ligados diretamente as três metoxilas, que apresentaram deslocamentos em $\delta 60,82$ ppm (posição *para*) e $\delta 56,07$ (posição *meta*) acoplado aos hidrogênios em $\delta 3,85$ ppm e $\delta 3,86$ pmm respectivamente. Os hidrogênios em $\delta 6,67$ ppm estão diretamente ligados aos dois átomos de carbono em $\delta 103,41$ ppm que por serem equivalentes possuem o mesmo deslocamento. Outro átomo de carbono quaternário tem deslocamento em $\delta 137,83$ ppm que pelo acoplamento a longa distância está ligado a cadeia propílica, a qual foi possível elucidar pelo COSY (figura 4.14). Outro deslocamento importante foi o do átomo de carbono em $\delta 87,38$ ppm que corresponde a C-H ligado a oxigênio. Na figura 4.16 está a estrutura elucidada a partir dos espectros de RMN.

Figura 4.14: Mapa de correlações de ^1H - ^1H a três ligações (COSY) em CDCl_3 da fração PRHR-SPF4.

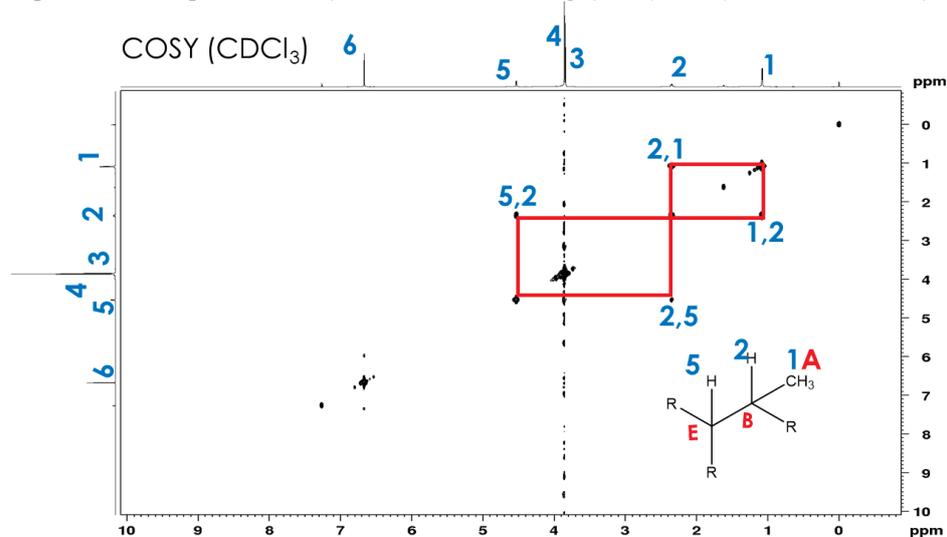


Figura 4.15: Mapa de correlações de ^1H - ^{13}C a longa distância (gHMBC) em CDCl_3 da fração PRHR-SPF4.

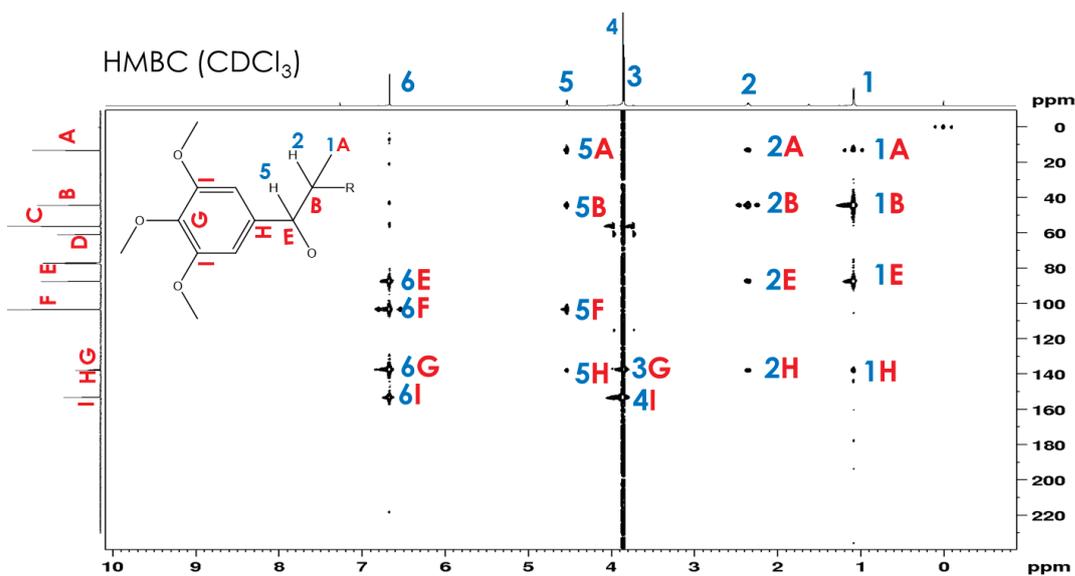
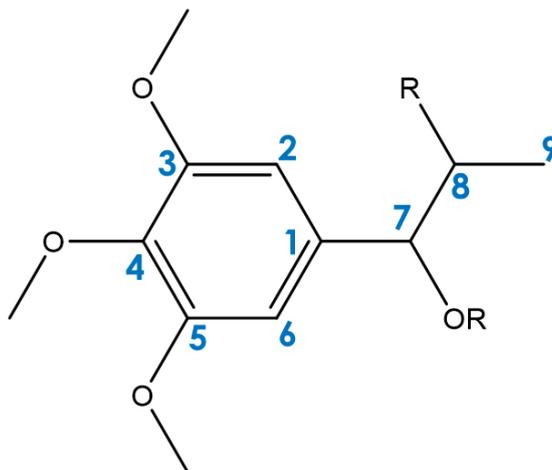
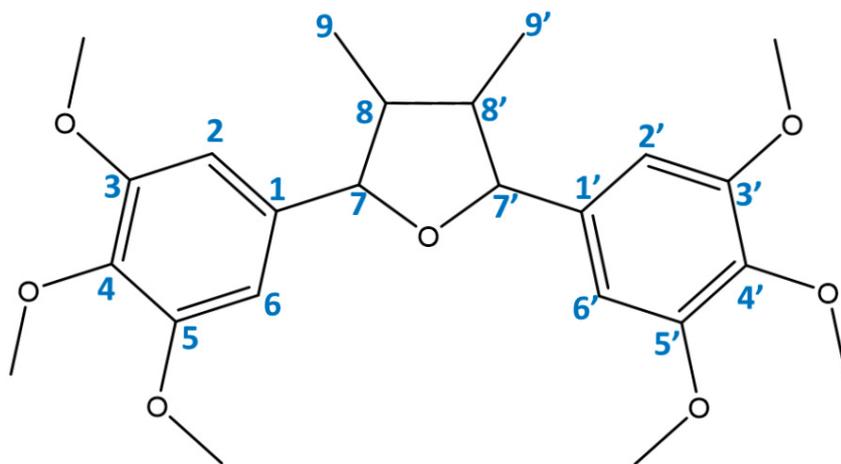


Figura 4.16: Estrutura parcialmente determinada por RMN da fração PRHR-SPF4.



