

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELAINE FERNANDA DOS SANTOS

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Piper aff. divaricatum* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO

CURITIBA

2025

ELAINE FERNANDA DOS SANTOS

ESTUDO FITOQUIMICO DE *Piper aff. divaricatum* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química; Área de concentração: Química Orgânica.

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

CURITIBA

2025

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

Santos, Elaine Fernanda dos

Estudo fitoquímico de *piper aff. divaricatum* e avaliação do potencial antimicrobiano. / Elaine Fernanda dos Santos. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

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

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

1. Planta (*Piper divaricatum*). 2. Ação antimicrobiana. 3. Compostos orgânicos (Meroterpenos). I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

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 **ELAINE FERNANDA DOS SANTOS**, intitulada: **ESTUDO FITOQUÍMICO DE Piper aff. divaricatum E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO**, sob orientação da Profa. Dra. BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 27 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica
04/04/2025 10:43:07.0

BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
07/04/2025 13:43:42.0

SIRLEI DIAS TEIXEIRA

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

Assinatura Eletrônica
08/04/2025 11:24:40.0

FRANCISCO DE ASSIS MARQUES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
11/04/2025 10:44:38.0

ANA LUISA LACAVA LORDELLO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
07/04/2025 14:45:45.0

LUIZ EVERSON DA SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à minha família, em reconhecimento a todo carinho e suporte que sempre me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais Olga e José, e ao meu irmão e cunhada, Felipe e Joviane, pelo amor incondicional, pelo apoio e dedicação, e por tornarem essa jornada possível, mesmo estando longe.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, pela oportunidade de fazer parte dessa equipe maravilhosa e dedicada, e por todos os ensinamentos compartilhados.

À Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas, e Agrícolas (UNICAMP) pelo empenho na realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao Prof. Dr. Diones Krinski da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) pela realização da coleta da espécie em análise.

Aos professores Dr^a Ana Luísa Lacava Lordello, Dr. Brás Heleno de Oliveira e Dr. Francisco de Assis Marques pelas valiosas contribuições no relatório de qualificação.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em contribuir com o crescimento desse trabalho, professores doutores Ana Luísa Lacava Lordello, Francisco de Assis Marques, Ieda Maria Begnini, Kahlil Schwanka Salomé, Luiz Everson da Silva e Sirlei Dias Teixeira.

À professora Dr^a Sonia Zawadzki pela oportunidade de atuar ao seu lado, por sua generosidade, dedicação e gentileza.

Às Doutoradas Josiane Regina Teixeira e Teresa Daros Szollosi (CASA 4 - UFPR), pelo apoio, dedicação e profissionalismo. Seu cuidado, empatia e orientação foram fundamentais para o meu bem-estar. Sou imensamente grata por todo o acompanhamento e por me ajudarem nessa jornada com tanto carinho e compreensão.

Aos meus amigos do LAPNEQ por sua amizade, paciência e pela troca de

conhecimentos. Obrigada por dividirem comigo as angústias, as alegrias e por nunca medirem esforços para ajudar no que fosse preciso, em especial Aurea P. Ferriani, Carmem N. Jost, Carolina de M. Azevedo, Deborah V. de Lima, Gesieli P.C. da Silva, Fabiele K. C. W. do Amaral, Mariane C. Pesenti, Inaiara Casapula, Pedro H.D. Bellardo, Rafael Sari, Rebeca G. de Camargo e Sara S. L. Graf.

À aluna de iniciação científica Laura Helena Schroeder Borges, pela colaboração na execução deste trabalho, pela amizade, confiança e por acreditar em nossa pesquisa. Obrigada pelo companheirismo tanto profissional quanto pessoal. Sem dúvidas, será uma profissional brilhante.

A todos os meus amigos de sempre e aos colegas que tive a alegria de conhecer ao longo deste trabalho, com destaque especial para Anne Raquel Sotilles, Maria Clara da Silva Durigon, Rubens Cândido Zimmermann e Viviane Rodrigues Chagas.

À Universidade Federal do Paraná, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química, bem como a seus professores e servidores. Meu agradecimento também aos órgãos de fomento Capes, CNPq e Fundação Araucária.

