

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL SARI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL, IDENTIFICAÇÃO
DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE *Piper mikanianum*
(Kunth) Steud. (Piperaceae).

Curitiba 2023

RAFAEL SARI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL, IDENTIFICAÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE *Piper mikonianum*
(Kunth) Steud. (Piperaceae).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química. Área: Química Orgânica. Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena
Lameiro de Noronha Sales Maia

CURITIBA 2023

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

Sari, Rafael

Composição química do óleo essencial, identificação de metabólitos secundários e avaliação das atividades biológicas de folhas, caules e raízes de *Piper Mikanianum* (Kunth) Steud. (Piperaceae) / Rafael Sari. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

1. Bactericidas. 2. Fungicida. 3. Inseticida. 4. Piperaceae. 5. Piper Mikanianum. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

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 tese de Doutorado de **RAFAEL SARI** intitulada: **Composição química do óleo essencial, identificação de metabólitos secundários e avaliação das atividades biológicas de folhas, caules e raízes de *Piper mikanianum* (kunth) Steud. (Piperaceae)**, sob orientação da Profa. Dra. BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 26 de Abril de 2023.

Assinatura Eletrônica

06/05/2023 16:19:05.0

BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

04/05/2023 09:13:13.0

SIRLEI DIAS TEIXEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ - CAMPUS PATO BRANCO)

Assinatura Eletrônica

04/05/2023 21:37:10.0

BRÁS HELENO DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/05/2023 19:20:11.0

RICARDO ANDRADE REBELO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU)

Assinatura Eletrônica

04/05/2023 15:18:54.0

KAHLIL SCHWANKA SALOME

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

“Eu sei que não vou morrer, porque de mim vai ficar
o mundo que eu construí, o meu Rio Grande meu lar
campeando as próprias origens, qualquer guri vai achar”

(Origens, Rock de Galpão).

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele o caminho teria sido bem mais difícil.

Agradeço aos meus pais Valdocir Pedro Sari e Beloni Mazzonetto Sari por todo o amor, acolhimento, carinho, paciência e dedicação, obrigado por me ensinarem muito sobre a vida e sobre persistir no que eu sonhasse, obrigado por fazerem do meu sonho seus sonhos.

Agradeço ao meu irmão Robson Sari e minha cunhada Elisandra Regina Grassi Sari, e ao meu sobrinho Enzo Gabriel Grassi Sari e em especial ao meu querido afilhado Pedro Lucas Grassi Sari, por todo o apoio, amizade e incentivo.

Agradeço a minha irmã Francielly Sari Perusso e ao meu cunhado Diego Carlos Perusso e em especial a minha querida afilhada Maria Valentina Sari Perusso, pelas conversas, incentivos e pela amizade de sempre.

Agradeço em especial as minhas tias, Cleci Mazzonetto, Sonia Maria Mazzonetto e Melania Mazzonetto Richetti, por terem contribuído muito para a chegada deste momento, seja com palavras, gestos e atitudes, tenho um orgulho imenso de poder ter compartilhado um pouco desta caminhada com vocês.

Agradeço a minha querida prima Hellen Paula Mazzonetto Richetti pela vivência, amizade, e por estar sempre comigo quando eu mais precisei, agradeço também ao meu compadre Vinicius Numasawa pela amizade e por todo o apoio dado.

Agradeço a minha querida prima Dulcineia Nardi da Silva e ao meu primo Raphael Silva, por todo apoio e amizade.

Agradeço a minha orientadora Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, pela orientação e pelas conversas que, de uma forma ou de outra, sempre deram resultados práticos importantes.

A Prof. Sirlei Dias Teixeira, agradeço pelos ensinamentos, estímulo e por sempre acreditar em mim.

Ao meu querido grupo de pesquisa LAPNEQ, em especial: Elaine Fernanda dos Santos, Inaiara Casapula, Sara Selenia Graf, Carolina de Macedo Azevedo, Rebeca Gabriel de Camargo e Gabriel Marcus Souza Diniz, quero agradecer-lhes os momentos que passamos, agradeço o bom convívio, as boas discussões, os momentos de descontração e alegria que por vezes se instalava, e dizer que sem vocês o caminho teria sido bem mais árduo.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial agradeço a minhas amigas Anne Raquel Sotiles e Suelen dos Santos, obrigado pelo companheirismo e pelas conversas do dia-dia.

Agradeço as zeladoras da limpeza, em especial a Ester Santana da Silva, que mantêm a limpeza, a ordem e a conservação dos espaços físicos em nossa universidade.

À Universidade Federal do Paraná, UFPR - Curitiba agradeço ao espaço cedido para que eu pudesse realizar as atividades demandadas por este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR, pelos ensinamentos transmitidos.

Por fim, é preciso pontuar que muito maior que o título de doutor, é a minha gratidão por tudo que tive a chance de me tornar nesta experiência.

Gratidão por tudo que aqui vivi e aprendi.

Obrigado!

RESUMO

Piper mikanianum, também conhecida como jaborandi, é uma planta amplamente utilizada na medicina popular devido à sua grande variedade de metabólitos secundários presentes nas folhas, caules e raízes. Esses metabólitos são muito interessantes para a pesquisa e o desenvolvimento de biomoléculas, podendo ser aplicáveis em diversos setores industriais. As partes aéreas e raízes de *P. mikanianum* foram coletadas para a obtenção de extratos brutos, utilizando solventes com diferentes graus de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol). A partir dos resultados obtidos nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), observou-se que todos os extratos brutos apresentaram significativa atividade antibacteriana. Neste estudo, os extratos brutos de *P. mikanianum* foram fracionados e possibilitaram a identificação de diversas substâncias, incluindo três arilpropanoides, um flavonol e um alcaloide. Essas substâncias foram identificadas por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas, e incluem safrol, miristicina, asaricina, piperina que foi isolado pela primeira vez na espécie *P. mikanianum* e 4',7-dimethoxikaempferol, sendo este relatado pela primeira vez na família Piperaceae. Além disso, o estudo comparou o óleo essencial das folhas de *P. mikanianum* coletadas em duas regiões, Santa Catarina e Paraná, e foi avaliada pela primeira vez uma variação intraespecífica na composição química. Os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e as substâncias majoritárias presentes no óleo essencial não apresentaram atividade bactericida semelhante à observada no óleo essencial bruto, exceto pelo α -pineno, que teve efeito bactericida e fungicida elevado frente a *Candida albicans*, *E. coli*, *Salmonella choleraesuis* e *S. aureus*. O estudo também destacou a atividade inseticida apresentada pelo óleo essencial de *P. mikanianum* coletado em Santa Catarina e safrol, que apresentaram alta atividade inseticida frente a *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes ferrugineus*, *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*, resultado similar ao do composto sintético Pirimifós-metilico. Além disso, os óleos essenciais coletados nas regiões de Santa Catarina e Paraná e o safrol apresentaram alta atividade fungicida frente a *Fusarium graminearum*, sendo que essa ação foi relatada pela primeira vez, para a espécie *P. mikanianum*.

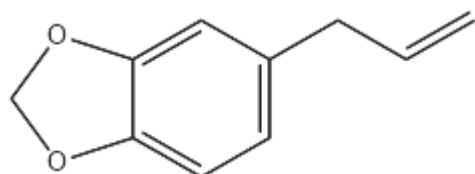
Palavras-chave: bactericida, extratos brutos, fungicida, inseticida, óleo essencial, *P. mikanianum*.

ABSTRACT

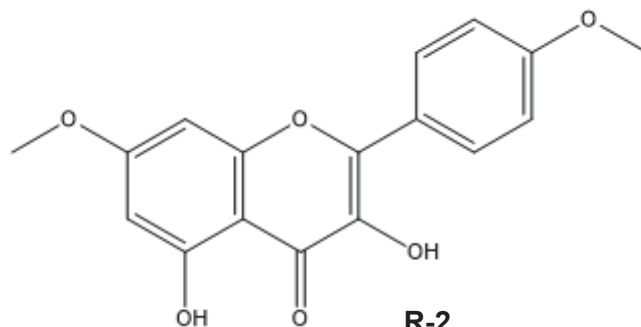
Piper mikanianum, also known as jaborandi, is a plant widely used in folk medicine due to the presence of a wide variety of secondary metabolites in its leaves, stems, and roots. The use of these metabolites is very interesting in the research and development of biomolecules and may be applicable in several industrial sectors. The crude extracts of the aerial parts and roots of *P. mikanianum* were obtained using solvents with different degrees of polarity (hexane, ethyl acetate, and methanol). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assays showed significant antibacterial activity for all crude extracts evaluated. This study involved the fractionation of crude extracts of *P. mikanianum*, and the identification of several substances, including three arylpropanoids, a flavonol, and an alkaloid. These substances, identified using spectrometric and spectroscopic techniques, include safrole, myristicin, asaricin, and piperine, isolated for the first time in the *P. mikanianum* species, well as 4',7-dimethoxikaempferol, reported for the first time in the Piperaceae family. In addition, the study compared the essential oil of *P. mikanianum* leaves collected in two regions, Santa Catarina and Paraná, where evaluated the intraspecific variation in chemical composition for the first time. The essential oils showed bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, even though the major compounds of the essential oil did not show bactericidal activity similar to that observed in the crude essential oil, except for α -pinene, which has a high bactericidal and fungicidal effect against *Candida albicans*, *E. coli*, *Salmonella choleraesuis*, and *S. aureus*. The study also highlighted the insecticidal activity presented by the essential oil of *P. mikanianum* collected in Santa Catarina and its component safrole, which showed high insecticidal activity against *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes ferrugineus*, *Sitophilus oryzae*, and *Sitophilus zeamais*, a result similar to that of the synthetic compound Pirimiphos-methyl. In addition, the essential oils collected in the regions of Santa Catarina and Paraná, and safrole, showed high fungicidal activity against *Fusarium graminearum*, depicted for the first time in this study for the species *P. mikanianum*.

Keywords: bactericide, crude extracts, essential oil, fungicide, insecticide, *P. mikanianum*.

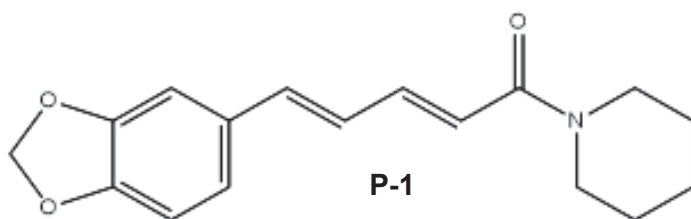
ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



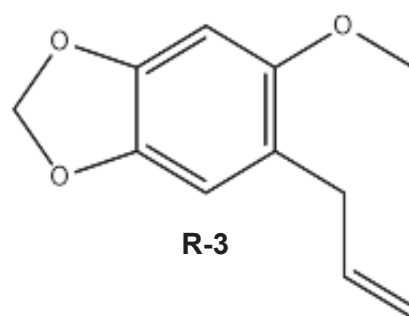
S-4 e S-2



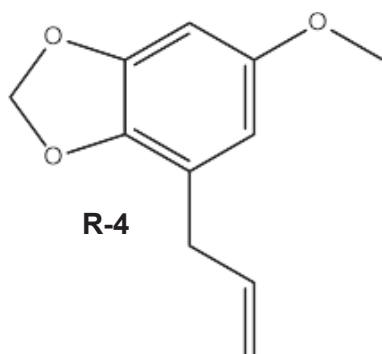
R-2



P-1



R-3



R-4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i> (JARAMILLO, et al., 2001).	19
Figura 2. Exemplos de compostos isolados e que representam as principais classes de compostos encontrados no gênero <i>Piper</i> (Adaptado de ARCHIBOLD et al., 2018; ALVES et al., 2010).....	22
Figura 3. (A) Folhas de <i>Piper</i> (DUARTE, et al., 2009) e (B) endemismo da espécie <i>P. mikanianum</i> no Brasil. (GUIMARÃES, et al., 2020).....	23
Figura 4. Constituintes químicos majoritários identificados no óleo essencial de folhas <i>Piper mikanianum</i> . (A) Biciclogermacreno; (B) β -cariofileno; (C) Limoneno; (D) Safrol (DUARTE, et al., 2009).....	24
Figura 5. Fluxograma das atividades realizadas no estudo	27
Figura 6. (A) Caules, (B) raízes e (C) folhas de <i>Piper mikanianum</i>	28
Figura 7. (A) Aparelho de cleverger modificado e (B) óleo essencial de <i>Piper mikanianum</i>	28
Figura 8. Extração das folhas de <i>Piper mikanianum</i> utilizando os solventes: (A) hexano (B) acetato de etila (C) metanol.	29
Figura 9. Sistema de filtração líquida a vácuo para a retirada da clorofila.	30
Figura 10. Esquema para a partição dos extratos.	31
Figura 11. Sistema de fracionamento das frações hexano, diclorometano e metanol utilizando coluna líquida a vácuo preenchida de sílica flash.....	31
Figura 12. Ilustração do método de disco difusão por halo de inibição.....	37
Figura 13. Ilustração da placa estéril de 96 poços.	38
Figura 14. Ilustração da mudança da coloração da amostra (A) antes da titulação e (B) após a titulação, devido à presença do indicador murexida, e (C) após centrifugação.	42
Figura 15. Cromatograma dos óleos essenciais das folhas secas de <i>P. mikanianum</i> coletadas em Atalanta – (SC).	43
Figura 16. Estruturas química dos compostos majoritários identificado no óleo essencial das folhas de <i>P. mikanianum</i> coletadas em Atalanta-SC.	44
Figura 17. Cromatograma das folhas secas de <i>P. mikanianum</i> coletadas em Curitiba (PR).	47
Figura 18. Estruturas químicas dos compostos majoritários identificado no óleo essencial das folhas de <i>P. mikanianum</i>	47
Figura 19. Gráfico das classes de compostos identificadas no OE de folhas secas de <i>P. mikanianum</i> coletadas em Atalanta-SC e Curitiba PR.	49
Figura 20. Atividade inseticida (%) do óleo essencial de <i>P. mikanianum</i> (PR), <i>P. mikanianum</i> (SC) e safrol pelo método de fumigação na concentração de 138,38 $\mu\text{L L}^{-1}$ de	

ar contra <i>Rhyzopertha dominica</i> , <i>Cryptolestes ferrugineus</i> , <i>Sitophilus oryzae</i> e <i>Sitophilus zeamais</i>	55
Figura 21. Atividade fungicida do óleo essencial de <i>P. mikanianum</i> (PR), <i>P. mikanianum</i> (SC) e safrol pelo método de volatilização na concentração de 100% contra <i>Fusarium graminearum</i> após incubação por 7 dias a 28 °C.....	56
Figura 22. Gráfico com os resultados da determinação elementar das folhas, caules e raízes de <i>Piper mikanianum</i> coletadas em Atalanta-SC.....	58
Figura 23. Gráfico com os resultados da determinação de metais das folhas, caules e raízes de <i>Piper mikanianum</i> coletadas em Curitiba-PR.....	59
Figura 24. Gráfico rendimento dos Extratos de <i>Piper mikanianum</i>	61
Figura 25. Atividade quelante de cálcio dos extratos de <i>Piper mikanianum</i>	62
Figura 26 (A, B, C). Espectros na região do infravermelho dos extratos brutos folhas, raízes e caules de <i>P. mikanianum</i>	66
Figura 27. Perfil químico dos extratos (hexano, acetato de etila e metanol) das folhas, caules e raízes de <i>P. mikanianum</i>	67
Figura 28. (A) Gráfico de “scores” E (B) Gráfico de “loadings” PC1 e PC2 dos extratos brutos de <i>P. mikanianum</i>	69
Figura 29. Fluxograma da purificação das frações F5DCM e F7DCM.....	73
Figura 30. Cromatogramas das 20 frações da partição diclorometano do extrato folhas acetato de etila de <i>P. mikanianum</i>	73
Figura 31. Cromatograma da fração F4DCM.....	74
Figura 32. Estrutura Química da substância (S-4).....	75
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H da substância S-4 (400 MHz CDCl ₃).....	76
Figura 34. RMN ¹³ C desacoplado da substância S-4 (100 MHz, CDCl ₃).....	77
Figura 35. Mapa de correlação (HSQC) direta ¹ H- ¹³ C, proveniente do experimento de (400 MHz, CDCl ₃) da substância S-4.....	78
Figura 36. Mapa de correlação (HSQC) direta ¹ H- ¹³ C, proveniente do experimento de (400 MHz, CDCl ₃) da substância S-4.....	79
Figura 37. Principais correlações observadas no mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (HMBC) da substância S-4.....	79
Figura 38. Cromatograma da F6DCM.....	80
Figura 39. Representação molecular da substância R-1, e os deslocamentos químicos de RMN de ¹ H.....	82
Figura 40. RMN de ¹ H da substância R-1 (400 MHz, CDCl ₃).....	83
Figura 41. RMN de ¹³ C da substância R-1 (100 MHz, CDCl ₃).....	84
Figura 42. (A) Sólido amarelado, (B) Representação da estrutura molecular (ORTEP) da substância R-1.....	85

Figura 43. Cromatogramas das 18 frações da partição hexano do extrato folhas acetato de etila de <i>P. mikanianum</i>	85
Figura 44. Cromatograma e foto da fração S-2 (A) e do padrão de safrol (B).	86
Figura 45. Espectro de RMN ^1H da substância S-2 (200 MHz, CDCl_3).....	87
Figura 46. (A) Cromatogramas das 8 frações resultantes e (B) CCD da partição diclorometano do extrato raízes metanol de <i>P. mikanianum</i>	88
Figura 47. Espectro de RMN ^1H da substância R-2 contida na fração F9.10MDCM (200 MHz, CDCl_3).....	91
Figura 48. Representação molecular da substância R-2, e os deslocamentos químicos de RMN de ^1H	91
Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C desacoplado da substância R-2 contida na fração F9.10MDCM (200 MHz, CDCl_3).	92
Figura 50. (A) Cromatogramas das 11 frações resultantes da partição metanol do extrato raízes metanol de <i>P. mikanianum</i>	93
Figura 51. Imagem da ccd de raízes em acetato de etila (12 frações (a) partição metanol) e (3 frações (B) partição hexano).....	94
Figura 52. Cromatogramas das frações resultantes da partição metanol (A) e hexano (B) do extrato raízes em acetato de etila <i>P. mikanianum</i>	95
Figura 53. Cromatograma analítico da F3RAH (A) e (B) cromatogramas F3RAH7 e F3RAH8 após a purificação.....	96
Figura 54. Fluxograma da purificação da Fração F3RAH.....	97
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H da substância R-3 contida em mistura na fração F3RAH7 (200 MHz, CDCl_3).	99
Figura 56. Representação molecular da substância R-3, e os deslocamentos químicos de RMN de ^1H	99
Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C desacoplado da substância R-3 contida na fração F3RAH7 (50 MHz, CDCl_3).	100
Figura 58. Representação molecular da substância R-4, e os deslocamentos químicos de RMN de ^1H	101
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H da substância R-4 contida na fração F1RAH (200 MHz, CDCl_3).	102
Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado da substância R-4 contida na fração F1RAH (50 MHz, CDCl_3).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades Biológicas retratadas em literatura para a família Piperaceae.....	20
Tabela 2 - Método gradiente utilizado nas separações por CLAE em coluna C18 analítica.	34
Tabela 3 - Método gradiente utilizado nas separações por CLAE em coluna C18 semi-preparativa.....	35
Tabela 4 - Método gradiente utilizado na separação Crhomatotron.	35
Tabela 5. Parâmetros instrumentais e condições operacionais do equipamento (ICP-OES).	37
Tabela 6. Índices aritméticos e identificação dos compostos presentes no óleo essencial de folhas secas de <i>P. mikanianum</i>	45
Tabela 7. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas secas de <i>P. mikanianum</i>	46
Tabela 8. Índices aritméticos e identificação dos compostos presentes no óleo essencial de folhas secas de <i>P. mikanianum</i>	48
Tabela 9. Atividades antimicrobianas (CIM) dos óleos essenciais de folhas secas de <i>P. mikanianum</i> e padrões.....	53
Tabela 10. Atividades antimicrobianas (CBM) dos óleos essencial de folhas secas de <i>P. mikanianum</i> e padrões.....	53
Tabela 11. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de <i>P. mikanianum</i> contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.	64
Tabela 12. Fracionamento e massas (mg) das frações oriundas do extrato folhas em acetato de etila partição (DCM).	71
Tabela 13. Fracionamento e massas (mg) das frações oriundas do extrato folhas em acetato de etila partição (Hexano).	72
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e mapa de correlação $^1\text{H}^{13}\text{C}$ a longa distância (HMBC) Clorofórmio- d_4 , ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), comparação com a literatura para o safrol (Clorofórmio- d_4 , ^1H -RMN 400 MHz e ^{13}C 100 MHz) (MOHOTTALAGE, et al., 2007).	74
Tabela 15. Purificação da fração (F6DCM) em mistura, e suas novas sub-frações.....	81
Tabela 16. Dados de RMN de R-1 (Clorofórmio- d_4 , ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), comparação com a literatura para o safrol (Clorofórmio- d_4 , ^1H -RMN 400 MHz e ^{13}C 100 MHz, ALOTAIBI, et al., 2021).....	81
Tabela 17. Dados de RMN de S-2 (Clorofórmio- d_4 , ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), comparação com a literatura para o safrol (Clorofórmio- d_4 , ^1H -RMN 400 MHz e ^{13}C 100 MHz, MOHOTTALAGE, et al., 2007).	87

Tabela 18. Massas (mg) das frações da partição dcm do extrato das raízes em metanol de <i>P. mikanianum</i> .	89
Tabela 19. Dados de RMN de R-2 (Clorofórmio-d ₄ , ¹ H 200,12 MHz e ¹³ C em 50,32 MHz), comparação com a literatura para a piperina (Clorofórmio-d ₄ , ¹ H-RMN 400 MHz e ¹³ C 100 MHz, SAHA, et al., 2013; SUZERY, et al., 2019).	90
Tabela 20. massas (mg) das frações da partição metanol do extrato das raízes em metanol de <i>P. mikanianum</i> .	93
Tabela 21. massas (mg) das frações da partição metanol (a) e hexano (b) do extrato das raízes em acetato de etila <i>P. mikanianum</i> .	96
Tabela 22. Dados de RMN de R-3 (Clorofórmio-d ₄ , ¹ H 200,12 MHz e ¹³ C em 50,32 MHz), comparação com a literatura para a asaricina (Clorofórmio-d ₄ , ¹ H-RMN 400 MHz e ¹³ C 100 MHz, LORENZO, et al., 2001; HEMATPOOR, ET AL., 2016).	98
Tabela 23. Dados de RMN de R-3 (Clorofórmio-d ₄ , ¹ H 200,12 MHz e ¹³ C em 50,32 MHz), comparação com a literatura para a miristicina (Clorofórmio-d ₄ , ¹ H-RMN 500 MHz e ¹³ C 125 MHz, YOU, et al., 2015; ANSORY, et al., 2019).	101

LISTA DE ABREVIações

ACN – Acetonitrila.

CBM – Concentração Bactericida Mínima.

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio.

CC – Cromatografia em coluna.

CCD – Cromatografia em camada delgada.

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa.

CG-DIC – Cromatografia Gasosa Acoplada ao detector de Ionização de Chama.

CG-EM – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.

CIM – Concentração Inibitória Mínima.

CLAE – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência.

cm – Centímetros.

d – duplete.

EM – Espectrometria de massas.

eV – Elétron-volts

g – Grama.

HMBC – *Heteronuclear multiple bond correlation* (Correlação heteronuclear à múltiplas ligações).

HSQC – *Heteronuclear single quantum coherence* (Correlação heteronuclear a uma ligação).

Hz – Hertz.

ICP-OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado.

IVTF – Espetroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.

M – Molaridade.

mg – Miligrama.

MHz – Megahertz.

mL – Mililitro.

mm – Milímetro.

min – Minuto.

O.E – Óleo Essencial.

O.Es - Óleos essenciais.

P. mikanianum – *Piper mikanianum*.

RMN – Ressonância magnética nuclear.

Rpm – Rotações por minuto

s – simpleto.

SC – Santa Catarina.

PR – Paraná.

Rf – Fator de retenção.

TMS – Tetrametilsilano.

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 A Família Piperaceae.....	19
1.2 O gênero <i>Piper</i>	26
1.3 <i>Piper mikanianum</i>	26
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Coleta e identificação do material botânico	27
3.2 Secagem e moagem	28
3.3 Extração dos óleos essenciais e identificação dos metabólitos secundários voláteis	28
3.4 Obtenção dos extratos	29
3.5 Fracionamento dos extratos	30
3.5.1 Cromatografia líquida a vácuo	30
3.5.1.1 Remoção da Clorofila	30
3.5.1.2 Fracionamento das frações utilizando coluna líquida a vácuo	31
3.6 Separação e Identificação dos dos metabólitos secundários não voláteis	33
3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	33
3.6.2 Infravermelho (IV-TF)	33
3.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	33
3.6.4 Cromatografia de Camada Fina Preparativa Acelerada Centrifugamente (CHROMATOTRON)	33
3.6.5 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)	33
3.7 Análise multivariada de dados	36
3.8 Análise elementar (ICP-OES)	36
4. Ensaios biológicos	37
4.1 Atividade antibacteriana	37
4.1.1 Difusão em Disco	37
4.1.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Máxima (CBM)	38
4.2 Atividade inseticida e fungicida	39
4.2.1 Criação dos insetos	39
4.2.2 Isolado fúngico e preparação do inóculo	40
4.2.3 Atividade inseticida contra pragas de armazenamento	40
4.2.4 Atividade fungicida contra <i>Fusarium graminearum</i> por volatilização	40
4.2.5 Atividade fungicida contra <i>Fusarium graminearum</i> por contato	41
4.2.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	41
4.3 Atividade quelante de cálcio dos extratos	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

5.1 Óleo essencial: constituintes químicos das folhas secas de <i>Piper mikanianum</i> , coletadas em Atalanta - Santa Catarina.	43
5.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas secas de <i>Piper mikanianum</i> coletadas em atalanta-santa catarina.	46
6. Óleo essencial: constituintes químicos das folhas secas de <i>Piper mikanianum</i> , Coletadas em Curitiba - Parana	47
7. Comparação entre as identificações dos óleos essenciais extraídos das folhas de <i>Piper mikanianum</i> , de atalanta – SC e curitiba – PR.	49
8. Atividades microbiológicas dos O.E de <i>Piper mikanianum</i> coletada e Atalanta-SC e Curitiba-PR.....	51
9. Atividade inseticida contra pragas de armazenamento	54
9.1 Atividade fungicida de <i>P. mikanianum</i> e safrol contra <i>Fusarium graminearum</i> por contato	55
10. Análise elementar das folhas e caules de <i>P. mikanianum</i> Atalanta – SC.e Curitiba - PR.....	57
11. Extratos brutos de <i>P. mikanianum</i>	60
11.1 Rendimento dos extratos das partes aéreas e raízes de <i>P. mikanianum</i> Atalanta - SC.....	60
11.2 Atividade Quelante de Cálcio dos extratos brutos de <i>P. mikanianum</i> Atalanta – SC.....	61
11.3 Atividade bactericida dos extratos brutos de <i>P. mikanianum</i> de Atalanta – SC.....	62
11.4 Caracterização espectroscópica dos extratos brutos de <i>P. mikanianum</i>	64
11.5 Perfil fitoquímico por CLAE dos extratos brutos de <i>P. mikanianum</i>	67
12. Dados físicos e espectrométricos das substâncias identificadas	70
13. Elucidação estrutural das substâncias isoladas	71
13.1 Fracionamento e partição do extrato folhas em acetato de etila de <i>Piper mikanianum</i>	71
13.1.1 Cromatogramas da partição diclorometano do extrato das folhas em acetato de etila.	72
13.1.2 Determinação estrutural da substância majoritária S-4 contida na fração F4DCM.....	74
13.1.3 Purificação por CLAE semi-preparativo das substâncias contidas na fração F6DCM.....	80
13.1.4 Determinação estrutural da substância F6DCM7	81
13.2 Cromatogramas da partição hexano do extrato das folhas em acetato de etila.	85
13.2.1 Determinação estrutural das substâncias S-2.	87
14. Fracionamento e partição do extrato raízes em metanol de <i>Piper mikanianum</i>	88
14.1 Cromatogramas da partição diclorometano do extrato raízes metanol.....	88
14.2 Determinação estrutural da substância majoritária R-2 contida na fração F910MDCM.....	89
14.3 Cromatogramas da partição metanol do extrato raízes metanol.	93
15. Fracionamento e partição do extrato de raízes em acetato de etila	94
15.1 Determinação estrutural da substância majoritária R-3 contida em mistura na subfração F3RAH7.....	98

15.2 Determinação estrutural da substância majoritária R-4 contida em mistura na subfração F1RAH.....	101
16. CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
17. REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS	118
ANEXO 1 – ESTRUTURAS IDENTIFICADAS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. mikanianum</i> Atalanta - SC.....	118
ANEXO 2 – ESTRUTURAS IDENTIFICADAS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. mikanianum</i> Curitiba -PR.....	119

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas pelos seres humanos para tratamentos medicinais é tão antiga quanto a própria existência da humanidade. A eficácia terapêutica das propriedades fitoquímicas presentes nas plantas frente a doenças infecciosas, representa o ponto de partida para a descoberta de novas substâncias naturais com potencial terapêutico (VIEGAS et al., 2006; SHARMA et al., 2017; JAMWAL et al., 2018; SARI, et al., 2020).

A busca e o aumento no interesse por novas substâncias a partir de fontes naturais vêm ganhando importância e, muitas plantas têm sido estudadas e avaliadas quanto ao seu potencial farmacológico, especialmente na Ásia, América Latina e África, uma vez que a utilização de plantas como fonte de medicamentos é predominante nestes locais (VIEGAS et al., 2006; DUARTE, 2006).

Atualmente, a medicina moderna reconhece o valor dos fitoterápicos, ou seja, o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças, porém, apesar do grande interesse da utilização de plantas para o desenvolvimento de novos fármacos, o aproveitamento pelo ser humano, do potencial dos vegetais ainda é baixo. Estima-se que aproximadamente 300 mil espécies de plantas foram investigadas fitoquimicamente, e somente 6% desse total foram verificados quanto aos seus potenciais farmacológicos (NEWMAN, 2012; NEWMAN e CRAGG, 2020).

Se por um lado há um panorama de interesse da indústria farmacêutica na utilização de plantas medicinais com potenciais farmacológicos, por outro lado há também um grande interesse na utilização dessas ervas medicinais frente a pragas na agricultura, tornando necessária a busca por substâncias alternativas que substituam os produtos sintéticos. Atualmente, a principal medida no controle de pragas de armazenamento é por meio do uso de inseticidas e fungicidas sintéticos, que são aplicados antes e durante o período de armazenamento. Entretanto, o uso demasiado destas substâncias sintéticas causa diversos impactos negativos ao ambiente, além de deixar resíduos tóxicos nos cereais (SPOCHACZ et al., 2018; PRAKASH et al., 2022; CHACÓN et al., 2021).

Neste sentido, as pesquisas e as investigações fitoquímicas das plantas presentes nos diferentes biomas mundiais, podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novas drogas que possuam menores efeitos colaterais, tanto na saúde humana, quanto aos efeitos gerados ao ambiente (VARANDA, 2006; RODRIGUES, et al., 2010). E consequentemente, a área da química de produtos naturais vem a explorar os diferentes biomas e seus seres vivos, visando a descoberta de novos agentes promissores biologicamente (BERLINCK et al., 2017; BERNARDINI et al., 2018).

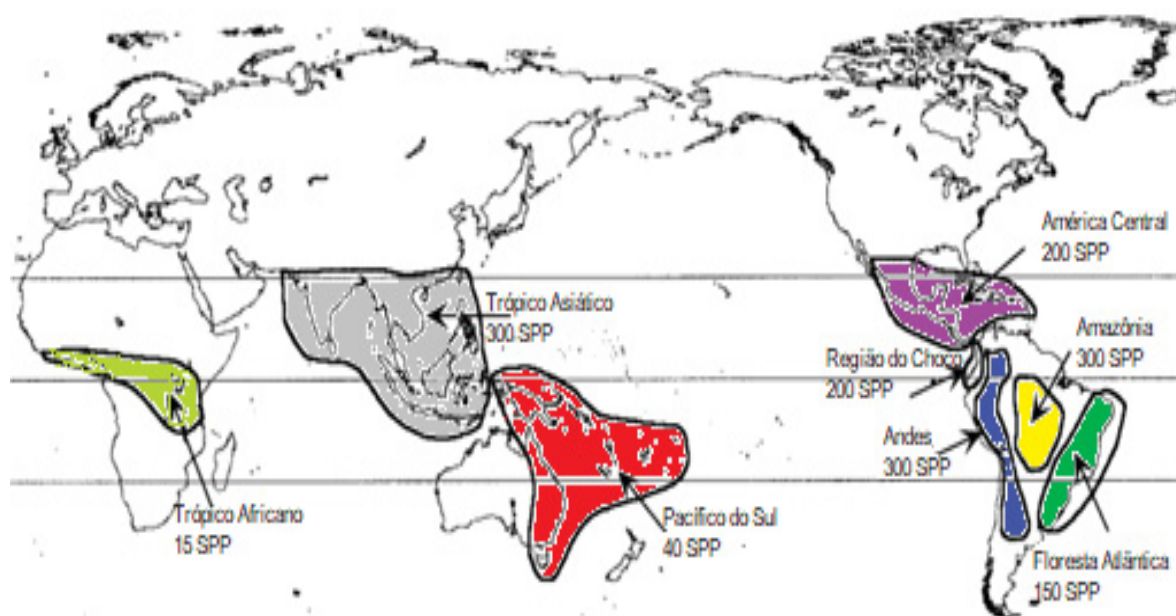
Nesse contexto, o Brasil e seus biomas são uma importante fonte de produtos naturais, devido a sua grande biodiversidade. Mas embora existam inúmeras espécies vegetais, muitas delas ainda não foram investigadas do ponto de vista químico e/ou

biológico, e sendo assim, existe uma vasta flora ainda a ser investigada (RIBEIRO et al., 2020; SARI, et al., 2020).

1.1 A Família Piperaceae.

A família Piperaceae é composta por 8 gêneros e 3000 espécies que são encontradas em regiões tropicais e subtropicais quentes do mundo, como a América do Sul e Central. Os dois principais gêneros dessa família são: *Peperomia* e *Piper* (BARDELLI, et al., 2008; OYEMITAN, 2017). Na FIGURA 1 pode ser observada a ampla distribuição do gênero *Piper* pelo mundo, incluindo continentes como a África, América do Sul, Ásia, Austrália, Europa, Oceania e América Central. O desenvolvimento e crescimento da família Piperaceae nestas regiões do globo, pode estar relacionado com os diferentes fatores abióticos, incluindo até regiões com alta interferência humana (OYEMITAN, 2017).

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *PIPER* (JARAMILLO, et al., 2001).



A família Piperaceae vem sendo bastante estudada e inúmeros são os relatos de suas atividades biológicas, por exemplo, na TABELA 1 observa-se a relação da família e sua importância frente a algumas atividades biológicas.

TABELA 1. ATIVIDADES BIOLÓGICAS RETRATADAS EM LITERATURA PARA A FAMÍLIA PIPERACEAE.

Família	Espécie	Atividade Biológica	Referência
Piperaceae	<i>Piper amalago</i>	Citotóxica*	STEIN, et al., 2022
	<i>Peperomia obtusifolia</i>	Bacteriana**	MOSTACERO, et al., 2021.
	<i>Piper porphyrophyllum</i>	Anti-inflamatória**	AHMAD, et al., 2014.
	<i>Piper nigrum</i>	Antitumoral*	GRINEVICIUS, et al., 2017.
	<i>Piper ovatum</i>	Larvicida**	KANIS, et al., 2013.
	<i>Piper hispidum</i>	Inseticida**	SANTOS, et al., 2010.
	<i>Piper mikanianum</i>	Antiparasitária**	GOMES, et al., 2021.

Nota: *ensaios *in vivo*. ** ensaios *in vitro*.

1.2 O gênero *Piper*.

O gênero *Piper*, dada sua importância medicinal e ecológica é muito estudado devido as suas propriedades farmacológicas e, por séculos tem sido usado no tratamento de várias condições, desde inflamações até doenças mais graves como o câncer. Para o meio ambiente, as plantas desse gênero também são muito importantes, pois algumas espécies são utilizadas para estabelecer um ambiente saudável, ajudando no controle de pragas, a estabilizar a erosão e a melhorar a fertilidade do solo (BARBOSA, et al., 2017). Citando-se como exemplos *Piper umbellatum*, com comprovada atividade antibacteriana (JR. SILVA, et al., 2014). *Piper amalago*, cujo extrato possui atividades diuréticas (NOVAES et al., 2013). E as partes aéreas de *P. nudibaccatum* forneceram arilpropanoides e sesquiterpenos, além de um complexo trímero de arilpropanoide com dois sesquiterpenos (LIU, et. al, 2013). De *Peperomia blanda* foram isolados cromenos, flavonas glicosidadas com atividade antioxidante, lignanas com atividade tripanocida e secolignanas com atividade citotóxica e anti-inflamatória (FELIPPE, et al, 2011), bem como, algumas espécies desse gênero serem importantes recursos alimentares de morcegos, por possuírem alta qualidade energética (MARTINS, et al., 2014).

As investigações relatadas, salientam a importância do gênero, destacando também que o estudo dos constituintes bioativos são a forma mais rápida, menos dispendiosa e com melhores perspectivas de resultados para a obtenção de novos princípios ativos, entretanto, apesar da elevada importância científica, este gênero ainda necessita de pesquisas que demonstrem as suas atividades biológicas e seu potencial de uso (MENDONÇA, 2002; GUIDO, et al., 2010).

No campo da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, a especialidade oncológica também tem despertado o interesse de muitos, devido à deficiência de um arsenal terapêutico abrangente e eficaz. Uma nova alternativa para o tratamento do câncer

é urgente, visto que muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou até mesmo desenvolvem resistência a estes agentes (VECHIA et al., 2009; BARBOSA et al., 2021).

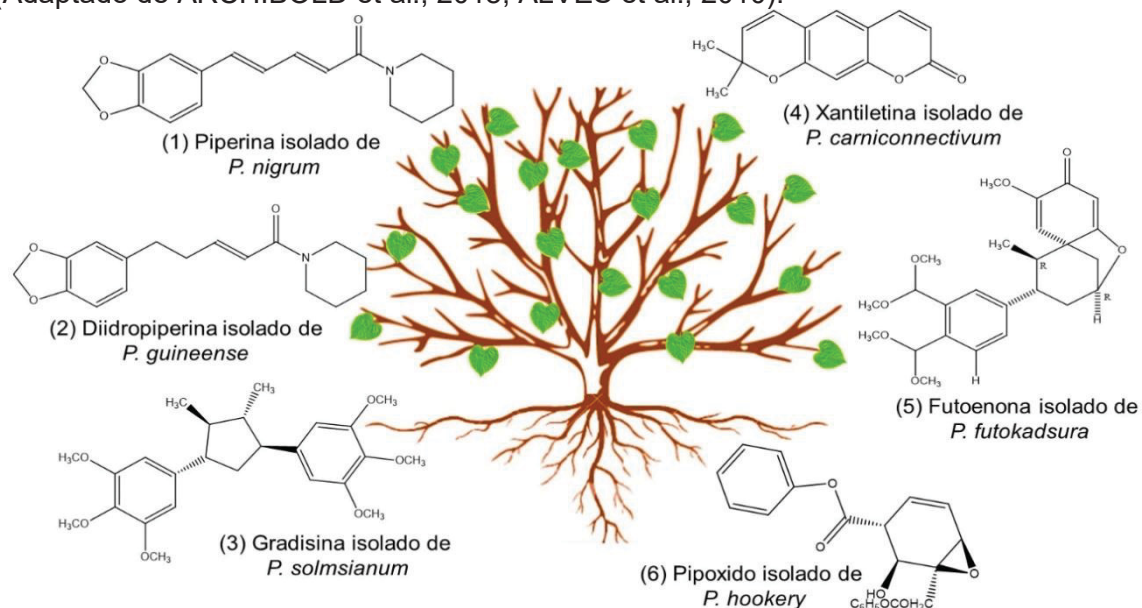
Um exemplo é o estudo de Sacoman e colaboradores (2008), com *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae), que avaliaram a citotoxicidade do extrato bruto em diclorometano, obtido a partir das partes aéreas contra nove linhagens de células humanas de câncer (MCF-7, NCI-ADR/RES, Ovar-3, PC-3, HT-29, NCI-H460, 786-O, UACC-62, K-562) e apresentou atividade antiproliferativa contra todas as linhagens celulares a baixas concentrações (entre 4,0 e 9,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e com seletividade (1,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para linhagens de células de leucemia (K-652), demonstrando potencial atividade anti câncer desse extrato.

Na espécie *Peperomia elongata* H. B. & K. (Piperaceae), os extratos de folhas, caules e raízes, apresentaram ação citotóxica, sendo os extratos de caules os mais promissores frente às linhagens celulares testadas de câncer humano, podendo assim ser empregado como agente antimitótico (CAMPOS et al., 2007).

Em se tratando de pesquisa e desenvolvimento de inseticidas/larvicidas botânicos, a busca por substâncias que apresentem menores riscos à saúde humana e ao ambiente, vem despertando grande interesse, somado à demanda crescente por produtos isentos de agrotóxicos. Inúmeras são as espécies de plantas que apresentam atividades inseticida ou fungicida (CORRÊA, et al., 2011). Um exemplo é o estudo de Carneiro e colaboradores em 2019, no qual, os autores relatam a atividade antifúngica da espécie *P. mikanianum*, cuja amostra apresentou safrol como composto majoritário, revelando atividade fungicida por contato contra linhagens de *Candida albicans*.