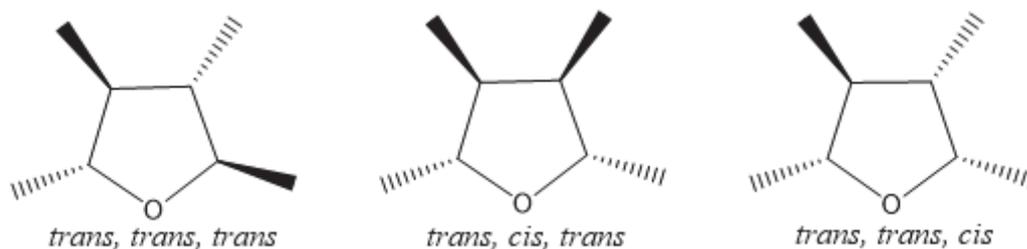
O multiplete simétrico em $\delta 2,35$ ppm presentes no RMN ^1H , indica a possibilidade de um dímero, levando a pensar que a estrutura se trata de uma lignana. A análise de DRX de monocristal comprovou que se tratava de um dímero (figura 4.17), confirmando a estrutura da lignana tetra-hidrofurânica.

Figura 4.17: Estrutura da substância PRHR-SPF4.



Das três possíveis configurações entre os substituintes do anel tetra-hidrofurânico da lignana (figura 4.18), “*trans, cis, trans*”; “*trans, trans, trans*”; e “*trans, trans, cis*”, essa última os sinais dos hidrogênios no carbono 7/7', 8/8' e 9/9' diferem entre si, pois os grupos arílicos em *cis* possuem rotação restrita acarretando a proteção anisotrópica de H-9' e a desproteção de H-7'. As estereoquímicas *trans, cis, trans* e *trans, trans, trans* não apresentam distinção dos hidrogênios oxibenzílicos (7/7'), metinílicos (8/8') e metílicos (9/9') apresentando elementos de simetria nas moléculas (MORAIS, 2008; FERREIRA, 2013).

Figura 4.18: Estereoquímica relativa das lignanas tetra-hidrofurânicas.

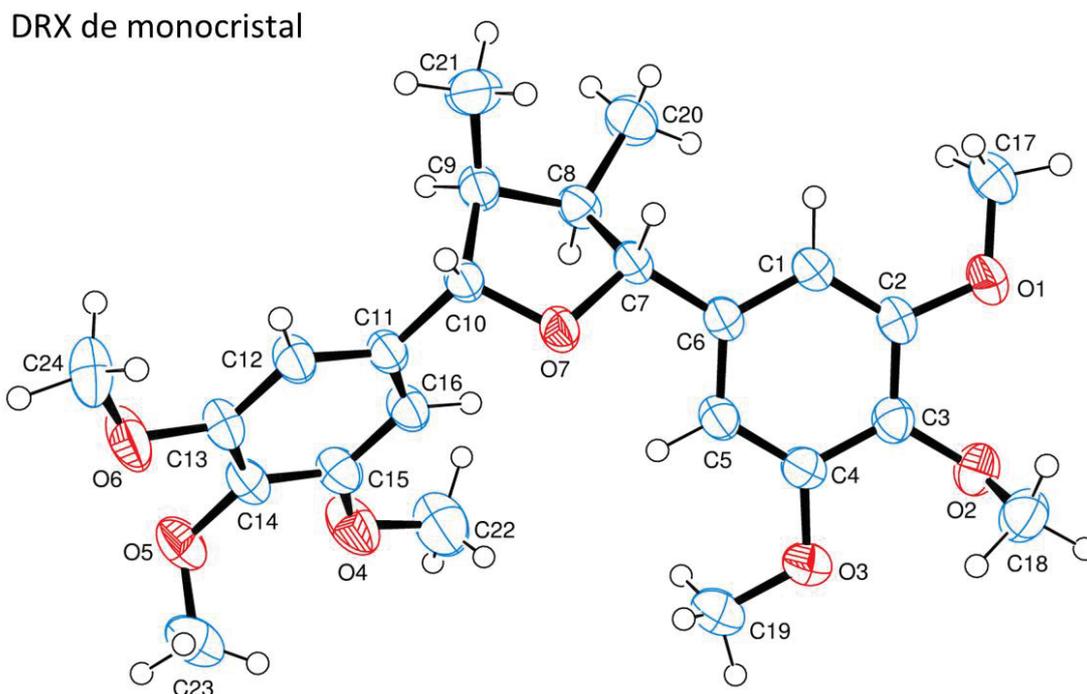


Adaptada FERREIRA, 2013.

A possibilidade de adquirir um cristal dessa substância pela evaporação lenta da acetonitrila, permitiu a análise de DRX de monocristal, o que ajudou não só elucidar toda a

estrutura como também a definir sua estereoquímica. Na figura 4.19 é possível observar os grupos arilas em *trans* em relação aos grupos metilas, enquanto as metilas estão em *cis*. A estereoquímica definida é *trans, cis, trans*. Todos os dados da análise de DRX em monocristal estão no apêndice 1.

Figura 4.19: DRX de monocristal da substância PRHR-SPF4: vista do fragmento crescente da molécula $C_{24}H_{32}O_7$, indicando o esquema de numeração dos átomos. Os elipsóides térmicos são desenhados no nível de probabilidade de 50%.



A substância foi identificada como a neolignana grandisina, é a primeira vez que essa substância é relatada na espécie de *Piper rivinoides* Kunth. Porém já foi anteriormente isolada na espécie *Piper solmsianum* (FERREIRA, 2013) na estereoquímica *trans, trans, trans*. Estudo mais aprofundado quanto a atividade biológica se faz necessário, já que a estereoquímica encontrada é diferente da relatada até o momento.

4.3 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Piper rivinoides* KUNTH.:

A extração dos óleos essenciais das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. foi feita por duas vezes, a primeira foi em 2019, onde o mesmo material vegetal foi destinado para a preparação dos extratos e do óleo. Com o objetivo de fazer mais testes uma nova coleta das folhas foi feita em 2022, no mesmo local, no mês de março, correspondente ao da primeira coleta, no qual o óleo foi quimicamente analisado e enviado para testes biológicos.

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e as análises foram feitas por CG/EM, a tabela 4.6 mostra os principais compostos presentes no óleo de 2019 e a tabela 4.7 contém os constituintes do óleo de 2022, ambos identificados pelo índice de retenção e comparação dos espectros de massas com a literatura (ADAMS, 2017). No apêndice 2 e 3 estão as tabelas completas com os compostos identificados em cada óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.

Tabela 4.6: Principais constituintes presentes no óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. coleta 2019.

IA	IA teórico*	Composto	%
1007	1008	δ -3- careno	9,00
1414	1417	<i>E</i> -cariofileno	4,34
1494	1500	α -muuroleno	16,08
1516	1517	miristicina	20,14
1545	1555	elemicina	22,25

*Índice aritmético teórico ADAMS, 2017.

Algumas das substâncias apresentadas na tabela 4.6 já haviam sido identificadas em LEAL et al., 2019, como o δ -3- careno e o α -muuroleno, porém foi relatado 40,81% de isoelemicina, tabela 1.1, enquanto nesse trabalho, o composto identificado como majoritário foi a elemicina com 22,25%, figura 4.20 A e B. Essas substâncias diferenciam na posição da ligação dupla da cadeia propenólica ligada ao anel benzênico.