E a todos que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Ao infinito e além...”

Buzz Lightyear

RESUMO

A família Piperaceae engloba uma grande diversidade de espécies em todo mundo. No Brasil, essa família está presente com diversos gêneros e espécies, sendo o gênero *Piper* aquele que concentra a maior quantidade de espécies. Entre as espécies do gênero, destaca-se *Piper* aff. *divaricatum*, recentemente identificada e encontrada no município de Tangará da Serra, no estado Mato Grosso, região centro-oeste do Brasil. Nesse estudo, foram realizadas investigações químicas dos extratos brutos das folhas, galhos e raízes e do óleo essencial dessa espécie. Os extratos foram submetidos à diferentes técnicas cromatográficas (CLAE, CCDA, CCDP, CLV), e, após análises espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas uni e bidimensionais), foram identificadas seis substâncias. Entre elas, destacam-se dois meroterpenoides, (*E*)-2-(4',8'-dimetilnona-3',7'-dien-1-il)-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila e (*E*)-2-(4',8'-dimetilnona-3',7'-dien-1-il)-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila, ambos descritos pela primeira vez. Além disso, foram encontrados dois derivados de ácido benzoico, 4-nerolidilcatecol e (*E*)-4-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1-il)-3-hidroxibenzoato de metila, bem como um arilpropanoide, a miristicina, e um sesquiterpeno acíclico oxigenado, o nerolidol. Uma análise de impressão digital dos extratos brutos foi realizada para correlacionar os componentes da amostra vegetal, destacando as variações conforme o solvente extrator e o órgão vegetativo, com suporte das análises quimiométricas (ACP). A composição química do óleo essencial das folhas de *P.* aff. *divaricatum* foi determinada por CG-EM, identificando-se um total de 38 constituintes. Dentre eles, os principais foram sesquiterpenos, seguidos por arilpropanoides, sesquiterpenos oxigenados e, em menor proporção monoterpenos. A análise antibacteriana dos extratos e do óleo essencial revelou atividade promissora contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides* e *Escherichia coli*, e não apresentou atividade contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* até a concentração de 2,0 mg mL⁻¹. Já as frações demonstraram eficiência contra um número maior de microrganismos como *S. aureus*, *S. epidermides* e *E. coli*, *S. choleraesuis*, e *C. albicans*.

Palavras-chave: *Piper* aff. *divaricatum*, meroterpenoides, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The Piperaceae family comprises a vast diversity of species globally, with Brazil harboring a significant number of genera and species. Within this context, the genus *Piper* exhibits the highest species richness. Among its representatives, *Piper* aff. *divaricatum* - a recently identified species collected in Tangará da Serra, Mato Grosso, Central-West Brazil - has garnered attention due to its unique chemical profile. This study reports the phytochemical investigation of crude extracts obtained from leaves, stems, and roots, as well as the essential oil of *P.* aff. *divaricatum*. The extracts were subjected to various chromatographic techniques (HPLC, CCDA, CCDP, VLC), and subsequent structural elucidation was performed using spectroscopic methods ^1H and ^{13}C NMR, including 1D and 2D experiments). Six secondary metabolites were identified, notably including two meroterpenoids - (*E*)-2-(4',8'-dimethylnona-3',7'-dien-1-yl)-2-methyl-2H-chromen-6-carboxylic acid methyl ester and (*E*)-2-(4',8'-dimethylnona-3',7'-dien-1-yl)-8-hydroxy-2-methyl-2H-chromen-6-carboxylic acid methyl ester - both described here for the first time. Additional constituents included two benzoic acid derivatives (4-nerolidylcatechol and (*E*)-4-(3',7'-dimethylocta-2',6'-dien-1-yl)-3-hydroxybenzoic acid methyl ester), one arylpropanoid (myristicin), and one oxygenated acyclic sesquiterpene (nerolidol). Fingerprint profiling of the crude extracts was conducted to assess the chemical variation among different plant organs and extraction solvents, supported by principal component analysis (PCA). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of the essential oil from the leaves revealed 38 constituents, predominantly sesquiterpenes, followed by arylpropanoids, oxygenated sesquiterpenes, and, to a lesser extent, monoterpenes. The antibacterial activity of the crude extracts and essential oil demonstrated selective inhibition against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli*, with no observable effect against *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans* at concentrations up to 2.0 mg. mL⁻¹. However, the chromatographic fractions exhibited broader antimicrobial activity, effectively inhibiting *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. choleraesuis*, and *C. albicans*.