No Brasil existem cerca de 500 espécies do gênero *Piper*, sendo encontradas principalmente em matas úmidas e lugares sombreados como a Amazônia e Mata Atlântica (JARAMILLO, et al., 2001; OLIVEIRA, et al., 2020). Este gênero apresenta-se como planta arbustiva por possuir porte arbóreo, ocasionalmente escandente, suas flores pequenas, podendo ser perfeitas ou imperfeitas, em espigas, com 2-6 estames e 2-4 estigmas (IWAZAKI, et al., 2006). Suas folhas, flores e outras partes são muito utilizadas em diversos tratamentos de enfermidades como, gastrintestinais, anti-hemorrágica, diurética, dores e inflamação. Isso ocorre devido à grande diversidade de classes de compostos isolados do gênero *Piper* tais como: amidas piperidínicas (1) e (2), lignanas (3), cumarinas (4), neolignanas (5), epóxidos de cicloexanos (6), entre outras classes de metabólitos secundários conforme pode ser observado na FIGURA 2 (CELIS, et al., 2008; DURANT-ARCHIBOLD, et al., 2018).

FIGURA 2. EXEMPLOS DE COMPOSTOS ISOLADOS E QUE REPRESENTAM AS PRINCIPAIS CLASSES DE COMPOSTOS ENCONTRADOS NO GÊNERO *Piper* (Adaptado de ARCHIBOLD et al., 2018; ALVES et al., 2010).



Os óleos essenciais de plantas pertencentes a este gênero também são muito estudados, os quais demonstram eficácia no controle de pragas, atuando como biopesticidas, além de possuírem amplas atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antioxidantes, antiparasitárias, analgésicas (SCOTT, et al., 2008; SANTOS, et al., 2012).

O estudo de identificação de compostos do óleo essencial, se constitui em importante tarefa para determinar a composição e as propriedades aromáticas de um óleo essencial, geralmente é realizado através da análise química, que usa técnica como a cromatografia gasosa (CG). Dois trabalhos do nosso grupo de pesquisas com *P. cubataonum*, *P. xylosteoides*, *P. hemmendorffii* e *Manekia obtusa* envolveram análises por técnicas de cromatografia em fase gasosa mono e bidimensional, nos quais relataram a presença de inúmeros compostos voláteis presentes no gênero *Piper* (SANTOS, et. al, 2014; SALOME 2015).

Os compostos voláteis presentes em óleo essencial contribuem para o aroma, bem como para propriedades medicinais e terapêuticas. No ano de 2010, Ferraz e colaboradores estudaram o efeito do óleo essencial obtido de três espécies de *Piper*, sendo elas: *P. amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides*. Esse estudo indicou que o óleo essencial apresentou propriedades promissoras para o desenvolvimento de novas substâncias acaricidas, reforçando a importância do gênero.

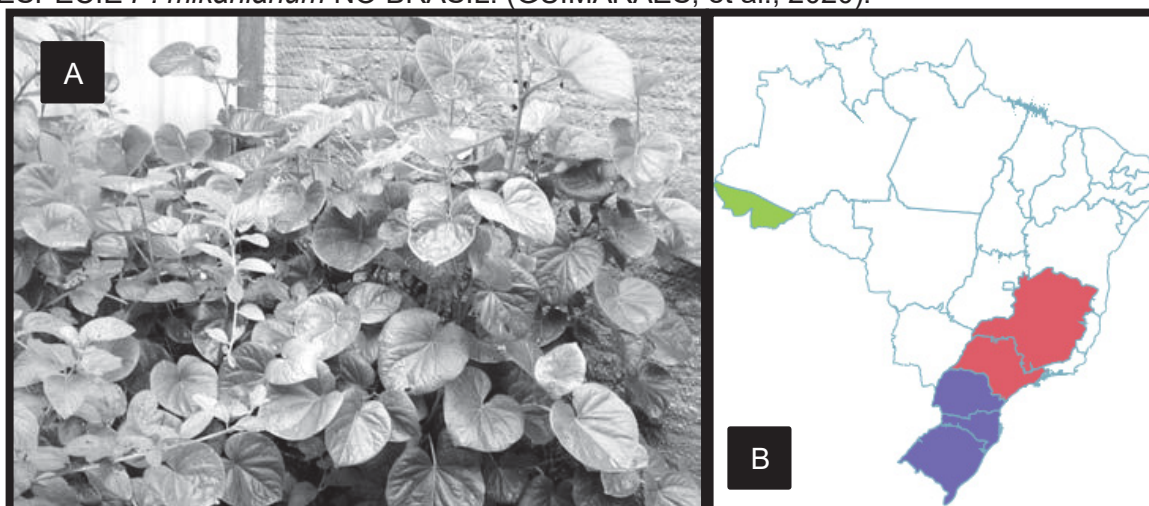
Em 2015, Brait e colaboradores publicaram uma revisão, contendo estudos de análise toxicológica e efeito anti-inflamatório do óleo essencial de folhas de *P. vicosanum*, na qual relataram que o óleo essencial apresentou atividade anti-inflamatória, podendo estar associada à presença de compostos majoritários como o limoneno.

Perigo e colaboradores em 2016, determinaram a composição dos óleos essenciais, bem como a atividade antibacteriana, de onze espécies de *Piper* de ocorrência na Floresta Atlântica. A inibição de *E. coli* foi atribuída aos sesquiterpenos, enquanto os monoterpenos foram associados à inibição de *S. aureus*.

1.3 *Piper mikanianum*

Levando-se em conta a diversidade de espécies encontradas no gênero *Piper*, é possível destacar a espécie *P. mikanianum* como pode ser visto na (FIGURA 3 A), nativa do Rio Grande do Sul, podendo ser encontrada em diferentes regiões do Brasil (FIGURA 3 B) e conhecida popularmente como pariparoba ou jaborandi. Na medicina popular suas folhas, cascas e frutos são utilizados para tratar uma variedade de problemas de saúde. As folhas servem para tratar problemas digestivos, como diarreias, cólicas estomacais e úlceras. Elas também são empregadas no tratamento de doenças da pele, como eczema e acne. As cascas são utilizadas para tratar dores de cabeça, febres, dores musculares e dores nas articulações, podendo ser aplicadas para tratar inflamações e distúrbios da próstata. As raízes são utilizadas para tratar problemas respiratórios, como asma, bronquite e tosse, e no tratamento de vômitos, enjoo e distúrbios menstruais. Além disso, servem como um tônico para o corpo, para melhorar a imunidade e a saúde geral (MENGUE, et al., 2001; SANTOS, et al., 2010; LOPES, et al., 2012; SOARES, et al., 2022).

FIGURA 3. (A) FOLHAS DE *Piper* (DUARTE, et al., 2009) e (B) ENDEMISMO DA ESPÉCIE *P. mikanianum* NO BRASIL. (GUIMARÃES, et al., 2020).



Em 2012, Borella e colaboradores publicaram que os extratos aquosos das folhas de *P. mikanianum* exerceram atividades alelopáticas sobre sementes e plântulas de rabanetes. Tais efeitos estão relacionados à quantidade de compostos aleloquímicos

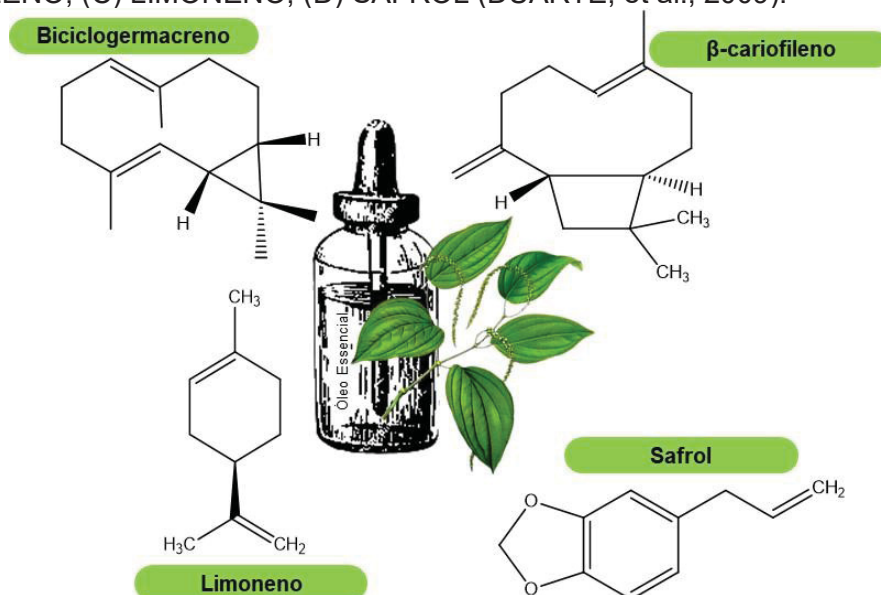
extraídos, porém, nenhum estudo foi realizado sobre o isolamento das substâncias presentes nesses extratos ativos, justificando assim o estudo da espécie.

Em estudos mais recentes, o óleo essencial das folhas de *P. mikanianum* foi testado quanto ao seu potencial antiparasitário, mostrando resultados positivos contra cepas de *Leishmania braziliensis*, porém nenhum estudo foi realizado contra pragas de grãos em armazenamento, o que reitera o estudo com esta espécie. Evidências sugerem que este efeito antiparasitário ocorre devido a um efeito sinérgico entre o composto majoritário safrol e os demais compostos químicos (GOMES, et al., 2021).

Soares, et al., (2022), estudando a composição química e a atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *P. mikanianum* coletada no Rio Grande do Sul, confirmou a presença das substâncias: β -mirceno (17,2%) e biciclogermacreno (26,3%) como principais componentes do O.E, e que o conjunto de substâncias presentes, apresentou capacidade quimiotaxia em um processo de inflamação, sugerindo assim, um alto potencial anti-inflamatório do O.E de *P. mikanianum*.

Em 2010, Duarte e colaboradores e em 2019, Carneiro e colaboradores, relataram em seus estudos sobre a composição química do óleo essencial de *P. mikanianum*, a presença de biciclogermacreno, β -cariofileno, limoneno e safrol (FIGURA 4), e como já mencionado anteriormente, estes constituintes do O.E estão associados aos efeitos terapêuticos apresentados pela espécie *P. mikanianum* (PARMAR, et al., 1997; DICKEL, et al., 2007; DUARTE, et al., 20010). Porém, nenhum estudo na literatura foi encontrado, relatando a variação intraespecífica na composição química do óleo essencial de *P. mikanianum* de diferentes localizações.

FIGURA 4. CONSTITUINTES QUÍMICOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS *Piper mikanianum*. (A) BICICLOGERMACRENO; (B) β -CARIOFILENO; (C) LIMONENO; (D) SAFROL (DUARTE, et al., 2009).



A importância científica da espécie já descrita na literatura fornece informações preliminares sobre o enorme potencial fitoquímico de *P. mikanianum*, os quais estimulam novos estudos sobre a identificação e o isolamento dos constituintes químicos, bem como, avaliação de possíveis atividades, microbianas, inseticida e fungicida.

Portanto, um estudo mais aprofundado é essencial, visto que cada vez mais é necessária a busca por novas substâncias com potenciais biológicos, devido à resistência ou baixa resposta apresentada pelos microrganismos patogênicos frente aos agentes disponíveis no mercado.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os metabólitos secundários voláteis e não voláteis de folhas, caules e raízes de *P. mikanianum*, bem como avaliar o seu potencial biológico.

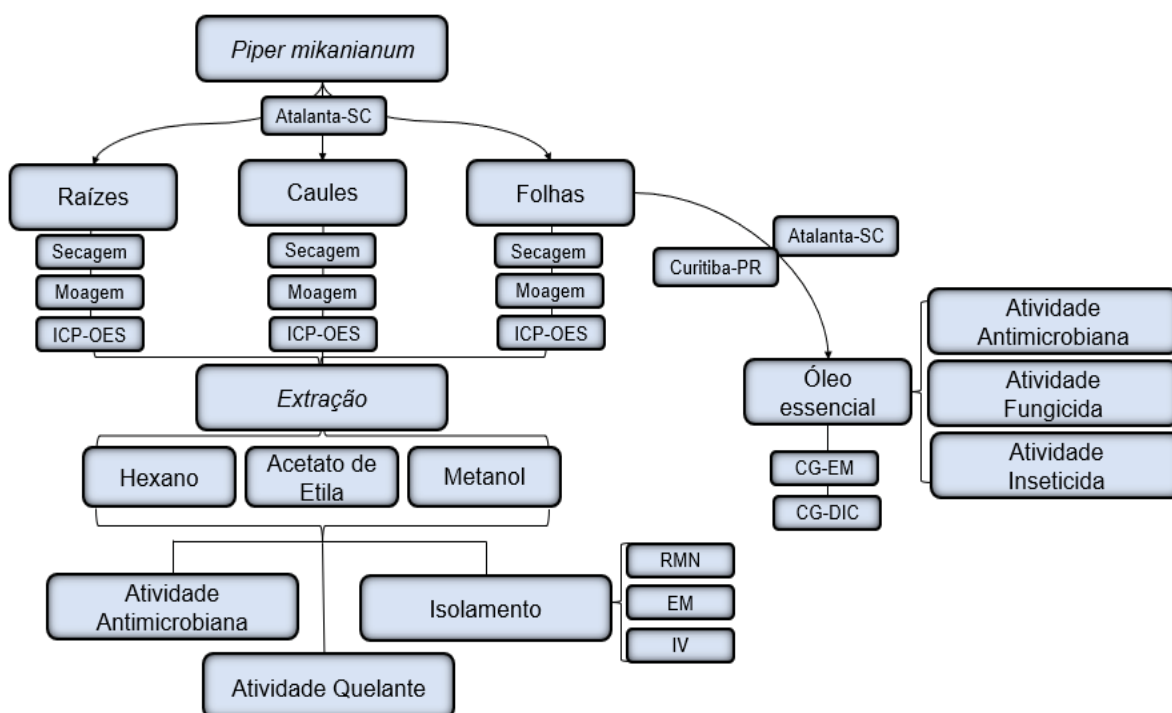
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar, secar e moer as folhas, caules e raízes de *Piper mikanianum*, oriundas de Atalanta-SC e folhas oriundas de Curitiba-PR;
- Identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *P. mikanianum* através de Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e Cromatografia gasosa acoplada a ionização de chamas (CG-DIC);
- Avaliar as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais frente a: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- Avaliar a atividade inseticida e fungicida dos óleos essenciais de *P. mikanianum* e do composto majoritário safrol contra quatro pragas (*Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae*, *Cryptolestes ferrugineus*, *Rhizopertha dominica*) e um patógeno de armazenamento (*Fusarium graminearum*).
- Analisar os elementos presentes nas folhas, caules e raízes de *P. mikanianum*, por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES);
- Realizar a extração das folhas, raízes e caules, partição, fracionamento, isolamento dos metabólitos secundários não voláteis dos extratos de *P. mikanianum*;
- Avaliar a atividade quelante de cálcio dos extratos brutos de *P. mikanianum*;
- Avaliar a atividade bactericida e bacteriostática dos extratos brutos de *P. mikanianum*, frente a: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. Coli*, *Enterococcus faecalis*;
- Realizar a identificação dos constituintes isolados utilizando os métodos espectrométricos e espectroscópicos: Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas referentes ao desenvolvimento desse estudo estão resumidas no fluxograma da FIGURA 5.

FIGURA 5. FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS.



Fonte: O autor (2023).

3.1 Coleta e identificação do material botânico

A coleta do material vegetal (folhas, caules e raízes) da espécie em estudo foi realizada na Apremavi - Associação de Preservação do Meio Ambiente e da Vida em Atalanta - SC, sob a supervisão do Prof. Ricardo Rabelo – FURB. A exsicata (FURB6170) foi depositada no Herbário da Universidade Regional de Blumenau (FURB), a coleta foi realizada no mês de maio de 2019.

Já o material vegetal (folhas) de *P. mikanianum*, foi coletado na cidade de Curitiba-Paraná, na floresta da Universidade Federal do Paraná, campus Jardim Botânico, sob orientação do Prof. Diones Krinski. A exsicata (TANG 6868) foi depositada no Herbário de Tangará da Serra, da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), a coleta foi realizada no mês de maio de 2023.

3.2 Secagem e moagem do material vegetal

Após a coleta do material vegetal da espécie em estudo, foi realizada a pré-secagem à sombra (FIGURA 6 A, B e C), em temperatura ambiente e posteriormente em estufa de ar circulante (marca Olidet CZ) a 40 °C, sendo em seguida triturado em micro moinho (marca Tecnal TE-648).

FIGURA 6. (A) CAULES, (B) RAÍZES E (C) FOLHAS DE *P. mikanianum*.

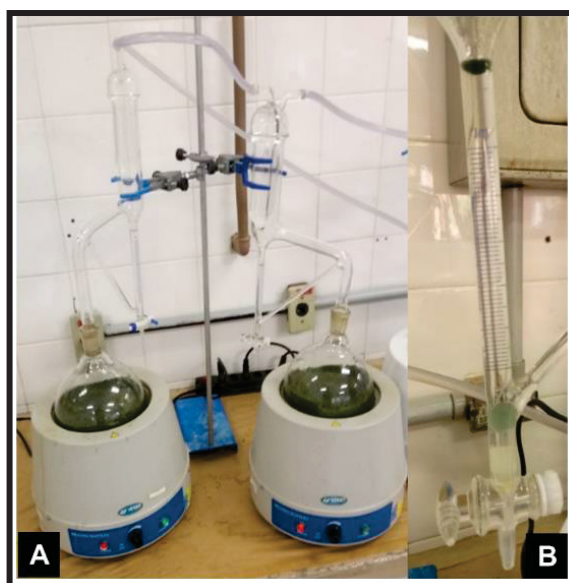


Fonte: O autor (2023).

3.3 Obtenção de óleo essencial e identificação dos metabólitos secundários voláteis.

As folhas secas (50,00 g) foram adicionadas a 1000 mL de água destilada e então, submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, por 4h, em triplicata (FIGURA 7A). Após cada obtenção, o óleo essencial foi coletado (FIGURA 7B) e separado do hidrolato (3 x 3mL) com hexano ultrapuro.

FIGURA 7. (A) APARELHO DE CLEVENGER MODIFICADO E (B) ÓLEO ESSENCIAL DE *P. mikanianum*.



Fonte: O autor (2023).

As análises dos óleos essenciais foram realizadas em cromatógrafo de fase gasosa (Shimadzu modelo GC-2010 Plus), acoplado a detector de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus para análises de amostras líquidas. Para a análise por CG-EM a amostra foi diluída a 1% (m/v) em hexano e caracterizada utilizando as seguintes condições de análises: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), e 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.

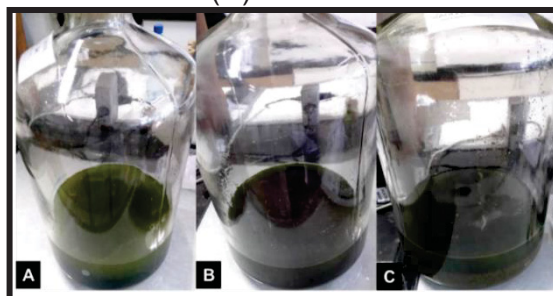
Foram injetados 1 μ L de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 0 °C, com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 250 °C

Os componentes do óleo essencial foram identificados com base no índice de retenção (IR) e determinados por intermédio de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados contendo entre 8 e 24 átomos de carbono, injetados nas mesmas condições cromatográficas (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963). Através do programa interpretativo automático, os espectros de massas dos constituintes detectados foram comparados com os espectros existentes na biblioteca de massas NIST 02 e na análise visual comparativa com os espectros de massas da literatura ADAMS (2017).

3.4 Obtenção dos extratos brutos

O material vegetal (folhas 403,57 g; caules 535,70 g e raízes 682,32 g) foi submetido à extração a frio com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (Anidrol), acetato de etila (Alphatec) e metanol (Dipa), com renovação de solvente em intervalos de 24 horas (FIGURA 8 A, B e C), até a exaustão da extração dos metabólitos secundários, verificada por meio de análises por cromatografia em camada delgada (CCD) e, posteriormente o resíduo remanescente foi desprezado. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo (Fisatom-810) à pressão reduzida e temperatura de 40 °C, e em seguida mantidos em dessecador.

FIGURA 8. EXTRAÇÃO DAS FOLHAS DE *P. mikanianum* UTILIZANDO OS SOLVENTES: (A) HEXANO (B) ACETATO DE ETILA (C) METANOL.



Fonte: O autor (2023).

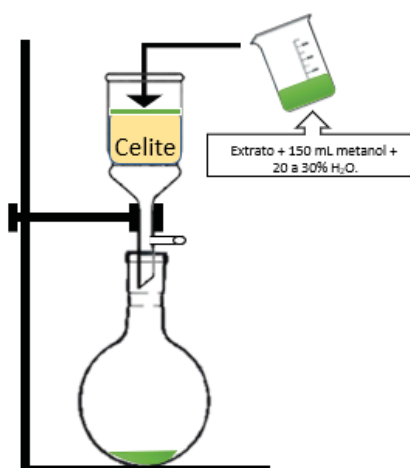
3.5 Fracionamento dos extratos brutos

3.5.1 Cromatografia Líquida a Vácuo

3.5.1.1 Remoção da Clorofila

Para a eliminação da clorofila presente nos extratos brutos de folhas e caules, foi empregado o método já bem consolidado na literatura (FERNANDES et al., 1997). Inicialmente foram pesados 10,00 g dos extratos brutos secos, e foram diluídos em 150 mL de metanol, posteriormente foram adicionados de 20 a 30% de água, para que ocorresse a floculação da clorofila, permitindo assim a separação da mesma por filtração em uma coluna de celite, conforme pode ser observado na FIGURA 9.

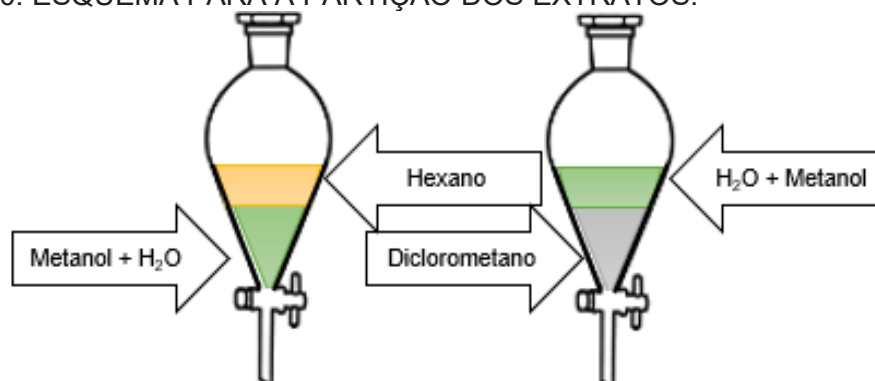
FIGURA 9. SISTEMA DE FILTRAÇÃO LÍQUIDA A VÁCUO PARA A RETIRADA DA CLOROFILA.



Fonte: O autor (2023).

Foi realizada a partição do filtrado com diferentes solventes com a finalidade de conseguir a separação dos compostos presentes nos extratos por afinidade com os solventes. O método para a partição envolveu a utilização de funis de separação de 500 mL (FIGURA 10), ao qual foram adicionados 100 mL de hexano e 20 mL de água na solução do extrato em metanol:água, sendo possível verificar a formação de um sistema bifásico. Em seguida houve a separação das duas fases sendo a fase superior a fase hexânica, a qual foi armazenada. A fase metanólica aquosa foi particionada com diclorometano (100 mL). Após nova separação das fases diclorometânica e metanol:água, estas foram armazenadas (COLL AND BOWDEN, 1986).

FIGURA 10. ESQUEMA PARA A PARTIÇÃO DOS EXTRATOS.



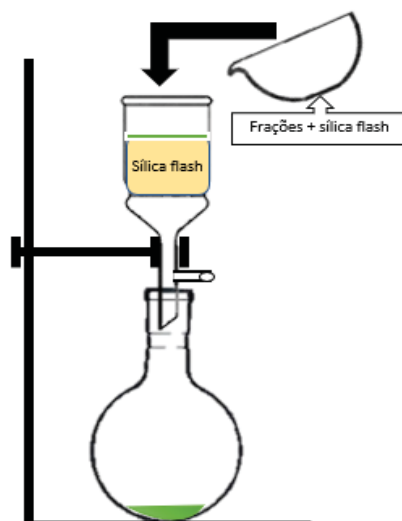
Fonte: O autor (2023).

Após a partição dos extratos, a fração metanol:água foi liofilizada utilizando o equipamento Liotop L101 para a retirada total da água. Do fracionamento total, obteve-se três frações: Fração em hexano (1200 mg), diclorometano (1500 mg) e metanol (1800 mg).

3.5.1.2 Fracionamento das frações utilizando coluna líquida a vácuo.

Consequente à partição, as frações foram inseridas em cadinhos de porcelana e misturadas com 3 a 5 gramas de sílica flash (Macherey-Nagel). Esta mistura foi inserida na parte superior da coluna líquida a vácuo (35 mm de diâmetro), esta, já previamente empacotada com sílica flash, e como fase móvel, foram utilizados os solventes hexano e acetato de etila (COLL AND BOWDEN, 1986). Esta técnica permite um fracionamento rápido, eficiente, bem como, menor volume de solventes e quanto ao aparato utilizado, é simples e universal, conforme pode ser observado por meio da FIGURA 11.

FIGURA 11. SISTEMA DE FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES HEXANO, DICLOROMETANO E METANOL UTILIZANDO COLUNA LÍQUIDA A VÁCUO PREENCHIDA DE SÍLICA FLASH (Dry-column flash).



Fonte: O autor (2023).

Como resultado da coluna Flash realizada com o extrato hexânico das folhas, eluída em acetado de etila, foram obtidas 18 frações, sendo possível a identificação de um composto, já para o extrato em diclorometano foram obtidas 22 frações, identificando-se apenas 2 compostos. O agrupamento das frações não foi possível devido as diferenças significativas apresentadas durante a realização da CCD analítica. O extrato metanólico das folhas, não foi purificado.

3.6 Separação e Identificação dos metabólitos secundários não voláteis

As técnicas espectrométricas e espectroscópicas utilizadas para a identificação das substâncias isoladas foram: Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensional (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC), Infravermelho (IV) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector de arranjo de diodos (PDA 2998) (COLOMBO, et al., 2008; VUKICS, et al., 2010), bem como os métodos de separação: Cromatografia de camada fina preparativa acelerada centrifugamente (Chromatotron) e a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear

As análises para a identificação das substâncias foram realizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os experimentos foram realizados em dois equipamentos, em diferentes frequências. As análises em 200 MHz foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFPR, e as amostras mais promissoras foram encaminhadas para a realização dos experimentos em 400 MHz, para o Centro de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

A obtenção dos espectros foi por meio do espectrômetro Bruker DPX 200 com campo magnético de 4,7 Tesla, (observando os núcleos de ^1H em 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), e/ou Bruker AVANCE III de 9,4 Tesla, observando os núcleos de ^1H (400,13 MHz) e ^{13}C (100,61 MHz), foram realizados experimentos unidimensionais e bidimensionais. Como experimentos bidimensionais foram realizados os mapas de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) e a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC). Os experimentos foram realizados utilizando-se aproximadamente 0,5 mL de solvente deuterado (clorofórmio-*d*, 99,8% Sigma-Aldrich), com tetrametilsilano (TMS 0,05 % v/v) como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, referenciados em relação ao TMS (0,00 ppm). As constantes de acoplamento (*J*) foram expressas em Hertz (Hz), e os espectros foram processados com o software TopSpin (Versão 3.6.2, Bruker Biospin).

3.6.2 Infravermelho com Transformada de Fourier

A técnica de Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) permite inferir sobre os grupos funcionais presentes nas substâncias, que mesmo em misturas

complexas, é possível identificá-los devido às absorções características observadas no espectro gerado.

Para a caracterização das amostras, foram obtidos espectros na região do infravermelho utilizando um espectrofotômetro Bruker – Vertex 70/70V® (DQI-UFPR) em modo de transmitância, as medidas foram realizadas a partir de 32 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} . As amostras foram analisadas utilizando pastilhas de KBr, os espectros foram processados no OriginPro 8.0.

3.6.3 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE)

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram conduzidas em um cromatógrafo de marca WATERS, dotado de bomba quaternária e injetor automático, detector ótico por arranjo de diodos (PDA 2998), utilizando-se uma coluna de fase reversa Kinetex® 5 μm , C18, com dimensões de (250x4,6 mm). Para a fase móvel foram empregados os solventes acetonitrila grau HPLC (Fase A) e água Milli-Q (Fase B), previamente sonicados e filtrados em membrana de poro tamanho 0,45 μm de teflon. Um gradiente de eluição foi utilizado conforme apresentado na TABELA 2. Uma alíquota de 10 μL da solução do extrato em acetonitrila (99,9%) foi injetada após filtração em filtro 0,13 mm de teflon hidrofílico. As análises foram realizadas em triplicatas, e observadas em 254 nm.

TABELA 2 - MÉTODO GRADIENTE UTILIZADO NAS SEPARAÇÕES POR CLAE EM COLUNA C18 ANALÍTICA.

Tempo (min)	Vazão fase móvel ($\text{mL}/\text{min}^{-1}$)	% Acetonitrila (v/v)	% H_2O -Milli-Q (v/v)
0	0,8	40	60
1	0,8	44	56
11	0,8	52	48
46	0,8	100	0
48	0,8	100	0

As análises de CLAE semi-preparativa, foram realizadas em coluna semi preparativa Kinetex 5 μm , de fase estacionária C18, com dimensões de (150x10mm), foi injetado uma massa de 4,5 mg, com volume de injeção de 120 μL . O cálculo de escalonamento da coluna analítica para a coluna semipreparativa, foi realizado através da ferramenta disponibilizada pela própria fabricante da kinetex®. As análises foram conduzidas utilizando-se de um método por gradiente, descritos na TABELA 3.

TABELA 3 - MÉTODO GRADIENTE UTILIZADO NAS SEPARAÇÕES POR CLAE EM COLUNA C18 SEMI-PREPARATIVA.

Tempo (min)	Vazão fase móvel (mL min ⁻¹)	% Acetonitrila (v/v)	% H ₂ O-Mili-Q (v/v)
0	3,8	40	60
1	3,8	44	56
7	3,8	52	48
15	3,8	100	0
16	3,8	100	0

3.6.4 Cromatografia de Camada Fina Preparativa Acelerada Centrifugamente (CHROMATOTRON).

A análise por cromatografia de camada fina preparativa acelerada centrifugamente (CHROMATOTRON) foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química (LAPNEQ) na UFPR – Curitiba, utilizando o equipamento Harrison Research nº 36D, para o preparo do disco utilizou-se como adsorventes 50 g de sílica gel HF-254, 4 g de CaSO₄ e 50 mL de água, a pasta foi adicionada a placa de vidro sinterizado.

A solução da amostra foi inserida no centro do disco giratório já equilibrado com o solvente hexano. A eluição com o solvente gerou bandas circulares de separação dos componentes que foram coletadas em balões de fundo redondo. O método de gradiente utilizado na separação por Chromatotron está descrito na TABELA 4.

TABELA 4 - MÉTODO GRADIENTE UTILIZADO NA SEPARAÇÃO POR (CRHOMATOTRON).

% Hexano (v/v)	% Diclorometano (v/v)	% Acetona (v/v)
100	-	-
99	1	-
95	5	-
90	10	-
80	20	-
50	50	-
30	70	-
10	90	-
-	100	-
-	50	50
-	-	100

3.6.5 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa – (CCDP)

Para o preparo das placas de cromatografia em camada delgada preparativa, foi utilizado uma suspensão formada por 15,00 g de sílica gel 60 PF₂₅₄ (Macherey-Nagel) em 30 mL de água destilada, dispersa sobre placas de vidro (20x20 cm) com o auxílio de espalhador, na espessura de 1,00 mm. As placas foram então secadas em temperatura ambiente, e depois ativadas em estufa (110 °C por 60 minutos). Posteriormente, as placas

foram mantidas em estufa a 40 °C. Nas separações cromatográficas, até 20 mg de amostra foram aplicadas em uma única placa, e amostras com maior massa foram distribuídas em duas ou mais placas preparativas.

A revelação das placas cromatográficas foi realizada por meio da visualização sob a luz ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), e para as análises em CCD, também se utilizou os reveladores anisaldeído e vanilina. As frações resultantes da CCDF foram raspadas da placa, filtradas e secas à temperatura ambiente, tendo suas massas determinadas e agrupadas de acordo com as análises de CCD.

3.7 Análise multivariada de dados

A partir dos dados obtidos dos extratos brutos nas análises por CLAE, foi realizada a Análise das Componentes Principais (ACP), utilizando-se o pacote PLS_toolbox 3.0 (EigenvectorResearch, Inc) que opera no *software* Matlab®v.7.0.1 (MathWork Inc)®. Após a análise dos extratos por CLAE, foi gerada uma matriz de dados, a partir das tabelas de identificação e, estas foram submetidas aos procedimentos estatísticos multivariados com valores centrados na média. Visando a redução da dimensão dos dados, foi utilizada a análise das componentes principais para a obtenção e representação simultânea das amostras (*scores*), considerando a composição química dos extratos (*loadings*), a fim de gerar agrupamentos ou separações entre todos eles, e os dados foram centralizados na média.

3.8 Análise elementar (ICP-OES)

Os elementos (Cu, Zn, Ca, Mn, Mo, Fe, Na, Mg, P, S, Ca, K, Co, Se, Li, Ni, Al) foram quantificados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). A curva analítica foi preparada na faixa de concentração de 0,010 a 2,0 mg L⁻¹.

As amostras foram dispersadas em 7 mL de solução de ácido nítrico HNO₃ 4 mol L⁻¹ previamente preparada com água Milli-Q e sonificadas por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo e o volume foi aferido para 50 mL com água Milli-Q. Utilizou-se o espectrômetro (Thermo Scientific modelo ICAP 6500), operando com visão axial e software iTeVa Analyst. Os parâmetros instrumentais se encontram na TABELA 5.

TABELA 5. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS E CONDIÇÕES OPERACIONAIS DO EQUIPAMENTO (ICP-OES).

Parâmetro	Tipo ou valor
Radiofrequência e Potência	40 MHz/1150W
Vazão do gás do plasma	12,0 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,0 L min ⁻¹
Vazão do gás no nebulizador	0,7 L min ⁻¹
Limite de quantificação (LOQ)	10 µg L ⁻¹
Linhas analíticas	Mg (280,3 nm); Mn (257,6 nm); Zn (213,8 nm); Co (238,9 nm); Ni (221,6 nm); Al (396,1 nm); Li (670,7 nm); Na (589,6 nm); K (766,4 nm); S (182,0 nm); P (213,6 nm) Cr (267,7 nm), B (249,6 nm), Cu (324,7 nm), Mo (202,0 nm), Se (196,0 nm), Fe (238,2 nm), Ca (396,8 nm)

Fonte: O autor (2023).

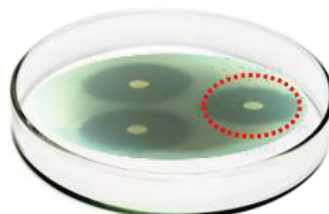
4. Ensaio biológicos

4.1 Atividade antibacteriana

4.1.1 Difusão em Disco

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *P. mikanianum* de Atalanta-SC, foi realizada pela técnica de disco difusão (FIGURA 12) de acordo com a metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). As cepas de bactéria utilizadas para as análises foram: *Salmonella sp.* (ATCC® 13076™) e *S. aureus* (ATCC® 25923™).

FIGURA 12. ILUSTRAÇÃO DO MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO POR HALO DE INIBIÇÃO.



Fonte: O autor (2023).

As bactérias foram cultivadas no meio caldo Mueller Hinton (Kasvi©) e plaqueadas em ágar Mueller Hinton (Kasvi©). Posteriormente foram transferidas para solução salina (0,85%) até atingir concentração de 10⁸ mL⁻¹ (UFC) unidades formadoras de colônias, equivalente à turvação da solução padrão de McFarland (bioMérieux©) de 0,5 (80% de transmitância). As amostras de óleo essencial (20 µL) de *P. mikanianum* foram

incorporados aos discos brancos estéreis (Laborclin®) e depositadas sobre o ágar Mueller Hinton (25 mL) solidificado e inoculado com os microrganismos (10^8 UFC mL⁻¹). Como controle positivo foram utilizados discos incorporados de Cloranfenicol 30 µg (Laborclin®) e como controle negativo foram utilizados o DMSO e o etanol (diluentes das amostras). As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24h (CLSI 2012). A determinação da inibição do crescimento microbiano foi feita por meio da medida dos halos inibitórios, em milímetros, com paquímetro digital. Os testes foram realizados em triplicatas, sob a supervisão da pesquisadora Maria Lucia Masson ocorridos na usina piloto A, centro politécnico UFPR-PR.

4.1.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

A atividade bacteriana dos extratos brutos de *P. mikanianum* Atalanta-SC, foram avaliadas usando a técnica de microdiluição em caldo, com placas estéreis de 96 poços, (FIGURA 13) de acordo com os *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (COCKERILL et al., 2012). Os extratos foram diluídos em série (7,8–1000 µg mL⁻¹) em caldo Mueller Hinton II para um volume final de 100 µL. Os inóculos bacterianos foram preparados em solução salina 0,85% a partir de uma cultura de placas com turbidez equivalente à escala McFarland 0,5 ($\sim 1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Esta suspensão foi então diluída 1:20 ($\sim 5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹) e 10 µL foram adicionados a cada poço. Como controle positivo, foi utilizado o agente antimicrobiano gentamicina (0,25–32 µg mL⁻¹). Como controle negativo, os microrganismos foram tratados com 1% de DMSO e como indicador de atividade biológica foi utilizado o corante resazurina (PRABST, et al., 2017).

As placas foram incubadas invertidas por 18 h a 35 ± 1 °C em estufa. Para posterior determinação da CIM, considerou-se o extrato inibidor o que causou a total eliminação do crescimento bacteriano quando observado a olho nu e/ou com a ajuda do corante resazurina, os resultados foram expressos em microgramas por mililitro (µg mL⁻¹) (PESSINI et al., 2003).

FIGURA 13. ILUSTRAÇÃO DA PLACA ESTÉRIL DE 96 POÇOS.



Fonte: O autor (2023).

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 microrganismo. Posteriormente, as placas foram incubadas a 36 °C por 24 a 48 h para as bactérias. A CBM é 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.

As cepas de bactéria utilizadas para as análises foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC® 27853™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212™), *Salmonella choleraesuis* (ATCC® 10708™), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 14990™) e, a levedura *Candida albicans* (ATCC® 96901™).

4.2 Atividade Inseticida e Fungicida

4.2.1 Criação dos insetos

As espécies de gorgulho, *Sitophilus zeamais* L. e *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), foram obtidos a partir da criação-estoque mantida no laboratório de entomologia Prof. Ângelo Moreira da Costa, seguindo a metodologia proposta por Zimmermann et al. (2021). Para a execução dos experimentos foram utilizados insetos adultos não-sexados com idade entre 3 e 8 dias.

Foram realizadas coletas de grãos de milho (*Zea mays*) (Poaceae) na região metropolitana de Curitiba, PR, Brasil com sinais de infestação de pragas de armazenamento. Após a coleta do material, as espécies *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Cucujidae) e *Rhizopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) foram isoladas dos demais insetos e mantidos separadamente.

A metodologia de criação adotada para *C. ferrugineus* foi proposta por Giunti et al. (2019), com modificações. Os insetos foram mantidos em recipientes plásticos com capacidade para 500 mL, vedados com tampa, contendo a mistura de farinha de milho (fubá) e gérmen de trigo (3:1, m:m), além de fragmentos de grãos de milho. Foram utilizados insetos adultos não-sexados com idade entre 4 a 10 dias. Para a espécie *R. dominica* foi adotada a metodologia proposta por Kanda et al. (2017), com modificações. Os insetos adultos foram mantidos em recipientes com capacidade para 1000 mL, vedados com tampa, contendo 400 g de grãos de milho e a mistura de farinha de milho e gérmen de trigo (5:1, g:g). Foram utilizados insetos adultos não sexados com idade entre 5 a 12 dias. Ambas as espécies foram mantidas em condições controladas, com 25 ± 1 °C, 60 ±

5% U.R. e com fotoperíodo de 12 h com luz e sem iluminação (L:D), mantidas em câmaras de BOD.

4.2.2 Isolado fúngico e preparação do inóculo

Foi utilizado o isolado de *Fusarium graminearum* CMRP31599, obtido da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense Taxonline (UFPR), sendo multiplicado em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA - Kasvi). Para o preparo do inóculo, o isolado foi incubado em estufa *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ e 12 h de fotofase, por 7 dias.

4.2.3 Atividade inseticida contra pragas de armazenamento

O efeito inseticida foi avaliado pelo método de fumigação por ser o método mais eficaz contra pragas de armazenamento (CHANG et al., 2017). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 tratamentos x 4 pragas), com 3 repetições. Os tratamentos foram: 1) O.E. de *P. mikanianum* (PR), 2) *P. mikanianum* (SC), 3) composto majoritário isolado safrol, na concentração de 10%, que corresponde a $138,38 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar, diluído em acetona, 4) controle negativo acetona (pura – 100%) e 5) controle positivo - inseticida sintético Pirimifós-metilíco (Actellic 500 EC) 16 mL L^{-1} (BALIOTA et al., 2022). A repetição dos tratamentos foi composta por 20 insetos para cada espécie, sendo o experimento repetido 4 vezes no tempo ($n=240/\text{tratamento}$).

Foram pipetados 200 μL de cada tratamento em recipiente com capacidade para 145 mL, contendo papel filtro, em seguida os tratamentos foram mantidos em temperatura ambiente por 7 min para evaporação da acetona, e posteriormente vedados e acondicionados em BOD a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e 12 h de fotofase. A avaliação da mortalidade foi realizada após 48 horas da aplicação dos tratamentos (ZIMMERMANN et al., 2021).

4.2.4 Atividade fungicida contra *Fusarium graminearum* por volatilização

Para avaliar o efeito fungicida por volatilização contra *F. graminearum*, foi conduzido um experimento em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos, em triplicata. Os tratamentos foram: 1) O.E. de *P. mikanianum* (PR), 2) O.E. de *P. mikanianum* (SC), 3) composto majoritário isolado safrol na concentração de 100% (puro), que corresponde a $120 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar, 4) água destilada autoclavada como controle negativo. Não foi usado controle positivo, pois não há fungicida sintético com modo de ação por

volatilização. A repetição dos tratamentos foi composta por uma placa para cada tratamento, sendo o experimento repetido 3 vezes no tempo.