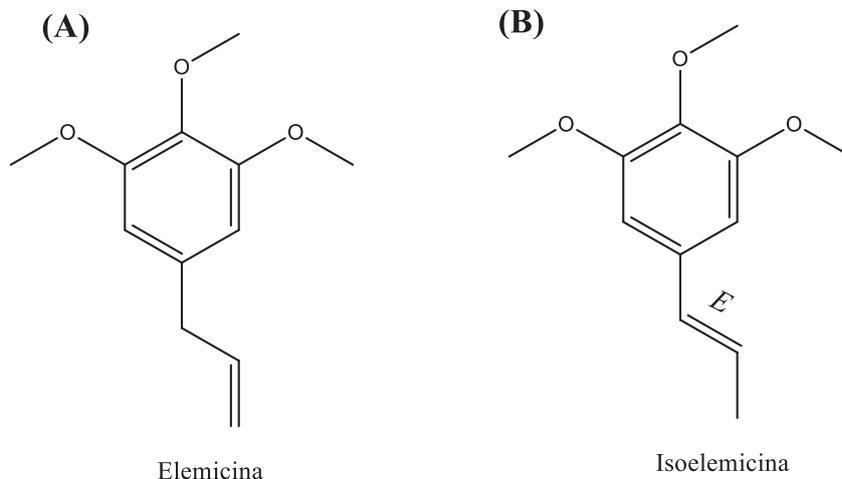
Na tabela 4.7 estão os principais constituintes do óleo essencial de 2022, que apesar de terem sido coletadas no mesmo mês de março, porém com três anos depois, houve diferença na quantidade do composto majoritário, a elemicina está presente em 61,44% seguido do α -muuroleno com 10,98%, além de outros compostos que não apareceram nesse óleo essencial como a miristicina. Vários fatores externos podem acarretar a diferença nos constituintes do óleo essencial como ataque de pragas, solo, fatores ambientais (SILVA at.al., 2013; BERGO at. al., 2017) como a escassez de água que ocorreram na região sul do Brasil nos últimos anos.

Tabela 4.7: Principais constituintes presentes no óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. coleta 2022.

IA	IA teórico*	Composto	%
1058	1054	γ -terpineno	4,04
1421	1417	<i>E</i> -cariofileno	1,99
1497	1500	biciclogermacreno	3,58
1500	1500	α -muuroleno	10,98
1550	1555	elemicina	61,44

*Índice aritmético teórico ADAMS, 2017.

Figura 4.20: Estrutura Elemicina e Isoelemicina: (A) Elemicina: composto majoritário do OE das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. analisado, 22,25% (2019) e 61,44% (2022); (B) Isoelemicina, composto majoritário do OE das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. relatado em LEAL et al., 2019, 40,81%



A miristicina, figura 4.21 (A), identificada no OE com 20,14% e no extrato das raízes em hexano, foi relatada anteriormente para *Piper rivinoides* Kunth em 13,3% (RODRIGUÉSIA, 2021). Já o composto α -muuroleno, figura 4.22, apresentou porcentagens parecidas com as da literatura (LEAL, 2019).

Figura 4.21: Estrutura da miristicina e do δ -3-Careno: (A) Miristicina: identificada no OE analisado em 20,14% (2019); (B) δ -3-Careno: identificado no OE analisado em 9% (2019) e 1,13% (2022).

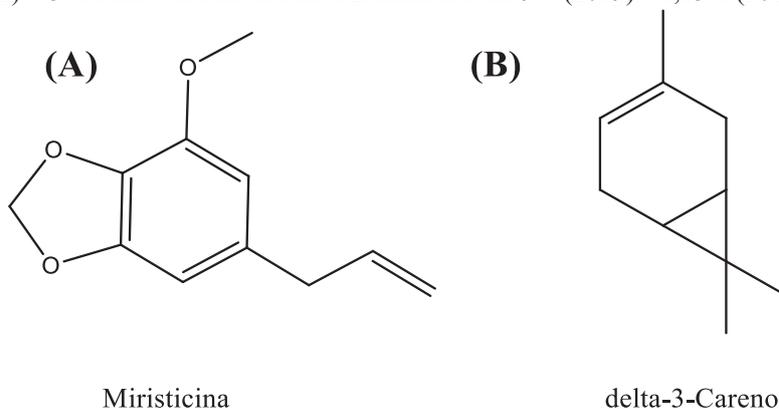
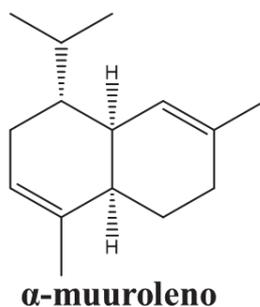


Figura 4.22: Estrutura do α -muuroleno: identificado no OE analisado em 16,08% (2019) e 10,98% (2022).



O potencial biológico dos óleos essenciais vem sendo investigado e revelado grande potencial para aplicações biomédicas (KUHN, et al., 2019). O conhecimento prévio das substâncias presentes no óleo essencial nos dá uma direção de futuros testes para conhecer melhor seus efeitos e futuras aplicações. A elemicina, por exemplo, é um alquenilbenzeno presente em várias plantas medicinais, apresenta atividades antimicrobiana, antioxidantes e antivirais. Em recente estudo, YANG, et al., 2019, mostra que a ativação metabólica da elemicina contribui para sua toxicidade, podendo causar doenças hepáticas.

SENEME, 2021, reuniu vários estudos nos últimos dez anos sobre a miristicina, relatando que óleos essenciais onde esse composto estava presente apresentaram atividade anti-inflamatória e antioxidante. Já os compostos α -Muuroleno e *E*-Cariofileno foram analisados e apresentaram atividade farmacocinética e baixa toxicidade (BARBOSA, et al., 2020).

4.3.1 Teste antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. coletadas em 2022:

Assim como já relatado para os extratos brutos no item 4.1.3, o teste antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. rico em elemicina foi analisado pela CIM e pela CBM em seis microrganismos, os dados positivos estão na tabela 4.8, não tendo apresentado ação bactericida contra *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 4.8: Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas da planta de *Piper rivinoides* Kunth. Concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) valores em mg mL⁻¹:

Microrganismo	CIM (mg mL ⁻¹)	CBM (mg mL ⁻¹)
<i>Candida albicans</i>	0,50	1,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,031	0,062
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,25	1,00
<i>Escherichia coli</i>	0,25	1,00

Diferente do extrato, o óleo essencial apresentou ação fungicida contra *Candida albicans* com CIM (0,50 mg mL⁻¹) e CFM (1,00 mg mL⁻¹), tendo o melhor resultado de CIM (0,031 mg mL⁻¹) e CBM (0,062 mg mL⁻¹) contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Além disso, apresentou um bom resultado frente as bactérias

gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* e gram-negativa *Escherichia coli* ambas com CIM ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) e CBM ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

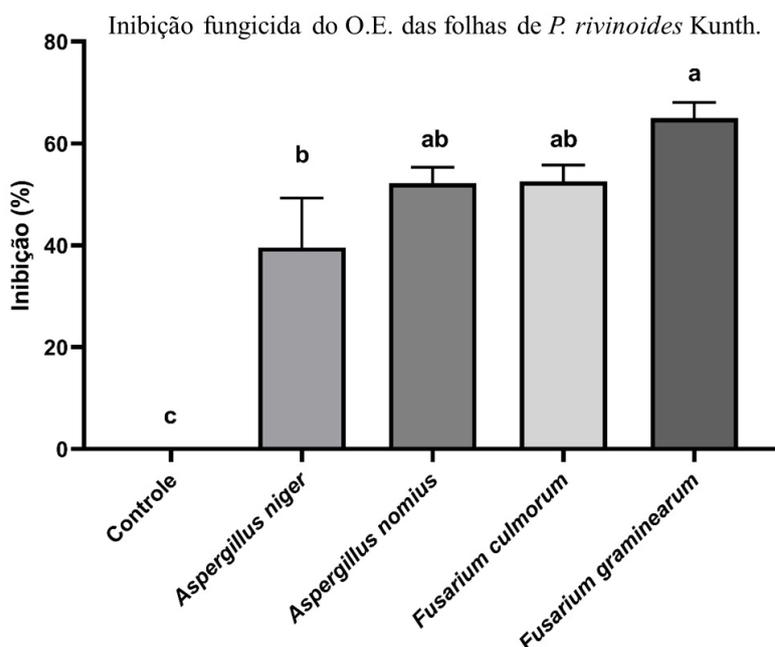
Devido à um resultado significativo em relação ao fungo *Candida albicans*, o óleo essencial foi mandado para outro tipo de teste fungicida, descrito a seguir.