Keywords: *Piper* aff. *divaricatum*, meroterpenoids, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DE PIPERACEAE	12
FIGURA 2 - <i>Piper aff. divaricatum</i> COLETA NO MUNICÍPIO DE TANGARÁ DA SERRA - MT	14
FIGURA 3 - FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR A PRODUÇÃO E ACÚMULO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS.	15
FIGURA 4 - SISTEMA HETEROCÍCLICO DO 2H-CROMENO	16
FIGURA 5 - BISSÍNTESE DE DERIVADOS DOS ÁCIDOS BENZÓICOS A PARTIR DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	17
FIGURA 6 - BISSÍNTESE DO ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIBENZOICO A PARTIR DO ÁCIDO CORÍSMICO.....	18
FIGURA 7 - BISSÍNTESE DOS CROMENOS A PARTIR DO ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIBENZOICO.	19
FIGURA 8 - RENDIMENTOS DOS EXTRATOS BRUTOS <i>P. aff. divaricatum</i>	32
FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS DE <i>P.aff. divaricatum</i> DAS FOLHAS, GALHOS E RAÍZES EM HEXANO, ACETATO DE ETILA E METANOL ($\lambda = 254$ nm).	34
FIGURA 10 - SCORES OBTIDO POR ACP DOS DADOS DE CLAE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS, GALHOS E RAIZES EM METANOL, ACETATO DE ETILA E HEXANO.	36
FIGURA 11 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> - PC1 (A) E PC2 (B).	37
FIGURA 12 - ESTRUTURA IDENTIFICADA COMO ASARICINA.....	38
FIGURA 13- ESPECTRO DE RMN ^1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 1	39
FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DESACOPLADO (CDCl_3 , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1.....	40
FIGURA 15 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS PARA A SUBSTÂNCIA 1 NO EXPERIMENTO HMBC (CDCl_3).....	41
FIGURA 16 – EXPERIMENTO DE COSY PARA SUBSTÂNCIA 1 (AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 7,0 A 2,5 ppm (600, 13 MHz, CDCl_3)).....	42
FIGURA 17 – EM (A) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS PRETAS) E COSY (SETAS VERMELHAS); EM (B) ESTRUTURA COM SEUS RESPECTIVOS CARBONOS (PRETO) E HIDROGÊNIOS (VERMELHO) PARA A SUBSTÂNCIA 1.....	42

FIGURA 18 - ESTRUTURA IDENTIFICADA DAS FRAÇÕES FHR-05-07-03 E FHR-07-09, (E)-2-(4',8'-DIMETILNONA-3',7'-DIEN-1-IL)-2-METIL-2H-CROMENO-6-CARBOXILATO DE METILA.....	43
FIGURA 19- ESPECTRO DE RMN ¹ H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 2.....	45
FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN ¹ H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl ₃) DE AMBAS AS FRAÇÕES, FHR-07-09-03 (A) E FHR-05-07-03 (B) PARA COMPARAÇÃO.....	46
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DESACOPLADO (CDCl ₃ , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 2 (FHR-07-09-03).....	47
FIGURA 22 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DESACOPLADO (CDCl ₃ , 150,90 MHz) DE AMBAS AS FRAÇÕES, FHR-07-09-03 (A) E FHR-05-07-03 (B) PARA COMPARAÇÃO.....	48
FIGURA 23 - CORRELAÇÕES OBSERVADAS PARA A SUBSTÂNCIA 2 NO EXPERIMENTO HMBC (CDCl ₃).....	48
FIGURA 24 - EXPERIMENTO DE COSY PARA SUBSTÂNCIA 2, (AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 8,0 A 5,0 ppm (CDCl ₃)).....	49
FIGURA 25 - EM (A) A ESTRUTURA COM OS DESLOCAMENTOS CORRESPONDENTES, (CARBONOS EM PRETO E HIDROGÊNIOS EM VERMELHO). EM (B), AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES IDENTIFICADAS NOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS PRETAS) E COSY (SETAS VERMELHAS) PARA A SUBSTÂNCIA 2.....	50
FIGURA 26 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO IDENTIFICADO COMO (E)-2-(4',8'-DIMETILNONA-3',7'-DIEN-1-IL)-2-METIL-2H-CROMENO-6-CARBOXILATO DE METILA (λ=254 nm).....	51
FIGURA 27 - ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA 2.....	51
FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES FHR-10, FHR-13 E FHR-14 (λ=254 nm).	52
FIGURA 29 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A SUBSTÂNCIA 3 (4-NEROLIDILCATECOL).....	53
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN ¹ H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3.....	55
FIGURA 31 - ESPECTROS DE RMN ¹ H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl ₃) DE AMBAS AS FRAÇÕES, FHR-10-04 (A) E FHR-07-07-03 (B) PARA COMPARAÇÃO. 56	56
FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DESACOPLADO (CDCl ₃ , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 3.....	57