Foram retirados discos com 8 mm de diâmetro do inóculo de 7 dias, e acondicionados no centro de placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio BDA. No centro da tampa da placa foi colocado um disco de papel filtro (Waterman® #1) de 8 mm de diâmetro, no qual foi pipetado 10 µL de cada tratamento. Em seguida, as placas foram vedadas com plástico polietileno para impedir o escape de metabólitos e acondicionados em BOD a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ e 12 h de fotofase, por 7 dias. Após esse período, foi calculada a média do crescimento do fungo, por duas medidas perpendiculares, utilizando um paquímetro digital.

4.2.5 Atividade fungicida contra *Fusarium graminearum* por contato

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos, em triplicata. Os tratamentos foram: 1) O.E. de *P. mikanianum* (PR), 2) O.E. de *P. mikanianum* (SC), 3) composto majoritário isolado safrol concentração de 1,5% pelo método de contato, 4) água destilada autoclavada como controle negativo. 4) controle negativo utilizando apenas o meio de cultura RPMI1640 (INLAB) e 5) controle positivo - fungicida sintético Tiofanato-metílico 700 mg L⁻¹ (Cercobin® 700WP) (AGROFIT, 2022). A repetição foi composta por um poço para cada tratamento, em placas de microdiluição com 96 poços de fundo chato, sendo uma placa por tratamento. O experimento repetido 3 vezes no tempo.

O inóculo de *F. graminearum* de 7 dias foi raspado e diluído em meio de cultura RPMI1640 até a concentração de 4×10^4 conídios mL⁻¹. Os tratamentos foram diluídos no meio de cultura RPMI1640 até a concentração de 3%. Posteriormente, foram pipetados 100 µL do fungo e de cada tratamento em placas de microdiluição de 96 poços com fundo chato, obtendo as concentrações finais de 2×10^4 conídios mL⁻¹ para o isolado de *F. graminearum* e 1,5% para os tratamentos. Em seguida, as placas foram mantidas em BOD a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ 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) (ZIMMERMANN et al., 2021).

4.2.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Foi conduzido um experimento para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de contato. Os tratamentos foram os O.E. de *P. mikanianum* (PR), *P. mikanianum* (SC) e o composto majoritário isolado Safrol, nas concentrações de 0,25% até

1,75%, com intervalo de 0,25% entre elas. O meio de cultura RPMI1640 foi usado como controle negativo. A metodologia e delineamento utilizados foram os mesmos descritos no tópico anterior. O valor do CIM foi determinado como a menor concentração em que não houve alteração na coloração (SOUZA et al., 2020).

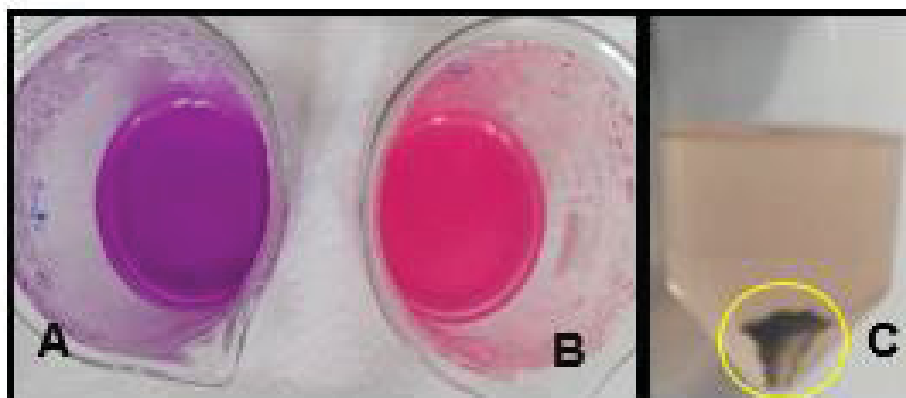
4.3 Atividade quelante de cálcio dos extratos

A capacidade quelante de cálcio foi determinada, segundo Rathore et al. (1993) com pequenas modificações. A uma alíquota de 1 g de amostra de extrato puro, foi adicionado 3 mL de NaOH (1 mol L^{-1}) e 1 mL de CaCl_2 (50 mmol L^{-1}) com agitação constante 150 rpm a 37°C . Posteriormente, um indicador (murexida) foi incorporado e a mistura foi titulada com EDTA $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ até a mudança de cor de rosa para roxo (FIGURA 14) (registrou-se o volume de EDTA gasto, sendo este V_1). Sequencialmente, foi adicionado etanol absoluto até a turbidez, seguido de centrifugação a $6,44 \times g$ por 1 h. O precipitado foi removido, dissolvido em água destilada (1 mL) e adicionado novamente com um indicador de murexida (25 μL). A solução foi titulada mais uma vez com EDTA até o ponto de viragem (roxo), enquanto o volume de EDTA gasto correspondeu ao volume de cálcio ligado (V_2), todas as análises foram realizadas em triplicata.

A equação 1 expressou a capacidade quelante dos íons cálcio.

$$\text{Capacidade Quelante de } \text{Ca}^{2+}\% = \left(\frac{V_2}{V_1} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

FIGURA 14. ILUSTRAÇÃO DA MUDANÇA DA COLORAÇÃO DA AMOSTRA (A) ANTES DA TITULAÇÃO E (B) APÓS A TITULAÇÃO, DEVIDO À PRESENÇA DO INDICADOR MUREXIDA, E (C) APÓS CENTRIFUGAÇÃO.

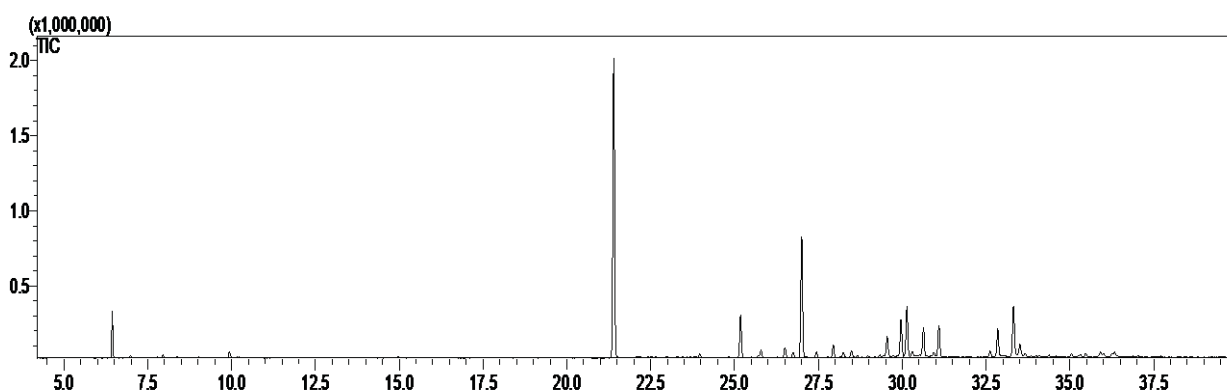


5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Óleo essencial: Constituintes químicos das folhas secas de *P. mikanianum*, coletadas em Atalanta - Santa Catarina.

O cromatograma da Figura 15 representa a análise do OE obtido por hidrodestilação, das folhas secas de *P. mikanianum* coletadas em Atalanta - SC. A integração dos picos no cromatograma visando a identificação dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas secas de *P. mikanianum* foi realizada com base na área dos picos em relação a área total do cromatograma. As análises foram realizadas em triplicata, possibilitando a identificação de 29 compostos, conforme pode ser observado na TABELA 6.

FIGURA 15. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO, DAS FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* COLETADAS EM ATALANTA – SC.



O rendimento do óleo essencial das folhas secas de *P. mikanianum* foi de 3,36%, sendo possível identificar 97,41% de seus componentes. Tendo como compostos majoritários, o arilpropanoide safrol, e o monoterpene α -pineno, o sesquiterpene β -cariofileno, e o viridifloreno, representando respectivamente uma porcentagem de 30,46%, 6,94%, 12,73% e 10,50%, e suas estruturas química estão representadas na FIGURA 16. A concentração observada neste estudo, do composto majoritário safrol, difere de valores de relatos da literatura, porém reforça a presença do arilpropanoide safrol como sendo majoritário no óleo essencial das folhas de *P. mikanianum* de Santa Catarina. No ano de 2002, Abreu e colaboradores ao estudarem a identificação do óleo essencial das folhas secas de *P. mikanianum* da região de Santa Catarina - Brasil relataram a presença do composto safrol com mais de 80% no O.E.

Cysne e colaboradores (2005) ao estudarem os óleos essenciais de quatro espécies de *Piper* (*P. arboreum*, *P. crassinervium*, *P. dilatatum* e *P. tuberculatum*), relataram a presença de inúmeros compostos da classe dos sesquiterpenos em sua composição química. Por meio da identificação é possível verificar a presença de 43,68% de sesquiterpenos, e de 30,46% de arilpropanoides, estes resultados condizem com os estudos relatados para o gênero *Piper*, e confirmam o óleo essencial deste gênero como fonte alternativa de substâncias das classes dos sesquiterpenos e de arilpropanoides.

Outros estudos envolvendo diferentes famílias de plantas, relatam a presença de sesquiterpenos em óleos essenciais, como o de Ghelardini e colaboradores (2001), no qual os autores ressaltam a importância do estudo de óleos essenciais, indicando a presença do sesquiterpeno β -cariofileno como um dos principais constituintes do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* da família Myrtaceae, e que doses de 10^{-4} a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ desse composto, pode reduzir drasticamente as contrações eletricamente evocadas do hemidiafragma frênico de ratos. Já em 2019, Zahra e colaboradores ao estudarem os óleos essenciais de duas espécies de *Scutellaria* do Irã, verificaram a presença de 88 compostos e sua maioria eram pertencentes à classe dos sesquiterpenos, confirmando a presença desta classe de metabólitos em O.E. e associando estas substâncias com inúmeras atividades biológicas.

FIGURA 16. ESTRUTURAS QUÍMICA DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO, DAS FOLHAS DE *P. mikanianum* COLETADAS EM ATALANTA-SC.

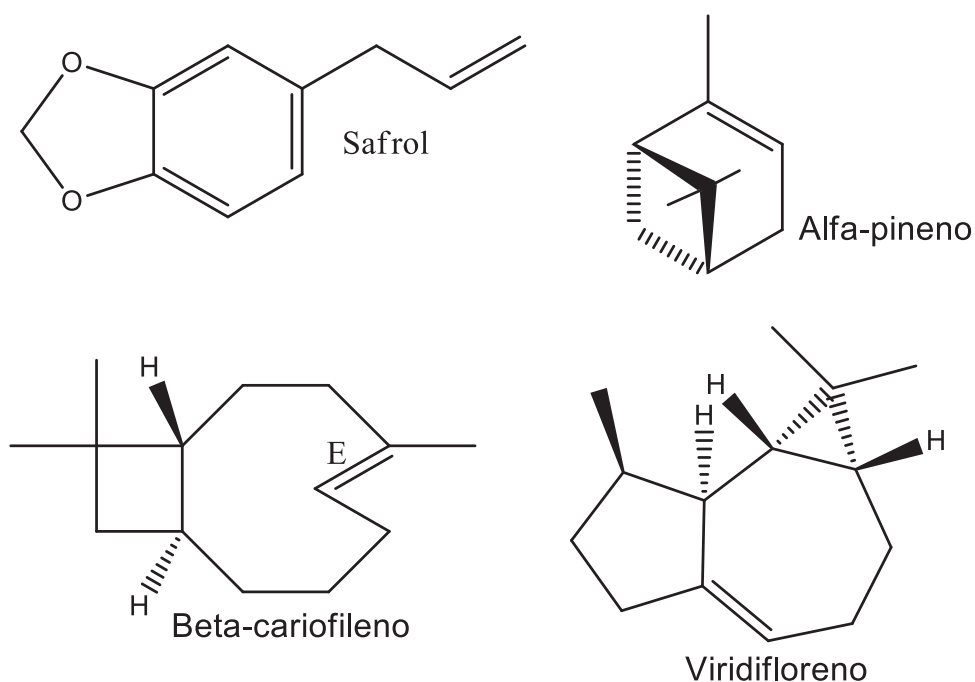


TABELA 6. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* COLETADO EM ATALANTA – SC, OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO

<i>Piper mikanianum</i> – Atalanta -SC						
Nº	Tr	¹ IA cal	² IA lit	Compostos	Concentração (%)	DP
1	6,442	931	932	α-Pineno	6,94	±2,79
2	6,988	945	946	Canfeno	0,24	±0,06
3	7,950	974	974	β-Pineno	0,75	±0,56
4	8,372	989	988	Mirceno	0,29	±0,10
5	9,933	1026	1024	Limoneno	1,22	±0,44
6	21,399	1287	1285	Safrol	30,46	±2,31
7	23,961	1345	1348	α-Cubebeno	0,40	±0,05
8	25,178	1370	1374	α-Copaeno	4,12	±0,90
9	25,787	1387	1389	β-Elemeneno	1,03	±0,13
10	26,503	1403	1409	α-Gurjuneno	1,09	±0,24
11	27,003	1413	1417	β-Cariofileno	12,73	±2,21
12	27,441	1422	1430	β-Copaeno	0,62	±0,13
13	27,948	1437	1437	α-Guaieno	1,33	±0,19
14	28,242	1442	1439	Aromadendreno	0,45	±0,07
15	28,488	1446	1452	α-Humuleno	0,75	±0,05
16	29,549	1474	1478	γ-Muuroleno	2,31	±0,23
17	29,963	1490	1496	Viridifloreno	10,50	±2,11
18	30,140	1494	1500	Biciclogermacreno	0,52	±0,01
19	30,631	1507	1505	<i>E,E,α</i> -Farneseno	4,29	±0,10
20	31,094	1518	1513	γ-Cadineno	2,60	±0,09
21	32,620	1552	1559	Germacreno B	0,71	±0,05
22	32,846	1562	1561	Nerolidol	5,28	±0,30
23	28,679	1569	1567	Palustrol	5,57	±0,29
24	33,318	1574	1577	Espatuleno	1,62	±0,09
25	33,506	1579	1582	Oxido cariofileno	0,20	±0,02
26	33,666	1594	1590	Copaen-4-α-ol	0,39	±0,01
27	35,040	1599	1600	Guaiol	0,27	±0,01
28	35,319	1630	1629	Eremoligenol	0,40	±0,02
29	35,910	1639	1640	epi-α-Muurolol	0,30	±0,01
Total identificado:					97,41	±0,057

Nota:¹Índice aritmético calculado. ²Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017). DP -Desvio padrão. São destacados em negrito os compostos majoritários.

5.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas secas de *P. mikanianum* coletadas em Atalanta - SC.

Na TABELA 7 estão apresentados os resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas secas de *P. mikanianum*. Devido a simplicidade e o baixo custo, o método de difusão em disco leva vantagens quando comparado com outros métodos, e tem sido amplamente utilizado para avaliar óleos essenciais frente aos microrganismos.

Em questão de efetividade, o óleo essencial de *P. mikanianum*, apresentou halos de inibição frente as bactérias *S. aureus* (gram-positiva) e *Salmonella tiphy* (gram-negativa), 8,87 mm e 6,66 mm, respectivamente e de modo geral, a bactéria gram-positiva *S. aureus* foi a mais inibida, em comparação com a inibição do antibiótico cloranfenicol. Isto pode ser explicado pelo fato de que as bactérias gram-positivas não possuem uma membrana externa em sua estrutura, e com isto, apresentam menor resistência aos mecanismos de permeabilidade (BRUL AND COOTE 1999; GUIMARÃES et al., 2010).

Segundo Alves e colaboradores (2016), ao estudarem a atividade antimicrobiana e a concentração inibitória mínima de inúmeros extratos do gênero *Piper*, relataram em seu estudo, que quase metade dos extratos testados foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, com halos de inibição variando entre 8 e 16 mm, resultados bem semelhantes aos encontrados neste estudo, o que corrobora e confirma o potencial do óleo essencial de *P. mikanianum*, frente aos microrganismos testados.

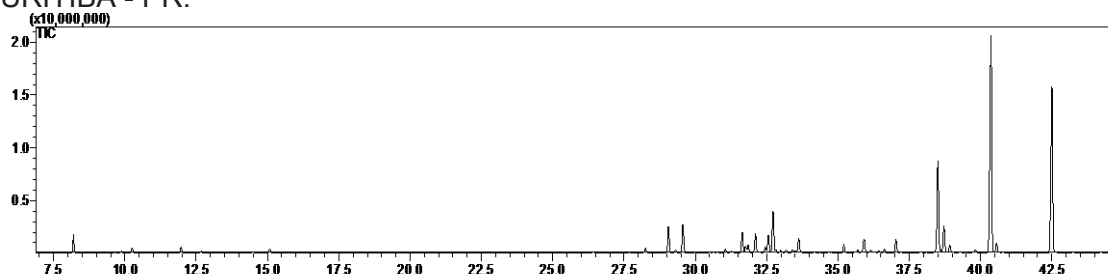
TABELA 7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* ATALANTA - SC.

Planta	Concentração (µL)	Diâmetro dos halos (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella tiphy</i>
<i>Piper mikanianum</i>	20 µL Óleo essencial	9,28	6,48
	20 µL Óleo essencial	9,02	7,15
	20 µL Óleo essencial	8,33	6,37
	Média	8,87±0,49	6,66±0,42
	Controle (Cloranfenicol)	28,88	28,94

6. Óleo essencial: Constituintes químicos das folhas secas de *Piper mikanianum*, coletadas em Curitiba – Paraná.

O cromatograma da Figura 17 representa a análise do OE, obtido por hidrodestilação, das folhas secas de *P. mikanianum* coletadas na cidade de Curitiba. A integração dos picos observados no cromatograma, visando a identificação dos constituintes químicos do óleo essencial, foi realizada com base na área dos picos em relação a área total do cromatograma, permitindo a identificação de 30 compostos, conforme pode ser observado na TABELA 8. A obtenção do OE foi realizada em triplicata e o rendimento calculado foi de 1,37%.

FIGURA 17. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO DAS FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* COLETADAS EM CURITIBA - PR.



Foram identificados 91,35% dos componentes do OE, sendo majoritários, ciccolorenona, eudesm-7(11) -en-4-ol, 4,6-dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodioxido (FIGURA 18), nas concentrações de 27,21%, 20,46% e 13,69%, respectivamente.

Em 2018, Krinski e colaboradores, ao estudarem a toxicidade dos óleos essenciais de 18 espécies da família Piperaceae sobre ovos da lagarta da soja, *Anticarsia gemmata*, destacaram dentre as espécies, o óleo essencial de *P. mikanianum* oriundos do Paraná, o qual apresentou os mesmos compostos majoritários encontrados no OE deste estudo.

FIGURA 18. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADO NO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO POR HIDRODESTILAÇÃO DAS FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* COLETADA EM CURITIBA – PR.

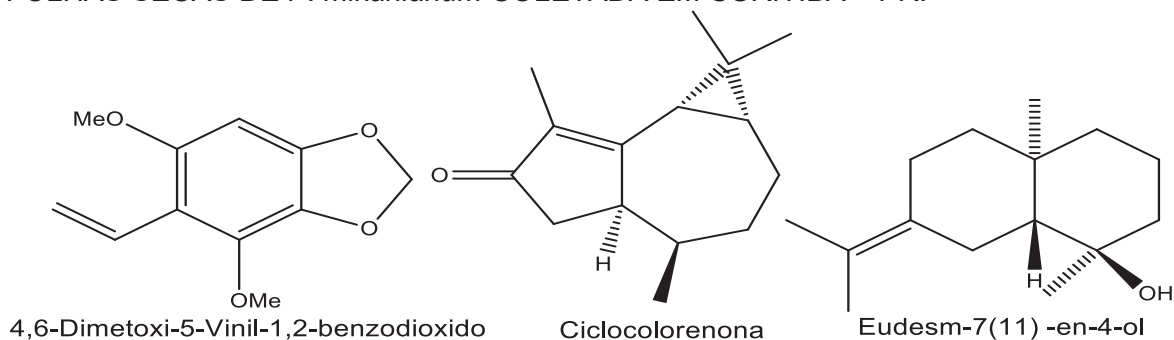


TABELA 8. ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* COLETADO EM CURITIBA – PR.

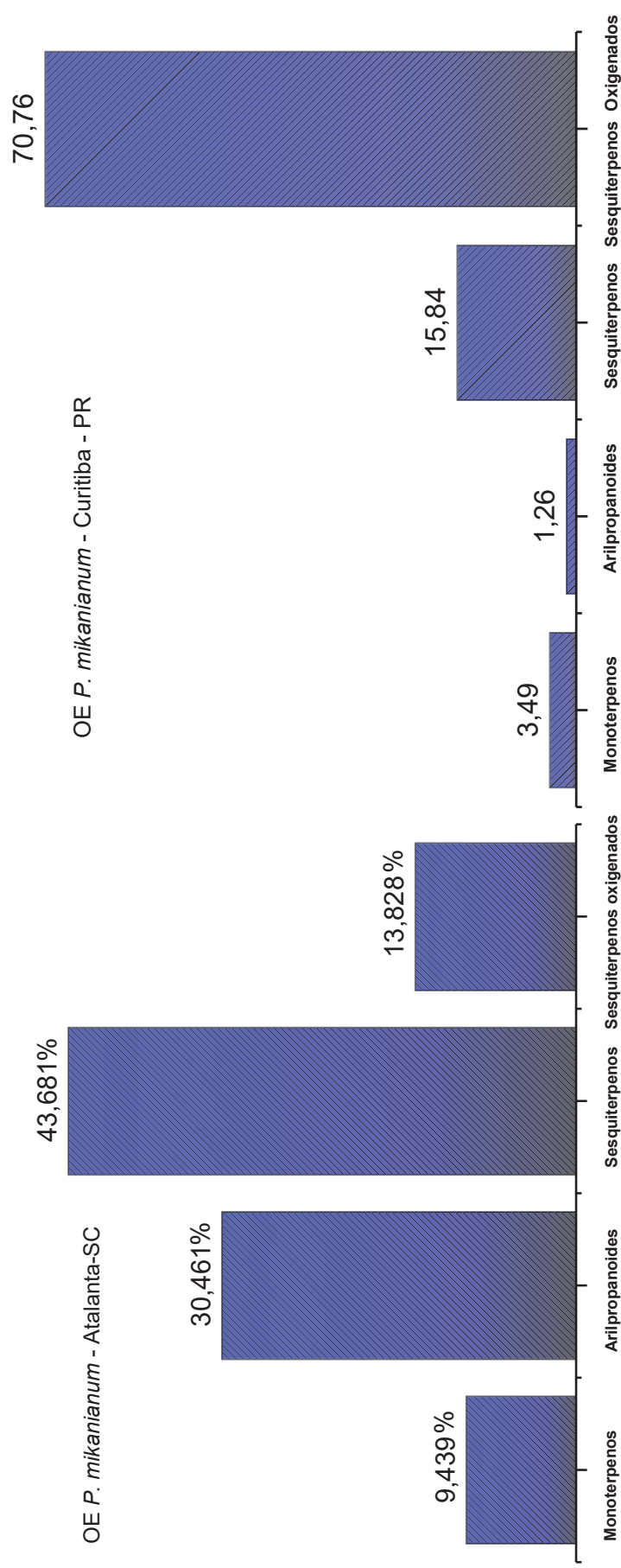
<i>Piper mikanianum</i> – Curitiba-PR						
Nº	Tr	¹ IR cal	² IR lit	Compostos	Concentração	DP
1	9,878	979	974	β-pineno	0,24	±0,00
2	10,255	989	988	Mirceno	1,5	±0,00
3	10,997	1007	1008	3-delta-Careno	0,09	±0,00
4	11,973	1030	1024	Limoneno	0,66	±0,02
5	12,684	1046	1044	(E)-β- Ocimeno	0,25	±0,01
6	14,494	1086	1085	p-Menta-2,4(8)-dieno	0,15	±0,00
7	15,075	1100	1095	Linalool	0,6	±0,01
8	23,852	1290	1285	Safrol	1,26	±0,06
9	28,257	1390	1389	β-Elemeneno	0,32	±0,02
10	29,063	1409	1409	α-Gurjuneno	2,29	±1,02
11	31,056	1457	1452	α-Humuleno	0,3	±0,00
12	32,112	1483	1478	γ-Muuroleno	2,12	±1,00
13	32,453	1491	1483	α-Amorfeneno	0,56	±0,19
14	32,560	1493	1492	cis-β-Guaieno	1,83	±0,70
15	32,729	1497	1500	Biciclogermacreno	4,87	±0,25
16	32,831	1500	1500	α-Muuroleno	0,33	±0,23
17	33,182	1509	1505	(E,E)-α-Farneseno	0,25	±0,01
18	33,414	1515	1511	γ-Amorfeneno	0,38	±0,01
19	33,499	1517	1513	γ-Cadineno	0,32	±0,10
20	33,627	1520	1522	Delta-cadineno	1,70	±0,09
21	35,213	1560	1561	(E)-Nerolidol	1,31	±0,05
22	35,694	1572	1567	Palustrol	0,45	±0,02
23	35,924	1578	1574	Germacreno D-4-ol	2,01	±0,29
24	36,154	1584	1582	Oxido de Cariofileno	0,38	±0,00
25	37,907	1630	1627	1- <i>epi</i> -Cubenol	0,19	±0,00
26	38,520	1647	1653	4,6-Dimetoxi-5-Vinil-1,2-benzodioxido	13,69	±2,05
27	38,723	1652	1656	α-Bisabolol oxido B	4,22	±1,26
28	38,928	1657	1658	Gimnomitrol	1,41	±0,37
29	40,366	1696	1700	Eudesm-7(11) -en-4-ol	20,46	±2,36
30	42,530	1757	1759	Ciclocolorenona	27,21	±3,62
Total identificado:					91,35	±0,06

Nota: ¹Índice de retenção calculado. ²Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2017). DP -Desvio padrão. São destacados em negrito os compostos majoritários.

7. Comparação entre as identificações dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de *P. mikanianum*, de Atalanta – SC e Curitiba – PR.

Nota-se uma variação na classe dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *P. mikanianum* de Santa Catarina quando comparada com o do Paraná, conforme pode ser observado na FIGURA 19.

FIGURA 19. GRÁFICO DAS CLASSES DE COMPOSTOS IDENTIFICADAS NO O.E DE FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* COLETADAS EM ATALANTA - SC E CURITIBA - PR.



O composto majoritário encontrado no óleo essencial de Atalanta – SC foi o arilpropanoide safrol, já o majoritário encontrado no óleo essencial de Curitiba – PR, foi o sesquiterpeno oxigenado ciclocolorenona. É possível observar que em ambos os óleos essenciais, os terpenos foram a classe mais abundante, sendo eles os sesquiterpenos (43,68%) no O.E coletado em Atalanta-SC e sesquiterpenos oxigenados (70,76%) no O.E coletado em Curitiba-PR. Alguns relatos na literatura confirmam que esta classe se faz presente frequentemente em O.Es de plantas medicinais, como por exemplo o estudo de Silva e colaboradores (2009), no qual os autores relatam a presença de terpenos no O.E da família Araliaceae, e indicam que esta classe de metabólitos secundários pode apresentar diversas funções orgânicas em suas estruturas, desde álcoois, cetonas, éteres, ésteres e aldeídos. As modificações estruturais são responsáveis por muito dos efeitos terapêuticos, bem como apresentam funções para a manutenção e sobrevivência da planta, como a repelência de insetos, sendo um agente de atração polínica, na defesa de herbívoros e como um sinalizante aleloquímico.

A variação das classes metabólicas presentes nos O.E de *P. mikanianum* pode estar relacionada com a coordenada geográfica do local em que a espécie se encontra, por exemplo, para uma vasta produção de metabólitos secundários, uma espécie de planta necessita de altos níveis de radiação solar, devido as reações biossintéticas que são realizadas pela espécie por meio de processos fotossintéticos (TAIZ & ZEIGER, 2013). Considerando, a relação entre incidência solar e altitude, observa-se diferenças nas altitudes e temperaturas médias das cidades de Curitiba-PR (945 m acima do mar; baixa incidência solar) (IBGE-2019) e de Atalanta-SC (545 metros acima do mar; alta incidência solar) (IBGE-2019).

Por outro lado, além da altitude, outros fatores podem estar atrelados à variação na composição dos óleos essenciais, como por exemplo: disponibilidade hídrica, macronutrientes e micronutrientes do solo e a poluição atmosférica. Estas relações entre a sazonalidade do clima e a manutenção da espécie, descreve e explica a diferença encontrada acerca da composição química da espécie estudada (GOBBO-NETO, et al., 2007).

8. Atividades Antimicrobiana dos O.E obtidos por hidrodestilação de folhas de *P. mikanianum* coletada em Atalanta-SC e em Curitiba-PR.

As doenças de origem alimentar causadas por agentes microbianos constituem uma significativa causa de mortalidade de pessoas no mundo todo, dentre os gêneros de patógenos mais comuns em surtos de intoxicação alimentar está o *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Pseudomonas*. Os óleos essenciais obtidos de plantas podem representar o ponto de partida no combate destas espécies microbiológicas, e a utilização de O.Es. em etapas de processo e até na industrialização de alimentos é uma forma interessante, menos dispendiosa e com melhores perspectivas de resultados (FLORES, et al., 2015).

Neste sentido os óleos essenciais de *P. mikanianum* coletados em Atalanta-SC e Curitiba-PR, os compostos puros safrol, β -cariofileno e α -pineno e uma mistura de safrol+ β -cariofileno+ α -pineno (30:12:7), proporções encontradas no óleo essencial, foram testados frente a algumas espécies patogênicas para avaliar o potencial de inibição e mortalidade.

Nota-se pela TABELA 9, que os óleos essenciais de *P.mikanianum* (SC e PR), inibiram o crescimento das bactérias *S. aureus* (0,125 e 0,062 mg mL⁻¹), e *E. coli* (2,00 e 0,50 mg mL⁻¹) respectivamente, além do O.E. da espécie coletada no PR, também inibiu a bactéria *S. epidermides* (1,00 mg mL⁻¹).

Os maiores teores de inibição dos agentes patogênicos foram encontrados para o O.E da espécie coletada no PR quando comparado com o O.E. da espécie coletada em (SC). A atividade bacteriostática do O.E (PR) pode estar relacionado com a alta concentração de sesquiterpenos oxigenados em sua composição química. Estudos na literatura relatam a presença de diferentes tipos de terpenos em O.E de plantas medicinais, denominados por mono e sesquiterpenos, estas substâncias são importantes cientificamente devido aos efeitos biológicos apresentados (MUÑOZ CASTELLANOS et al., 2020; PERCZAK et al., 2020). O alto teor bacteriostático do O.E (PR) frente a *S. aureus* está relacionado também com o mecanismo de permeabilidade da membrana externa desta bactéria. Visto que, as bactérias gram-negativas como por exemplo a *E. coli* são menos permeáveis a muitos antibióticos por possuírem membrana externa na constituição de sua parede celular, o que não existe na parede celular de bactérias gram-positivas, como é o caso da *S. aureus*, dessa forma, a redução da permeabilidade da membrana externa é um mecanismo de resistência exclusivo de bactérias gram-negativas (BRUL AND COOTE 1999; SCHERER, et al., 2017).

A bioatividade do O.E de SC não está relacionada com a presença dos compostos majoritários, por exemplo, o safrol só inibiu a bactéria *S. aureus* (1,00 mg mL⁻¹), já o composto β -cariofileno não se mostrou bioativo frente aos patógenos testados. A mistura

dos compostos majoritários (safrol+ β -cariofileno+ α -pineno) também se mostrou ineficiente, demonstrando assim que o agrupamento dos compostos majoritários não surtiu o mesmo efeito observado pelo O.E. Portanto, os teores de inibição observados para esse O.E pode estar relacionado com o sinergismo dos compostos identificados no O.E e potencializados pela presença do composto α -pineno, sendo que, este composto contribui para a boa inibição dos patógenos, frente a *S. aureus* (0,50 mg mL⁻¹), *Salmonella choleraesuis* (2,00 mg mL⁻¹), *E. coli* (1,00 mg mL⁻¹) e o fungo *C. albicans* (0,50 mg mL⁻¹), a resposta do potencial microbiológico deste composto foi superior ao do O.E, porém foi inferior aos antibióticos testados.

Na literatura os efeitos microbiológicos potencializado pelo composto α -pineno são bastante relatados, como por exemplo o estudo de Matsuo e colaboradores (2011), que ao estudar o α -pineno isolado da família Anacardiaceae, verificaram o potencial deste composto frente ao tratamento do melanoma mestatático, No ano de 2014, Nam e colaboradores observaram em seu estudo, que além do potencial terapêutico apresentado pelo α -pineno, este composto químico é um ótimo agente antimicrobiano, podendo ser identificado e isolado de diversos óleos essenciais de plantas medicinais.

Nossos resultados demonstraram também que a amostra do O.E de *P. mikanianum* (PR) apresentou efeito bactericida frente ao microrganismo *E. coli* (2,00 mg mL⁻¹), já o composto α -pineno e a mistura de majoritários (safrol+ β -cariofileno+ α -pineno 30:12:7 %) só tiveram efeito (CBM) frente a *C. albicans* (0,50 e 1,00 mg mL⁻¹) respectivamente, conforme pode ser observado na TABELA 10, o qual reforça o poder inibitório/bactericida do O.E de *P. mikanianum* oriundo do Paraná.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, os óleos essenciais do gênero *Piper* apresentam em sua composição muitos compostos químicos voláteis que estão associados a uma ampla aplicação biológica, podendo atuar como agentes antibacterianos e serem uma ótima alternativa aos produtos sintéticos utilizados pela indústria (SALLEH, et al., 2012; MONZOTE, et al., 2017; FILHO et al., 2023).

TABELA 9. ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS (CIM) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS POR HIDRODESTILAÇÃO DE FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* E PADRÕES.

Amostras	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermides</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. mikanianum</i> SC	*	0,125	*	*	2,00	*
<i>P. mikanianum</i> PR	*	0,062	1,00	*	0,50	*
Safrol	*	1,0	*	*	*	*
β -cariofileno	*	*	*	*	*	*
α -pineno	0,50	0,50	*	2,00	1,00	*
MIXOE	1,00	1,00	*	*	2,00	*
Antibióticos	0,002	0,008	0,008	0,004	0,004	0,062

Nota: *MIC >2,0 mg mL⁻¹, para as bactérias foi utilizado o antibiótico cloranfenicol e para as leveduras nistatina como padrão. MIXOE: Safrol+ β cariofileno+ α pineno.

TABELA 10. ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS (CBM) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS POR HIDRODESTILAÇÃO DE FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* E PADRÕES.

Amostras	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermides</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. mikanianum</i> SC	-	-	-	-	-
<i>P. mikanianum</i> PR	-	-	-	-	2,00
Safrol	-	-	-	-	-
β -cariofileno	-	-	-	-	-
α -pineno	0,50	-	-	-	-
MIXOE	1,00	-	-	-	-

Nota: (-) Não houve atividade bactericida. Antibióticos: Cloranfenicol e nistatina. MIXOE: Safrol+ β cariofileno+ α pineno.

9. Atividade inseticida contra pragas de armazenamento

A atividade inseticida frente a pragas de armazenamento apresentadas pelo OE de *P. mikanianum* de SC e safrol, ocasionaram mortalidade de 100% contra todas as pragas testadas, tendo resultado similar ao inseticida Pirimifós-metilico, conforme pode ser observado na FIGURA 20. Já o OE de *P. mikanianum* do PR demonstrou efeito inseticida ocasionando mortalidade em 89% para *Cryptolestes ferrugineus* e inferior a 60% para *R. dominica*, *S. oryzae* e *S. zeamais*. O controle (acetona) ocasionou mortalidade apenas para a espécie *S. oryzae*, com taxa inferior a 1%.

A atividade inseticida apresentada pelos OEs de *P. mikanianum* está atrelada ao poder inseticida e fungicida dos compostos presentes no gênero *Piper*, retratado na literatura contra diversas pragas (CHANG et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2019; RAJKUMAR et al., 2020; SANTANA et al., 2022) e fungos de armazenamento (TANGARIFE-CASTAÑO ET AL., 2014; MUÑOZ CASTELLANOS et al., 2020; CHACÓN et al., 2021) , demonstrando o seu potencial como espécie com substâncias ativas promissoras para o desenvolvimento de novos defensivos agrícolas.

A bioatividade dos OEs está associada à presença dos compostos majoritários na composição química (ZABKA e PAVELA, 2018; MUÑOZ CASTELLANOS et al., 2020; RAJKUMAR et al., 2020; JIANG et al., 2023), que podem ser alterados por fatores como localização geográfica, condições edafoclimáticas, agentes bióticos, genética e época de colheita, e consequentemente podem expressar diferentes atividades biológicas que esses produtos podem apresentar (CHELAGHEMA et al., 2022; JIANG et al., 2023).

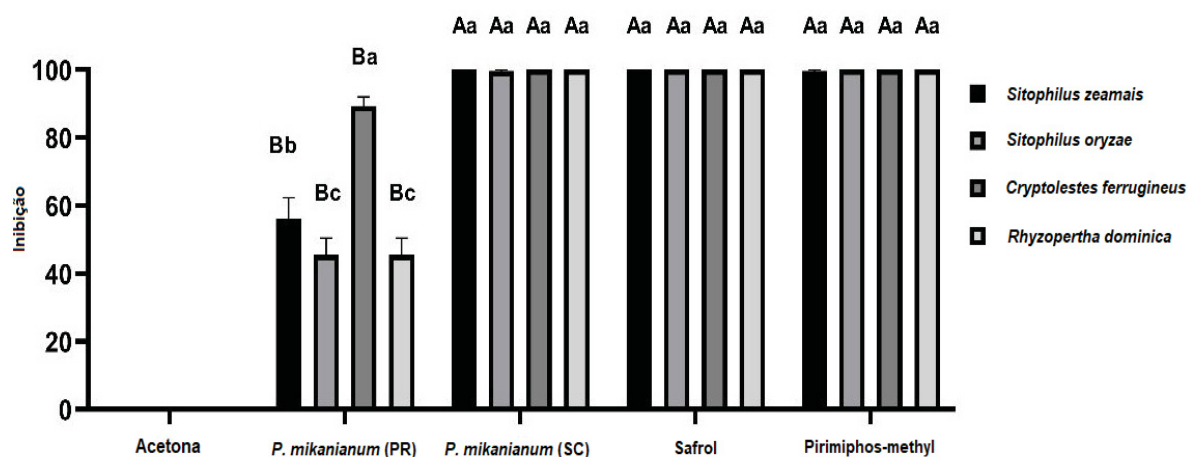
Em sua composição química, os OEs são formados por diferentes tipos de terpenos, com a predominância de mono e sesquiterpenos (MUÑOZ CASTELLANOS et al., 2020; PERCZAK et al., 2020). Pela análise por cromatografia gasosa, nas amostras obtidas em Santa Catarina e no Paraná foi observado o composto químico safrol, numa proporção superior a 30 e 1 %, respectivamente, e por esse motivo foi avaliado o efeito inseticida e fungicida dessa substância.

Nossos resultados demonstraram que a amostra do OE de *P. mikanianum* - SC e o composto safrol tiveram efeito inseticida contra todas as espécies de pragas testadas, com mortalidade próxima a 100%, sendo similar ao inseticida sintético. O OE proveniente do estado de SC possui concentração superior a 30% de safrol que a do Paraná, indicando que o potencial inseticida do OE dessa espécie pode estar relacionado com a presença dessa substância em sua composição química. Entretanto, relatos na literatura demonstram a eficácia do OE da espécie do Paraná como inseticida contra *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Erebidæ) (Hübner) (KRINSKI et al., 2018) e acaricida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

(Canestrini) (FERRAZ et al., 2010), com a mesma composição química e sem a presença do composto safrol em ambas as amostras.

A elevada mortalidade observada em nossos resultados pode estar correlacionada com a presença de substâncias voláteis nos OEs, pois quando inaladas pelos insetos através dos espiráculos, podem agir como inibidores dos neurotransmissores, por ação neurotóxica, causando hiperatividade, excitação e conseqüentemente a morte (CHANG et al., 2017; SANTANA et al., 2022). Entretanto, a ação inseticida dos OEs pode ser influenciada por diversos fatores como método de aplicação (ZIMMERMANN et al., 2021), concentração (OLIVEIRA et al., 2017; LOUGRAIMZI et al., 2018), organismo alvo (RAJKUMAR et al., 2020), tempo de exposição (LOUGRAIMZI et al., 2018) e principalmente com a composição química presente, os quais podem agir em sinergismo potencializando o efeito tóxico (SANTANA et al., 2022).

FIGURA 20. ATIVIDADE INSETICIDA (%) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. mikanianum* - PR, *P. mikanianum* - SC E SAFROL PELO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE 138,38 mL L⁻¹ DE AR CONTRA *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes ferrugineus*, *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*.