4.3.2 Avaliação do efeito fungicida do óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. coletadas em 2022:

Nesse teste fungicida o óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth. foi avaliado pela inibição do crescimento de quatro fungos, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nomius*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearu*, cuja inibição é dada em porcentagem pela fórmula do item 3.3.4.2.

Os resultados demonstram que houve variação na inibição do crescimento entre os isolados fúngicos expostos ao óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth. A espécie *A. niger* foi a que demonstrou menor sensibilidade ao produto, com inibição do crescimento inferior a 40%, enquanto o isolado de *F. graminearum* apresentou maior sensibilidade com inibição superior a 60% (figura 4.23).

Figura 4.23: Atividade fungicida do óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth. pelo método de contato na concentração de 1,5% contra isolados de *Aspergillus niger*, *Aspergillus nomius*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum*.



Até o presente momento só foi verificado um relato da atividade antifúngica do óleo essencial de *Piper rivinoides*. Leal et al. (2019) avaliaram a ação fungicida desse óleo essencial pelo método de contato contra as espécies *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, demonstrando a sua eficácia em concentrações inferiores a 1000 mg mL⁻¹, sendo 3δ-carene, α-murolene, (Z) carpacin e (E)-isoelemicin os compostos majoritários dessa amostra. Entretanto, outras espécies do gênero *Piper* foram relatadas com atividade fungicida contra isolados de *Aspergillus* e *Fusarium* (DA SILVA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2021).

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que além da composição química ser um fator que pode afetar a atividade fungicida, esse efeito também pode ser influenciado pelo organismo alvo (KUMAR et al., 2017). Ademais, outros fatores que também podem determinar ou influenciar no potencial antifúngico dos óleos essenciais, como por exemplo, a concentração (LEAL et al., 2019), o método de aplicação (ZIMMERMANN et al., 2022) e o mecanismo de ação (SOUZA et al., 2020).

4.4 FRACIONAMENTOS DOS EXTRATOS E DO ÓLEO ESSENCIAL:

4.4.1 Fracionamento do extrato das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. em acetato de etila

Primeiramente no extrato das folhas ocorreu a retirada da clorofila, nessa etapa a presença da água é fundamental já que a clorofila é insolúvel nesse solvente. Foi utilizado metanol (máximo 20%) promovendo a floculação da clorofila, para filtragem em sílica.

Antes do fracionamento do extrato, foi feita uma extração líquido-líquido, como a amostra filtrada estava em metanol e água o solvente escolhido foi o hexano, pois é imiscível em metanol e água, assim os componentes que possuem uma solubilidade maior em hexano foram separados. Em seguida essas frações passaram pelo processo de cromatografia em coluna líquida a vácuo com a fase móvel de diclorometano (DCM) e acetato de etila, sendo que o fluxo da fase móvel foi controlado por uma torneira aumentando e diminuindo o vácuo. As amostras que apresentaram similaridade na CCD foram agrupadas e pesadas, tabela 4.9, ficando a partição de hexano fracionada em três sub-frações e a partição de metanol fracionada em seis sub-frações.

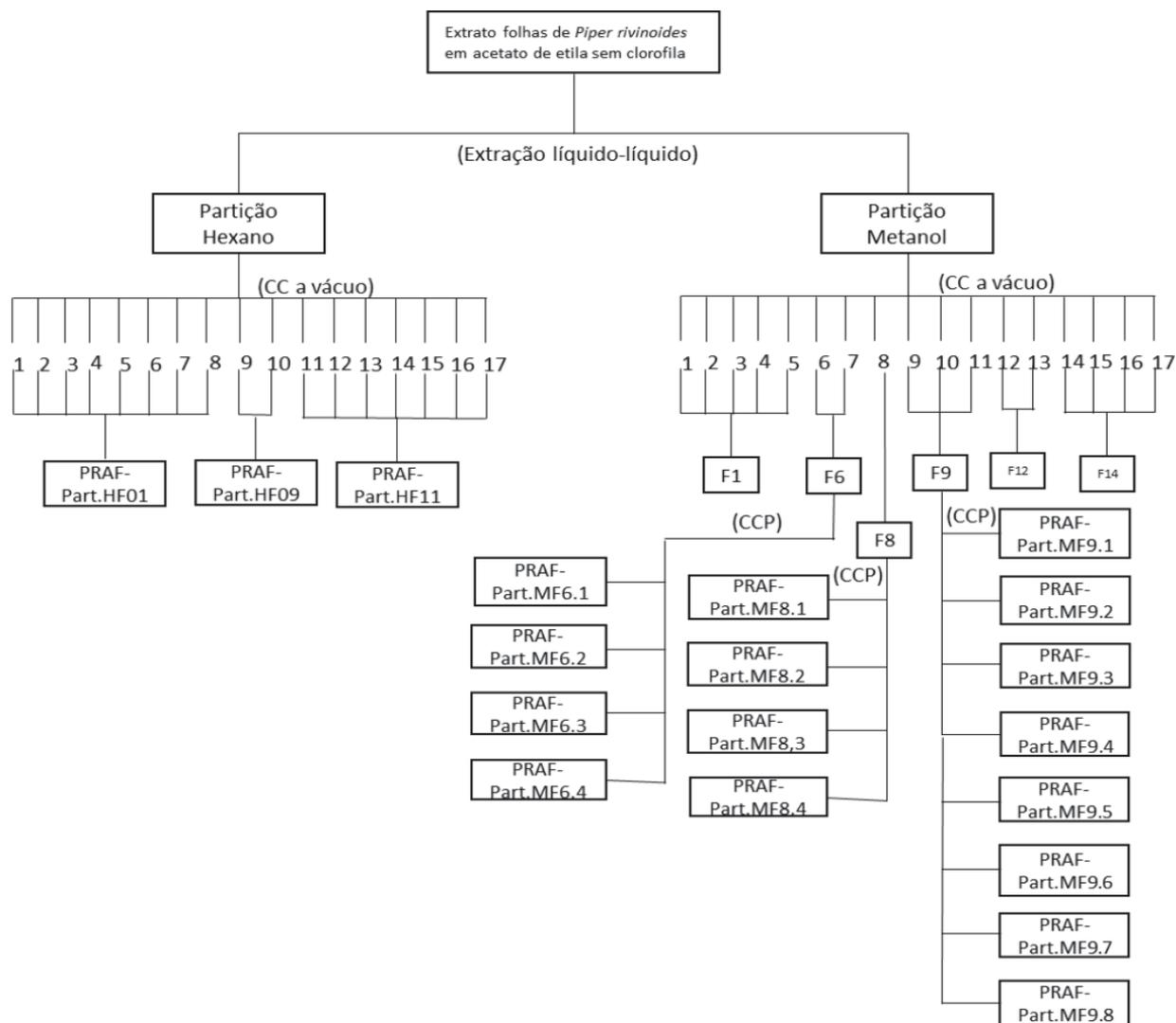
Tabela 4.9: Massa das sub-frações que apresentaram características semelhantes em CCD: *Piper rivinoides* Kunth. extrato em acetato de etila das folhas