FIGURA 33 - CORRELAÇÃO DE HMBC DA SUBSTÂNCIA 3.....	58
FIGURA 34 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DESACOPLADO (CDCl ₃ , 150,90 MHz) DE AMBAS AS FRAÇÕES, FHR-10-04 (A) E FHR-07-07-03 (B) PARA COMPARAÇÃO. 59	
FIGURA 35 - EM (A) ESTRUTURA COM DESLOCAMENTOS PARA A SUBSTÂNCIA 3 (CARBONOS EM PRETO E HIDROGÊNIO EM VERMELHO). EM (B) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC.	59
FIGURA 36 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO IDENTIFICADO COMO 4-NEROLIDILCATECOL (λ=254 nm).....	60
FIGURA 37 - ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA 3.....	60
FIGURA 38 - CROMATOGRAMA DE COMPARAÇÃO ENTRE AS FRAÇÕES FHR-07-08-03 E FHR-10.....	61
FIGURA 39 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A FHR-10-06, (E)-2-(4',8'-DIMETILNONA-3',7'-DIEN-1-IL)-8-HIDROXI-2-METIL-2H-CROMENO-6-CARBOXILATO DE METILA.....	62
FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN ¹ H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 4.....	64
FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DESACOPLADO (CDCl ₃ , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 4.....	66
FIGURA 42 - CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA A SUBSTÂNCIA 4.	67
FIGURA 43 - MAPA DE CONTOURNO DO EXPERIMENTO COSY DA SUBSTÂNCIA 4 (AMPLIAÇÃO NA REGIÃO DE 8,0 A 5,0 ppm (600, 13 MHz, CDCl ₃))	68
FIGURA 44 - EM (A) ESTRUTURA COM SEUS RESPECTIVOS CARBONOS (PRETO) E HIDROGÊNIO (VERMELHO). EM (B) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS PRETAS) E COSY (SETAS VERMELHAS) PARA A SUBSTÂNCIA 4.	68
FIGURA 45 - CROMATOGRAMA OBTIDO DO ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA 4, (E)-2-(4',8'-DIMETILNONA-3',7'-DIEN-1-IL)-8-HIDROXI-2-METIL-2H-CROMENO-6-CARBOXILATO DE METILA (λ=254 nm).....	69
FIGURA 46 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A SUBSTÂNCIA 5 (E)-4-(3',7'-DIMETILOCTA-2',6'-DIEN-1-IL)-3-HIDROXIBENZOATO DE METILA	70
FIGURA 47 - ESPECTRO DE RMN ¹ H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 5.....	71
FIGURA 48 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DESACOPLADO (CDCl ₃ , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 5.....	73