9.1 Atividade fungicida de *P. mikanianum* e safrol contra *Fusarium graminearum* por volatilização.

Os tratamentos na inibição do crescimento de *F. graminearum* estão mostrados na FIGURA 21. Os OEs de *P. mikanianum* de SC e PR mostraram efeito fungicida com inibição superior a 90%. Os resultados obtidos nessa pesquisa demonstraram que o composto safrol apresentou atividade fungicida superior a 90% na inibição do crescimento de *F. graminearum* por volatilização, assim como os OEs de *P. mikanianum* de SC e PR, indicando que a bioatividade desses OEs não está atrelada somente a presença do composto safrol, mas ao sinergismo entre os compostos que compõem essas amostras. Assim como na atividade inseticida, o efeito fungicida dos OEs está associada a presença de mono e sesquiterpenos

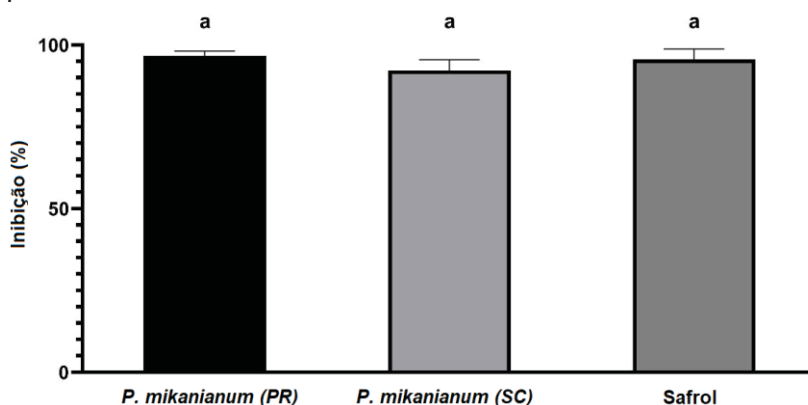
(JIANG et al., 2023), os quais são substâncias com baixo peso molecular e consequentemente apresentam alta capacidade de volatilizar (TANG et al., 2018; MUÑOZ CASTELLANOS et al., 2020).

No método por contato, nossos resultados apontam que ambas as amostras dos OEs de *P. mikanianum* e o composto safrol revelaram alta ação fungicida contra *F. graminearum*, com inibição superior a 90%. Os compostos em menor proporção possuem atividade biológica e podem agir como potencializadores do efeito fungicida dos compostos majoritários, pois as substâncias presentes nos OEs atuam em sinergismo (PERCZAK et al., 2020; CHACÓN et al., 2021). Até o presente momento, só há um relato sobre a atividade antifúngica da espécie *P. mikanianum* que foi relatada por Carneiro et al. (2019), cuja amostra coletada em SC apresentou o safrol como composto majoritário (82%) e revelando atividade fungicida por contato contra linhagens de *Candida albicans*.

Os resultados observados no MIC demonstram que o aumento da concentração do O.E ocasionou o aumento na taxa de inibição do crescimento do fungo. Resultados similares foram relatados por Jiang et al. (2023) que avaliaram o OE de *Humulus lupulus* contra *F. graminearum*.

O aumento na concentração do OE implica diretamente no efeito fungicida, e essas moléculas podem agir em diferentes sítios de ação (TANG et al., 2018). Os principais danos relatados ocorrem na morfologia das hifas, com má formação e danos na parede celular, além de causarem alterações na permeabilidade e estrutura da membrana plasmática, ocasionando a morte celular (RACHITHA et al., 2017; TANG et al., 2018; CHELAGHEMA et al., 2022; JIANG et al., 2023). Entretanto, além da concentração, outros fatores como a composição química, organismo alvo, linhagem testada e composição química do OE podem afetar o efeito fungicida desses produtos contra fitopatógenos (KRZYŚKO-ŁUPICKA et al., 2020; CHELAGHEMA et al., 2022).

FIGURA 21. Atividade fungicida do óleo essencial de *P. mikanianum* - PR, *P. mikanianum* - SC e safrol pelo método de volatilização na concentração de 100% contra *Fusarium graminearum* após incubação por 7 dias a 28 °C.



10. Análise elementar de folha, caule e raiz de *P. mikanianum* coletada em Atalanta – SC e Curitiba-PR.

As folhas, caules e raízes das espécies de *Piper* analisadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) continham como principais elementos: potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), conforme pode ser observado nas FIGURAS 22 E 23.

Os altos teores quantificados de potássio e cálcio nas folhas, caules e raízes revelam a importância do estudo sob a análise elementar de matrizes verdes. Estudos como de Gomes (2021), reforçam e informam o leitor, que íons como o potássio são essenciais para manutenção da vida, visto que, o consumo de alimentos que contenham o íon potássio é fundamental para a homeostase do corpo humano, podendo gerar graves repercussões como a hipopotassemia quando pouco consumido e absorvido.

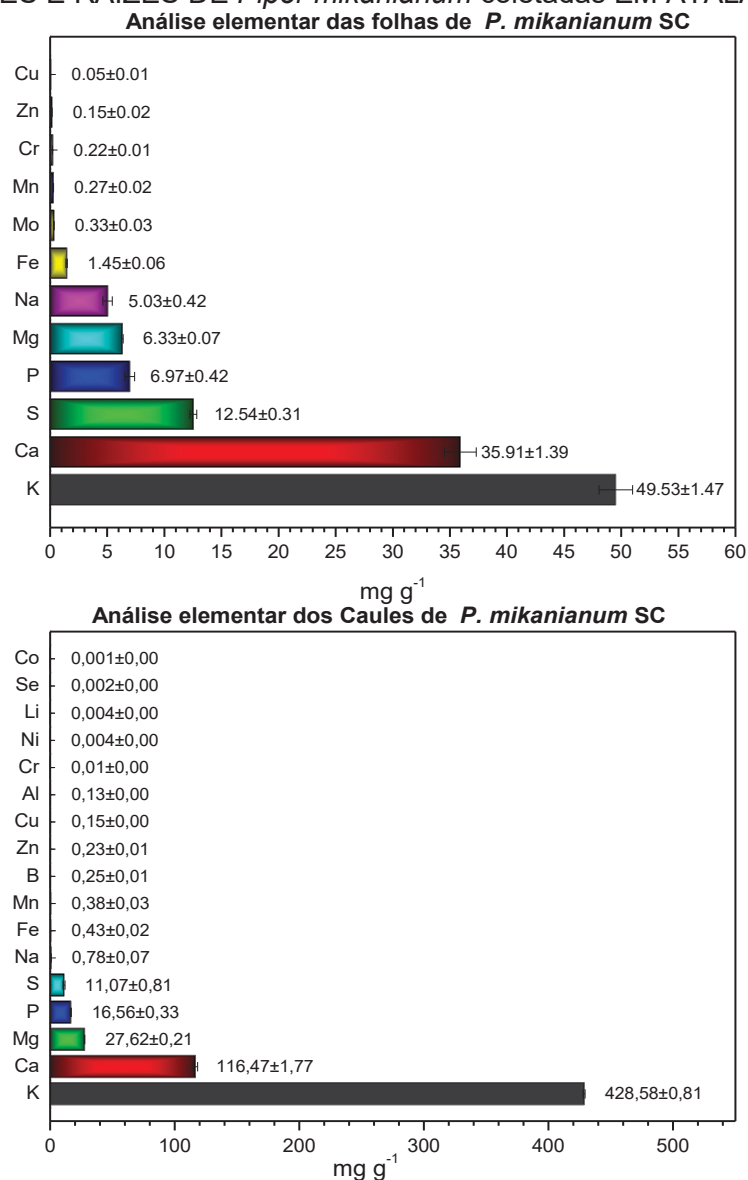
Relatos na literatura como de Silva e Ramos (2009), utilizando banana, que é uma das frutas mais consumidas no mundo devido aos seus altos valores energéticos e pelo elevado teor de potássio, na fabricação de doces de banana, e avaliaram sua composição química. Os resultados indicaram uma porcentagem de potássio nos doces de banana na faixa de 0,80 a 0,79 mg/g, cujos valores são inferiores quando comparados aos níveis de potássio encontrados neste trabalho para as folhas, caules e raízes de *P. mikanianum* coletadas em SC e PR. Estes resultados reforçam e tornam as partes aéreas e raízes desta espécie como um possível agente precursor de macro e micronutrientes essenciais para a sobrevivência humana.

O teor de cálcio obtido neste trabalho para as partes aéreas e raízes de *P. mikanianum* (SC e PR) é expressivo quando comparados com os teores de diferentes derivados de leite, incluindo o próprio leite puro, relatados por Masotti et. al., (2020). De acordo com os resultados, a quantidade de cálcio nos caules coletados em SC (116,47 mg g⁻¹), folhas (210,27 mg g⁻¹), bem como nas raízes (105,59 mg g⁻¹) coletadas no PR encontra-se na faixa estabelecida para os níveis desse elemento no leite, que variam de 80 a 210 mg g⁻¹. Já os valores de cálcio encontrados para as folhas (35, 91 mg g⁻¹) e raízes (71,97 mg g⁻¹) de *P. mikanianum* (SC), bem como as raízes (105,59 mg g⁻¹) do (PR) são superiores aos relatados para produtos lácteos como soro do leite (34,9 mg g⁻¹) e manteiga (13 a 19 mg g⁻¹).

Outros estudos envolvendo a determinação de metais na família Piperaceae já foram retratados na literatura. Segundo Silva e colaboradores em (2016), que ao estudar as folhas e os caules de duas espécies de *Piper*, sendo elas, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*, por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), indicaram a presença dos metais: Al, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V, Hg e As. A variação dos elementos encontrados quando comparado com os resultados obtidos

neste estudo pode ser atribuído a sazonalidade do clima e do solo, e as concentrações dos metais presente nas folhas, caules e raízes de *P. mikanianum* estão dentro dos limites para o consumo humano, uma vez que a concentração de metais presente em matrizes verdes não são regulamentadas por agências, exceto os metais arsênio, cádmio e chumbo.

FIGURA 22. GRÁFICO COM OS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR DAS FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE *Piper mikanianum* coletadas EM ATALANTA-SC.



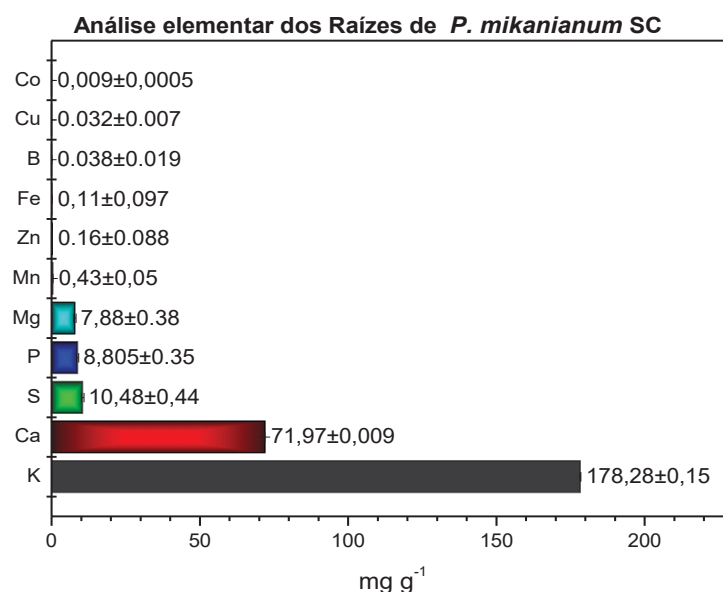
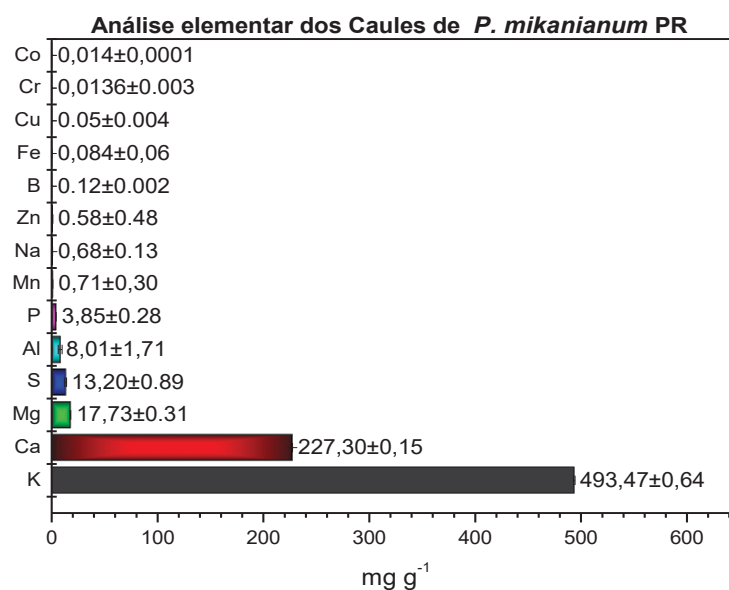
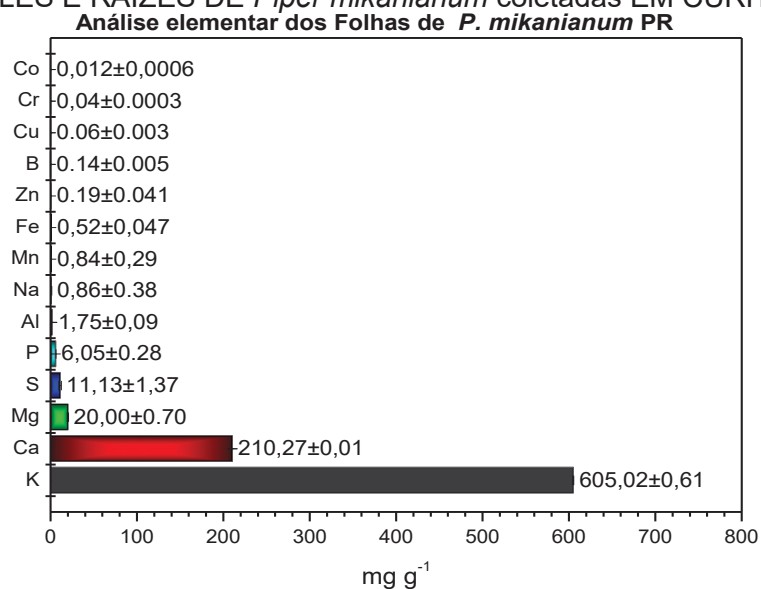
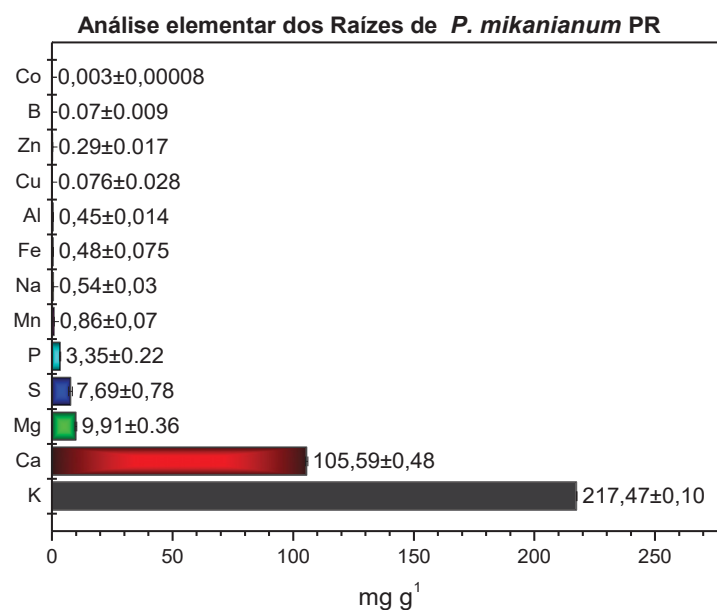


FIGURA 23. GRÁFICO COM OS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE METAIS DAS FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE *Piper mikanianum* coletadas EM CURITIBA-PR.



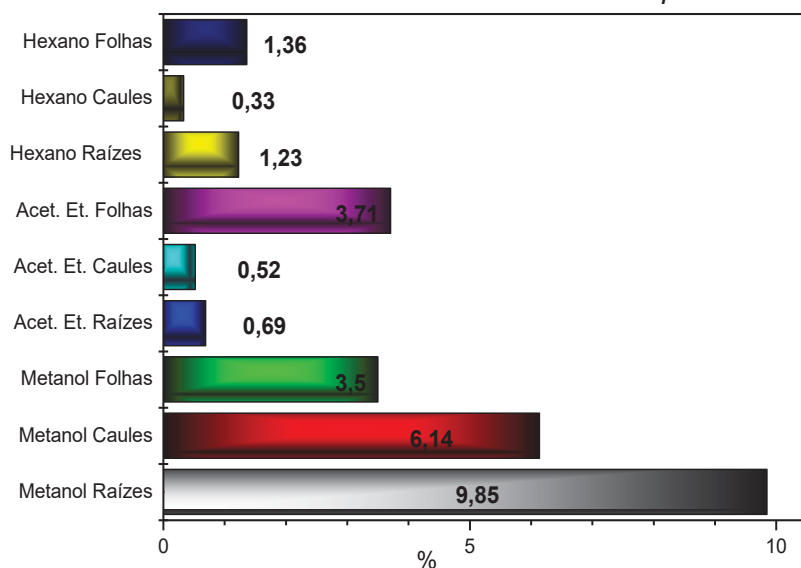


11. Extratos brutos de *P. mikanianum*

11.1 Rendimento dos extratos das partes aéreas e raízes de *P. mikanianum* Atalanta - SC.

O rendimento do teor de extrativos é uma ferramenta para estimar o potencial de substâncias extraíveis de uma espécie vegetal em diferentes categorias de solvente, como, por exemplo: aminoácidos, açúcares, flavonoides. Visto que, esta ferramenta pode ser considerada um parâmetro importante na avaliação da qualidade do produto vegetal (MUNHOZ et al., 2012).

Ao compararmos os resultados obtidos quanto aos rendimentos dos extratos, nota-se que os extratos em metanol de raízes (9,85%), caules (6,14%) e folhas (3,5%), conforme pode ser observado na FIGURA 24, foram os que apresentaram os maiores teores de rendimentos extrativos. Este fato pode ser explicado segundo Mohd, et al., (2012), pela facilidade de extração dos compostos polares quando submetidos a solventes polares, por exemplo, o metanol por possuir um grupo hidroxila, pode formar ligações de hidrogênio com o soluto, se tornando um solvente mais eficiente na extração. Além da natureza do solvente, relatos da literatura indicam que o solvente mais adequado para obtenção de extratos brutos é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Porém, a quantidade de massa de planta também influencia no rendimento de extração de metabólitos secundários, pois quanto mais massa verde, maior a possibilidade de se extrair os constituintes presentes em baixas concentrações, e que normalmente são os que apresentam as melhores atividades biológicas (FILHO CECHINEL, V. et al., 1998).

FIGURA 24. GRÁFICO RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE *Piper mikanianum*.

11.2 Atividade Quelante de Cálcio dos extratos brutos de *P. mikanianum* Atalanta – SC.

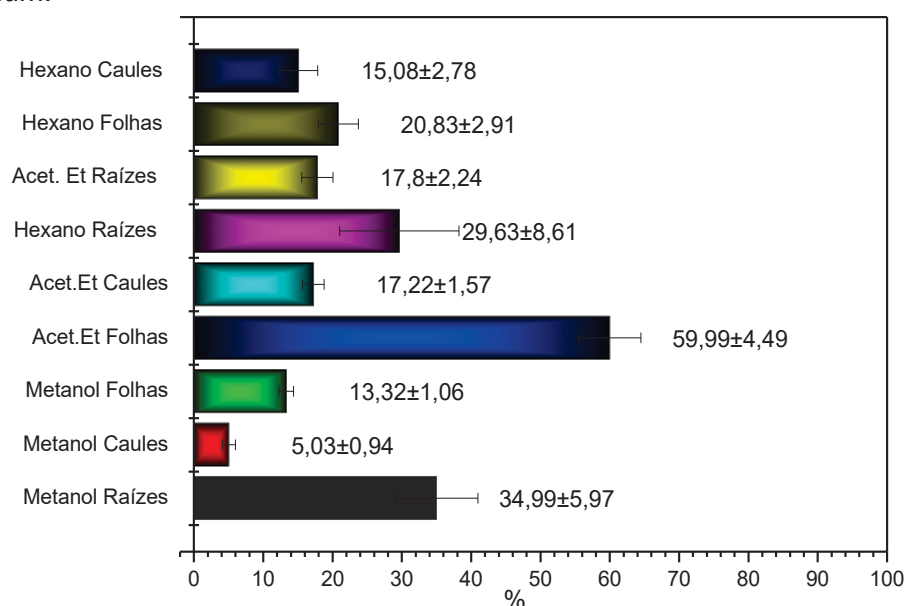
A atividade quelante de algumas substâncias ganhou interesse por parte da indústria alimentícia, cosméticos e de saneantes, devido à possibilidade de formação de complexos de metais com maior estabilidade do que outros compostos incapazes de formar a estrutura do quelato. Esta atividade pode ser definida como uma reação de equilíbrio entre um íon metálico e um agente complexante, aqui no caso o extrato da espécie em estudo (MATTAR, et al., 2022). Na indústria de alimentos por exemplo, os quelantes são utilizados para inibir a precipitação de corantes, atuando também como conservantes em alimentos, por meio da captura de íons prejudiciais (YUSSUF, et al., 2004). Um exemplo, são os compostos taninos ou polifenóis que possuem atividade quelante de Fe^{+2} já relatados na literatura e podem ser extraídos do chá preto e do grão de café (OLIVEIRA, et al., 2001). Neste sentido, a atividade quelante de matrizes verdes é de suma importância, uma vez que o aproveitamento de recursos naturais se torna uma alternativa na obtenção de produtos com maior valor agregado.

Os resultados deste experimento são expressos em porcentagem da atividade quelante (FIGURA 25). A habilidade quelante do extrato de *P. mikanianum*, revelou que o extrato de folhas em acetato de etila apresentou um teor de 59,99% como agente complexante de cálcio, seguido dos extratos: Raízes metanol 34,99% e raízes hexano 29,63%.

Estudos envolvendo a capacidade quelante de plantas utilizando o EDTA como agente quelante de metal, já são bastante descritos na literatura. Um exemplo, é o estudo de Adusei, et al., (2019), com os extratos aquoso e etanoico das sementes e frutos de *Tetrapleura tetráptera*, nos quais verificaram capacidade quelante em torno de 5,25 a 3,20

%, os autores ainda ressaltam que esta atividade está relacionada com os agentes quimiotáxicos presentes na espécie, tais como, fenóis, flavonoides, saponinas e alcaloides. Em um estudo conduzido em 2017 por Joel e colaboradores, a atividade quelante investigada nos extratos aquoso e etanólicos dos frutos de *Tetrapleura tetraptera*, revelaram que os teores de atividade quelante estavam na faixa de 7,10 a 35,52 % para o extrato aquoso e de 39,17 a 58,53 % para o extrato etanólico, os achados deste estudo estão condizentes com os resultados apresentados neste trabalho. Os resultados encontrados no estudo de Adusei, et al., (2019), são muito inferiores quando comparados aos encontrados neste estudo, esta alta atividade pode estar atrelada a compostos já identificados nesta espécie, como os arilpropanoides safrol, miristicina, asaricina, o flavonol 4',7-dimetoxikaempferol e o alcaloide piperina pois de acordo com Ferreira, et al., (2016), os extratos de plantas ricos em compostos fenólicos e flavonoides podem agir como quelantes naturais de metais.

FIGURA 25. ATIVIDADE QUELANTE DE CÁLCIO DOS EXTRATOS DE *Piper mikanianum*.



11.3 Atividade bactericida dos extratos brutos de *P. mikanianum* de Atalanta – SC.

Os resultados de CIM e CBM para os extratos brutos de *P. mikanianum* representados na TABELA 11, demonstram que todos os extratos testados tiveram um importante efeito antibacteriano. De fato, os valores da atividade CIM variaram de >1000 a 500 µg mL⁻¹ frente as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*.

O extrato bruto de raiz em hexano de *P. mikanianum* apresentou atividades bactericidas sobre *S. aureus* e *E. faecalis*, com uma razão CBM/CIM de 1 µg mL⁻¹, já o

extrato de raízes em metanol apresentou atividades bactericidas sobre a *S. aureus*, *E. Coli* e *E. faecalis*, com uma razão CBM/CIM de 1, 0,5 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. E para o extrato de caules em acetato de etila, a atividade frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* foi com uma razão de 1 e 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tais atividades bactericidas dos extratos provocaram uma alteração incompatível na estrutura da bactéria custando a sua sobrevivência. Já para os extratos de caule em acetato de etila e em metanol frente a bactéria *E. faecalis*, foi possível observar uma atividade bacteriostática, ou seja, o extrato bruto de *P. mikanianum* inibiu o crescimento bacteriano sem ter levado a morte (TAVARES, et al., 2001).

O extrato em metanol de *P. mikanianum* foi o mais promissor, e exibiu os menores valores de CIM e CBM quando comparados com os demais extratos, principalmente para as bactérias *E. coli*, uma bactéria gram-negativa e *E. faecalis*, uma bactéria gram-positiva. Este é um resultado muito significativo, visto que, apesar dos óleos essenciais de *P. mikanianum* serem bastantes estudados quanto as suas atividades bactericidas, não há relatos de estudos voltados na avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *P. mikanianum*. Na literatura há relatos prévios da atividade antimicrobiana com os extratos brutos da família Piperaceae, como o estudo de Zahin et al. (2021), que ao estudar diferentes extratos das sementes de *P. nigrum*, observou que os extratos apresentaram atividades frente as bactérias *S. typhimurium*. O mesmo ocorreu nos estudos de Karsha et al., 2010, que ao estudar as atividades microbianas do extrato de *P. nigrum* encontrou uma faixa de CIM de 50-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra cepas de referência de *S. aureus*, *S. faecalis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. typhi* e *E. coli*.

Os resultados encontrados neste estudo são divergentes dos encontrados na literatura, e possivelmente este fato pode estar atrelado a composição química da *P. mikanianum*, e mesmo sendo do mesmo gênero das plantas já relatadas na literatura, há uma grande diversidade quando comparado as suas composições filogenéticas.

TABELA 11. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS DE *P. mikanianum* ATALANTA-SC CONTRA BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS.

Atividades Antimicrobianas Extratos Brutos <i>Piper mikanianum</i>					
	($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Folhas	CIM	>1000	>1000	>1000	>1000
Hexano	CBM	>1000	>1000	>1000	>1000
Folhas	CIM	>1000	>1000	>1000	>1000
Act.Etila	CBM	>1000	>1000	>1000	>1000
Folhas	CIM	>1000	>1000	>1000	>1000
Metanol	CBM	>1000	>1000	>1000	>1000
Caule	CIM	>1000	>1000	>1000	>1000
Hexano	CBM	>1000	>1000	>1000	>1000
Caule	CIM	1000	>1000	833,3 $\pm$ 222,2	1000
Act.Etila	CBM	1000	>1000	1000	>1000
	CBM/CIM	1	-	1,2	-
Caule	CIM	>1000	>1000	>1000	1000
Metanol	CBM	>1000	>1000	>1000	>1000
Raíz	CIM	1000	>1000	833,3 $\pm$ 222,2	1000
Hexano	CBM	1000	>1000	>1000	1000
	CBM/CIM	1	-	-	1
Raíz	CIM	>1000	>1000	>1000	>1000
Act.Etila	CBM	>1000	>1000	>1000	>1000
Raíz	CIM	1000	>1000	500	500
Metanol	CBM	1000	>1000	1000	500
	CBM/CIM	1	-	0,5	1
Gentamicina ^a	($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	32	32	32	32

Nota: Os resultados são expressos como concentração inibitória mínima (CIM $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. ^a Controle positivo. *Concentrações testadas do extrato: 1000 a 7,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

11.4 Caracterização espectroscópica dos extratos brutos de *P. mikanianum*.

A absorção no espectro no infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) mostrado na FIGURA 26A dos extratos em metanol das folhas, caule e raiz de *P. mikanianum*, apresentaram bandas semelhantes no intervalo 2923,9 a 2931,5 cm^{-1} , a qual indica uma vibração de deformação axial assimétrica do grupo metileno, derivado de alcanos (C-H). Já as bandas em 1713,5 a 1715,4 cm^{-1} , são correspondentes à deformação axial C=O do grupo carbonila (PAVIA, et al., 2010).

As bandas em 1592,5 a 1652 cm^{-1} indicam dobramento N-H do grupo amins, que ocorrem geralmente nas regiões de 1550 a 1640 cm^{-1} . As bandas de 1395,9 a 1416,0 cm^{-1} indicam a presença de N=O, que normalmente absorvem na faixa de 1350 a 1550 cm^{-1} . E as bandas 1247,7 a 1262,6 cm^{-1} e 1030,4 a 1048,1 cm^{-1} , indicam a presença de grupos C-O. As absorções em 3235,2 a 3468,2 cm^{-1} dos espectros no IV de folhas e caule em

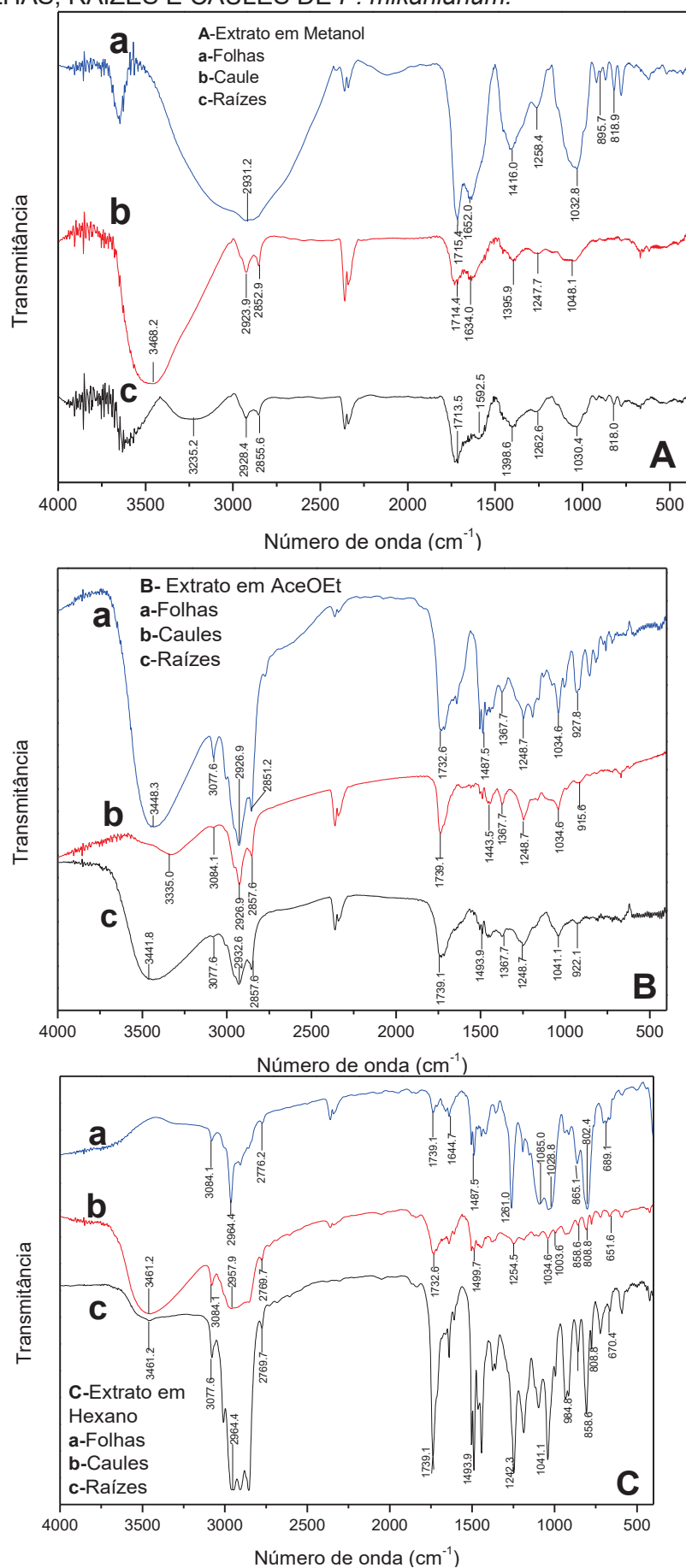
metanol (FIGURA 26A a,b,c) indicam a presença de grupos O-H e as bandas em 2852,9 a 2855,6 cm^{-1} , indicam a presença de grupos C-H de aldeídos (PAVIA, et al., 2010).

O espectro no IV (FIGURA 26B a,b,c) dos extratos em acetato de etila das folhas, caules e raízes de *P. mikanianum*, apresentam bandas semelhantes na faixa de 3335,8 a 3448,3 cm^{-1} , indicando a presença de grupos O-H, de 3077,6 a 3084,1 cm^{-1} , a presença de estiramento de C-H de aromáticos, de 2926,9 a 2932,6 cm^{-1} e de 2851,2 a 2857,6 cm^{-1} , a presença de grupos C-H de alcanos. Para as bandas em 1732,6 a 1739,1 cm^{-1} , indicativo da presença de C=O, em 1443,5 a 1493,9 cm^{-1} e 1367,7 indicam a presença de N=O, em 1248,7 cm^{-1} e 1034,6 a 1041,1 cm^{-1} , a presença de grupos C-O, e por fim as bandas em 915,6 a 927,8 cm^{-1} indicando a presença de estiramento de C-H de aromáticos (PAVIA, et al., 2010).

A absorção do espectro no IV (FIGURA 26C a,b,c) dos extratos em hexano das folhas, caule e raiz de *Piper mikanianum*, apresentaram bandas semelhantes na faixa de 3077,6 a 3084,1 cm^{-1} , indicando estiramento de C-H de aromáticos, de 2957,9 a 2969,4 cm^{-1} , a presença de grupos C-H de alcanos, de 2769,7 a 2776,2 cm^{-1} a presença de grupos C-H de aldeídos e de 1732,1 a 1739,1 cm^{-1} , indicando a presença de C=O de grupos aldeídos. A absorção no espectro em 1242,3 a 1261,0 cm^{-1} , 1034,6 a 1085,0 cm^{-1} e 984,8 a 1028 cm^{-1} , indicam a presença de grupos C-O, e em 865,1 a 858,6 cm^{-1} , 808,8 a 802,4 cm^{-1} e 651,6 a 689,1 cm^{-1} , indicam estiramento de C-H de aromáticos. A faixa de 3461,2 cm^{-1} dos espectros no IV de folhas e caules em metanol (Figura 23C b,c) é indicativo da presença de grupos O-H, que geralmente absorvem em 3200 a 3400 cm^{-1} (PAVIA, et al., 2010).

De modo geral a análise no infravermelho indica a presença de compostos aromáticos, cetonas, aldeídos e compostos nitrogenados na espécie estudada. Estudos sobre óleos essenciais de *P. mikanianum* já confirmaram a presença de compostos como os arilpropanoides e no gênero *Piper* tem-se vários relatos de isolamento de amidas e lignanas, observados nas análises de infravermelho (LEAL et al., 2005).

FIGURA 26 (A, B, C). ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS EXTRATOS BRUTOS FOLHAS, RAÍZES E CAULES DE *P. mikanianum*.

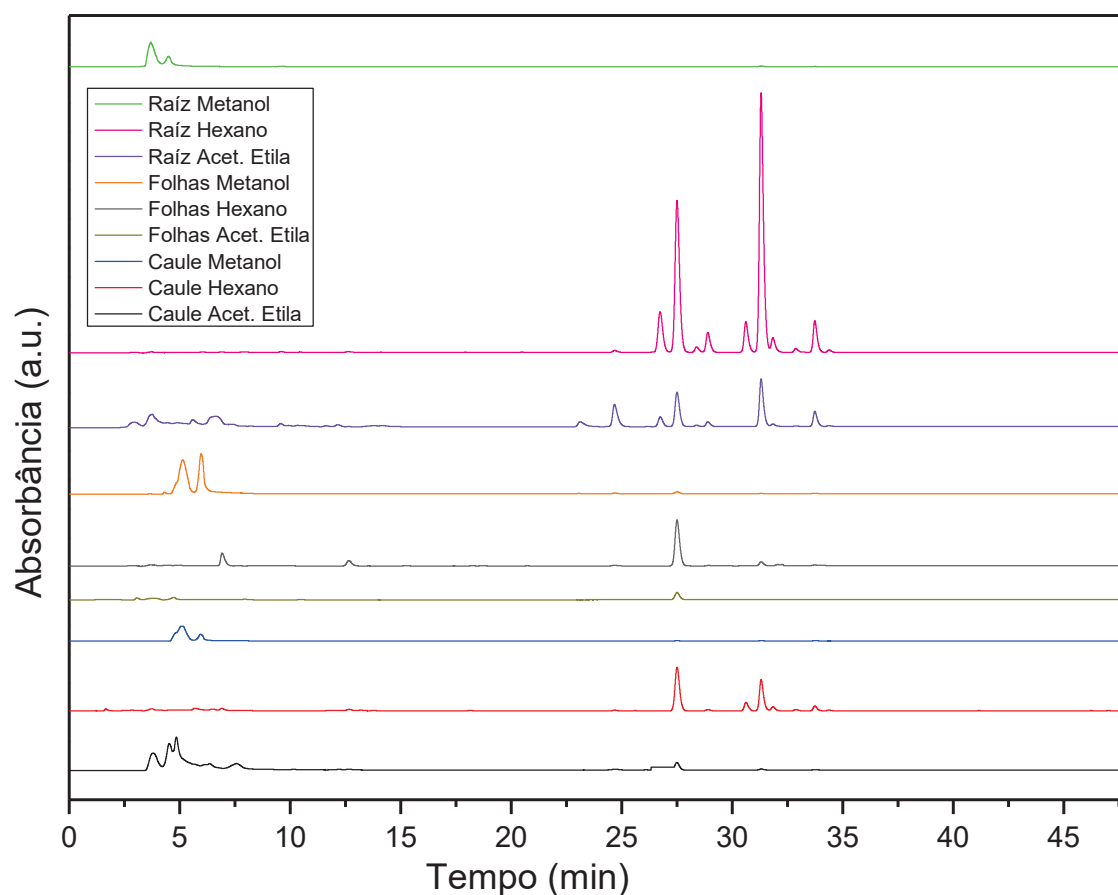


11.5 Perfil fitoquímico por CLAE dos extratos brutos de *P. mikanianum*.

Os perfis cromatográficos são muito utilizados no estudo de plantas, permitindo comparar e sugerir classes de compostos. A FIGURA 27 apresenta os cromatogramas dos extratos brutos de *P. mikanianum*, onde é possível observar picos com diferentes intensidades, sendo que os compostos detectados, em geral, são de média a alta polaridade. Verifica-se a variação dos metabólitos secundários presentes na espécie, contudo alguns picos se assemelham pelo seu tempo de retenção, podendo ser atribuídos aos mesmos compostos. Comprimento de onda... fase móvel

Todos os extratos foram analisados nas mesmas condições cromatográficas em triplicata e na mesma concentração.

FIGURA 27. PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS (HEXANO, ACETATO DE ETILA E METANOL) DAS FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE *P. mikanianum*.

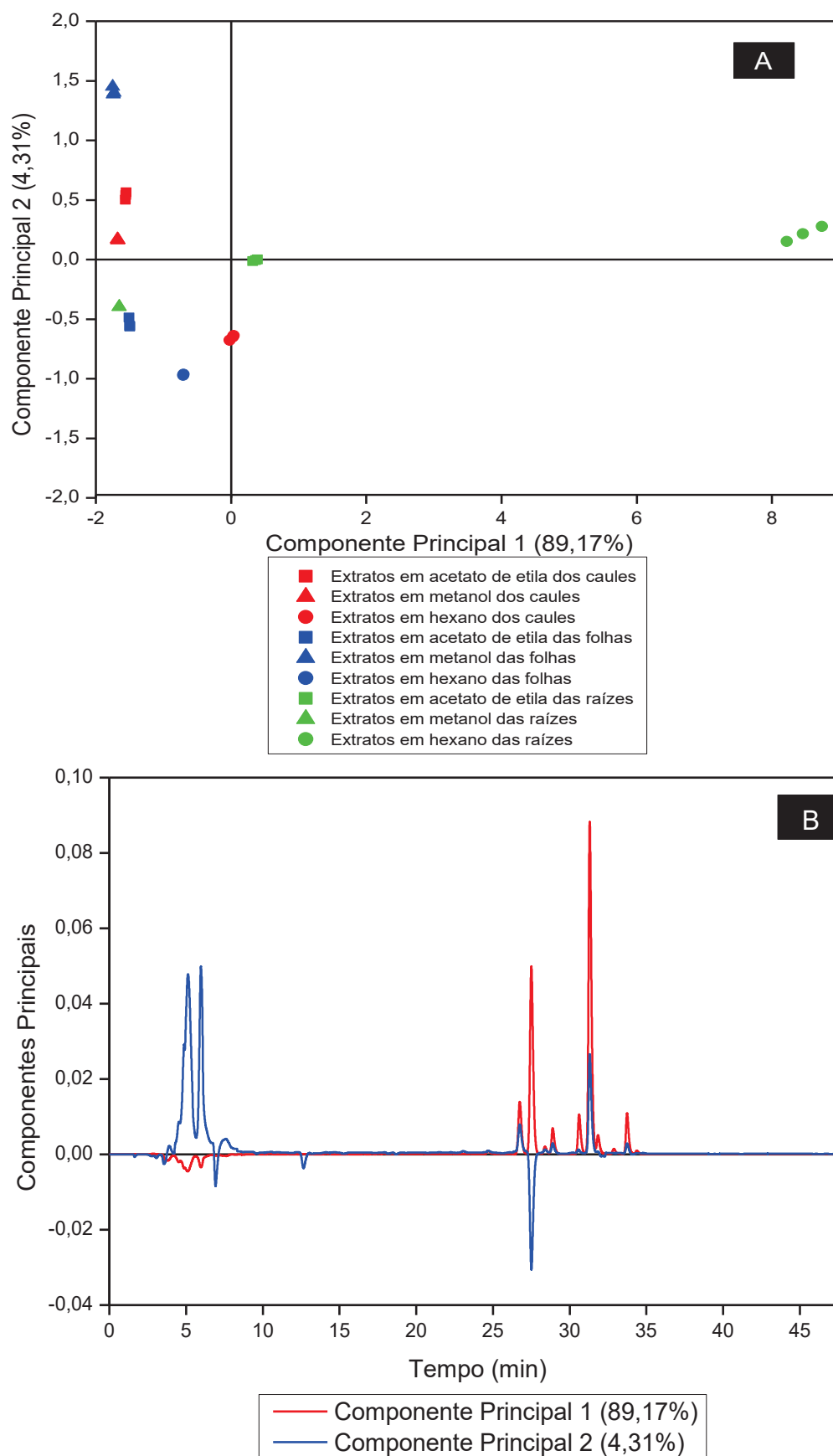


Para uma melhor análise de semelhanças e diferenças entre os diversos extratos, fez-se uma análise multivariada, no qual é possível observar pelo gráfico de *scores* (FIGURA 28 A) que a Componente Principal 1 (PC1) explica 89,17% de variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 4,31%, totalizando 93,48% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças estatísticas de composição

entre os extratos brutos. Pela PC1, nota-se que o extrato das raízes em acetato de etila se assemelha ao extrato em hexano das raízes. Pela PC2 nota-se que os extratos em acetato de etila e em metanol dos caules, localizados na PC2 no quadrante positivo não se diferenciam estatisticamente, porém se diferenciam do extrato em hexano localizados na PC2 quadrante negativo. Os extratos em acetato de etila e em hexano das folhas não se diferenciam estatisticamente pela PC2, porém se diferenciam do extrato em metanol pela PC2. E para os extratos das raízes, observa-se que os extratos em acetato de etila e em hexano não se diferenciam pela PC1, porém se diferenciam do extrato em metanol pela PC1.