Partição Hexano	
Amostra	Massa (mg)
PRAF-Part.HF01	6,8
PRAF-Part.HF09	1,3
PRAF-Part.HF11	4,0

Partição Metanol	
Amostra	Massa (mg)
PRAF-Part.MF1	16,2
PRAF-Part.MF6	34,1
PRAF-Part.MF8	45,7
PRAF-Part.MF9	18,8
PRAF-Part.MF12	16,4
PRAF-Part.MF14	22,2

As amostras que apresentaram maior massa (MF6, MF8 e MF9) foram submetidas à cromatografia preparativa (CCDP). Após uma CCD com revelação de anisaldeído cada uma das frações revelou mais de uma substância. A figura 4.24, mostra um fluxograma com todas as frações obtidas para futuras análises.

Figura 4.24: Fluxograma das frações do extrato de *Piper rivinoides* Kunth. em acetato de etila das folhas.



4.4.2 Fracionamento do extrato das raízes de *Piper rivinoides* Kunth em metanol:

O extrato das raízes de *Piper rivinoides* Kunth foi fracionado em CC à vácuo, em fase móvel com gradiente DCM:AcOEt:MeOH. Foram obtidas 26 frações. A tabela 4.10 estão os dados das massas obtidas das frações em sua respectiva fase móvel.

Tabela 4.10: Massa das frações do extrato das raízes de *Piper rivinoides* Kunth. em metanol

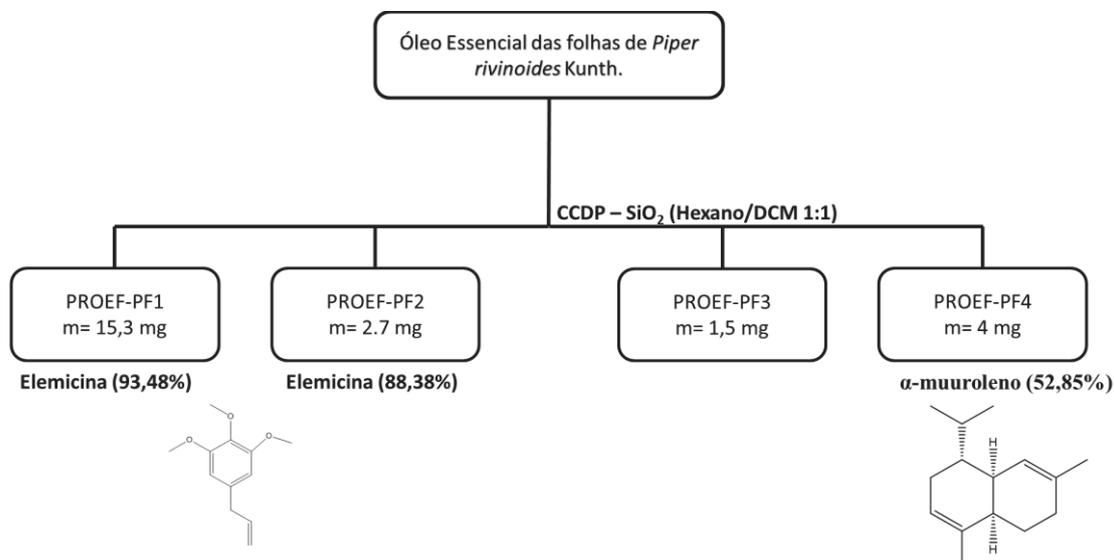
Extrato das raízes em metanol		
Código	massa	Fase móvel
PRMR-CF1	5,9 mg	DCM(100%)
PRMR-CF2	9,8 mg	DCM(100%)
PRMR-CF3	5,0 mg	DCM(100%)
PRMR-CF4	5,7 mg	DCM:AcOEt(10%)
PRMR-CF5	1,8 mg	DCM:AcOEt(10%)
PRMR-CF6	4,4 mg	DCM:AcOEt(20%)
PRMR-CF7	2,1 mg	DCM:AcOEt(20%)
PRMR-CF8	1,9 mg	DCM:AcOEt(30%)
PRMR-CF9	2,2 mg	DCM:AcOEt(30%)
PRMR-CF10	3,8 mg	DCM:AcOEt(40%)
PRMR-CF11	2,0 mg	DCM:AcOEt(40%)
PRMR-CF12	3,3 mg	DCM:AcOEt(50%)
PRMR-CF13	6,9 mg	DCM:AcOEt(50%)
PRMR-CF14	2,8 mg	DCM:AcOEt(75%)
PRMR-CF15	4,7 mg	DCM:AcOEt(75%)
PRMR-CF16	4,0 mg	DCM:AcOEt(90%)
PRMR-CF17	4,7 mg	DCM:AcOEt(90%)
PRMR-CF18	7,3 mg	AcOEt(100%)
PRMR-CF19	26,8 mg	AcOEt(100%)
PRMR-CF20	8,8 mg	AcOEt(100%)
PRMR-CF21	27,0 mg	AcOEt:MeOH(5%)
PRMR-CF22	82,9 mg	AcOEt:MeOH(5%)
PRMR-CF23	92,0 mg	AcOEt:MeOH(10%)
PRMR-CF24	24,74 mg	AcOEt:MeOH(10%)
PRMR-CF25	27,8 mg	AcOEt:MeOH(25%)
PRMR-CF26	1,1009 g	AcOEt:MeOH(25%)

4.4.3 Fracionamento do óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.:

O óleo essencial da folha de *Piper rivinoides* Kunth (20 mg). foi fracionado por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), em fase móvel hexano e DCM (1:1) foram obtidas 4 frações PROEF-PF1, PROEF-PF2, PROEF-PF3 e PROEF-PF4. Todas foram analisadas em CG/EM e apresentaram os compostos majoritários nas frações PF1 (elemicina 93,48%), PF2 (elemicina 88,38%) e PF4 (α -muuroleno 52,85%). A fração

PF3, por ter sido recolhida entre as manchas observadas não apresentou nada significativo. (Figura 4.25)

Figura 4.25: Fracionamento do óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.



As frações do óleo essencial e dos extratos obtidos como resultado desse trabalho serão utilizadas para análises futuras e testes biológicos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos extratos brutos de *Piper rivinoides* Kunth. mostrou que não há grande variedade dos compostos das raízes em comparação com as folhas. A atividade antimicrobiana apresentou resultados significativos para os extratos das raízes em acetato de etila e em hexano.

No fracionamento do extrato das raízes em hexano pela técnica de CLAE com coluna semi-preparativa, foi possível a identificação de quatro compostos, sendo três deles os arilpropanoides miristicina, safrol e elemicina. A identificação da neolignana grandisina ocorreu pelas técnicas de RMN e DRX de monocristal que foram essenciais para a determinação da estrutura e a estereoquímica relativa do tetra-hidrofurânico em *trans*, *cis*, *trans* que nessa configuração foi isolada pela primeira vez em espécies de *Piper*.