Pelo Gráfico de *loadings* (FIGURA 28 B) dos extratos brutos de *P. mikanianum*, podemos observar que pela PC1 os picos na faixa de 25 a 35 minutos, são os responsáveis por diferenciar os extratos em acetato de etila e em hexano das raízes dos demais. Já pela PC2, os picos localizados de 0 a 10 minutos, 25 e 30 minutos, apresentam maior influência na separação das amostras localizadas na PC2 positiva (extratos em acetato de etila e metanol caules, metanol folhas, hexano raízes). Já o pico localizado entre 25 e 30 minutos apresenta maior influência nas amostras localizadas na PC2 negativa (extratos em hexano caules, acetato de etila e hexano folhas e metanol raízes).

FIGURA 28. (A) GRÁFICO DE “SCORES” E (B) GRÁFICO DE “LOADINGS” PC1 E PC2 DOS EXTRATOS BRUTOS DE *P. mikanianum*.



12. Dados físicos e espectrométricos das substâncias identificadas

- **S-4**

Safrol: líquido oleoso incolor; arilpropanoide, CLAE: tR: 24,00 min (método 1) TABELA 2 (p. 33); fórmula molecular: $C_{10}H_{10}O_2$ (massa exata: 162,19 g/mol); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, HSQC, HMBC: FIGURA 31-37 (p.72-77); TABELA 14(p.73) (MOHOTTALAGE, et al., 2007).

- **R-1**

4',7-Dimethoxikaempferol: sólido amarelo; flavonol, CLAE: tR: 14,50 min (método 2) TABELA 3 (p. 33); fórmula molecular: $C_{17}H_{15}O_6$ (massa exata: 314,26 g/mol); RMN de 1H , ^{13}C desacoplado: FIGURA 40-42 (p.80-82); DRX: FIGURA 42; TABELA 16 (p. 79) (ALOTAIBI, et al., 2021).

- **P-1**

Piperina: sólido amarelo; alcaloide, CLAE: tR: 19,40 min (método 1) TABELA 2 (p. 33); fórmula molecular: $C_{17}H_{19}NO_3$ (massa exata: 285,35 g/mol); RMN de 1H e ^{13}C desacoplado: FIGURA 47-49 (p. 88-89); TABELA 19 (p.87) (SAHA, et al., 2013; SUZERY, et al., 2019).

- **R-3**

Asaricina: líquido oleoso incolor; arilpropanoide, CLAE: tR: 15,04 min (método 1) TABELA 2 (p. 33); fórmula molecular: $C_{11}H_{12}O_3$ (massa exata: 204,21 g/mol); RMN de 1H e ^{13}C desacoplado FIGURA 55-57 (p.95-96); TABELA 22 (p.94) (MOHOTTALAGE, et al., 2007).

- **R-4**

Miristicina: líquido oleoso incolor; arilpropanoide, Chromatotron TABELA 4 (p.34); fórmula molecular: $C_{11}H_{12}O_3$ (massa exata: 204,21 g/mol); RMN de 1H e ^{13}C desacoplado FIGURA 59-60 (p.98-99); TABELA 23 (p. 97) (MOHOTTALAGE, et al., 2007).

13. Elucidação estrutural das substâncias isoladas.

13.1 Fracionamento e partição do extrato de folhas em acetato de etila de *P. mikanianum*.

O fracionamento do extrato bruto em acetato de etila de folhas (10 g), foi submetido a coluna de celite para a retirada da clorofila, e após sua remoção, os extratos foram particionados em hexano e diclorometano com auxílio de um funil de separação, e então submetidos a cromatografia em coluna a vácuo, utilizando como fase estacionária sílica flash e como fase móvel hexano e acetato de etila em diferentes proporções.

Para a partição diclorometano foram obtidas 22 frações e para a partição hexano foram obtidas 18 frações, conforme a TABELA 12 e 13 respectivamente. O fracionamento dos extratos brutos de folhas em acetato de etila partição hexano e diclorometano resultou na identificação de um arilpropanóide em duas frações da partição, bem como um flavonol que foi reportado pela primeira vez na família Piperaceae e na espécie *P. mikanianum*.

TABELA 12. FRACIONAMENTO E MASSAS (mg) DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO FOLHAS EM ACETATO DE ETILA PARTIÇÃO (DCM).

Partição DCM 22 Frações		
Frações	Massa (mg)	Substâncias Identificadas
F1DCM	30	-
F2DCM	29	-
F3DCM	28	-
F4DCM	38	1
F5DCM	90	-
F6DCM	37,5	1
F7DCM	80	-
F8DCM	42	-
F9DCM	43	-
F10DCM	80	-
F11DCM	46	-
F12DCM	31	-
F13DCM	38	-
F14DCM	52	-
F15DCM	42	-
F16DCM	46	-
F17DCM	50	-
F18DCM	62	-
F19DCM	100	-
F20DCM	55	-
F21DCM	68	-
F22DCM	61	-

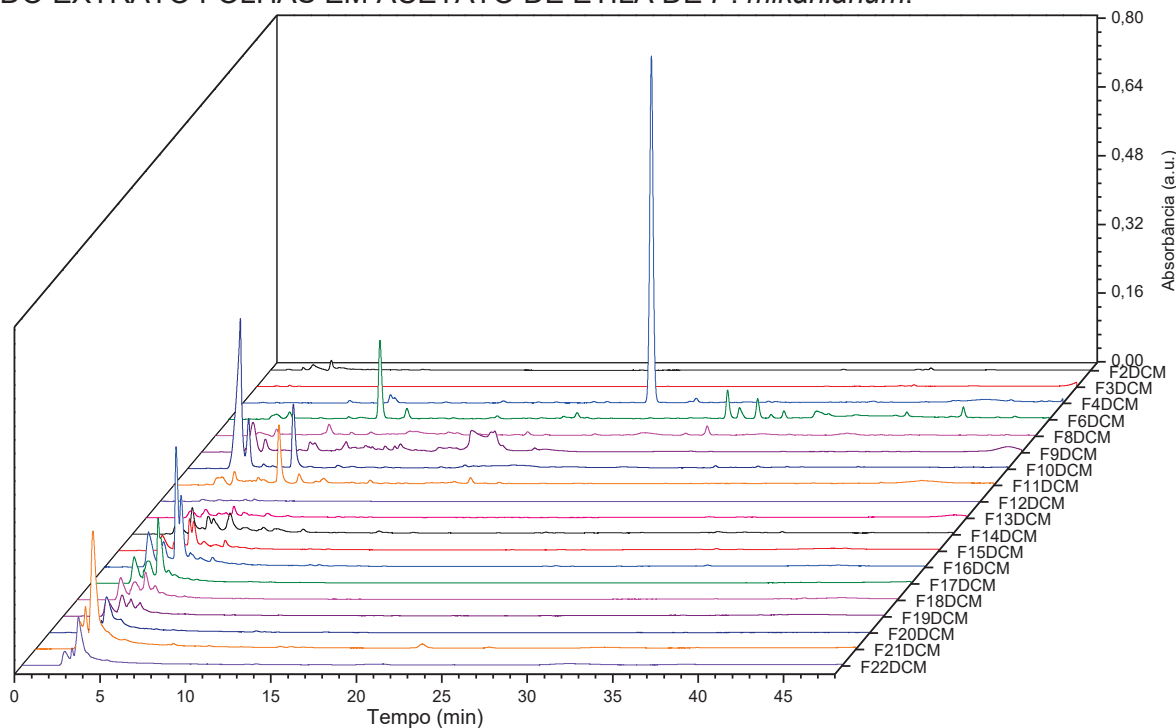
TABELA 13. FRACIONAMENTO E MASSAS (mg) DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO EXTRATO FOLHAS EM ACETATO DE ETILA PARTIÇÃO (HEXANO).

Partição Hexano 18 frações		
Frações	Massa (mg)	Substâncias Identificadas
F1FAHEX	10	1
F2FAHEX	10	-
F3FAHEX	33	-
F4FAHEX	98	-
F5FAHEX	35	-
F6FAHEX	13	-
F7FAHEX	5	-
F8FAHEX	6	-
F9FAHEX	4	-
F10FAHEX	6	-
F11FAHEX	7,4	-
F12FAHEX	4,6	-
F13FAHEX	6,5	-
F14FAHEX	13,7	-
F15FAHEX	20,3	-
F16FAHEX	5,9	-
F17FAHEX	7,7	-
F18FAHEX	1,9	-

13.1.1 Cromatogramas da partição diclorometano do extrato das folhas em acetato de etila.

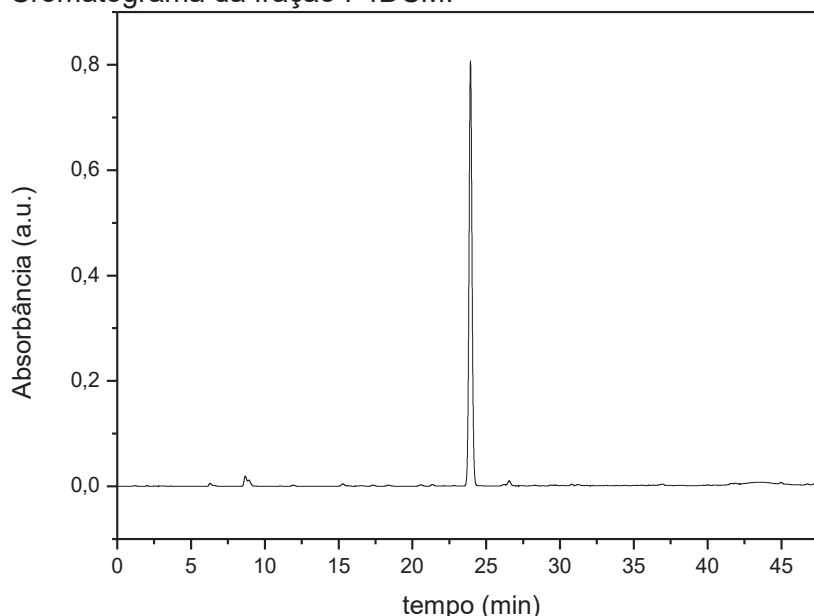
Das 22 frações resultantes da partição diclorometano do extrato das folhas em acetato de etila, 20 destas frações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (FIGURA 30), e as frações F5DCM e F7DCM foram submetidas a cromatografia em coluna preparativa (CCDP), gerando 6 novas frações respectivamente, porém devido a obtenção de pouca massa e à complexidade destas frações observadas por meio da (CCD), não foi possível o isolamento e a identificação deste material, conforme pode ser observado na FIGURA 29.

FIGURA 29. Fluxograma da purificação das frações F5DCM e F7DCM.

FIGURA 30. CROMATOGRAMAS DAS 20 FRAÇÕES DA PARTIÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO FOLHAS EM ACETATO DE ETILA DE *P. mikanianum*.

Dentre as 20 frações restantes da partição diclorometano do extrato de folhas em acetato de etila analisadas pela cromatografia líquida de alta eficiência, optou-se por iniciar a identificação do composto majoritário presente na mistura da fração F4DCM. A substância apresentou um tempo de retenção de 24,00 min conforme pode ser observado no cromatograma da FIGURA 31, e a elucidação estrutural dessa substância será mostrada na sequência deste trabalho.

FIGURA 31. Cromatograma da fração F4DCM.



13.1.2 Determinação estrutural da substância majoritária S-4 contida na fração F4DCM.

O constituinte majoritário presente na mistura da fração F4DCM, foi analisado pelas técnicas uni e bidimensionais de Ressonância Magnética Nuclear, sendo determinado como a substância S-4.

Os dados de RMN de ^1H , de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e do mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância da substância S-4 (FIGURA 32) isolada da partição DCM do extrato das folhas em acetato de etila estão descritos na TABELA 14.

TABELA 14. DADOS DE RMN DE ^1H , DE ^{13}C E MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA S4 (CLOROFÓRMIO, ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), COMPARAÇÃO COM A LITERATURA PARA O SAFROL (CLOROFÓRMIO, RMN ^1H 400 MHz e ^{13}C 100 MHz) (MOHOTTALAGE, et al., 2007).

Nº	^1H (δ) S-4	^1H (δ) Safrol	^{13}C (δ) S-4	^{13}C (δ) Safrol	HMBC ($^3J_{\text{H-C}}$)
1	-	-	133,84	134,28	-
2	6,68 (1H; d; $J=1,4$ Hz)	6,72 (1H; d; $J = 1,4$ Hz)	109,06	109,52	(121,70;145,81;39,87)
3	-	-	147,62	148,04	-
4	-	-	145,81	146,23	-
5	6,72 (1H; d; $J=7,8$ Hz)	6,78 (1H; d; $J = 7,9$ Hz)	108,13	108,58	(133,84;147,62)
6	6,62 (1H; dd; $J=7,8; 1,4$ Hz)	6,67 (1H; dd; $J = 7,9; 1,7$ Hz)	121,27	121,72	(39,87;109,06;145,81)
7	5,91 (m)	5,95 (2H; s)	100,75	101,21	(145,81;147,62)
8	3,30 (d)	3,34 (2H; d; $J = 6,7$ Hz)	39,87	40,33	(109,06;115,62;121,27)
9	5,91 (1H; m)	5,96 (1H; m)	137,57	138,02	(133,84)
10	5,05 (2H; m)	5,10 (2H; m)	115,62	116,20	(39,87)

A análise de RMN de ^1H , (FIGURA 33), mostrou a presença de 3 sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,72, 6,62 e 6,67, e suas respectivas constantes de acoplamento indicam um anel aromático trissubstituído nas posições 1, 3 e 4 e atribuídos a H-5; H-6 e H-2 respectivamente. Além da presença de um duplete (H-8) em δ_{H} 3,30 ($J = 6,72 \text{ Hz}$), e de dois multipletos nas regiões de δ_{H} 5,91 (H-9) e 5,05 (H-10), integrando para um e dois hidrogênios respectivamente, indicando uma cadeia alílica ligada ao anel aromático. Observa-se também o sinal do hidrogênio (m) do grupo metilenodioxido em δ_{H} 5,91 ppm, sobreposto com o sinal do H-9, e, portanto, integrando para três hidrogênios. A estrutura da substância e seus deslocamentos químicos podem ser observadas na FIGURA 32.

FIGURA 32. ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA (S-4).

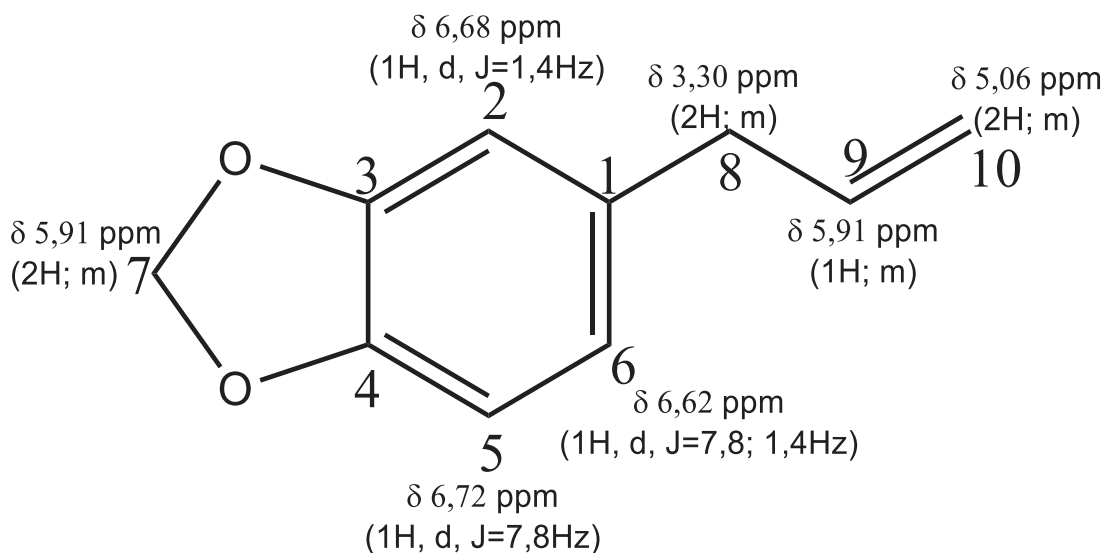
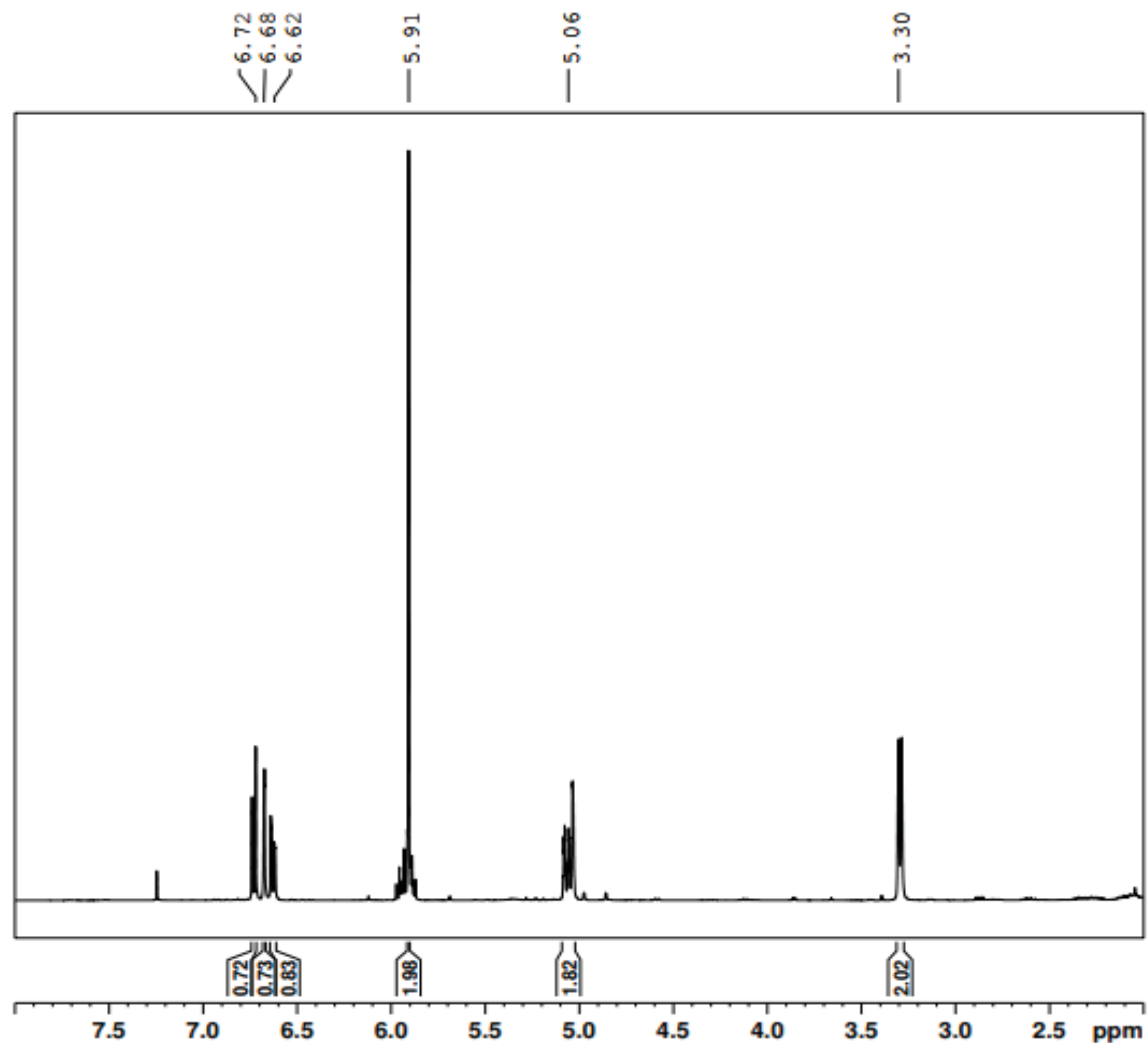
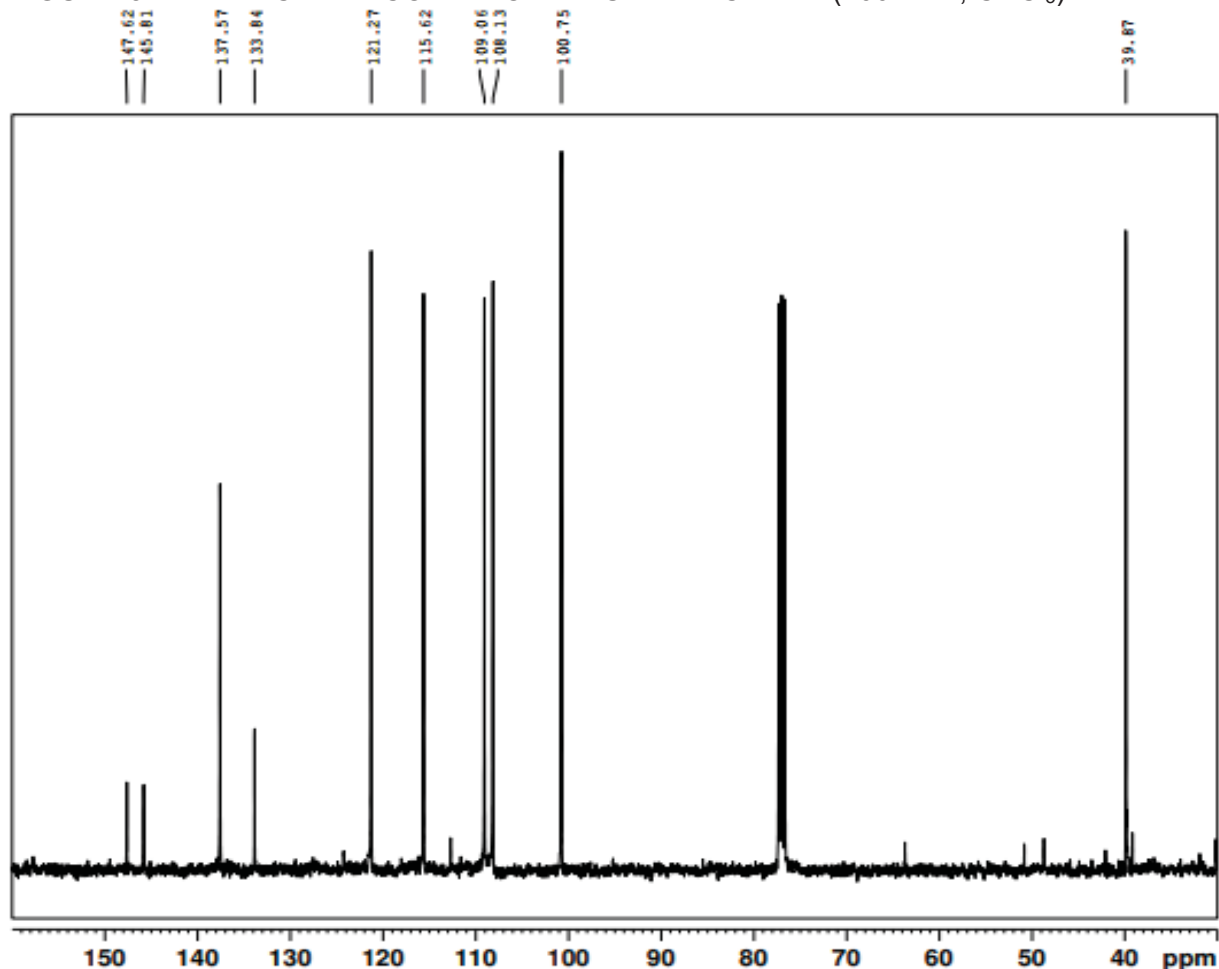


FIGURA 33. ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBSTÂNCIA S-4 (200,12 MHz CDCl_3).

O espectro de RMN de ^{13}C {H} (Figura 34), mostrou a presença de dez átomos de carbono, sendo 8 carbonos sp^2 , localizados na região entre δ 108 a 147, o que permitiu a proposta de uma estrutura de um arilpropanoide.

FIGURA 34. RMN ^{13}C DESACOPLADO DA SUBSTÂNCIA S-4 (100 MHz, CDCl_3).

Pelo mapa de correlação direta HSQC (^1H - ^{13}C) (FIGURA 35 E 36), foi possível observar a correlação dos sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 6,72 com o carbono em δ 108,13, δ 6,67 como o carbono em δ 109,06 ppm, e δ 6,64 com o carbono em δ 121,27 ppm, bem como o sinal em δ 5,91 correlaciona diretamente com os carbonos em δ 100,75 e 137,57, isto porque os sinais dos hidrogênios ficaram sobrepostos, já o sinal do hidrogênio em δ 5,05 se correlaciona diretamente com o carbono em δ 115,61, correspondendo ao carbono da ligação dupla terminal, e o hidrogênio em δ 3,30 ppm com o carbono em δ 39,87.

Por meio das correlações observadas no experimento de correlação a longa distância HMBC (^1H - ^{13}C) (FIGURA 37) foi possível confirmar as posições da cadeia alílica do grupo metilenodióxido e dos hidrogênios aromáticos. O hidrogênio em δ 6,67 apresentou correlação a três ligações (3J) com os carbonos em δ 39,87; 121,27; 145,81, o hidrogênio em δ 6,62 correlacionou 3J com os carbonos em δ 39,87; 109,06; 145,81, e o hidrogênio em δ 6,72 correlacionou 3J com os carbonos em δ 147,62; 133,84, confirmando o anel aromático, já os hidrogênios em δ 3,30 correlacionou 3J com os carbonos em δ 121,27; 109,06; 115,61, os hidrogênios em δ 5,91, 3J com o carbono em δ 133,84, e os hidrogênios em δ 5,05, 3J com o carbono em δ 39,87, confirmando a cadeia alílica. Já os

hidrogênios em δ 5,91, correlaciona 3J com o carbono em 147,62; 145,81, confirmando os hidrogênios do grupo metilenodioxido.

Este composto foi determinado como safrol, que é um composto natural da classe dos arilpropanoides, sendo encontrado no gênero *Piper* em *Piper betle*, *Piper mikanianum* e em outras espécies como a *Sassafras albidum* e a *Cinnamomum camphora*. Sua toxicidade frente ao citocromo P450 já é descrita na literatura, o que torna este composto um possível agente cancerígeno para nós seres humanos, porém esta substância poderia ser utilizada como um hepatocarcinogênico no combate de roedores (HU, et al. 2019). Estudos ressaltam a importância do safrol e sua vasta utilização na síntese orgânica como precursor para a formação de novos compostos químicos, estas substâncias derivadas do safrol apresentam um vasto emprego comercial, como por exemplo a síntese do piperonal composto utilizado como fixador de perfumes, e do butóxido de piperonila utilizado na agricultura como um inseticida de larga utilização (MAIA, et al., 2019).

FIGURA 35. MAPA DE CORRELAÇÃO (HSQC) DIRETA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA S-4.

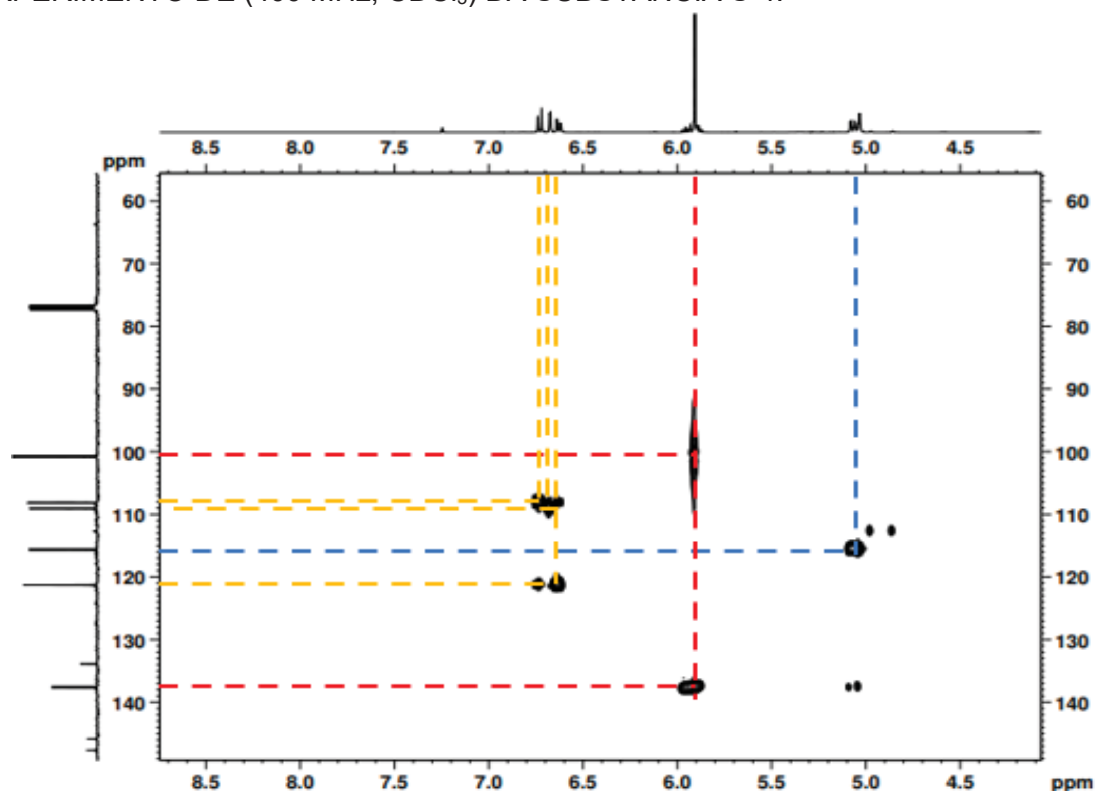


FIGURA 36. MAPA DE CORRELAÇÃO (HSQC) DIRETA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA S-4.

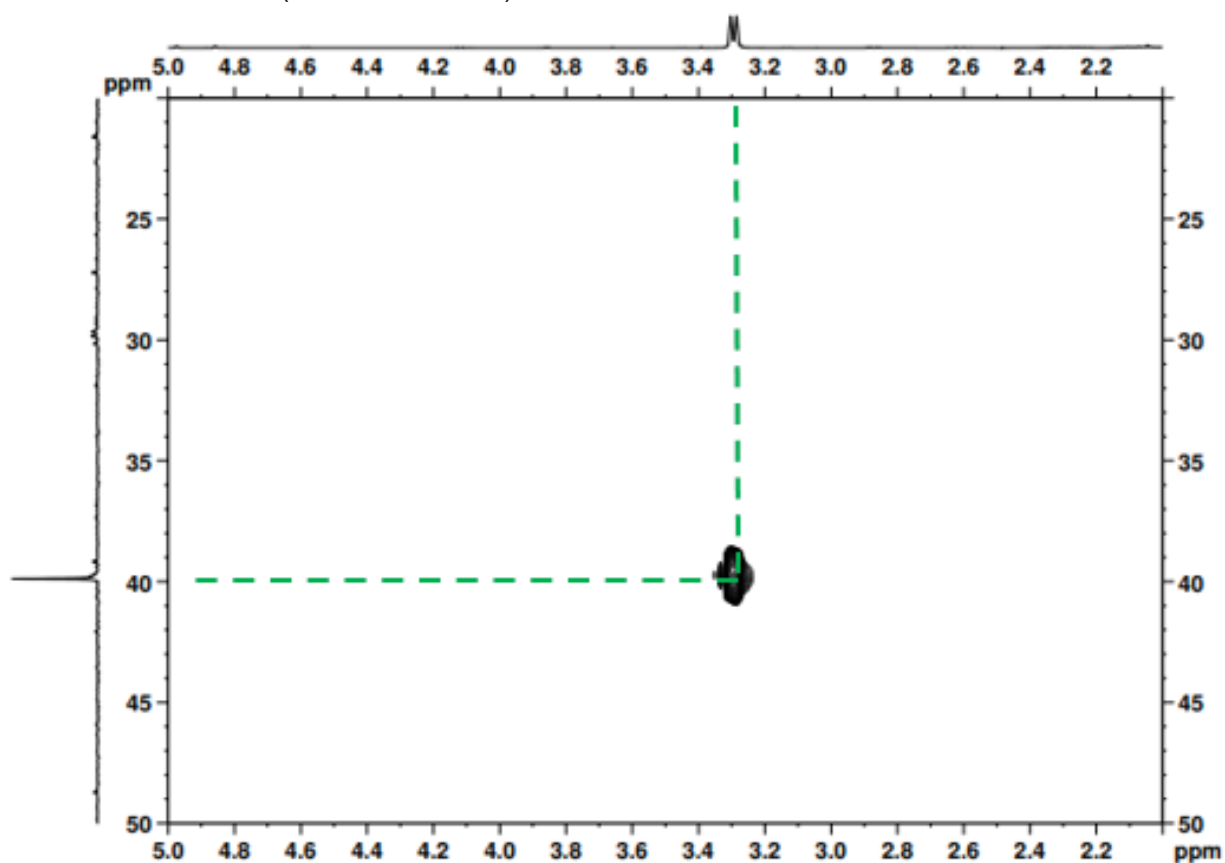
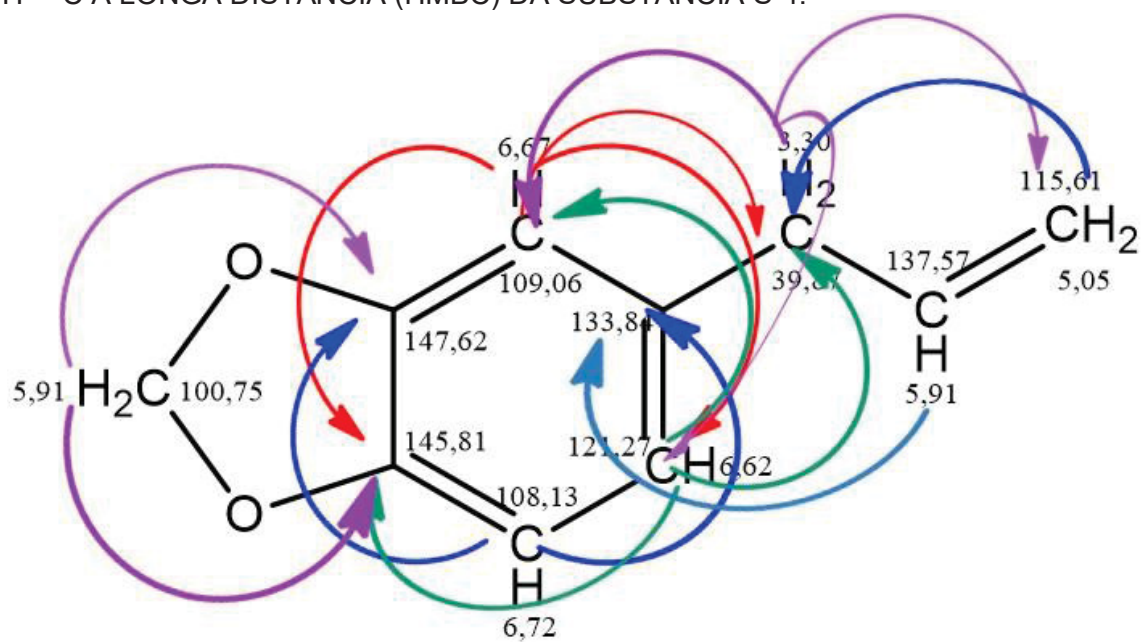


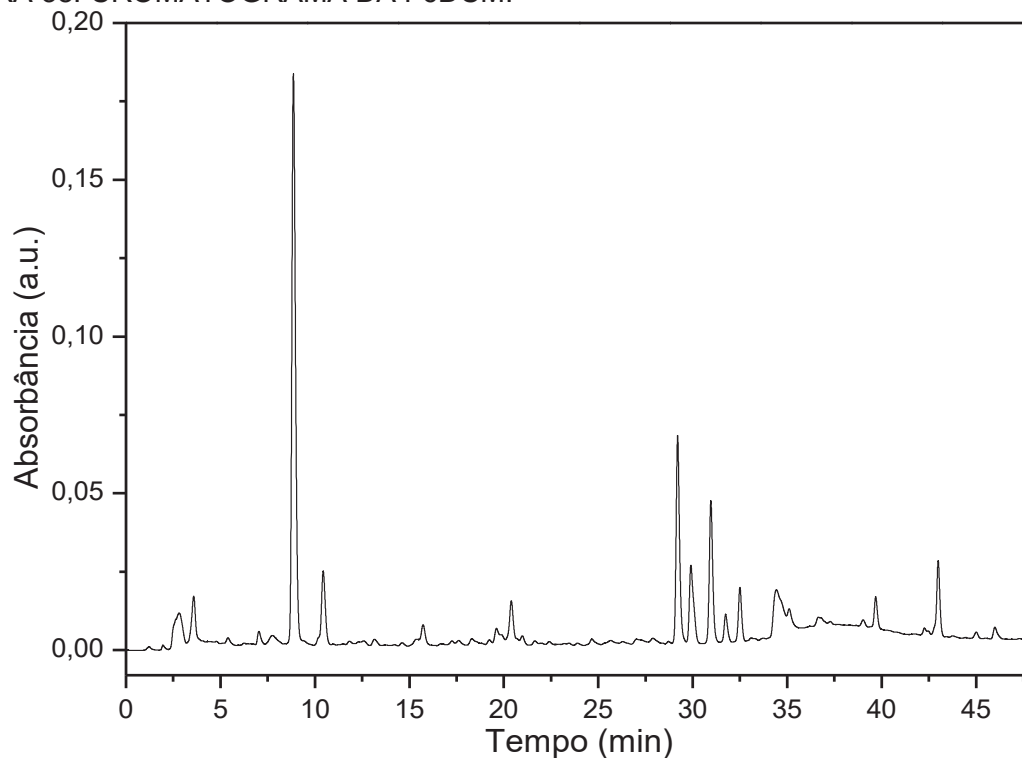
FIGURA 37. PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA S-4.



13.1.3 Purificação por CLAE semi-preparativo da fração F6DCM.

Com o intuito de isolar as substâncias presentes na Fração F6DCM (37,5 mg), optou-se pela separação dos componentes da mistura utilizando a CLAE semi-preparativa, conforme pode ser observado na FIGURA 38.

FIGURA 38. CROMATOGRAMA DA F6DCM.



A separação dos constituintes da mistura da fração F6DCM se deu por meio da CLAE-semi-preparativa, o qual foram feitas 8 injeções de 125 μ L diluídas em 1 mL acetonitrila, resultando em 10 novas subfrações, conforme pode ser observado na TABELA 15.

No entanto, dessas 10 subfrações, apenas a substância majoritária presente na mistura da F6DCM7 foi isolada e identificada. As demais frações não foram possíveis a sua separação e o isolamento devido à baixa massa obtida e à alta complexidade apresentada em CCD.

TABELA 15. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO F6DCM, E SUAS SUB-FRAÇÕES.

Purificação F6DCM por CLAE SEMIPREPARATIVA	
Frações	Massa (mg)
F6DCM1	*
F6DCM2	*
F6DCM3	4,0
F6DCM4	1,0
F6DCM5	0,3
F6DCM6	6,0
F6DCM7	7,0
F6DCM8	0,2
F6DCM9	4,0
F6DCM10	5,0

Nota: *Não apresentou massa.

13.1.4 Determinação estrutural da substância F6DCM7

Após a purificação por CLAE da F6DCM de *P. mikanianum*, a fração F6DCM7 (7 mg), foi analisada pelas técnicas unidimensionais de Ressonância Magnética Nuclear, sendo determinada como a substância R-1 (TABELA 16 E FIGURA 39).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C {H} estão mostrados nas FIGURAS 40 E 41.

TABELA 16. DADOS DE RMN DE R-1 (CLOROFÓRMIO, ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), COMPARAÇÃO COM A LITERATURA PARA O FLAVONOL (CLOROFÓRMIO, ^1H -RMN 400 MHz e ^{13}C 100 MHz), (ALOTAIBI, et al., 2021).

Nº	^1H (δ) R-1	^1H (δ) 4',7-Dimethoxikaempferol	^{13}C (δ) R-1	^{13}C (δ) 4',7-Dimethoxikaempferol
1	-	-	-	-
2	-	-	145,73	145,7
3	-	-	135,69	136,6
4	-	-	175,24	175,1
5	-	-	160,86	160,9
6	6,38 (1H; d; J=2,2 Hz)	6,40 (1H; d; J=2,2 Hz)	97,91	98,0
7	-	-	165,74	165,7
8	6,50 (1H; d; J=2,2 Hz)	6,52 (1H; d; J=2,2 Hz)	92,24	92,1
9	-	-	156,89	156,8
10	-	-	103,97	103,9
1'	-	-	123,23	123,2
2' e 6'	8,18 (2H; d; J=9,2 Hz)	8,20 (2H; d)	129,41	129,4
3' e 5'	7,04 (2H; d; J=9,2 Hz)	7,06 (2H; d)	114,12	114,0
4'	-	-	161,17	161,1
5-OH	11,75 (1H; s)	11,76 (s)	-	-
7-OCH ₃	3,89 (3H; s)	3,91 (s)	55,84	55,9
4'-OCH ₃	3,89 (3H; s)	3,91 (s)	55,43	55,4
3-OH	-	-	-	-

O espectro de RMN de ^1H apresentado na FIGURA 40, revela que para o anel A observa-se dois hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,50 e 6,38, com constantes de acoplamento que indicam que os hidrogênios estão em posição meta ($J=2,2$ Hz), em um

anel tetrassubstituído. Enquanto para o anel B, observam-se os hidrogênios H-3'/H-5' e H-2'/H-6' em δ_H 7,04 e 8,18 respectivamente, com constante de acoplamento indicativa de os hidrogênios estarem em posição *orto* ($J=9,2$ Hz).

Além do padrão de substituição dos anéis presentes no esqueleto de flavonoides, os espectros de RMN ^1H permitiram deduzir a natureza de grupos substituintes, um sinal em (δ_H 3,89) para dois grupos metoxila e um sinal em 11,75 ppm para um grupo hidroxila C5 em ligação de hidrogênio com a carbonila em C-4.

FIGURA 39. REPRESENTAÇÃO MOLECULAR DA SUBSTÂNCIA R-1, E OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H .

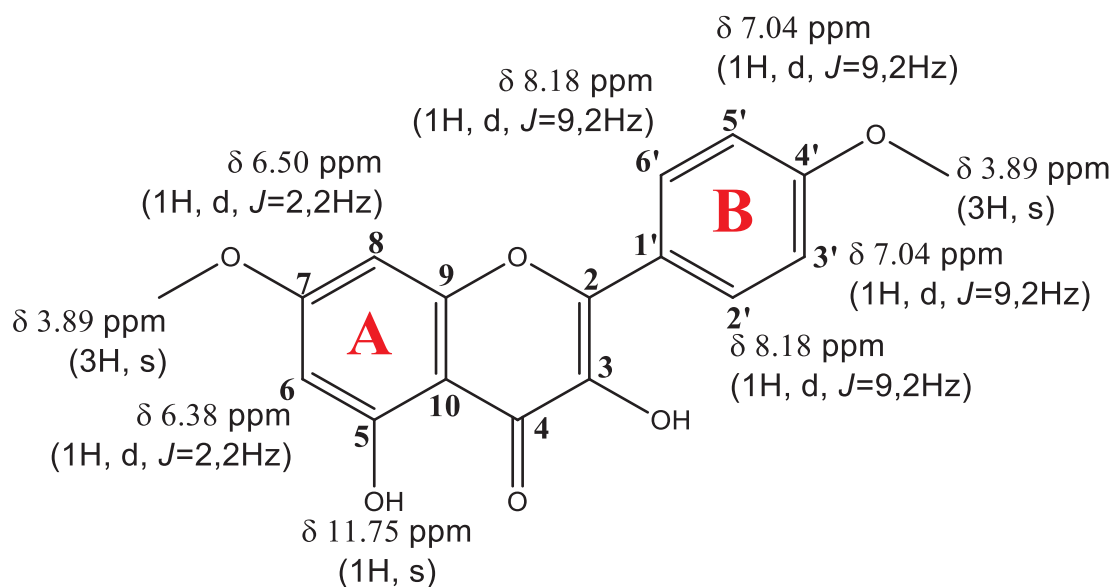
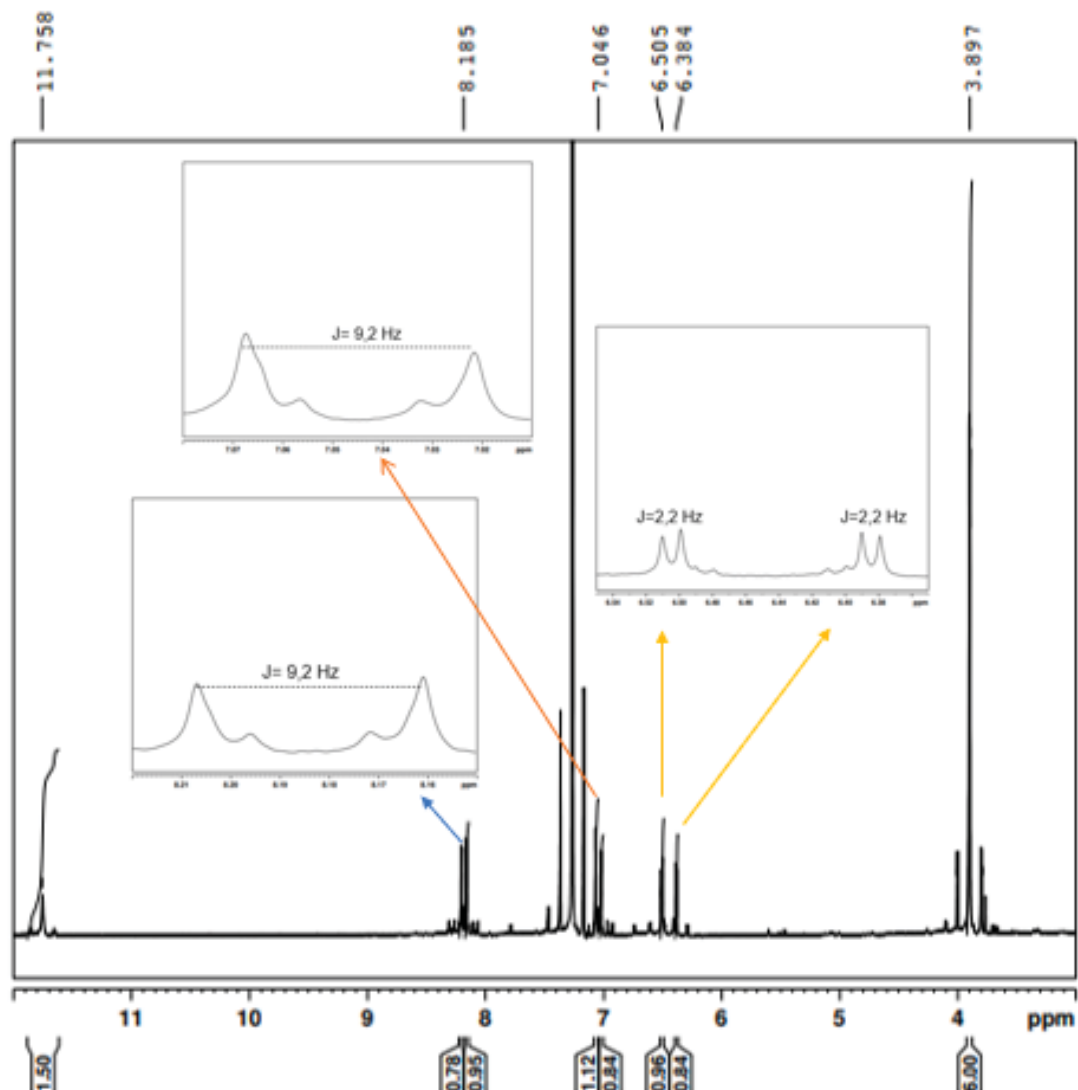


FIGURA 40. RMN DE ^1H DA SUBSTÂNCIA R-1 (400 MHz, CDCl_3).

Embora as informações obtidas nos espectros de RMN de ^1H tenham permitido deduzir a proposta da estrutura, informações relevantes e mais conclusivas foram obtidas pelos espectros de RMN ^{13}C , conforme pode ser observado na FIGURA 41.

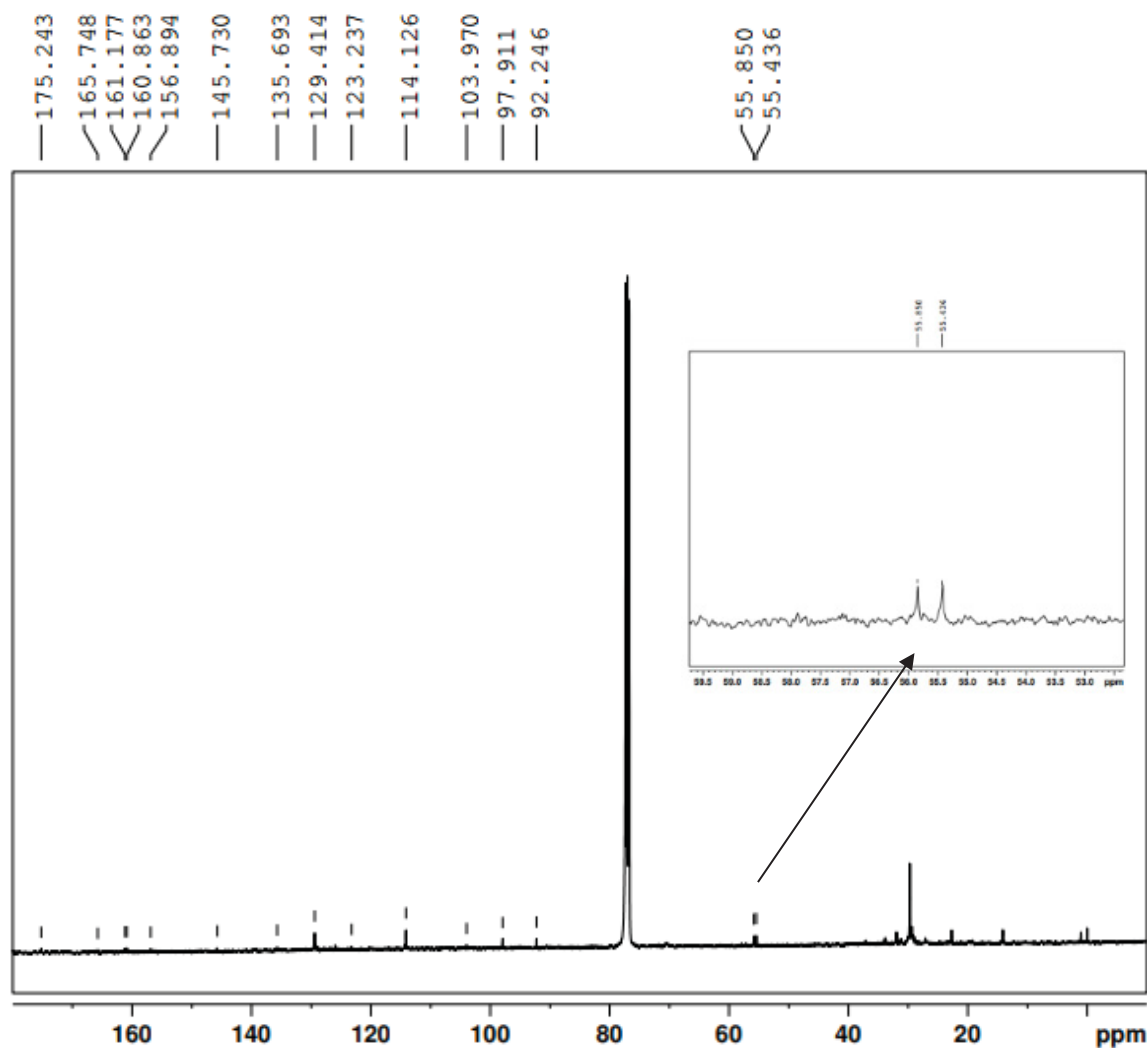
O espectro de RMN de ^{13}C , indica a presença de 15 átomos de carbono, cujos deslocamentos químicos são compatíveis com C-3 (δC 135,69 ppm) no anel C, C-3'/5' e C-2'/6' (δC 114,2 e 129,41 ppm) no anel B, C-6 (δC 97,91 ppm) e C-8 (δC 92,24 ppm) no anel A, além de um grupo carbonila (δC 175,24 ppm) e dois grupos metoxila (δC 55,84 e 55,43 ppm) de um flavonol.

Portanto, a substância R-1 trata-se do flavonol 4',7-Dimethoxikaempferol, sendo que a estrutura do flavonol 4',7-Dimetoxikaempferol é relatado pela primeira vez na família Piperaceae e na espécie *P. mikanianum*.

Trabalhos publicados na literatura relatam que os flavonóis têm potencial significativo como agentes anticancerígenos, bem como são capazes de inibir a proliferação de células cancerosas em diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de mama, cólon, pulmão, próstata e ovário, tais efeitos podem estar correlacionado com a

estrutura química dos flavonóis, e que a presença de grupos hidroxila mostrou ser mais eficaz nas atividades anticancerígenas em comparação com aqueles compostos sem grupos hidroxilas (LAZARO, 2002; HIRPARA, et al., 2009; RAULF et al., 2018).

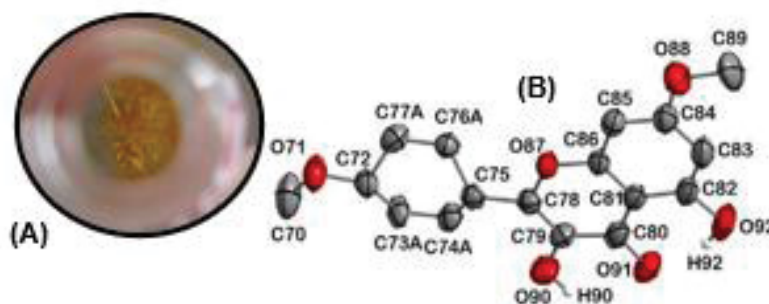
FIGURA 41. RMN DE ^{13}C DESACOPLADO DA SUBSTÂNCIA R-1 (100 MHz, CDCl_3).



Além dos espectros de RMN, foram obtidos também dados de difração de raios x, e a análise de DRX da substância R-1 confirmou um esqueleto do tipo flavonol (FIGURA 42).

Contudo, o cristal não apresentou boa difração, uma vez que o valor de R_{int} foi superior a 20%, e para ser considerada boa difração, este valor deve ser inferior a 12%. Esta questão envolvendo o alto valor de R_{int} está relacionada possivelmente ao tamanho muito pequeno do cristal, acarretando um número muito limitado de dados médios.

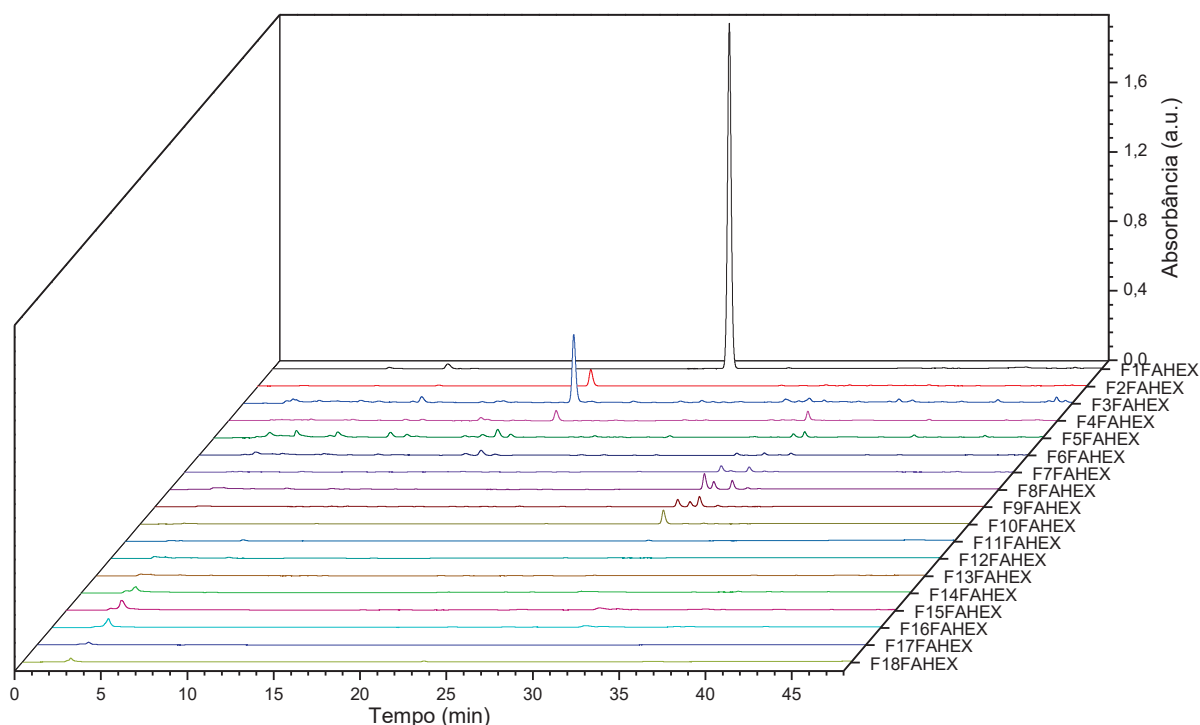
FIGURA 42. (A) SÓLIDO AMARELADO, (B) REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR (ORTEP) DA SUBSTÂNCIA R-1.



13.2 Cromatogramas da partição hexano do extrato das folhas em acetato de etila.

As 18 frações resultantes da partição hexano do extrato das folhas em acetato de etila, foram submetidas a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme pode ser observado na FIGURA 43.

FIGURA 43. CROMATOGRAMAS DAS 18 FRAÇÕES DA PARTIÇÃO HEXANO DO EXTRATO FOLHAS ACETATO DE ETILA DE *P. mikanianum*.



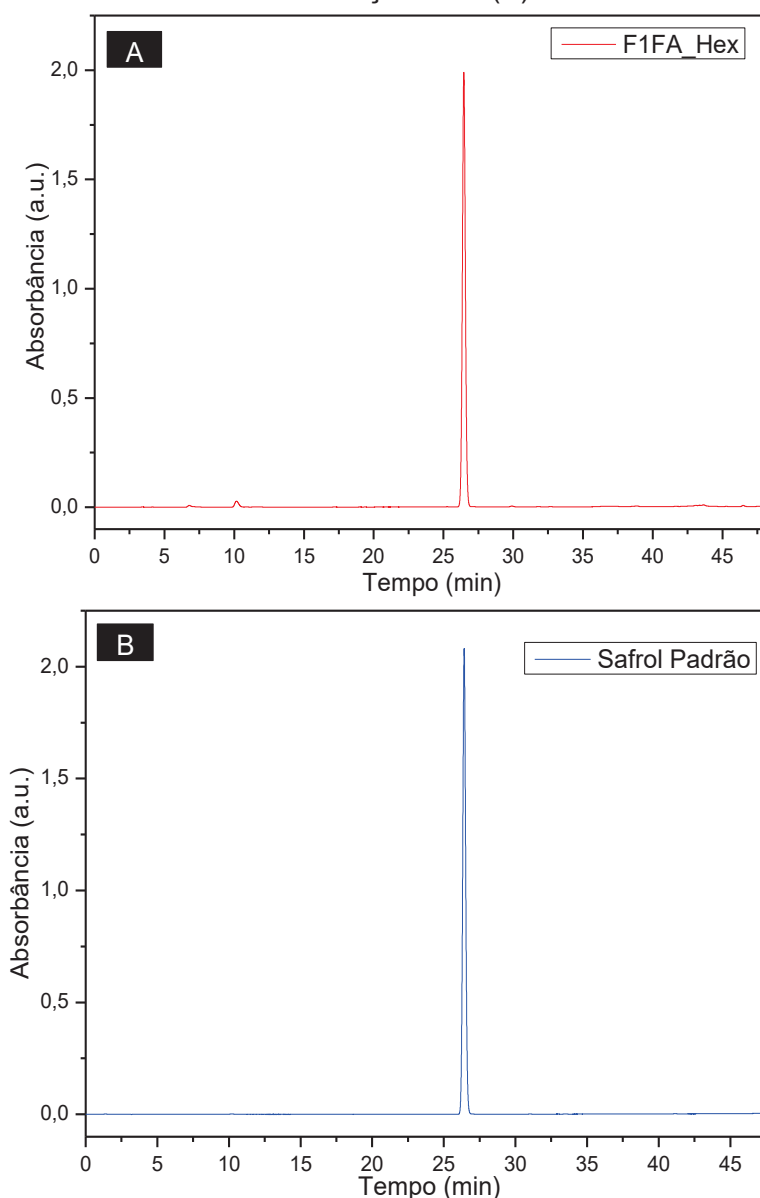
Dentre as 18 frações resultantes da partição hexano do extrato folhas em acetato de etila analisadas pela técnica de CLAE, somente houve a identificação da substância presente na fração F1FAHEX, pois devido à complexidade apresentadas na CCD, bem como, a obtenção de pouca massa de algumas frações, não foi possível dar continuidade no isolamento e na identificação dos compostos químicos presentes. Porém é necessário

dar continuidade ao trabalho, aumentando a compreensão dos aspectos fitoquímicos da família Piperaceae, uma vez que, o conhecimento químico dessa família e da espécie *P. mikanianum* pode fortalecer o uso racional desta planta medicinal e seus possíveis agentes farmacológicos.

A substância majoritária presente na fração F1FAHEX apresentou tempo de retenção de 26,30 min, conforme pode ser observado no cromatograma da FIGURA 44A.

A elucidação estrutural dessa substância será mostrada na sequência deste trabalho e a substância foi determinada com S-2.

FIGURA 44. CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO S-2 (A) E DO PADRÃO DE SAFROL (B).



13.2.1 Determinação estrutural das substâncias S-2.

Pela proximidade encontrada nos tempos de retenção na análise de CLAE do constituinte majoritário da fração F1FAHEX (26,40 min) (FIGURA 44A), quando comparado com o padrão do safrol (26,40 min), observados na (FIGURA 44B), deduziu-se que poderia se tratar novamente do arilpropanoide Safrol.

Para a confirmação e a identificação da substância presente na fração F1FAHEX, esta foi analisada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (FIGURA 45) e seus deslocamento químicos foram comparados com a literatura (TABELA 17).

FIGURA 45. ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBSTÂNCIA S-2 (200 MHz, CDCl_3).

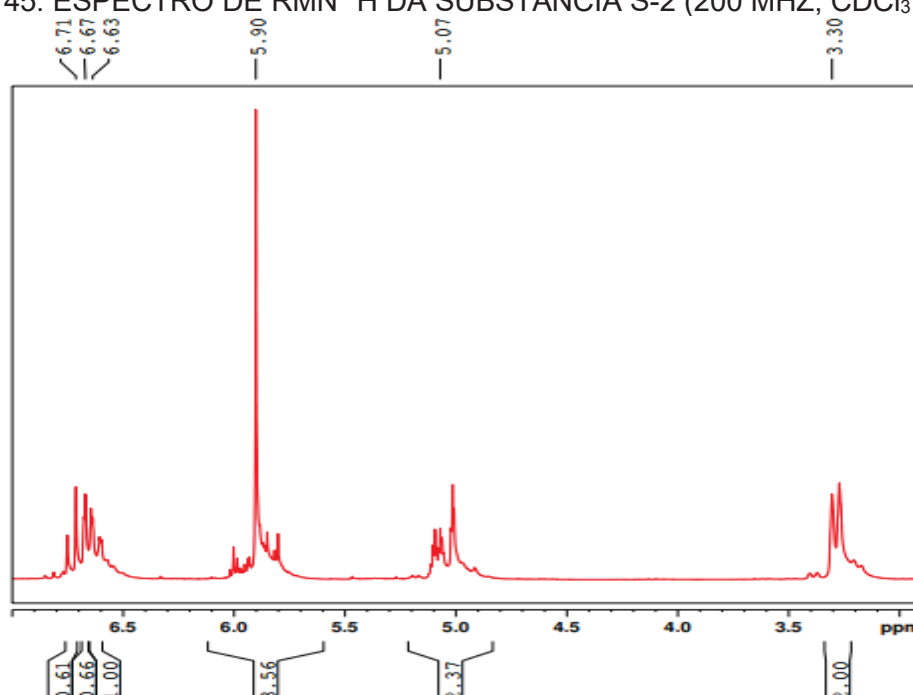


TABELA 17. DADOS DE RMN DE S-2 (CLOROFÓRMIO, ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), COMPARAÇÃO COM A LITERATURA PARA O SAFROL (CLOROFÓRMIO, ^1H -RMN 400 MHz e ^{13}C 100 MHz), (MOHOTTALAGE, et al., 2007).

Nº	^1H (δ) ^a S-2	^1H (δ) ^b S-4	^1H (δ) ^c Safrol
1	-	-	-
2	6,67 (1H; d; J=1,43)	6,67 (1H; d; J=1,46)	6,72 (1H; d; J = 1,4)
3	-	-	-
4	-	-	-
5	6,71 (1H; d; J= 7,90)	6,72 (1H; d; J=7,88)	6,78 (1H; d; J = 7,9)
6	6,63 (1H; dd; J= 7,86; 1,60)	6,62 (1H; dd; J=7,88; 1,46)	6,67 (1H; dd; J = 7,9;1,7)
7	5,90 (m)	5,91 (m)	5,95 (2H; s)
8	3,30 (m)	3,30 (m)	3,34 (2H; d; J = 6,7 Hz)
9	5,90 (m)	5,91 (m)	5,96 (1H; m)
10	5,07 (m)	5,05 (m)	5,10 (2H; m)

Por meio dos tempos de retenção observados pela técnica de CLAE, juntamente com os deslocamentos químicos adquiridos no espectro de RMN de ^1H da substância presente na fração F1FAHEX e comparados com dados na literatura, confirma-se que o composto encontrado nesta fração S-2, trata-se novamente do arilpropanoide safrol.

14. Fracionamento e partição do extrato raízes em metanol de *Piper mikanianum*.

O extrato bruto em metanol raízes, (10 g), foi particionado em diclorometano e metanol com auxílio de funil de separação, e então foram submetidos a cromatografia em coluna a vácuo, utilizando sílica flash como fase estacionária e eluídos com hexano e acetato de etila em diferentes proporções. Para a partição diclorometano foram obtidas 12 frações e reagrupadas por CCD de acordo com o seu R_f em 8 novas frações, as massas obtidas estão descritas na TABELA 18. Já para a partição metanol, foram geradas, 24 frações, reagrupadas por CCD de acordo com o seu R_f em 11 novas frações, cujas massas foram anotadas, conforme (TABELA 20).

14.1 Cromatogramas da partição diclorometano do extrato raízes metanol.

As frações foram analisadas por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme pode ser observado na FIGURA 46.

FIGURA 46. CROMATOGRAMAS DAS 8 FRAÇÕES RESULTANTES DA PARTIÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO RAÍZES EM METANOL DE *P. mikanianum*

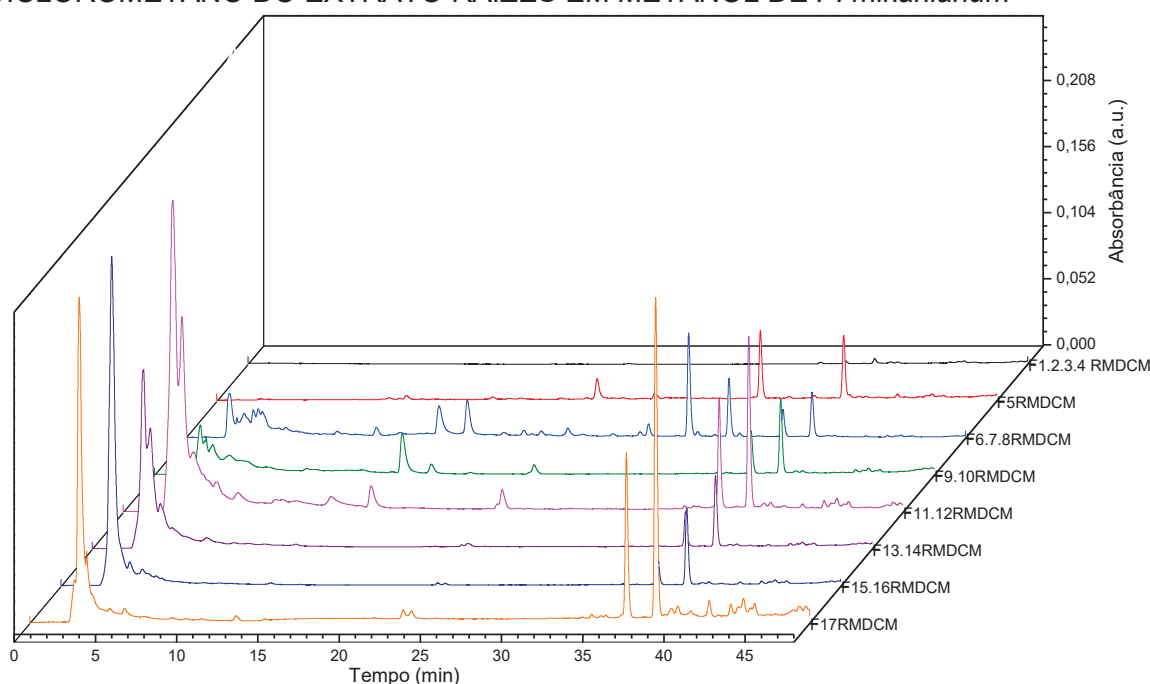


TABELA 18. MASSAS (mg) DAS FRAÇÕES DA PARTIÇÃO DCM DO EXTRATO DAS RAÍZES EM METANOL DE *P. mikanianum*.

Coluna à vácuo – Partição diclorometano – Extrato raízes em metanol <i>P. mikanianum</i>		
Frações	Massa (mg)	Substâncias
1.2.3.4	18	-
5	28	-
6.7.8	30	-
9.10	52	1
11.12	38	-
13.14	46	-
15.16	41	-
17	71	-

Dentre as 8 frações resultantes da partição diclorometano do extrato raízes em metanol analisadas pela técnica de CLAE, somente houve a identificação da substância presente na fração F9.10MDCM, que pertence a classe dos alcaloides, identificado pela primeira vez nas raízes de *P. mikanianum*, porém sendo já reportado o seu isolamento na família Piperaceae em espécies como a *P. nigrum* (Lima, et al., 2021).

A elucidação estrutural dessa substância contida em mistura na fração F9.10MDCM, será mostrada na sequência deste trabalho.

14.2. Determinação estrutural da substância majoritária P-1 contida na fração F9.10MDCM.

O constituinte químico isolado e identificado da fração F9.10MDCM foi analisado pela técnica unidimensional de ^1H e de ^{13}C desacoplado por Ressonância Magnética Nuclear, sendo determinado como a substância P-1.

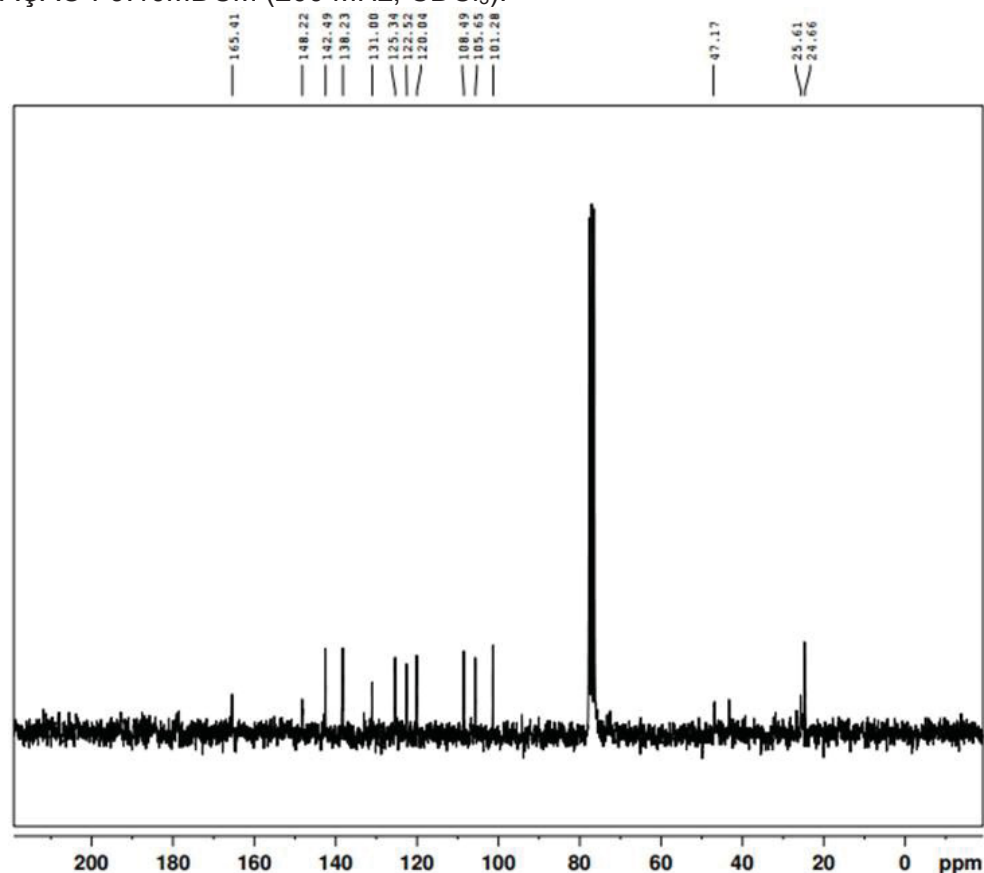
Os dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ da substância P-1 isolada da partição em DCM do extrato de raízes de *P. mikanianum*, estão descritos na TABELA 19.

TABELA 19. DADOS DE RMN DE P-1 (CLOROFÓRMIO, ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), COMPARAÇÃO COM A LITERATURA PARA A PIPERINA (CLOROFÓRMIO, ^1H -RMN 400 MHz e ^{13}C 100 MHz), (SAHA, et al., 2013; SUZERY, et al., 2019).

Nº	^1H (δ) ^a P-1	^1H (δ) ^b Piperina	^{13}C (δ) ^a P-1	^{13}C (δ) ^b Piperina
C=O	-	-	165,40	165,30
1	-	-	131,00	130,80
2	6,99 (1H; d; $J=1,5\text{Hz}$)	6,97 (1H; d)	105,65	105,50
3	-	-	148,22	148,00
4	-	-	148,22	148,00
5	6,80 (1H; m)	6,78 (1H; m)	108,49	108,30
6	6,90 (1H; dd; $J=8,0$; 1,5 Hz)	6,89 (1H; dd)	122,52	122,40
1'	3,59 (4H; m)	3,63 (4H; m)	47,17	46,10
2'	1,64 (4H; m)	1,56 (4H; m)	25,61	26,00
3'	1,69 (2H; m)	1,66 (2H; m)	24,66	24,50
A	6,45 (1H; d; $J=14,6\text{Hz}$)	6,44 (1H; d)	120,04	119,80
B	7,41 (1H; m)	7,42 (1H; ddd)	142,49	142,40
C	6,74 (1H; m)	6,69 (1H; m)	125,34	125,10
D	6,76 (1H; m)	6,78 (1H; m)	138,23	138,30
OCH ₂	5,98 (2H; s)	5,97 (2H; s)	101,28	101,10

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 47), apresentou sinais em δ_{H} 1,64 a 7,41 ppm, indicando a presença de 3 sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,99 ppm, 6,90 ppm e 6,76 ppm atribuídos a H-2; H-6; H-5 respectivamente, característico de um anel aromático trissubstituído nas posições 1, 3 e 4, bem como indicou a presença de hidrogênios olefínicos com sinais em δ_{H} 7,41 ppm, 6,74 ppm, 6,76 ppm e 6,45 ppm, correspondentes aos hidrogênios H-b, H-c, H-d e H-a respectivamente, foram observados sinais também para os hidrogênios do anel piperidínico em δ_{H} 3,59 ppm, 1,69 ppm e 1,64 ppm, correspondentes aos hidrogênios H-1', H-3' e H-2'. E por fim, observou-se o sinal de um multiplete (m) do grupo metilenodioxido em δ_{H} 5,98 ppm. A estrutura da substância e seus deslocamentos químicos podem ser observadas na FIGURA 48, já os sinais observados de δ_{H} foram comparáveis com os relatados para o espectro RMN de ^1H da piperina (SAHA, et al., 2013; SUZERY, et al., 2019).

FIGURA 49. ESPECTRO DE RMN ^{13}C DESACOPLADO DA SUBSTÂNCIA P-1 CONTIDA NA FRAÇÃO F9.10MDCM (200 MHz, CDCl_3).



Portanto, a substância P-1 trata-se de um metabólito secundário da classe dos alcaloides, conhecido como piperina e relatado pela primeira vez o seu isolamento e identificação nas raízes da espécie *P. mikanianum*.

A piperina é um composto orgânico encontrado na pimenta preta e em outras plantas do gênero *Piper*. Ela tem sido estudada em função da ampla gama de propriedades biológicas que apresenta, em um estudo publicado em 2015 no Journal of Translational Medicine, relataram que a piperina pode ter efeitos benéficos na prevenção e tratamento do câncer de mama. Os resultados sugerem que a piperina pode inibir a proliferação de células cancerosas (ZHANG, et al., 2015). Outros estudos têm explorado o potencial da piperina como agente anticonvulsante (PERDERSEN, et al., 2009), anti-inflamatório (BAE, et al., 2010), gastrointestinal, diabético (BAWA, et al., 2021), fungicida (OLIVEIRA, et al., 2020). Tais efeitos farmacológicos reforçam a importância desta substância e destacam o estudo fitoquímico desta espécie da família Piperaceae.

Em resumo, a piperina tem mostrado potencial para uma variedade de aplicações biológicas, no entanto, é importante notar que as pesquisas ainda estão em estágios iniciais e são necessários mais estudos para confirmar esses efeitos em humanos.

14.3 Cromatogramas da partição metanol do extrato raízes metanol.

As 11 frações resultantes da partição metanol do extrato das raízes em metanol, foram submetidas a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme pode ser observado na FIGURA 50 e suas massas foram determinadas, conforme pode ser observado na TABELA 20. Contudo, diante da alta complexidade e do grande número de metabólitos secundários de alta a média polaridade presentes nestas frações e juntamente com a pouca massa obtida destes metabólitos, não foi possível realizar o isolamento e a identificação destas substâncias, a continuação do estudo é de suma importância para o entendimento da fitoquímica destas frações e será realizado pelo nosso grupo por meio de protocolos específicos para substâncias polares visando o isolamento e a identificação destes compostos.

FIGURA 50. (A) CROMATOGRAMAS DAS 11 FRAÇÕES RESULTANTES DA PARTIÇÃO METANOL DO EXTRATO RAÍZES EM METANOL DE *P. mikanianum*.

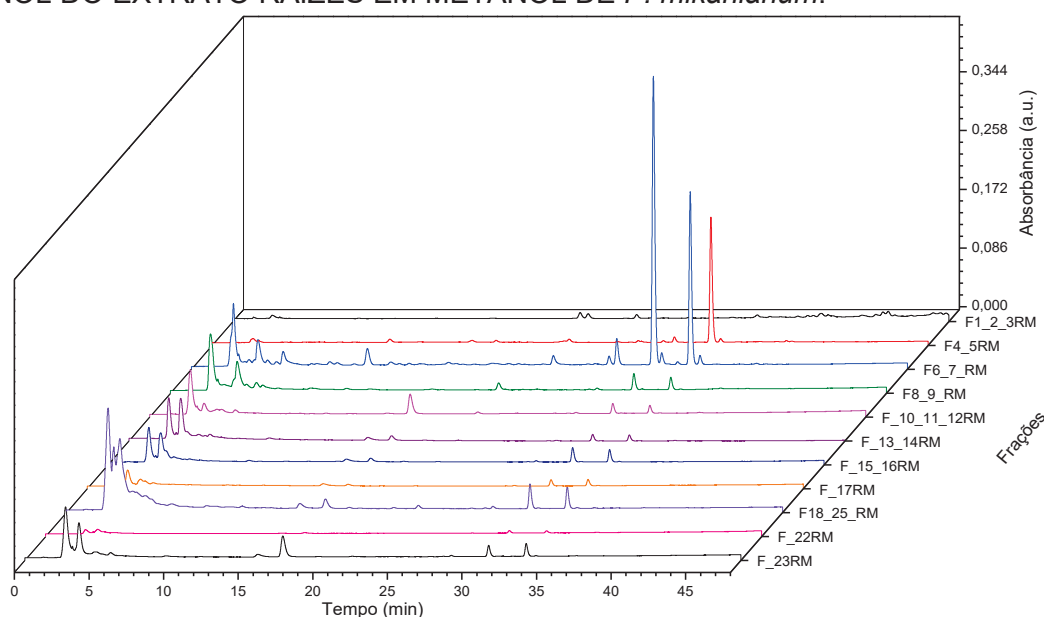


TABELA 20. MASSAS (mg) DAS FRAÇÕES DA PARTIÇÃO METANOL DO EXTRATO DAS RAÍZES EM METANOL DE *P. mikanianum*.

Coluna à vácuo - Partição metanol - Extrato raízes e metanol de *Piper mikanianum*.

Frações	Massa (mg)
1.2.3	9,9
4.5	5,5
6.7	12,6
8.9	4,6
10.11.12	5,4
13.14	5,6
15.16	3,3
17	2,2
18 a 25	20
22	2,5
23	3,4

15. Fracionamento e partição do extrato de raízes em acetato de etila.

Os extratos brutos em acetato de etila raízes (10 g), foram particionados em hexano, e metanol com auxílio de um funil de separação, e então foram submetidos a cromatografia em coluna a vácuo, utilizando sílica flash (0,04-0,063 mm; Macherey-Nagel, Germany) como fase estacionária e eluidos com hexano e acetato de etila em diferentes proporções.

Para a partição metanol gerou-se 7 frações, sua CCD pode ser observada na FIGURA 51 A e seus cromatogramas realizados através do CLAE estão na FIGURA 52 A, e na TABELA 21 A estão as massas de cada fração. Porém, devida a complexidade das frações, e a pouca massa não foi possível o isolamento e a identificação destas substâncias.

Já para partição hexano foram obtidas 3 frações, sua CCD está representada na FIGURA 51 B, seu cromatograma pode ser observado na FIGURA 52 B, suas massas estão relatadas na TABELA 21 B. A elucidação das substâncias desta partição será demonstrada na sequência deste trabalho.

FIGURA 51. IMAGEM DA CCD DE RAÍZES EM ACETATO DE ETILA 7 FRAÇÕES (A) PARTIÇÃO METANOL E 3 FRAÇÕES (B) PARTIÇÃO HEXANO.