O estudo fitoquímico dos óleos essenciais das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. ocorreu pela análise de CG/EM, em que foram identificados 42 compostos no óleo essencial extraído da planta colhida em 2019, a mesma usada para o preparo dos extratos, e 33 compostos no óleo volátil de 2022. Em ambos foi identificado como composto majoritário a elemicina, porém de 22,25% em 2019 foi para 61,44% em 2022, sendo essa variação possivelmente relacionada a fatores ambientais.

A presença da elemicina e dos outros arilpropanoides nos extratos e nos óleos pode ser um dos fatores pela ocorrência da atividade antimicrobiana e fungicida.

6 REFERÊNCIAS:

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. ed. 4.1, 30 Janeiro 2017
- ARRUDA, C.; MEJÍA, J. A. A.; RIBEIRO, V. P.; OLIVEIRA, L.C.; SILVA, M. L. A.; BASTOS, J. K. Development of a Validated High-performance Liquid Chromatography Method and Optimization of the Extraction of Lignans from *Piper cubeba*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 753–759, 2019.
- ARRUDA, A. L. A.; SOUZA, D. G.; VIEIRA, C.J. B.; OLIVEIRA, R. F.; PAVAN, F. R.; FUJIMURA, C. Q. L.; RESENDE, U. M.; CASTILHO, R. O. Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.2, p.276-281, 2012.
- BARBOSA, D. C. S.; HOLANDA, V. N.; ASSISA, C. R. D.; AGUIAR, J. C. R. O. F.; NASCIMENTO, P. H.; SILVA, W. V.; NAVARRO, D. M. A. F.; SILVA, M. V.; LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory potential, in silico, of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg fruit peel essential oil. **Industrial Crops & Products** v.151, p.112-372, 2020.
- BERGO, C.L.; AMARAL do, W.; BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C.; CORREA JUNIOR, C.; SILVA da, L.E.; CÔCCO, L.C. Teor e composição química do óleo essencial de espécies de *Piper* no Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v.19, n.2, p.177-183, 2017.
- BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA P. C. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p.706-710, 2017.
- BERNUCI, K. Z.; IWANAGA, C. C.; FERNADEZ-ANDRADE, C.M M.; LORENZETTI, F. B.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. S.; GONÇALVES, J. E.; AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; SCODRO, R. B. L.; CARDOSO, R. F.; BALDIN, V. P.; CORTEZ, D. A. G. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of *Piper* Species. **Molecules**, v. 21, p. 16-98, 2016.
- BORGES, L. P.; AMORIN, V. A. Metabólitos Secundários de Plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.
- CARNEIRO, J. N. P.; CRUZ, R. P.; CAMPINA, F. F.; COSTA, M. S.; SANTOS, A. T. L.; SALES, D. L.; BEZERRA, C. F.; SILVA, L. E.; ARAUJO, J. P.; AMARAL, W.; REBELO, R. A.; BEGNINI, I. M.; LIMA, L. F.; COUTINHO, H. D. M.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.135, p.110-987, 2020.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Fifteenth Informational Supplement. **Wayne, PA, CLSI document M100-S15**, 2005.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Norma aprovada 3ª ed. **Wayne, PA, CLSI document M31-A3**, 2008.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Twenty-Second Informational Supplement. **Wayne, PA, CLSI document M 100-S22**, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; Fundamentos de Cromatografia. **Editora da Unicamp**, Campinas – SP, p.47-62; 2006.

CORADIN, L.; SIMINSK, A.; REIS, A.; Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Sul. **Instituto do Meio Ambiente e dos recursos Naturais Renováveis**. 2ª ed., p. 934, Brasília: MMA, 2011.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. **John Wiley & Sons: Chichester**, 3rd ed. Reino Unido, 2009; p. 148-156.

ELLOF, J. N. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FERREIRA, L.S. **Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FRANÇOIS, T., MICHEL, J.D.P., LAMBERT, S.M., NDIFOR, F., VYRY, W.N.A., HENRI, A.Z.P., CHANTAL, M. Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense* L., *Piper guineense* schum. et thonn., *Piper nigrum* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon. **African journal of Biotechnology**. v. 8, nº. 3, p.424–431, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.

KUHN, D.; ZIEM, R.; SCHEIBEL, T.; BUHL, B.; VETTORELLO, G.; PACHECO, L. A.; HEIDRICH, D.; KAUFFMANN, C.; FREITAS, E. M.; ETHUR, E. M.; HOEHNE, L. Atividade antibiofilme do óleo essencial de *Campomanesia aurea* O. Berg contra microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos. **LWT** v.108, p. 247-252, 2019.

LEAL, A. L. A. B.; MACHADO, A. J. T.; BEZERRA, C. F.; INÁCIO, C. E. S.; ROCHA, J. E.; SALES, D. L.; FREITAS, T. S.; ALMEIDA, W. O.; AMARAL, W.; SILVA, L. E.; FERRIANI, A. P.; MAIA, B. H. L. N. S.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; BARRETO, H. M.; COUTINHO, H. D. M. Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* Kunth. (BETIS-WHITE). **Food and Chemical Toxicology**, v.131, p. 110-559, 2019.

LIU, Y.-C.; LEE, M.-R.; CHEN, C.-J.; LIN, Y.-C.; HO, H.-C. Purification of Cu/Zn Superoxide Dismutase from *Piper betle* Leaf and Its Characterization in the Oral Cavity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p.2225–2232, 2015.

MACEDO, A.L.; SANTOS, T.C.C.; VALVERDE, A.L.; MOREIRA, D.L.; VASCONCELOS, T.R.A. An Overview of Neolignans of the Genus *Piper*, L.: Isolation Methods and Biological Activities. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.17, p.693-720, 2017.

MARTÍNEZ-BAUTISTA, B. G.; BERNAL-RAMÍREZ, L. A.; BRAVO-AVILEZ, D.; SAMAIN, M. S.; AMEZCUA, J. M. R.; RENDÓN-AGUILAR, B. Traditional Uses of the Family *Piperaceae* in Oaxaca, Mexico. **Tropical Conservation Science**, v. 12, p. 1–22, 2019.

MENDES V. A.; STOCCO, P.; LARA, A. C.; OLIVEIRA, C. M.; LISBOA, H. C. F. Avaliação do uso de produtos naturais na prática do profissional de saúde. **Revista Saúde (Sta. Maria)**. v. 44, n. 1, p. 1-7, 2018.

MORAIS, S. K. R. **Constituintes químicos de algumas espécies de Myristicaceae**. Tese (Doutorado) – Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOREIRA, D. L.; PAIVA, R. A.; MARQUES, A. M.; BORGES, R. M.; BARRETO, A. L. S.; CURVELO, J. A. R.; CAVALCANTI, J. F.; ROMANOS, M. T. V.; SOARES, R. M. A.; KAPLAN, M. A. C. Bioactive Neolignans from the Leaves of *Piper rivinoides* Kunth. (Piperaceae). **Records of Natural Products**, v. 10, n. 4, p. 472-484, 2016.

NAIM, D. M.; MAHBOOB, S. Molecular identification of herbal species belonging to genus *Piper* within family *Piperaceae* from northern Peninsular Malaysia. **Journal of King Saud University – Science**. v. 32, p. 1417–1426, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**. V. 83, p. 770–803, 2020.