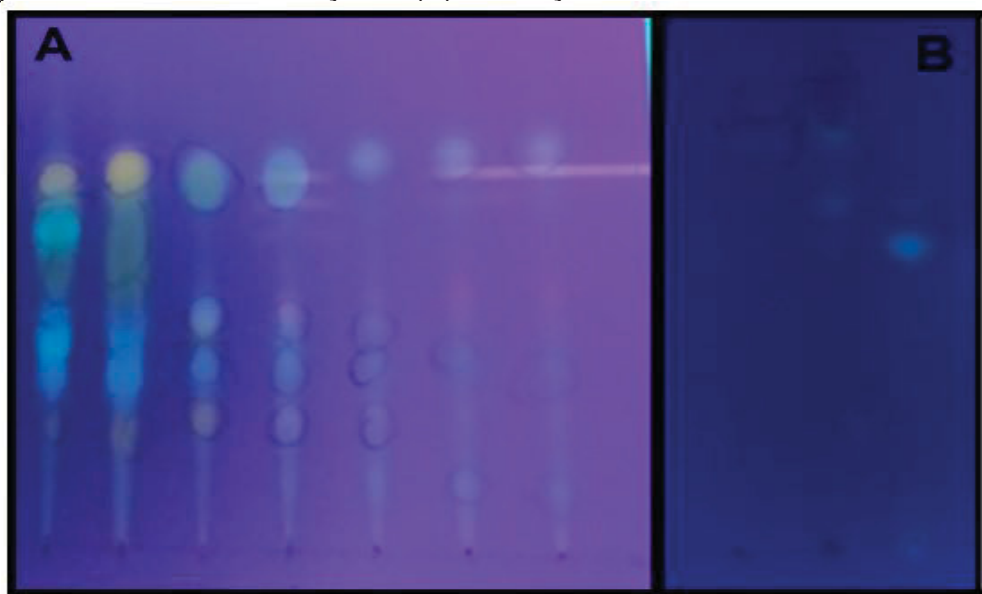


FIGURA 52. CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES RESULTANTES DA PARTIÇÃO METANOL (A) E HEXANO (B) DO EXTRATO RAÍZES EM ACETATO DE ETILA *P. mikanianum*.

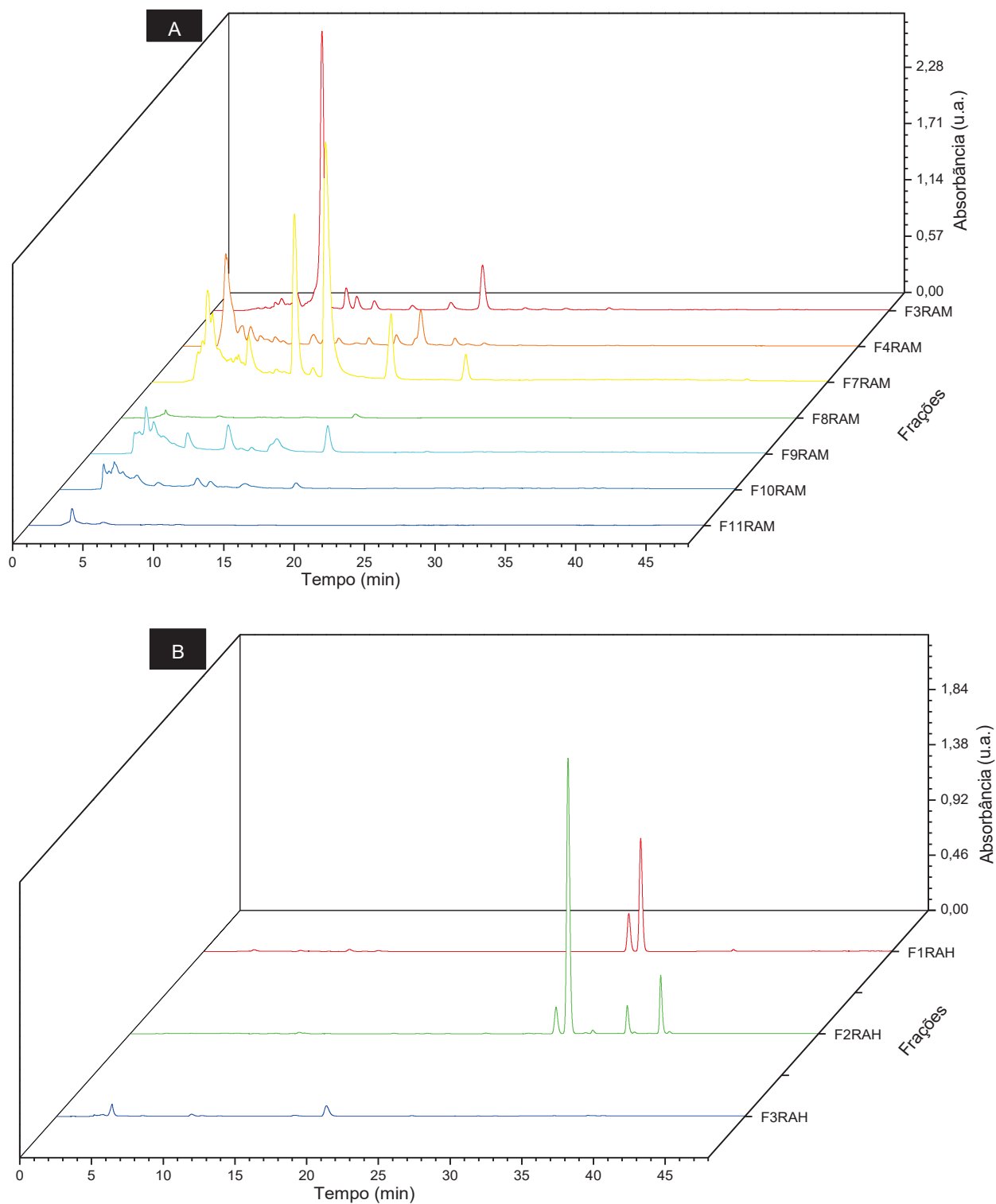
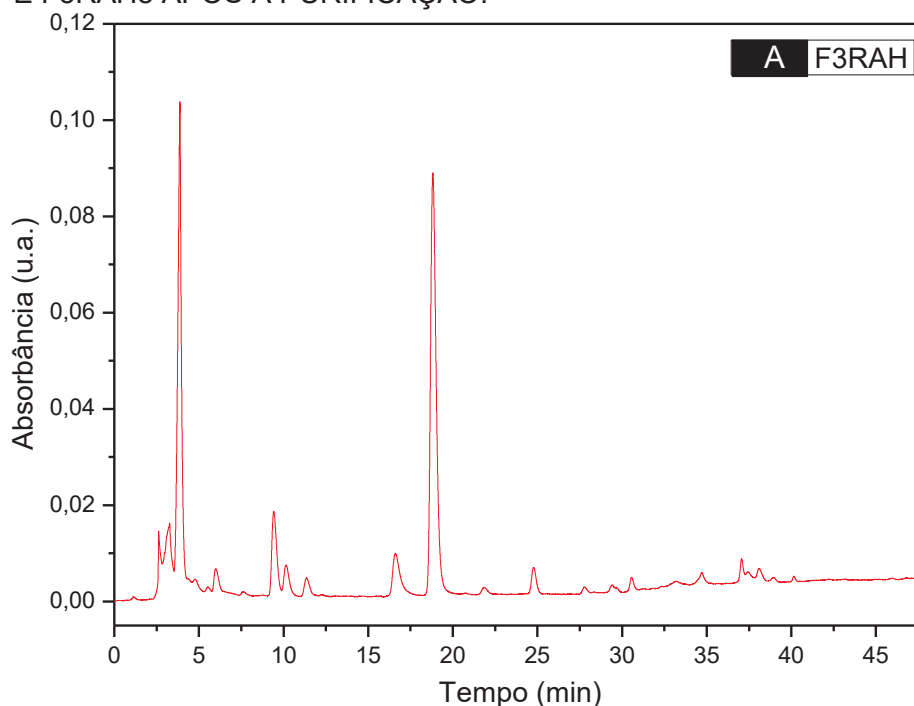


TABELA 21. MASSAS (mg) DAS FRAÇÕES DA PARTIÇÃO METANOL (A) E HEXANO (B) DO EXTRATO DAS RAÍZES EM ACETATO DE ETILA *P. mikanianum*.

(A) Coluna à vácuo -Partição Metanol – Extrato acetato de etila raízes de <i>Piper mikanianum</i> .		(B) Coluna à vácuo – Partição Hexano – Extrato acetato de etila raízes de <i>Piper mikanianum</i> .	
Número das frações	Massa (mg)	Número das frações	Massa (mg)
F1RAM	28,0	F1RAH	230,0
F2RAM	63,0	F2RAH	400,0
F3RAM	11,0	F3RAH	100,0
F4RAM	4,2		
F5RAM	5,7		
F6RAM	80,0		
F7RAM	130,0		
F8RAM	52,0		
F9RAM	79,0		
F10RAM	50,0		
F11RAM	100,0		
F12RAM	50,0		

A identificação das substâncias foi iniciada pela fração F3RAH (FIGURA 53 A), devido a simplicidade da amostra. Foram então realizadas corridas por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, conforme pode ser observado na FIGURA 53 B através de uma coluna semi-preparativa, gerando oito novas frações (F3RAH1 até a F3RAH8), porém somente as frações F3RAH7 (16,2 mg) e F3RAH8 (18 mg) apresentaram massa suficiente para a continuação das análises de identificação por meio da técnica unidimensional de RMN de ^1H e ^{13}C desacoplado, conforme pode ser observado na FIGURA 54.

FIGURA 53. CROMATOGRAMA ANALÍTICO DA F3RAH (A) E (B) CROMATOGRAMAS F3RAH7 E F3RAH8 APÓS A PURIFICAÇÃO.



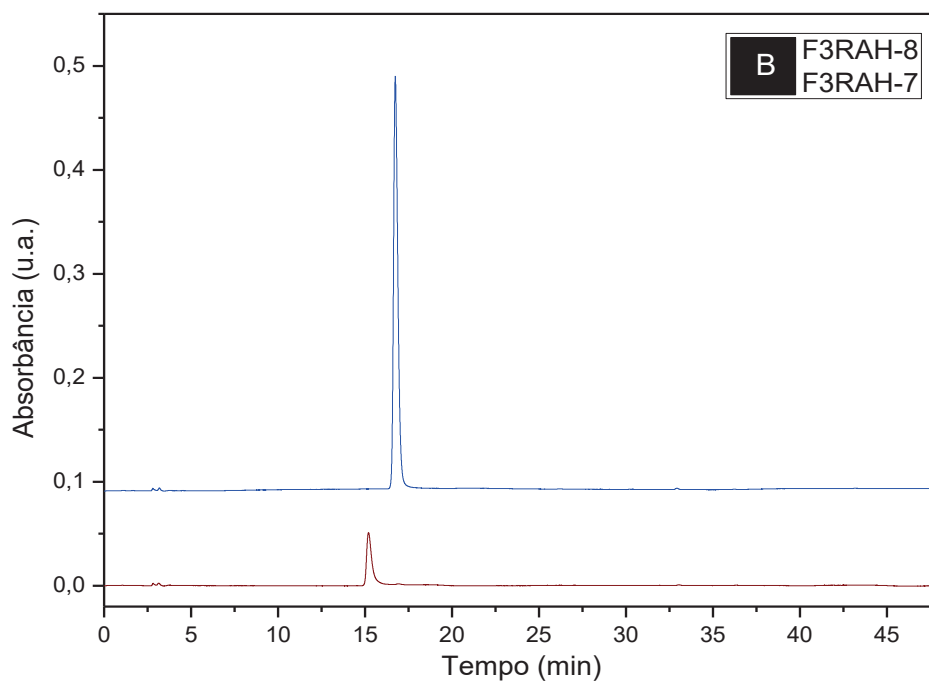
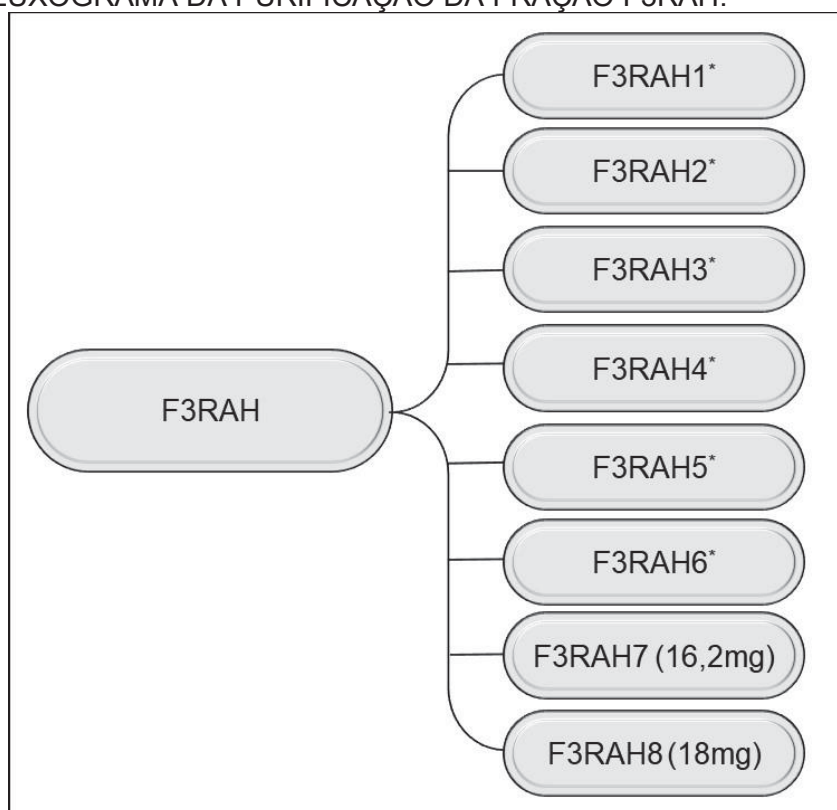


FIGURA 54. FLUXOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO F3RAH.



Nota: *não obtido massa destas frações.

A elucidação estrutural da substância contida em mistura na fração F3RAH7, será mostrada na sequência deste trabalho, já a fração F3RAH8 não foi possível a identificação das substâncias presentes na mistura.

15.1 Determinação estrutural da substância majoritária R-3 contida em mistura na subfração F3RAH7.

O constituinte químico isolado e identificado da fração F3RAH7 foi analisado pela técnica unidimensional de ^1H e de $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ por Ressonância Magnética Nuclear, sendo determinado como a substância R-3.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância R-3 isolada da partição em hexano do extrato de raízes em acetato de etila de *P. mikanianum*, estão descritos na TABELA 22.

TABELA 22. DADOS DE RMN DE R-3 (CLOROFÓRMIO, ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), COMPARAÇÃO COM A LITERATURA PARA A ASARICINA (CLOROFÓRMIO, ^1H -RMN 400 MHz e ^{13}C 100 MHz), (LORENZO, et al., 2001; HEMATPOOR, ET AL., 2016).

Nº	^1H (δ) ^a R-3	^1H (δ) ^b Asaricina	^{13}C (δ) ^c R-3	^{13}C (δ) ^c Asaricina
1	-	-	120,75	120,20
2	6,63 (1H, s)	6,64 (1H, s)	109,64	109,70
3	-	-	146,32	146,40
4	-	-	140,99	141,00
5	6,50 (1H, s)	6,51 (1H, s)	94,86	95,0
6	-	-	152,10	152,20
1'	3,27 (2H, d, $J=6,6$ Hz)	3,28 (2H, d, $J=6,8$ Hz)	33,97	34,00
2'	5,93 (m)	5,87 (m)	137,27	137,3
3'	4,98 - 5,05 (2H, m)	4,99 - 5,06 (2H, m)	115,20	115,3
3a	5,85 (2H, s)	5,88 (2H, s)	100,94	101,00
OMe	3,72 (3H, s)	3,45 (2H, s)	56,47	56,6

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 55), apresentou sinais de δ_{H} 3,27 a 6,63 ppm, indicando a presença de 2 sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,63 ppm (1H, s; H-2), e 6,50 ppm (1H, s; H-5, típicos de hidrogênios ligados a anel benzênico tetra substituído em que os hidrogênios estão em posição para, bem como indicou a presença de um conjunto de multipeto em δ_{H} 5,93 ppm (1H) e um sinal em δ_{H} 5,85 ppm (2H,s) característico dos hidrogênios do grupo metilenodioxido, foram observados sinais também em δ_{H} 4,98 e 5,05 ppm (2H, m) correspondendo aos hidrogênios de grupamento vinila, H-2' e H-3', além de um dupeto em δ_{H} 3,27 ppm (2H, d, $J=6,6$ Hz) característicos de hidrogênios benzílicos, e na região dos hidrogênios alifáticos foi observado um simpleto em δ_{H} 3,72 ppm (3H) referentes aos prótons do grupo metoxila ligados ao C-6. A estrutura da substância e seus deslocamentos químicos podem ser observadas na FIGURA 56, já os sinais observados de δ_{H} foram comparáveis com os relatados para o espectro RMN de ^1H da asaricina (HEMATPOOR, et al., 2016).

FIGURA 55. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA SUBSTÂNCIA R-3 CONTIDA EM MISTURA NA FRAÇÃO F3RAH7 (200 MHz, CDCl_3).

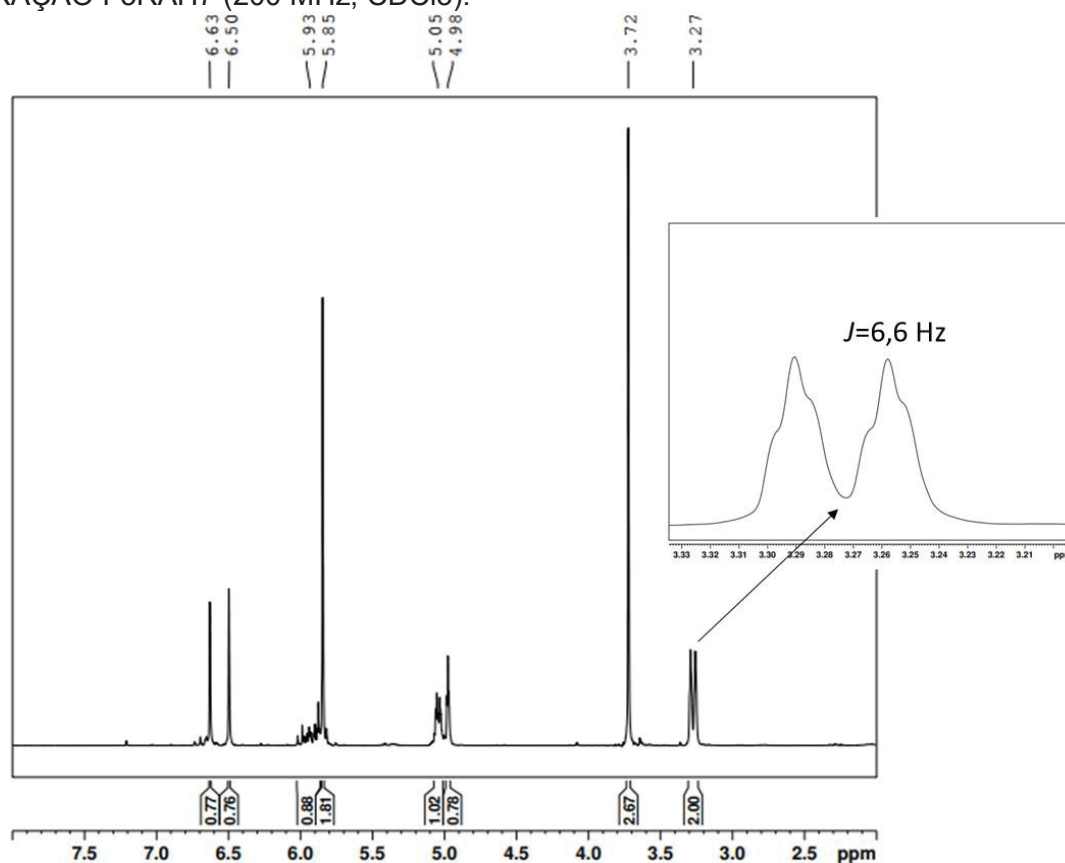


FIGURA 56. REPRESENTAÇÃO MOLECULAR DA SUBSTÂNCIA R-3, E OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H .

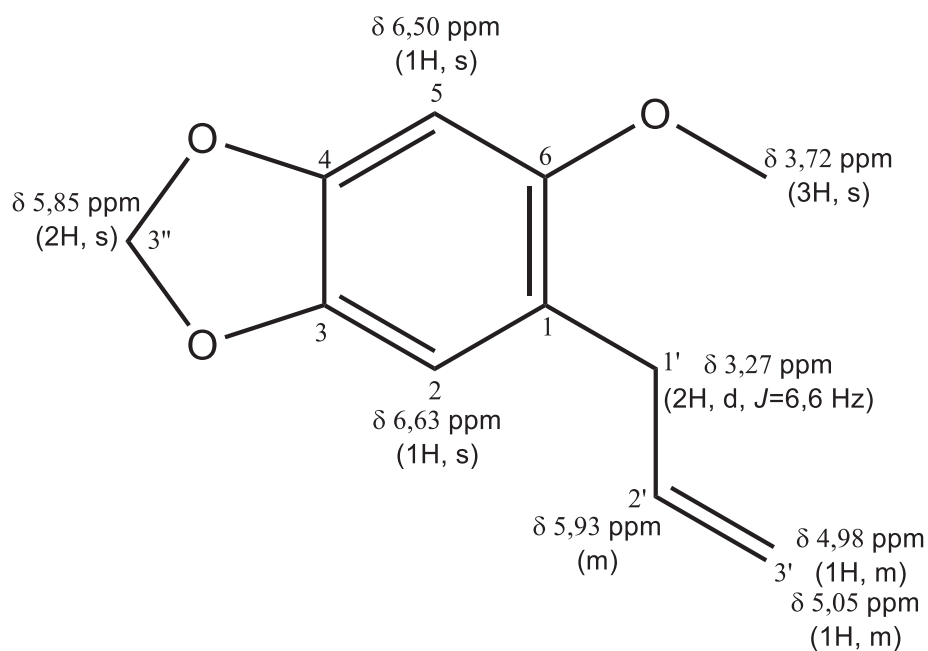
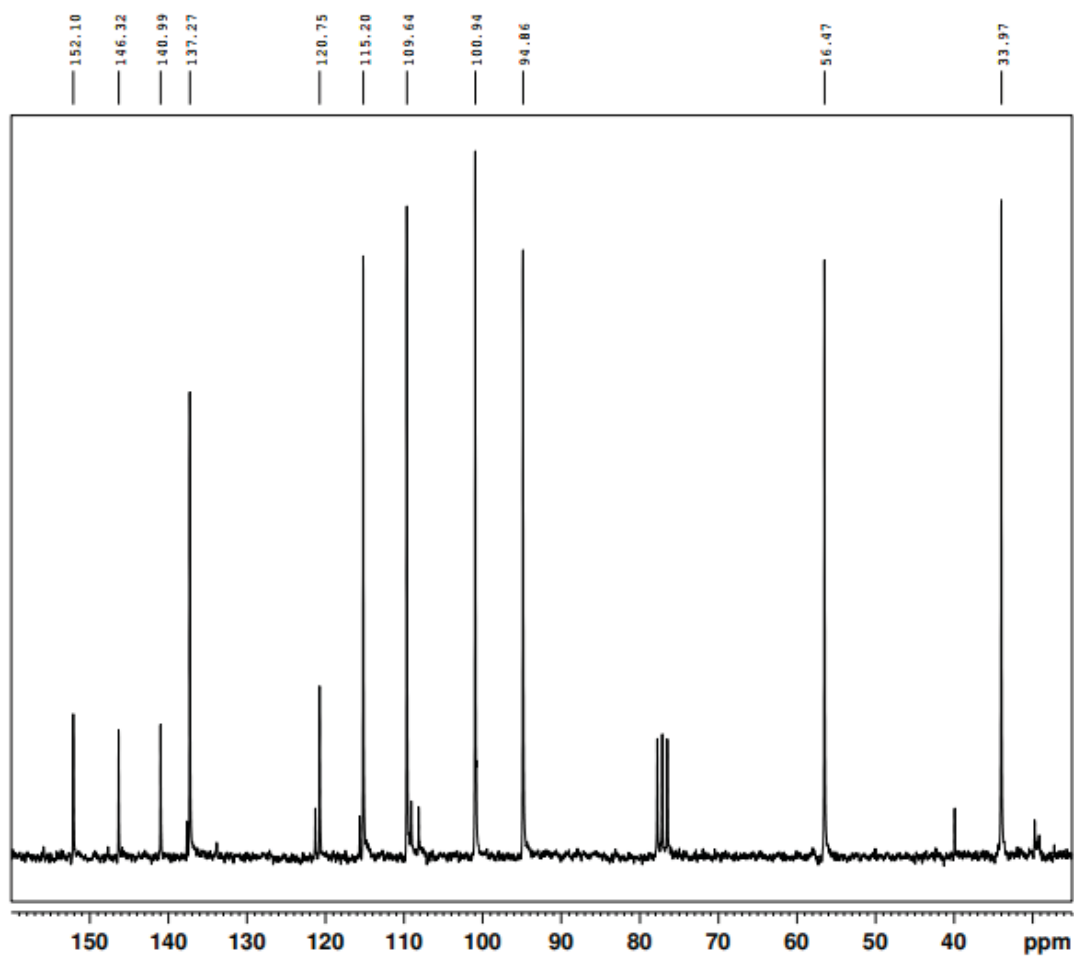


FIGURA 57. ESPECTRO DE RMN ^{13}C DESACOPLADO DA SUBSTÂNCIA R-3 CONTIDA NA FRAÇÃO F3RAH7 (50 MHz, CDCl_3).



Através da análise de RMN de ^{13}C desacoplado (FIGURA 57), é possível observar a presença de onze átomos de carbono, sendo 8 carbonos sp^2 , localizados na região entre δC 94,86 a 152,10 ppm, bem como a presença de um grupo metoxila (δC 56,47) e um grupo metilenodioxido $\text{C}-\text{H}_2$ em δC 100,93 ppm. Os sinais observados para o deslocamento químico dos carbonos foram comparáveis com os relatados para o espectro RMN de ^{13}C desacoplado confirmando se tratar da substância asaricina, relatado pela primeira vez na espécie na espécie *P. mikanianum*.

15.2 Determinação estrutural da substância majoritária R-4 contida em mistura na fração F1RAH.

Para a purificação da fração F1RAH, a separação das substâncias na mistura foi realizada por cromatografia de camada fina preparativa acelerada centrifugamente (Chromatotron), gerando duas novas frações (F1RAH1 e F2RAH2), porém somente a fração F1RAH1 (14,2 mg) foi identificada por meio de técnicas unidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C desacoplado, sendo determinado como a substância R-4.

A elucidação estrutural da substância contida em mistura na fração F1RAH1 será mostrada em sequência, e os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância R-4, estão descritos na TABELA 23 e sua representação estrutural pode ser observada na FIGURA 58.

TABELA 23. DADOS DE RMN DE R-3 (CLOROFÓRMIO, ^1H 200,12 MHz e ^{13}C em 50,32 MHz), COMPARAÇÃO COM A LITERATURA PARA A MIRISTICINA (CLOROFÓRMIO, ^1H -RMN 500 MHz e ^{13}C 125 MHz), (YOU, et al., 2015; ANSORY, et al., 2019).

Nº	^1H (δ) ^a R-4	^1H (δ) ^b Miristicina	^{13}C (δ) ^c R-4	^{13}C (δ) ^c Miristicina
1	-	-	134,64	134,60
2	-	-	143,52	143,5
3	-	-	148,85	148,8
4	6,38 (1H, d, $J=1,4\text{Hz}$)	6,41 (1H, s)	102,69	102,7
5	-	-	152,39	-
6	6,35 (1H, d, $J=1,4\text{Hz}$)	6,37 (1H, s)	107,72	107,80
1'	3,29 (2H, d, $J=6,6\text{Hz}$)	3,32 (2H, d, $J=6,5\text{Hz}$)	40,23	40,2
2'	5,93 (m)	5,96 (1H, m)	137,37	137,3
3'	5,03 – 5,10 (2H, m)	5,09 (2H, m)	115,85	115,80
3''	5,93 (2H, s)	5,95 (2H, s)	101,24	101,20
OMe	3,88 (3H, s)	3,91 (3H, s)	56,55	56,60

FIGURA 58. REPRESENTAÇÃO MOLECULAR DA SUBSTÂNCIA R-4, E OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H .

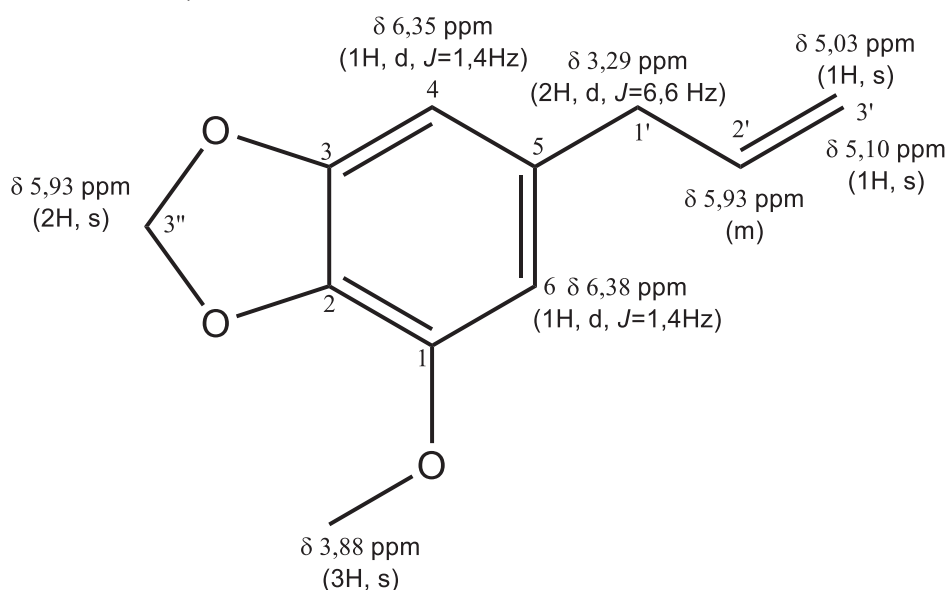
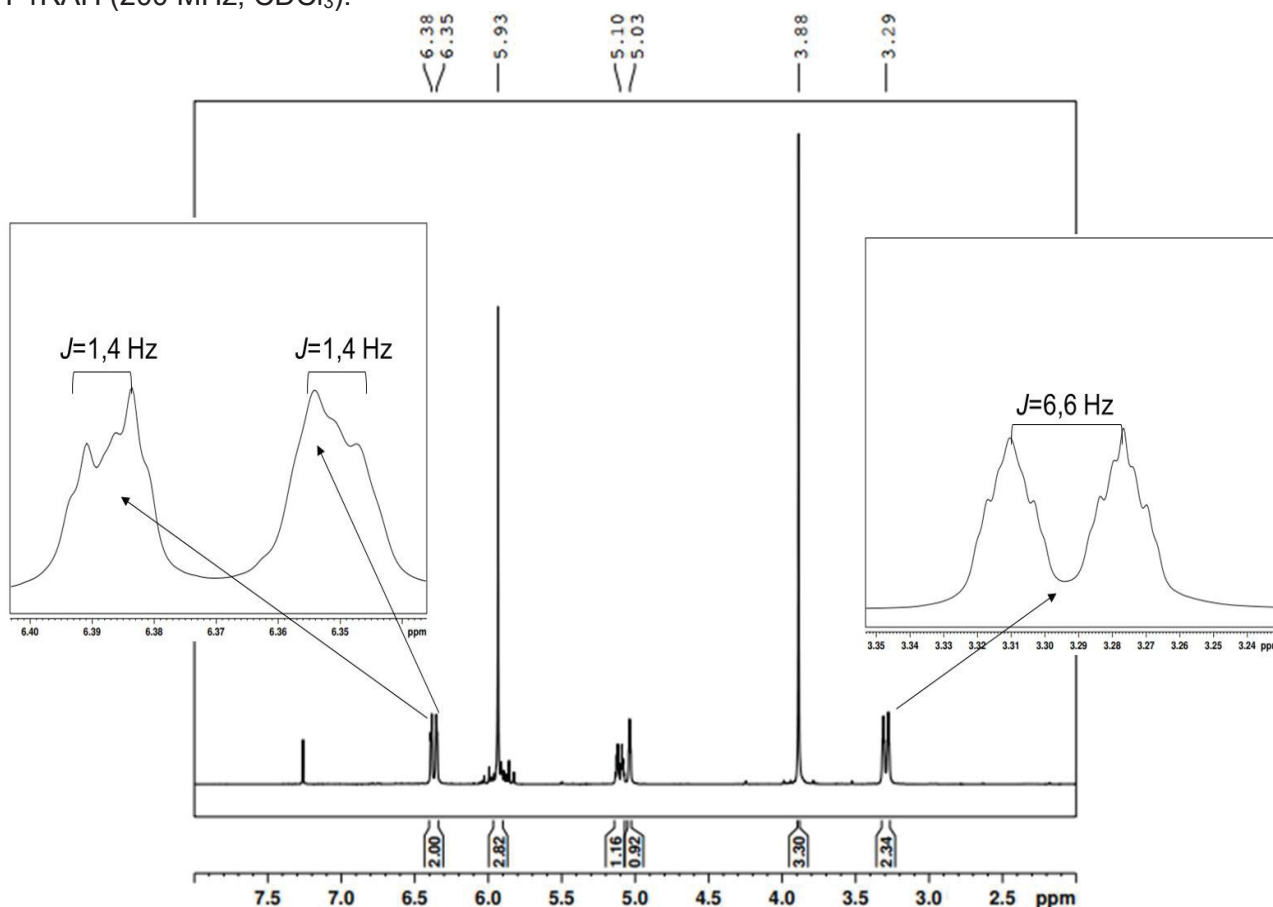


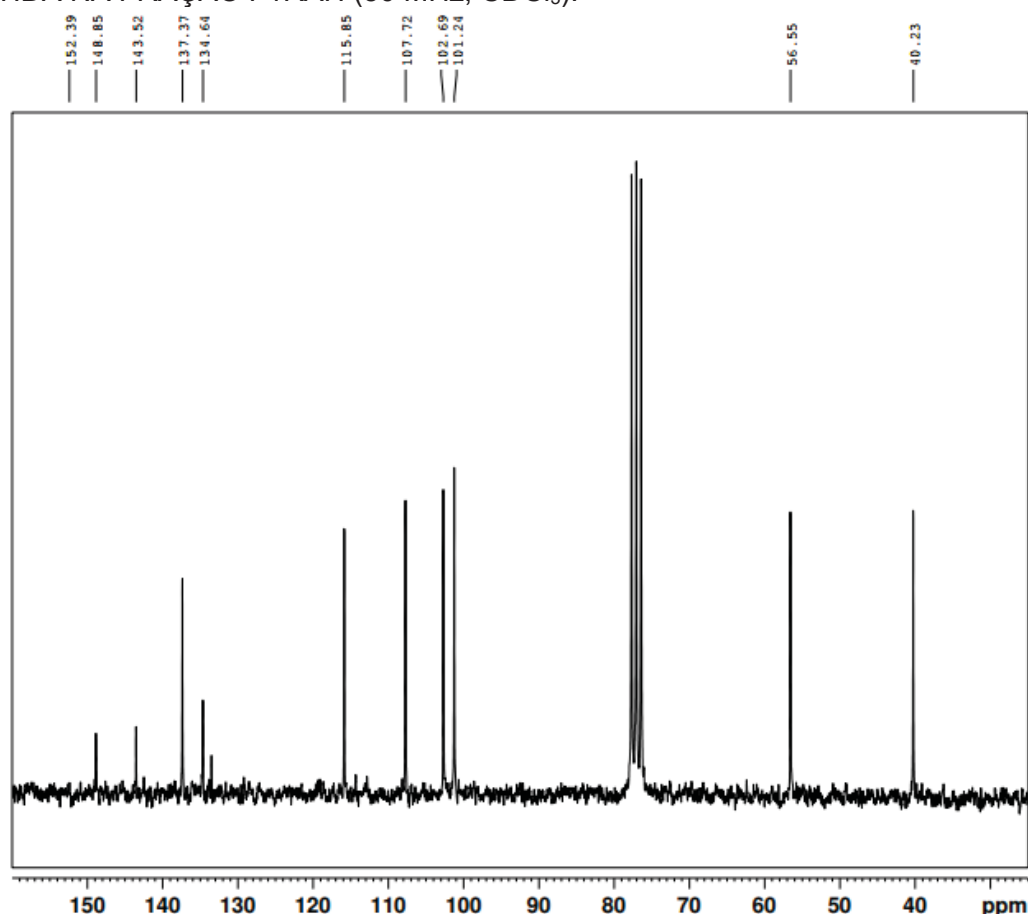
FIGURA 59. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA SUBSTÂNCIA R-4 CONTIDA NA FRAÇÃO F1RAH (200 MHz, CDCl_3).



O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 59), apresentou sinais de δ_{H} 3,29 a 6,39 ppm, indicando a presença de 2 hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,38 ppm (2H, d, 1,4 Hz) e δ_{H} 6,35 ppm (2H, d, 1,4 Hz), sugerindo que os prótons estão em posição meta, bem como indicou a presença de um conjunto de multiplete em δ_{H} 5,93; 2H, característico dos hidrogênios do grupo metilenodioxido, foram observados sinais também em δ_{H} 5,10 e 5,03 ppm (2H, m) correspondendo aos hidrogênios de substituinte vinila, H-2' e H-3', além de um duplete em δ_{H} 3,29 ppm (2H, d, $J=6,6$ Hz) que estão associados aos sinais de hidrogênios alílicos e olefínicos, e por fim um sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,89 ppm (3H, s), representando os prótons do grupamento metoxila ligados ao C-5.

A estrutura da substância e seus deslocamentos químicos podem ser observadas na FIGURA 58, já os sinais observados de δ_{H} foram comparáveis com os relatados para o espectro RMN de ^1H da Miristicina (4,5-Metilenodioxo-3-metoxi alil-benzeno) (YOU, et al., 2015; ANSORY, et al., 2019).

FIGURA 60. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DESACOPLADO DA SUBSTÂNCIA R-4 CONTIDA NA FRAÇÃO F1RAH (50 MHz, CDCl_3).



Por meio da análise de RMN de ^{13}C desacoplado (FIGURA 60), observa-se a presença de onze átomos de carbono, sendo 8 carbonos sp^2 , localizados na região entre (δC 102,69 ppm a 152,39 ppm), bem como a presença de um grupo metoxila (δC 56,55 ppm) e um grupo metilenodioxido $\text{C}-\text{H}_2$ em (δC 101,24 ppm). Os sinais observados para o deslocamento químico dos carbonos juntamente com os dados obtidos para o espectro de hidrogênio confirmam a substância como sendo a miristicina (4,5-Metilenodioxil-3-metoxi alil-benzeno), relatado pela primeira vez na espécie *P. mikanianum*.

A miristicina geralmente é encontrada em plantas, como o anis-estrelado e a noz-moscada. Ela possui atividades biológicas e pode ter efeitos benéficos e prejudiciais para a saúde, dependendo da dose e do contexto de uso. Estudos como o de Andrade e colaboradores em 2008, retratam a presença de miristicina em altas concentrações (0,2-16%) no óleo essencial das folhas de *P. marginatum*, indicando a sua presença na espécie e no gênero *Piper*.

Um artigo recente publicado em 2022 na revista *Pharmaceuticals* ressalta o poder terapêutico da miristicina e visa os efeitos deste composto na reversão da resistência a múltiplas drogas em células cancerosas, os resultados do estudo sugerem que o uso da miristicina pode aumentar a eficácia das quimioterapias e diminuir a resistência das células

cancerosas a esses tratamentos. No entanto, ainda há lacunas no conhecimento sobre o uso do miristicina na terapia do câncer e mais estudos são necessários para determinar a eficácia e segurança desse composto em humanos (SENEME, et al., 2022.). O estudo e o isolamento de substâncias de plantas é de extrema importância para a descoberta de novos compostos terapêuticos, bem como para a compreensão dos processos biológicos envolvidos na interação entre os seres vivos e o meio ambiente.

16. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo investigou pela primeira vez a comparação química dos óleos essenciais das folhas da mesma espécie coletada em duas regiões do Brasil. A análise química do óleo essencial de *Piper mikanianum* oriunda de Atalanta-SC, revelou a presença do composto majoritário safrol em concentração superior a 30% de área relativa e a classe metabólica predominante neste óleo foram os sesquiterpenos com um teor de 43,68%. Já a composição química do óleo essencial de *P. mikanianum* oriunda de Curitiba-PR, revelou a presença do composto majoritário ciclocolorenona superior a 25% e a classe metabólica predominante neste óleo essencial foram os sesquiterpenos oxigenados com um teor de 70,76% de área relativa. A variação intraespecífica na composição química do óleo essencial de *P. mikanianum* de localidades diferentes, pode ser explicado devido aos fatores intrínsecos como a: disponibilidade hídrica, macronutrientes e micronutrientes do solo e até influência da poluição local atmosférica.

Foi verificado que o O.E coletado em Santa Catarina apresentou boa inibição bacteriana por halo frente a *Staphylococcus aureus* e *Salmonella tiphy* o que corrobora com o potencial do óleo essencial de *P. mikanianum*. E que os dois O.Es apresentaram fraca atividade (CIM) frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bem como o O.E oriundo do Paraná também apresentou baixo efeito bacteriostático frente a *Staphylococcus epidermides*. A mistura dos majoritários identificados no O.E. de Santa Catarina (Safrol+ β -cariofileno+ α -pineno), assim como o safrol e o β -cariofileno isolados foram testados, mas não apresentaram bons resultados inibitórios, e somente o α -pineno apresentou uma boa inibição bacteriostática frente *Staphylococcus aureus* e bactericida contra a *Candida albicans*, reforçando assim que esta substância contribui para os efeitos observados no O.E de *P. mikanianum*.

O presente estudo descreve o primeiro relato da bioatividade do O.E de *P. mikanianum* e do composto safrol contra pragas e fungos de armazenamento, bem como possibilita a utilização destes O.E em programas de manejo integrado para produtos armazenados. Contudo, por se tratar de substâncias voláteis, há a necessidade de investigar tecnologias de formulação e aplicação para prolongar as atividades biológicas.

O presente estudo fitoquímico investigou pela primeira vez também a análise elementar de folhas, caules e raízes de *P. mikanianum* oriundas de Atalanta – SC e Curitiba-PR, no qual ressalta a importância da técnica e indicam as partes aéreas e as raízes como uma possível fonte de íons, como: potássio e cálcio. E quanto ao rendimento dos extratos brutos de *P. mikanianum* de Atalanta-SC foram satisfatórios, quando comparados a outros resultados encontrados na literatura.

O estudo retratado revelou pela primeira vez a atividade quelante dos extratos brutos de *P. mikanianum*, no qual o extrato em acetato de etila apresentou o maior percentual quelante (59,99%), indicando este extrato como um possível agente quelante, bem como, indica que esta capacidade quelante do extrato pode estar correlacionada com os compostos isolados como o arilpropanoide safrol e o flavonol 4',7-dimetoxikaempferol.

Como respostas para as atividades bactericidas (CIM) dos extratos brutos de *P. mikanianum*, o extrato metanólico se mostrou o mais promissor agente antibacteriano, frente as bactérias *E. coli* e *E. faecalis*, pois apresentou potencial bactericida quando comparado com os demais extratos.

Através das análises do perfil fitoquímico e caracterizações químicas foi possível verificar a variação dos metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos e órgãos da espécie. Confirma-se a presença do composto safrol e 4',7-dimetoxikaempferol nos extratos de folhas em acetato de etila, sendo que a estrutura do composto 4',7-dimetoxikaempferol é a primeira vez relatada na espécie *P. mikanianum*.

Já o extrato de raízes metanol, forneceu o isolamento do alcaloide piperina, sendo também retratado pela primeira vez na espécie *P. mikanianum*.

E por fim, o estudo fitoquímico das raízes em acetato de etila de *P. mikanianum* levou a identificação de dois arilpropanoides, sendo eles: asaricina e miristicina, as quais estão sendo descritas pela primeira vez nesta espécie.

17. REFERÊNCIAS

- ABREU, A.M.; SEVEGNANI, L.; MACHICADO, A.R.; ZIMERMANN, D.; REBELO, R. *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brazil – a New Source of Safrole. **Journal of Essential oil Research**, v.14, n.5, p.361-363, 2002.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, 4 ed. Carol Stream, Illinois, USA. 2017.
- ADUSEI, S.; OTCHERE, J.K; OTENG, P.; MENSAH, R.Q. MENSAH-TEI, E. Phytochemical Analysis, Antioxidant and Metal Chelating Capacity of *Tetrapleura tetráptera*. **Heliyon**, v.5, p.15, 2019.
- AHMAD, F.; SIRAT, H.M.; JAMALUDIN, F.; MUSTAPHA, N.M.; ALI, R.; ARBAIN, D.; ABOUL-ENEIN, H.A. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Piper porphyrophyllum* (Fam. Piperaceae). **Arabian Journal of Chemistry**, v.7. p.1031-1033, 2014.
- ALOTAIBI, A.; EBILOMA, G.U.; WILLIAMS, R.; ALFAYEZ, I.A.; NATTO, M.; ALENEZI, S.; SIHERI, W.; IGOLI, J.O.; FEARNLEY, J.; KOONING, H.P. WATSON, D.G. Activity of Compounds from temperate propolis againsts *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*. **Molecules**, v.26, n.13, p.3912, 2021.
- ALVES, H.S.; OLIVEIRA, G.E.; ZOGHBI, M.G; CHAVES, M.C.O. Flavonóides de *Piper carniconnectivum* C.DC.. Piperaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, p.160-164, 2010.
- ALVES, H.S.; ROCHA, W.R.V.; FERNANDES, A.F.C.; NUNES, L.E.; PINTO, D.S. COSTA, J.I.V.; CHAVES, M.C.O.; CATÃO, R.M.R. Atividade Antimicrobiana de Produtos Obtidos de Espécies de *Piper* (Piperaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.21, n.2, p.168-180, 2016.
- ANDRADE, E.H.A.; CARREIRA, L.M.; SILVA, M.H.L.; SILVA, J.D.; BASTOS, C.N.; SOUSA, P.J.C.; GUMARÃES, E.F.; MAIA, J.G.S. Variability in Essential-Oil Composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**. v.5. 2008.
- ANSORY, H.M.; SARI, E.N.; NILAWATI, A.; HANDAYANI, S.; AZNAM, N. Sunscreen and Antioxidant Potential of Myristicin in Nutmeg Essential Oils (*Myristica fragrans*). **Advances in Health Sciences Research**. v.26, p.137-142, 2019.
- ARAÚJO, A. M. N. DE; OLIVEIRA, J. V. DE; FRANÇA, S. M.; et al. Toxicity and repellency of essential oils in the management of *Sitophilus zeamais*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 5, p.372–377, 2019.
- ARCHIBOLD-DURANT, A.A.; SANTANA, A.I.; GUPTA, M.P. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.10, n.217, p.63-82, 2018.
- BAE, G.A.; KIM, M.S.; JUNG, W.S.; SEO, S.W.; YUN, S.W.; KIM, S.G.; PARK, R.K.; KIM, E.C.; SONG, H.J.; PARK, S.J. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. **European Journal of Pharmacology**, v.10, n.642, p.154-162, 2010.
- BALIOTA, G. V.; LAMPIRI, E.; BATZOGIANNI, E. N.; ATHANASSIOU, C. G. Insecticidal Effect of Four Insecticides for the Control of Different Populations of Three Stored-Product Beetle Species. **Insects**, v. 13, n. 4, p. 325, 2022.
- BARBOSA, L.M.; SHIRASUNA, R.T.; LIMA, F.C.; ORTIZ, P.R.T.; BARBOSA, K.C.; BARBOSA, T.C.; Lista de Espécies Indicadas para a Restauração Ecológica para Diversas Regiões do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**. São Paulo, 2017.
- BARBOSA, S.S.; CARVALHO, A.S.; ANDRADE, L.G.; O Uso de Medicamentos Biossimilares Para o Tratamentodo Câncer. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação-REASE**, v.7, n.10, p.1108-1120, 2021.

BARDELLI, K.C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A.V. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v.35, p.553-561, 2008).

BAWA, G.; KHURANA, N.; SINGH, A. Clinical uses of Piperine: A Review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, n.11, p.2232-2270, 2021.

BERLINCK, R.G.S.; BORGES, W.S.; SCOTTI, M.; VIEIRA, P.C. The Chemistry of natural products in Brazil in the XXI century. **Química Nova**, v.40, n.6, 2017.

BERNARDINI, S. TIEZZI, A.; MASCI, L.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, , p. 1926-1950, 2018.

BORELA, J.; MARTINAZZO, E.G.; AUMONDE, T.Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D.M.; VILLELA, F.A. Respostas na Germinação e no Crescimento Inicial de Rabanete Sob Ação de Extrato Aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, p.415-420, 2012.

BRAIT, D.R.H.; VAZ, M.S.M.; ARRIGO, J.S.; CARVALHO, L.N.B.; ARAÚJO, F.H.S.; VANI, J.M.; MOTA, J.S.; CARDOSO, C.A.L.; OLIVEIRA, R.J.; NEGRÃO, F.J.; KASSUYA, C.A.; ARENA, A.C. Toxicological Analysis Andanti-Inflammatory Effects of Essential Oil From *Piper vicosanum* leaves. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.73, p. 699-705, 2015.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative Agents in Food: Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. **International Journal of Food Microbiol**, v.50, p.1-17, 1999.

CAMPOS, P.B.C.; GAMA, J.J.T.; PEREIRA, L.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; GUIMARÃES, E.F.; KATO, M.J.; FURLAN, M.; PESSOA, C. Antitumor Activity of Extracts from *Peperomia elongata*. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n.10, p.760–765, 2007.

CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.J.; PAROUL, N.; TONIAZZO, G.; ZBORALSKI, F.; PRICHOA, F.C.; KUBIAK, G.B.; LERIN, L.A. Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Extratos de Canela-Sassafrás (*Ocotea odorífera* (Vell.) Rowher), **Perspectiva**, v.34, n.127, p.123-133, 2010.

CARNEIRO, N.S.; ALVES, C.C.F.; ALVES, J.M.; EGEA, M.B.; MARTINS, C.H.G.; SILVA, T.S.; BRETANHA, L.C.; BALLESTE, M.P.; MICKE, G.A.; SILVEIRA, E.V.; MIRANDA, M.L.D. Chemical Composition, Antioxidante and Antibacterial Activities of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 89, n.3, p.1907-1915, 2017.

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.; 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.1-28, 2019.

CELIS, A.; MENDONZA, C.; PACHÓN, M.; CARDONA, J.; DELGADO, W.; CUCA, L.E. Extractos Vegetales Utilizados Como Biocontroladores com Ênfasis em la Familia Piperaceae. Una Revisión. **Agronomía Colombiana**, v.26, n.1, p.97-106, 2008.

CHACÓN, C.; BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E.; CAAMAL-CHAN, G. In vitro antifungal activity and chemical composition of *Piper auritum* kunth essential oil against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium equiseti*. **Agronomy**, v. 11, n. 6, 2021.

CHANG, Y.; LEE, S.H.; NA, JH.; CHANG, P. S.; HAN, J. Protection of Grain Products from *Sitophilus oryzae* (L.) Contamination by Anti-Insect Pest Repellent Sachet Containing Allyl Mercaptan Microcapsule. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 11, p. 2634–2642, 2017.

CHELAGHEMA, A.; DURAND, N.; SERVENT, A. Antifungal and antimycotoxic activities of 3 essential oils against 3 mycotoxinogenic fungi. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, p. 1–16, 2022.

CLSI, **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard**, 7 ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 95 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

COCKERILL, F.R.; WIKLER, M.A.; ALDER, J.; DUDLEY, M.N.; ELIOPOULOS, G.M.; FERRARO, M.J.; HARDY, D.J.; HECHT, D.W.; HINDLER, J.A.; PATEL, J.B.; POWELL, M.; SWENSON, J.M.; THOMSON, R.B.; TRACZEWSKI, M.M.; TURNIDGE, J.D.; WEINSTEIN, M.P.; ZIMMER, B.L.; **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**, 9 ed., v. 32, 2012.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; McCULLAGH. Study of C- And O-Glycosyl Flavones in Sugarcane Extracts using Liquid Chromatography Exact Mass Measurement Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.3, p.483-490, 2008.

COLL and BRUCE, F.B. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. **Journal of Natural Products**, v.49, n.5, p.934-936, 1986.

CORREIA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N Insecticidal activities of plants and applications: a review. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. v.13, n.4, 2011.

CYSNE, J.B.; CANUTO, K.M.; PESSOA, O.D.L.; NUNES, E.P.; SILVEIRA, E.R. Leaf Essential Oils of Four *Piper* species From the State of Ceará - Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6, p.1378-1381, 2005.

DICKEL, M.L.; RATES, S.M.; RITTER, M.R. Plants Popularly Used For Losing Weight Purposes In Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.1, p.60-71, 2007.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multi Ciência**, n.7, 2006.

DUARTE, M.C.; SIENBENROCK, M.C.N. Caracteres Anatômicos de Folha e Caule de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud., Piperaceae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n1, p.45-51. 2010.

DURANT-ARCHIBOLD, A.A. SANTANA, A.I.; GUPTA, M.P. Ethnomedical Uses and Pharmacological Activities of Most Prevalent Species of Genus *Piper* in Panama: A Review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.217, p.63-82, 2018.

FELIPPE, L.G.; JR, J.M.B.; BALDOQUI, D.C.; NASCIMENTO, I.R.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Structure and Absolute Configuration of a Secolignan from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry Letters**, v.4, n. 3, p. 245-249. 2011.

FERNANDES, A.M.A.P; PRADO, A.L; BARATA, L.E.S.; PAULO, M.Q.; AZEVEDO, N, R.; FERRI, P.H. A Method to Separate Lignoids from *Virola* Leaves. **Phytochemical Analysis**, v.8, p.18-21, 1997.

FERRAZ, A.B.F.; BALBINO, J.M.; ZINI, C.A.; RIBEIRO, V.L.S.; BORDIGNON, S.A.L.; POSER, G.V. Acaricidal activity and Chemical Composition of The Essential Oil from Three *Piper* Species. **Parasitology Research**, v.107, p.243-248, 2010.

FERRERA, T.S.1; HELDWEIN, A.B.1; DOS SANTOS, C.O.1; SOMAVILLA, J.C.1; SAUTTER, C.K. Substâncias Fenólicas, Flavonoides e Capacidade Antioxidante em Erveiras Sob Diferentes Coberturas do Solo e Sombreamentos. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.18, n.2, p. 588-596, 2016.

FILHO, A.A.P.; CUNHA, M.M.; STANTON, M.A.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; DUARTE, E.S. Atividade in vitro de óleos essenciais de espécies de *Piper* (Piperaceae) contra taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. **Metabolites**. v.13, n.1, p.95. 2023.

FILHO CECHINEL, V.; YUNES, R.A. Estratégias Para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização da Atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p.1-7, 1998.

FLORES, A.M.P.C.; MELO, C.B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.37, n.1, p.65-72. 2015.

GIUNTI, G.; PALERMO, D.; LAUDANI, F.; et al. Repellence and acute toxicity of a nano-emulsion of sweet orange essential oil toward two major stored grain insect pests. **Industrial Crops and Products**, v. 142, n. September, p. 111869, 2019.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.D.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local Anaesthetic Activity of beta-Caryophyllene. **Il Farmaco**, v.56, p. 387-389, 2001.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, vol.33, n.3, p.667-669, 2010.

GUIMARÃES, E.F., MEDEIROS, E.V.S.S., QUEIROZ, G.A. 2020. **Piper in Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P.; Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabolitos Secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p.374-381, 2007.

GOMES, E.B. PEREIRA, H.C.P. Distúrbios do Potássio. **Revista de Ciências da Saúde**, vol. 33, n.1, p. 232-250, 2021.

GOMEZ, M.C.V.; ROLÓN, M.; CORONEL, C.; CARNEIRO, J.N.P.C.; SANTOS, A.T.L.; BEZERRA-ALMEIDA, J.W.; MENEZES, S.A.; SILVA, L.E.; COUTINHO, H.D.M.; AMARAL, W.; RIBEIRO-FILHO, J.; MORAIS-BRAGA, M.F.B. Antiparasitic effect of essential oils obtained from two species of *Piper* L. native to the Atlantic forest. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.32, p 1-6, 2021.

GRINEVICIUS, V.M.A.S.; ANDRADE, K.S.; OURIQUE, F.; MICKE, G.A.; FERREIRA, S.R.S.; PEDROSA, R.C. Antitumor activity of conventional and supercritical extracts from *Piper nigrum* L. cultivar bragantina through cell cycle arrest and apoptosis induction. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.128, p.94-101. 2017.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HETMAPOOR, A.; LIEW, S.Y.; CHONG, W.L.; AZIRUN, M.S.; LEE, V.S.; AWANG, K. Inhibition and Larvicidal Activity of Phenylpropanoids from *Piper sarmentosum* on Acetylcholinesterase against Mosquito Vectors and Their Binding Mode of Interaction. **Plos One**. v.5, p. 6-11. 2016.

HIRPARA, K.V.; AGGARWAL, P.; MUKHERJEE, A.J.; JOSHI, N.; BURMAN. Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.9, p.138-61. 2009.

HU, L.; SHAO, H.; ZHONG, L.; SONG, L.Z.; WU, F. Cytotoxicity of Safrole in HepaRG Cells: Studies on the Role of CYP1A2 - Mediated Ortho-quinone Metabolic Activation. **Xenobiotica**, v.49, n.2, pg.1504-1515, 2019.

IWAZAKI, M.C.; SOUZA, L.A.; OLIVEIRA, J.H.G. Morfo-Anatomia Comparativa da Flor de *Peperomia Dahlstedtii* C. DC., *Ottonia Martiana* Miq. e *Piper Gaudichaudianum* Knoch (Piperaceae). **Hoehnea**, v.33, n.4, p.545-558, 2006.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant Growth Regulator Mediated Consequences of Secondary Metabolites in Medicinal Plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.9, p.26-38. 2018.

JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.88, n.4, p.706-716. 2001.

JIANG, H.; ZHONG, S.; SCHWARZ, P.; CHEN, B.; RAO, J. Antifungal activity, mycotoxin inhibitory efficacy, and mode of action of hop essential oil nanoemulsion against *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 400, n. June 2022, p. 134016, 2023.

JOEL, J.S.; SHEENA, O.E.; MARTINS, O.E. CHUKWUMAOBIM, N.S.; EMMANUEL, A.A. Comparative antioxidant capacity of aqueous and ethanol fruit extracts of tetrapleura tetraptera. **Journal of Biological Sciences**, v.17, p.185-193, 2017.

JR. SILVA, I.F.; OLIVEIRA, R.G.; SOARES, I.M.; ALVIM, T.C.; ASCÊNCIO, S.D.; MARTINS, D.T.O. Evaluation of Acutetotoxicity, Antibacterial Activity, and Mode faction of the Hydroethanolic Extract of *Piper Umbellatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, n.1, p.137–143. 2014.

KANDA, D.; KAUR, S.; KOUL, O. A comparative study of monoterpenoids and phenylpropanoids from essential oils against stored grain insects: acute toxins or feeding deterrents. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 2, p. 531–545, 2017.

KANIS, L.A.; RABELO, B.D.; MOTERLE, D.; NOGARETTI, R.M.; NUNES, T.; SILVA, O.S.; PROPHIRO, J.S. Standardized extract of *Piper ovatum* (Piperaceae) to control *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products**, v.50, n.816-820. 2013.

KARSHA, P.V. LAKSHMI, O.B. Antibacterial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* Linn.) With Special Reference to its Mode of Action on Bacteria. **Indian Journal os Natural Products and Resources**, v.1, n.2, p.213-215, 2010.

KRINSKI, D. FOERSTER, L.A. DESCHAMPS, C. Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian *Piper* species: controlling *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidiae) at the initial stage of development. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.40, p.1-10, 2018.

KRZYŚKO-ŁUPICKA, T.; SOKÓŁ, S.; PIEKARSKA-STACHOWIAK, A. Evaluation of fungistatic activity of eight selected essential oils on four heterogeneous *Fusarium* isolates obtained from cereal grains in southern Poland. **Molecules**, v. 25, n. 2, 2020.

LAZARO, M.L. Flavonoids as anticancer agentes: structure-activity relationship study. **Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents**. v.2, n.6, p.691-714. 2002.

LEAL, L.F.; MIGUEL, O.G.; SILVA, R.Z.; YUNES, R.A.; SANTOS, A.S.; CECHINEL-FILHO, V. Chemical Composition of *Piper mikanianum* Essential Oil. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 17, p.316-317, 2005.

LIU, H.X.; CHEN, K.; SUN, Q.Y.; YANG, F.M.; HU, G.W.; WANG, Y, H.; LONG, C.L. Nudibaccatumone, a Trimer Comprising a Phenylpropanoid and Two Sesquiterpene Moieties from *Piper nudibaccatum*. **Journal of Natural Products**, v.4, p.732-736, 2013.

LIMA, P.J.P.L.; CRUZ, D.T.S.; GAZANI, T.H.; PAIVA, S.G.; PEREIRA, M.D.; SOUZA, L.A.; REBELO, M.A..R. Extração da piperina a partir da pimenta-do-reino: comparação de processos extrativos. **Revista Saúde em foco**, n.13, p.614-627, 2021.

LOPES, J.J.; MARX, C.; INGRASSIA, R.; PICADA, J.N.; PEREIRA, P.; FERRAZ, A.B.F. Neurobehavioral and Toxicological Activities Of Two Potentially CNS-Acting Medicinal Plants of *Piper* Genus. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.64, p.9-14, 2012.

LORENZO, D.; LOAYZA, I.; LEIGUE, L.; FRIZZO, C.; DELLACASSA, E.; MOYANA, P. Asaricin, the Main Component of *Ocotea opifera* Mart. Essential Oil. **Natural Product Letters**, v.13, n.3, p.163-170, 2001.

LOUGRAIMZI, H.; EL IRAQUI, S.; BOUAICHI, A.; et al. Insecticidal effect of essential oil and powder of *Mentha pulegium* L. leaves against *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) and *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Curculionidae, Tenebrionidae), the main pests of stored wheat in Morocco. **Polish Journal of Entomology**, v. 87, n. 3, p. 263–278, 2018.

MAIA, J.G.S.; Andrade, E.H. Database of the amazona aromatic plants and theirvessential oils. **Química Nova**, v.32, n.3, p.595-622, 2019.

MARTINS, M.P.V.; TORRES, J.M.; ANJOS, E.A.C. Dieta De Morcegos Frugívoros Em Remanescente De Cerrado Em Bandeirantes, Mato Grosso Do Sul. **Biotemas**, v.27, n.2, p.129-135, 2014.

MATTAR, G.; HADDARAH, A.; HADDAD, J.; PUJOLA, M.; SEPULCRE, F. New Approaches, Bioavailability and the Use of Chelates as a Promising Method for Food Fortification. **Food Chemistry**, v.373, n.30, Article 131392, 2022.

MASOTTI, F.; CATTANEO, S.; STUNKNYTE, M.; PICA, V.; NONI, C. Analytical Advances in the Determination of Calcium in Bovine Milk, Dairy Products and Milk-based Infant Formulas. **Trends in Food Science & Technology**, v.103, p.348-360, 2020.

MATSUO, A.L.; FIGUEIREDO, C.R.; ARRUDA, D.; PEREIRA, F.V.; SCUTTI, J.A.B.; MASSAOKA, M.H.; TRAVASSOS, L.R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G. α Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochem Biophys Res Commun**. v.29, n.4 p.11–54, 2011.

MELO, C.M.T; COSTA, L.A.; BONNAS, R.C. Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante de Pimentas *Capsicum Chinense* (bode), *Capsicum baccatum* variedade praetermissum (cumari) e *Capsicum frutescens* (malagueta). **Enciclopédia Bioesfera**, v. 7, n.12, p.1-6, 2011.

MENDONÇA, D. Fitoterápicos: Nosso Verde Vale Ouro. **Revista Pharma Business**, p.25-30. 2002.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de Plantas Medicinais na Gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p.21-35, 2001.

MOHD. F.B.; ABDUL R.; PIN K. Y.; ZAMREE M.D.S.; LUQMAN C.A.; SOH S. Y.; THOMAS C.S. Y. The Effects of Varying Solvent Polarity on Extraction Yield of *Orthosiphon stamineus* Leaves. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n.11, p.1207-1210, 2012.

MOHOTTALAGE, S. et al., Components from Sri Lankan *Piper betle* L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, *Musca domestica*. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 22, p. 130–138, 2007.

MONZOTE, L.; SCULL, R.; COS, P.; SETZER, W.N. Essential Oil from *Piper aduncum*: Chemical Analysis, Antimicrobial Assessment, and Literature Review. **Medicines**. v.4, n.3, p.49, 2017.

MOSTACERO, N.R.; CASTELLI, M.V.; CUTRÓ, A.C.; HOLLMANN, A.; JUNIOR, J.M.B.; FURLAN, M.; VALLES, J.; FULGUEIRA, C.L.; LÓPEZ, S.N. Antibacterial activity of prenylated benzopyrans from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). **Natural Product Research**, v.35, n.10, p.1706-1710, 2021.

MUÑOZ CASTELLANOS, L.; AMAYA OLIVAS, N.; AYALA-SOTO, J.; et al. In Vitro and in Vivo Antifungal Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oils and Functional Extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p.1-8, 2020.

MUNHOZ, V. M.; LONGHINI, R.; SILVA, T. A. P.; LONNI, A. A. S. G.; SOUZA, J. R. P.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Pharmacognostic study of the flowers of *Tagetes patula* L. (Asteraceae). **Revista Fitos**, v.7, n.4, p.225-230, 2012.

NAM, S.Y.; CHUNG, C.K.; SEO, J.H.; RAH, S. Y.; KIM, H.M.; JEONG, H.J. The therapeutic efficacy of α -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. **International Immunopharmacology**, v.23, p.273-282, 2014.

NOVAES, A.S.; MOTA, J.-S.; BARISON, A.; VEBER, C.L.; NEGRÃO, F.J.; KASSUYA, C.A.L.; BARROS, M.E. Diuretic and Antilithiasic Activities of Ethanol Extract From *Piper amalago* (Piperaceae). **Phytomedicine**, v.21, p.523-528, 2014.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NOVAES, G.M.; SILVA, M.J.D.; ACHKAR, M.T.; VILEGAS. Compostos Antioxidantes e Sua Importância Nos Organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.11, n.2, p.535-539, 2013.

OLIVEIRA, M.L.B.; FRANÇA, T.A.R.; CAVALANTE, F.S.; LIMA, R.A. O Gênero *Piper* No Brasil: O Estado da Arte da Pesquisa, **Biodiversidade**, v.19, n.3, p.19, 2020.

OLIVEIRA, A. C.; QUEIROZ, K. S.; HELBIG, E. O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbasco. **Arquivos Latinoamericanos de Nutrição**, v. 51, p. 276–283, 2001.

OLIVEIRA, J. V. DE; FRANÇA, S. M. DE; BARBOSA, D. R. E S. Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 10–17, 2017.

OLIVEIRA, K.G.; BATISTA, E.A.; KRALJIC, P.S.; MATTA, R.A.; BATISTA, R.M.; LUCAS, V.A.S.; FERNANDES, S.H. Desenvolvimento de um fungicida natural a partir da piperina. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.7, 2020.

OLIVEIRA, M. R.; ANJOS DA SILVA, L.; SANTOS DA SILVA, R.; BRANCO DE QUEIROZ, C. C.; TAKEARA, R. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Piper* species from the Amazon. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 6, p. 536–548, 2021.

OYEMITAN, I.A. **African Medicinal Spices of Genus *Piper*. Medicinal Spices and Vegetables from Africa**, p.581-597, 2017.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução a Espectroscopia**. Cengage Learning, 4 ed., Washington, 2010.

PARMAR, V.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASSAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the Genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.597-673, 1997.

PEDERSEN, M.E.; METZLER, B.; STAFFORD, G.I.; STADEN, J.V.; JÄGER, A.K.; RASMUSSEN, H.B. Amides from *Piper capense* with CNS activity – A preliminar SAR analysis. **Molecules**, v.14, n.9, p. 3833-3843, 2009.

PEDROSO, M. P.; GODOY, L. A. F. de; FIDÉLIS, C. H. de V.; FERREIRA, E. C.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CG xGC). **Química Nova**, v.32, n.2, p.421-430, 2009.

PERIGO, C.V.; TORRES, R.B.; BERNACCI, L.C.; GUIMARÃES, E.F.; HABER, L.L.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; QUECINI, V.; MARQUES, M.O.M. The Chemical Composition and Antibacterial Activity of Eleven *Piper* Species from Distinct Rainforest Areas in Southeastern Brazil. **Industrial Crops and Products**, v.94, p. 528-539, 2016.

PERCZAK, A.; GWIAZDOWSKA, D.; GWIAZDOWSKI, R.; et al. The inhibitory potential of selected essential oils on *Fusarium* spp. growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds. **Pathogens**, v. 9, n. 1, 2020.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A. Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.8, p.1115-1120, 2003.

PRABST, K.; ENGELHARDT, H.; RINGGELER, S.; HUBNER, H. **Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. Cell Viability Assays: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v.1601, p.1-17, 2017.

RACHITHA, P.; KRUPASHREE, K.; JAYASHREE, G. V.; GOPALAN, N.; KHANUM, F. Growth inhibition and morphological alteration of *Fusarium sporotrichioides* by *Mentha piperita* essential oil. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 1, p. 74–79, 2017.

RAJKUMAR, V.; GUNASEKARAN, C.; DHARMARAJ, J.; et al. Structural characterization of chitosan nanoparticle loaded with Piper nigrum essential oil for biological efficacy against the stored grain pest control. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 166, n. January, p. 104566, 2020.

RATHORE, H.S.; FILIPPI, R.G.; WACHNIK, R.A. ESTABIL, J.J.; KWOK, T. Electroigration and current-carrying implications for aluminum-based metallurgy with tungsten stud via interconnections. **Submicrometer Metallization**. 1993.

RAULF, A.; IMRAN, M.; KHAN, I.A.; REHMAN-UR-MUJEEB.; GILANI, S.A.; MEHMOOD, Z.; MUBARAK, M.S. Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability. **Phytotherapy Research**. v.32, p.2109-2130, 2018.

RIBEIRO, V.; DIAS, N.; PAIVA, T.; HAGSTRÖM-BEX, L.; NITZ, N.; PRATESI, R.; HECHT, M. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resitance**, v. 12, p. 7-17,2020.

REGASINI, L.O.; COTINGUIBA, F.; MORANDIM, A.A.; KATO, M.J.; SCORZONI, L.; GIANNINI, M.J.M.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. **African Journal of Biotechnology**. v.8, n.12, p.2866-2870, 2009.

RODRIGUES, E.; ALMEIDA-DUARTE, J.M.; PIRES, J.M. Perfil Farmacológico e Fitoquímico de Plantas Indicadas Pelos Caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) Como Potenciais Analgésicas. Parte I. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, p.981-991, 2010.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, G. E. Cytotoxicity and Antitumoral Activity of Dichloromethane Extract and its Fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p.411-415, 2008.

SAHA, K.C.; SEAL, H.P.; NOOR, M.A. Isolation and characterization of piperine from the fruits of black pepper (*Piper nigrum*). **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v.11, p.11-16, 2013.

SALEHI, B.; ZAKARIA, Z. A.; GYAWALI, R.; et al. *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v.7, n.24, p.1364, 2019.

SALLEH, W.M.N.H.W.; AHMAD, F.; YEN, K.H.; SIRAT, H.M. Chemical Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Piper officinarum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**. v.7, n.12, p.7720-7731, 2012.

SALOMÉ, K.S. **Estudo dos Metabólitos Secundários de *Piper Xylosteoides* e *Piper Hemmendorffii* (Piperaceae)**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química,

Área de Concentração em Química Orgânica, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química. Universidade Federal do Paraná Curitiba. 2015.

SANTANA, A. DA S.; BALDIN, E. L. L.; SANTOS, T. L. B. DOS; et al. Synergism between essential oils: A promising alternative to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Crop Protection**, v. 153, n. December 2021, 2022.

SANTOS, M.R.A.; SILVA, A.G.; LIMA, R.A.; LIMA, D.K.S.; SALLET, L.A.P.; TEIXEIRA, C.A.D.; POLLI, A.R.; FACUNDO, V.A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.2, p.319-324. 2010.

SANTOS, M.S.; POSER, G.V.; BORDIGNON, S.; RIBEIRO, V.L.S.; FERRA, A.B.F. Análise Química e Avaliação da Atividade Acaricida das Folhas de *Piper Amalago*, *P. Mikanianum* e *P. Xylosteoides* em Larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*, **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n.6, p.1-288, 2010.

SANTOS, T.G.; REBELO, R.A.; DALMARCO, E.M.; GUEDES, A.; GASPER, A.L.; CRUZ, B.A.; SCHIMIT, A.P.; CRUZ, R, C, B.; STEINDEL, M.; NUNES, R.K. Composição Química e Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial das Folhas De *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. Dc. **Química Nova**, v. 35, p.477-481, 2012.

SANTOS, T.G.; FUKUDA, K.; SARTORATO, A.; DUARTE, M.C.T.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; AUGUSTO, F.; MARQUES, F.A.; MAIA, B.H.L.N.S. Characterization of The Essential Oils of Two Species of Piperaceae by One- And Two-Dimensional Chromatographic Techniques With Quadropole Mass Spectrometric Detection. **Microchemical Journal**, v.115, p.113-120, 2014.

SARI, R.; CONTERNO, P.; SILVA, L.D.; LIMA, V.A.; OLDONI, T.L.; THOMÉ, G.R.; CARPES, S.T.; Extraction of Phenolic Compounds from *Tabernaemontana catharinensis* Leaves and Their Effect on Oxidative Stress Markers in Diabetic Rats. **Molecules**, v.25, n.10, p.2391, 2020.

SENEME, E.F.; SANTOS, D.C.; LIMA, C.A.; ZELIOLI, I.A.M.; SCIANI, J.M.; LONGATO, G.B. Effects of Myristicin in Association with Chemotherapies on the Reversal of the Multidrug Resistance (MDR) Mechanism in Cancer. **Pharmaceuticals**, v.15, p.1233, 2022.

SILVA, C.B.; SIMIONATTO, E.; HESS, S.; PERES, M.T.L.; SIMIONATTO, E.L.; JUNIOR, A.W.; POPPI, N.R.; FACCENDA, O.; CANDIDO, A.C.S.; SCALON, P.Q. Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *hydrocotyle bonariensis* LAM(ARALIACEAE). **Química Nova**, v.32, n.9, p.2373-2376. 2009.

SILVA, L.A.; RAPOSO, J.D.A.; CAMPOS, L.P.G.; CONCEIÇÃO, E.C.; OLIVEIRA, R.B.; MOURÃO, R.H.V. Atividade Antioxidante do óleo essencial de *Myrcia Sylvania* (G.Mey.) DC. Por Diferentes Métodos de Análises Antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/Ácido linoleico). **Revista Fitos**, v.12, p117-126, 2018.

SILVA, R.J.F.; AGUIAR-DIAS, A.C.A.; FAIAL, K.C.F.; MENDONÇA, M, S. Caracterização Farmacognóstica de *Piper arboreum* e *P. tuberculatum* (Piperaceae). **Acta Amazonica**, v.46, p.195-208, 2016.

SILVA, M.B.L. RAMOS, A.M. Composição Química, Textura e Aceitação Sensorial de Doces em Massa Elaborados com Polpa de Banana e Banana Integral. **Revista Ceres**, v. 56, p.551-554, 2009.

SILVA, C.B.; SILVA, K.B.; OLIVEIRA, E.L.S.; SOARES, V.F.; COSTA, J.G.; SANTOS, A.F. A Importância da Ação Antioxidante de Óleos Essenciais em Benefício da Saúde. **Diversitas Journal**, v.2, p.52-55, 2017.

SCOTT, I.M.; JENSEM, H.R.; PHILOGÈNE, B.J.R.; ARNASON, J. A Review of *Piper* Spp. (Piperaceae) Phytochemistry, Insecticidal Activity and Mode of Action. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p.65–75. 2008.

SHARMA, A.; VALLEJO-FLORES, C.R.; TAKETA-CARDOSO, A.; VILLARREAL, L.M. Antibacterial Activities of Medicinal Plants Used in Mexican Traditional Medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.208, p.264-329. 2017.

SHERER, C.B.; BOTONI, L.S.; COSTA-VAL, A.P.; Mecanismos de ação de antimicrobianos e resistência bacteriana. Medvep **Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, v.4, n.13, p.12-20. 2017.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed., New York, 2005.

SOARES, K.D.; BORDIGNON, S.A.L.; APEL, M.A. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Piper gaudichaudianum* and *Piper mikanianum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.297, n.28. 2022.

SOUZA, D.P.; PIMENTEL, R.B.Q.; SANTOS, A.S. Fungicidal properties and insights on the mechanisms of the action of volatile oils from Amazonian Aniba trees. **Industrial Crops and Products**, v. 143, n. October 2019, p. 111914, 2020.

STEIN, J.; JORGE, B.C.; REIS, A.C.C.; RADAI, J.A.S.; MOREIRA, S.S.; FRAGA, T.L.; MOTA, J.S.; OLIVEIRA, R.J.; KASSUYA, C.A.L.; ARENA, A.C. Evaluation of the safety of ethanolic extract from *Piper amalago* L. (Piperaceae) leaves in vivo: Subacute toxicity and genotoxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.129. 2022.

SUZERY, M.; RIA, R.Y.S.; CAHYONO, B. Alkaloids piperine in dichloromethane fraction of red galangal rizhome (*Alpinia purpurata*). **Conference Series: Materials Science and Engineering**, v.509. 2019.

TANG, X.; SHAO, Y.L.; TANG, Y.J.; ZHOU, W.W. Antifungal activity of essential oil compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). **Molecules**, v. 23, n. 9, 2018.

TANGARIFE-CASTAÑO, V.; CORREA-ROYERO, J. B.; ROA-LINARES, V. C.; et al. Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 3, p. 221–227, 2014.

TAVARES W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**, 3.ed., São Paulo, Atheneu, 2001.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed, Porto Alegre, p.820. 2013.

TIAN, J.; ZENG, X.Z.; ZHANG, S.; WANG, Y.; ZHANG, P.; LU, A.; PENG, X. Regional Variation in Components and Antioxidant and Antifungal Activities of *Perilla frutescens* essential oils in China. **Industrial Crops and Products**, v.59, p.69-79, 2014.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-471, 1963.

VARANDA, E.A. Atividade Mutagênica de Plantas Medicinais. **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v.27, p.1-7, 2006.

VECHIA, L.D.; GNOATTO, S.C.B.; GOSMANN, G. Derivados Oleananos e Ursanos e sua Importância na Descoberta de Novos Fármacos com Atividade Antitumoral, Anti-inflamatória e Antioxidante. **Química Nova**, v.32, p.1245-1252. 2009.

VIEGAS, C.F.; BOLZANI, V.S. Os produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v.29, p.326-337.2006.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural Characterization of Flavonoid Glycosides by Multi-Stage Mass Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v.29, p.1-16, 2010.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Review Chapter: Fusarium Genus and Essential Oils. **Sustainable Development and Biodiversity**. p.95–120, 2018.

ZAHIN, M.; BOKHARI, N.A.; AHMAD, I.; HUSAIN, F.M. ALTHUBIANI, A.S.; ALRUWAYS, M.W.; PERVEEN, K.; SHALAWI, M. Antioxidant, Antibacterial, and Antimutagenic Activity of *Piper nigrum* Seeds Extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.28, p.5094-5105, 2021.

ZAHRA, G.; KHADIJEH, B.; HOSSEIN, D.; Ali, S. Essential Oil Composition of two Scutellaria Species from Iran. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v.6, p.244-253. 2019.

ZHANG, J.; ZHU, X.; LI, H.; LI, B.; SUN, L.; XIE, T.; ZHU, T.; ZHOU, H.; YE, Z. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. **International Immunopharmacology**. V.24, n.1, p.50-58, 2015.

ZIMMERMANN, R. C.; ARAGÃO, C. E. DE C.; ARAÚJO, P. J. P. DE; et al. Insecticide activity and toxicity of essential oils against two stored-product insects. **Crop Protection**, v. 144, n. February, p. 105575, 2021.

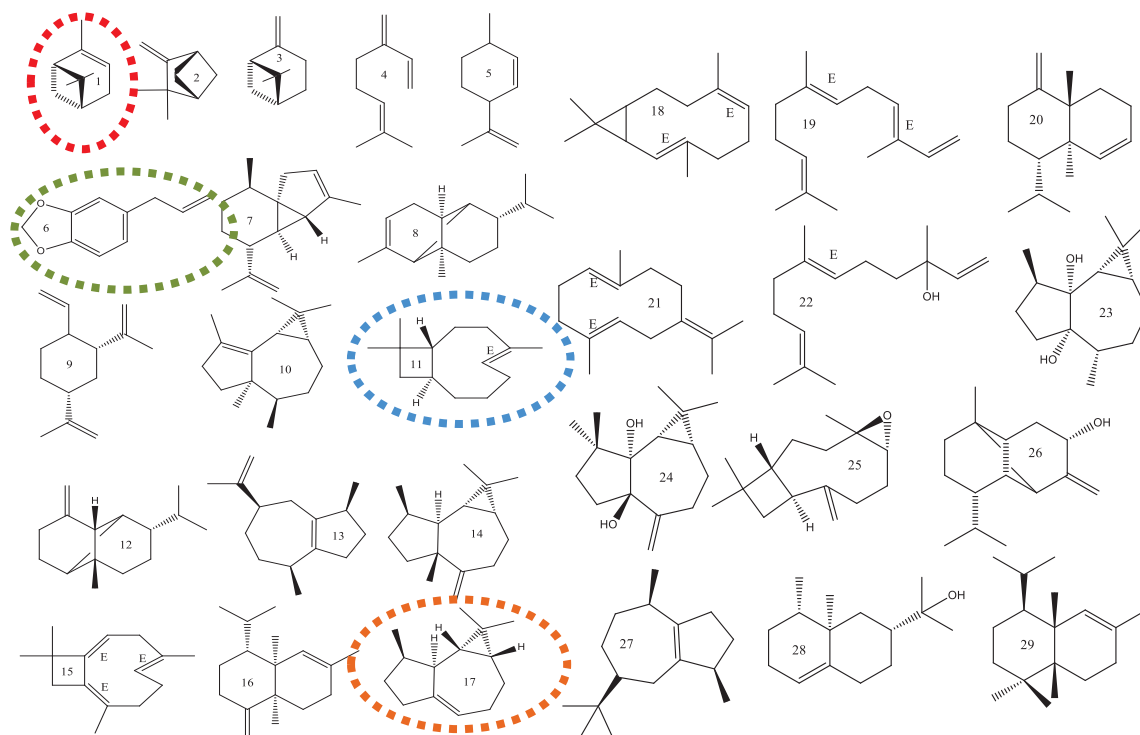
YOU, C.X.; JIANG, H.Y.; ZHANG, W.J.; GUO, S.S.; YANG, K.; LEI, N.; MA, P.; GENG, Z.F.; DU, S.S. Contact toxicity and repellency of the main componentes from the oil of *Clausena anisum-olens* agains two stored products insects. **Journal of Insect Science**, v.15, n.1, p.87, 2015.

YUSSUF, N.; COOK, R. S. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 2. ed. Whashington, DC: American Pharmaceutical Association, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 – ESTRUTURAS IDENTIFICADAS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. mikanianum*.

Atalanta – (SC). As estruturas destacadas, são as que apresentaram maiores teores no óleo essencial.



ANEXO 2 – ESTRUTURAS IDENTIFICADAS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. mikanianum*.

Curitiba – (PR). As estruturas destacadas, são as que apresentaram maiores teores no óleo essencial.