RAMOS, C. S.; SILVA, M. W. F.; MORAES, M. M.; ALMEIDA, A. V.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolization of Insecticidal Amides from Leaves of *Piper tuberculatum* by *Heracleides hectorides* and *Naupactus bipes*. **Jornal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 724-730, 2020.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

RESTELLO, M. R.; MENEGAT, C.; MOSSI, J. A.; Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamays* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae), **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n.2, p. 304-307, 2009.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.

RODRIGUES, V. A. A. **Avaliação qualitativa e genotípica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* isolados de pacientes com diferentes condições clínicas bucais**. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências biomédicas. Universidade de São Paulo, 2015.

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas**, v.18, n.1, p.19-26, 2016.

SENEME, E. F.; DOS SANTOS, D. C.; SILVA, E. M. R.; FRANCO, Y. E. M; LONGATO, G. B. Potencial farmacológico e terapêutico da Miristicina: Uma literatura análise. **Moléculas**, v. 26, p. 59-14, 2021.

SILVA, A.L.; CHAVES, F.C.M.; LAMEIRA, R.C.; BIZZO, H.R. Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas**, v. 15, n. 4, p. 670-674, 2013.

SILVA, J. K.; TRINDADE, R.; ALVES, N. S.; FIGUEIREDO, P. L.; MAIA, J. G. S.; SETZER, W. N. Essential Oils from Neotropical *Piper* Species and Their Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 257, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHEKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC**. 2ª edição, Porto Alegre/ Florianópolis, 2000.

SINGH, T.P.; CHAUHAN, G.; AGRAWAL, R.K.; MENDIRATTA, S.K. In vitro study on antimicrobial, antioxidant, FT-IR and GC-MS/MS analysis of *Piper betle* L. leaves extracts. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.13, p. 466-475, 2019.

SOUZA, S. P.; VALVERDE, S. S.; COSTA, N. F.; CALHEIROS, A. S.; LIMA, K. S. C.; FRUTUOSO, V. S.; LIMA, A. L. S. Chemical composition and antinociceptive activity of the essential oil of *Piper mollicomum* and *Piper rivinoides* Kunth. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 22, p. 788-793, 2014.

TRALAMAZZA, S.M., BEMVENUTI, R.H., ZORZETE, P., DE SOUZA GARCIA, F., CORRÊA, B., 2016. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, v.196, p.445–450, 2016.

TSUKATANI, T.; SUENAGA, H.; SHIGA, M.; NOGUCHI, K.; ISHIYAMA, M.; EZOE, T.; MATSUMOTO, K. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, p. 160-166, 2012.

VALADARES, A. C. F.; ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; DEUS, I. P. B.; FILHO, J. G. O.; SANTOS, T. C. L.; DIAS, H. J.; CROTTI A. E. M.; MIRANDA, M. L.D. Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2691-2699, 2018.

VILELA, G.R., ALMEIDA, G.S., D'ARCE, M.A.B.R., MORAES, M.H.D., BRITO, J.O., DA SILVA, M.F. DAS G.F., SILVA, S.C., DE STEFANO PIEDADE, S.M., CALORI-DOMINGUES, M.A., DA GLORIA, E.M. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, p. 108–111, 2009.

XIANG, C.-P.; HAN, J.-X.; LI, X.-C.; LI, Y.-H.; ZHANG, Y.; CHEN, L.; QU, Y.; HAO, C.-Y.; LI, H.-Z.; YANG, C.-R.; ZHAO, S.-J.; XU, M. Chemical Composition and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Essential Oils from *Piper* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 65, p. 3702–3710, 2017.

YANG, X-N; WANG, Y-K.; ZHU, X.; XIAO, X-R.; X-R.; DAI, ZHANG, M-Y.; QU, Y.; YANG, X-W.; QIN, H-B.; GONZALEZ, F. J.; LI, F. Metabolic Activation of Elemicin Leads to the Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase. **Chemical Research in Toxicology**. V. 32, p. 1965–1976, 2019.

ZIMMERMANN, R.C., POITEVIN, C.G., BISCHOFF, A.M., BEGER, M., DA LUZ, T.S., MAZAROTTO, E.J., BENATTO, A., MARTINS, C.E.N., SALES MAIA, B.H.L.N., SARI, R., DA ROSA, J.M., PIMENTEL, I.C., ZAWADNEAK, M.A.C.. Insecticidal and antifungal activities of *Melaleuca raphiophylla* essential oil against insects and seed-borne pathogens in stored products. **Industrial Crops and Products**, v. 182, p. 114871, 2022.

7 APÊNDICES:

APÊNDICE 1: Dados cristalográficos da Neolignana Grandisin.

Crystal structure analysis of C₂₄H₃₂O₇

Crystal data: C₂₄H₃₂O₇, M = 432.49; Triclinic; space group P-1, a= 9.6881(7) Å, b= 10.5524(8) Å, c= 12.1595(8) Å, α = 106.599(2) °, β = 98.224(2)°, γ = 102.613(3)°, V = 1134.15(14) Å³, Z = 2, D_c= 1.266 Mg/m³, F(000) = 464, T = 299(2) K, μ (Mo-K α) = 0.092 mm⁻¹, λ (Mo-K α) = 0.71073 Å.

Crystals are prism colorless. From a sample under oil, one, ca 0.525 x 0.522 x 0.390 mm, was mounted on a Micro-mount/mesh on a Bruker D8 Venture diffractometer, equipped with a Photon 100 CMOS detector, Mo-K α radiation and graphite monochromator. Intensity data were measured by thin-slice ω - and ϕ -scans. Total n°. of reflections recorded, to θ_{\max} = 29 °, was 83656 of which 6029 were unique (R_{int} = 0.042); 4438 were 'observed' with I > 2 σ I.

Data were processed using the APEX3 (1) program. The structure was determined by the intrinsic phasing methods routines in the SHELXS program (2A) and refined by full-matrix least-squares methods, on F²'s, in SHELXL (2B). The non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters. All hydrogen atoms were located in differences maps and were refined isotropically and freely. At the conclusion of the refinement, wR₂ = 0.095 and R₁ = 0.144 (2B) for all 75644 reflections weighted w = [σ^2 (F_o²) + (0.0535P)² + 0.9317P]⁻¹ with P = (F_o² + 2F_c²)/3; for the 'observed' data only, R₁ = 0.048.

In the final difference map, the highest peak (ca 0.25 and -0.22 e. Å⁻³) is between C(10) and C(11) atoms.

Scattering factors for neutral atoms were taken from reference (3). Computer programs used in this analysis have been noted above, and were run through WinGX (4) at the Universidade Federal do Paraná.

References

- (1) Program APEX3, Bruker AXS Inc., Madison, WI (2015).
- (2) G. M. Sheldrick, SHELX – Programs for crystal structure determination (SHELXT) and refinement (SHELXL-2014), Acta Cryst. (2008) A64, 112-122, (2015) C71, 3-8 and (2015) A71, 3-8.
- (3) 'International Tables for X-ray Crystallography', Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992). Vol. C, pp. 500, 219 and 193.
- (4) L. J. Farrugia, (2012) J. Appl. Cryst. 45, 849–854.

Legends for Figures

Figure 1. View of grow fragment of molecule of $C_{24}H_{32}O_7$, indicating the atom numbering scheme. Thermal ellipsoids are drawn at the 50 % probability level.

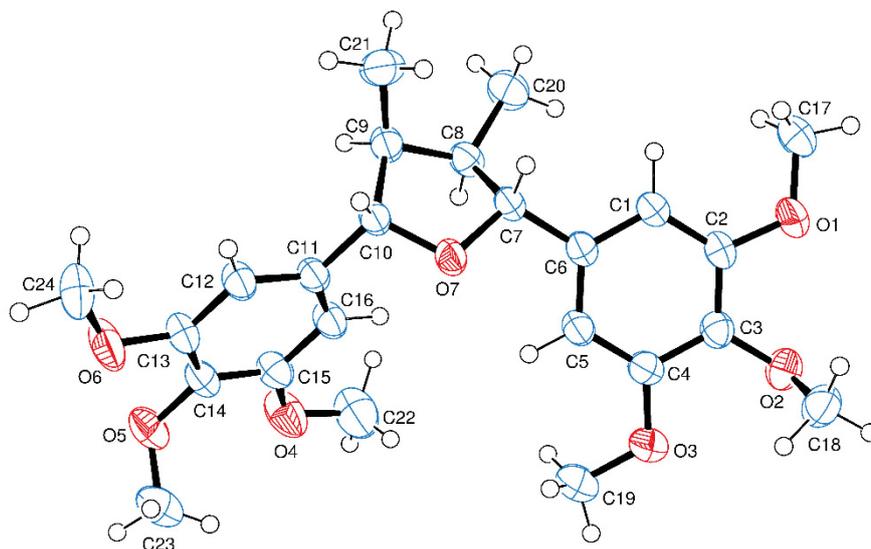
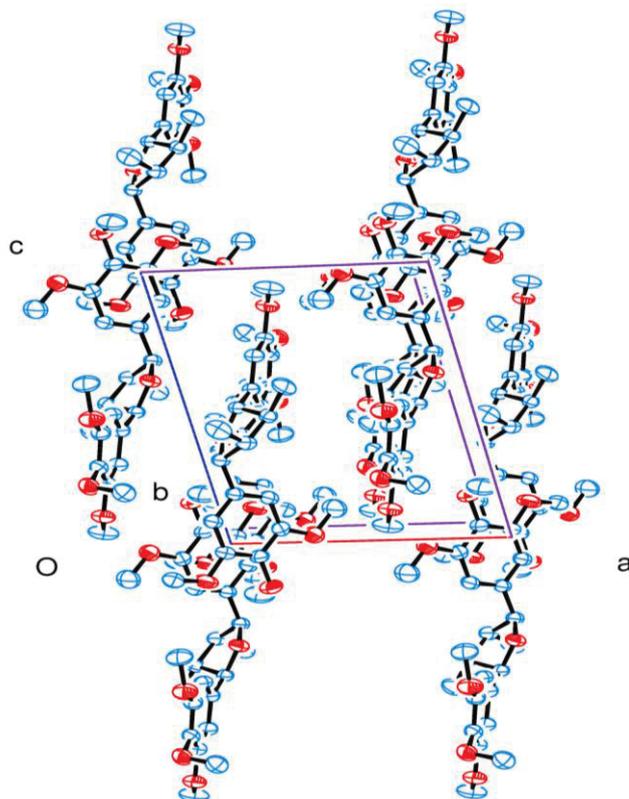


Figure 2. Packing of molecules of $C_{24}H_{32}O_7$, viewed along b axis. Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level. Hydrogen atoms were omitted for clarity.



APÊNDICE 2: Constituintes presentes no óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth. com coleta da planta em 2019.

AI	AI teórico*	Composto	%
931	932	α -pineno	0,2
987	988	mirceno	0,17
1005	1002	felandreno	0,21
1007	1008	careno	9
1015	1014	α -terpineno	0,24
1022	1020 / 1022	<i>p</i> -cimeno/ <i>o</i> -cimeno	0,35
1027	1024	limoneno	0,16
1055	1054	γ -terpineno	0,8
1082	1086	terpinoleno	0,28
1363	1373	α -ilangeno	0,8
1371	1374	α -copaeno	0,54
1385	1389	β -elemeno	0,22
1414	1417	<i>E</i> -cariofileno	4,34
1425	1431	β -gurgeneno	0,21
1437	1442	6,9-guaiadieno	1,28
1444	1448	<i>cis</i> -muuro-la-3,5-dieno	0,32
1450	1452	α -humuleno	0,61
1454	1458	<i>allo</i> -aromadendreno	1,08
1470	1478	γ -muuroleno	0,77
1475	1480	germacreno D	1,83
1483	1489	β -selimeno	0,15
1485	1478	γ -muuroleno	0,06
1490	1500	biciclogermacreno	2,27
1494	1500	α -muuroleno	16,08
1497	1506	(<i>Z</i>)- α -bisaboleno	0,39
1500	1500	<i>n</i> -pentadecano	1,18
1508	1513	γ -Cadineno	0,21
1516	1517	miristicina	20,14
1545	1555	elemicina	22,25
1552	1559	germacreno B	0,41
1558	1561	<i>E</i> -nerodidol	0,28
1563	1570	<i>cis</i> -Muuro-l-5-em-4- α -ol	0,09
1575	1582	oxido cariofileno	0,61
1601	1600	guaiol	0,16
1612	1620	dilapiol	2,60
1636	1640	<i>epi</i> - α -cadinol	0,80
1640	1644	α -muuro-dol	1,33
1649	1640	<i>epi</i> - α -cadinol	1,08

1667	1677	occidenol	0,20
1683	1679	khusinol	0,13
1686	1684	cedranol	0,13
1700	1700	<i>n</i> -heptadecano	0,34
Total			94,30

*Índice aritmético teórico ADAMS, 2017.

APÊNDICE 3: Constituintes presentes no óleo essencial das folhas de *Piper rivinoides* Kunth com coleta da planta em 2022.

AI	AI teórico*	Composto	%
933	932	α -pineno	0,53
949	946	canfeno	0,23
988	989	2-hidroxi-3-metilpentanoato de metila	0,12
1010	1008	δ -3-careno	1,13
1017	1014	α -terpineno	1,67
1024	1020 / 1022	<i>para</i> -cimeno/ <i>orto</i> -cimeno	1,14
1045	1032	<i>E</i> - β -ocimene	0,14
1058	1054	γ -terpineno	4,04
1369	1374	isoleveno	0,86
1377	1374	α -copaeno	0,49
1384	1387	β -bourboneno	0,15
1390	1400	β -longipineno	0,17
1421	1417	<i>E</i> -cariofileno	1,99
1431	1430	β -copaene	0,12
1442	1442	6,9-guaiadieno	0,8
1449	1450 / 1451	<i>cis</i> ou <i>trans</i> -muurolo-3,5-dieno	0,25
1457	1452	α -humuleno	0,19
1462	1460 / 1464	<i>allo</i> -aromadendreno / 9- <i>epi</i> - <i>E</i> -cariofileno	0,63
1473	1475	γ -gurjunene	0,24
1476	1478	γ -muurolo	0,59
1482	1478	γ -muurolo	1,32
1497	1500	biciclogermacreno	3,58
1500	1500	α -muurolo	10,98
1520	1528	zonareno	1,74
1531	1529	kessano	0,53
1550	1555	elemicina	61,44
1561	1559	germacreno B	0,28
1580	1577	spatuleno	0,85
1584	1585	presilfiperfolan-8-ol	0,21
1599	1600	guaiol	0,19
1629	1638	<i>epi</i> - α -cadinol	1,08
1649	1644	α -muurolol	0,99
1659	1656	valerianol	0,77
Total			99,44

*Índice aritmético teórico ADAMS, 2017.