FIGURA 49 - CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA SUBSTÂNCIA 5...	74
FIGURA 50 - EM (A) ESTRUTURA COM SEUS RESPECTIVOS CARBONOS (PRETO) E HIDROGÊNIOS (VERMELHO). EM (B) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELO EXPERIMENTO DE HMBC (SETAS PRETAS) PARA A SUBSTÂNCIA 5.....	74
FIGURA 51 - CROMATOGRAMA OBTIDO DA SUBSTÂNCIA 5, (E)-4-(3',7'-DIMETILOCTA-2',6'-DIEN-1-IL)-3-HIDROXIBENZOATO DE METILA ($\lambda=254$ nm).....	75
FIGURA 52 – CROMATROGRAMA AMPLIADO NA REGIÃO DE 20 A 40 MIN. DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS, JUNTAMENTE COM SUAS ESTRUTURAS ($\lambda=254$ nm).....	76
FIGURA 53 - ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 2 E 4.....	77
FIGURA 54 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A SUBSTÂNCIA 6 ((E)-NEROLIDOL)	78
FIGURA 55 - ESPECTRO DE RMN 1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 6.....	79
FIGURA 56 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DESACOPLADO (150,90 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 6.....	81
FIGURA 57 - CORRELAÇÃO DE HMBC DA SUBSTÂNCIA 6.....	82
FIGURA 58 - EM (A) ESTRUTURA COM SEUS RESPECTIVOS CARBONOS (PRETO) E HIDROGÊNIOS (VERMELHO). EM (B) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS PRETAS) PARA A SUBSTÂNCIA 6.....	82
FIGURA 59 - ISÔMEROS DE NEROLIDOL.....	83
FIGURA 60 - CROMTOGRAMA OBTIDO POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>P. aff. divaricatum</i>	85
FIGURA 61 - COMPONENTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. aff. divaricatum</i>	87
FIGURA 62 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS ORIUNDOS DO EXTRATO DE <i>P. divaricatum</i>	88
FIGURA 63 - ESPECTRO DE RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03.....	103
FIGURA 64 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03.....	104
FIGURA 65 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ¹ H- ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03	105
FIGURA 66 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C A LONGA DISTANCIA (400 MHz,	

CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03.....	106
FIGURA 67 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03.....	107
FIGURA 68 - ESPECTRO DE RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-07-03.....	108
FIGURA 69 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-07-03.....	109
FIGURA 70 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ¹ H- ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-07-03	110
FIGURA 71 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C A LONGA DISTANCIA (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-07-03.....	111
FIGURA 72 - ESPECTRO DE RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-08-03.....	112
FIGURA 73 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-08-03.....	113
FIGURA 74 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ¹ H- ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-08-03	114
FIGURA 75 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C A LONGA DISTANCIA (400 MHz, CDCl ₃) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-08-03.....	115

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1 - FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CCDP PARA A SUBSTÂNCIA 1.....	37
FLUXOGRAMA 2 - FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CCDP PARA A SUBSTÂNCIA 2.....	43
FLUXOGRAMA 3 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CCDP PARA A SUBSTÂNCIA 3.....	53
FLUXOGRAMA 4- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SUBSTÂNCIA 6 ...	77
FLUXOGRAMA 5 – FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES FHR-03, FHR-09, FHR-15 E FHR-18.....	84
FLUXOGRAMA 6 - PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DA COLUNA DE RAÍZES EM HEXANO	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CONDIÇÕES DO CLAE UTILIZADAS NA ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>P. aff. divaricatum</i>	24
TABELA 2 - MÉTODOS DESENVOLVIDOS PARA ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS POR CLAE EM COLUNA C18 ANALÍTICA E MÉTODO UTILIZADO NA SEPARAÇÃO EM COLUNA C18 SEMI-PREPARATIVA.	25
TABELA 3 - CONDIÇÕES DE ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>P. aff. divaricatum</i> POR CG-MS	26
TABELA 4 - FRAÇÕES AGRUPADAS DO FRACIONAMENTO POR COLUNA À VÁCUO DO EXTRATO DE RAÍZES EM HEXANO	29
TABELA 5 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 1 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA	38
TABELA 6 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 2.	44
TABELA 7- DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 3.	54
TABELA 8 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 4.	63
TABELA 9 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 5.	70
TABELA 10 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 6.	78
TABELA 11 - ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>P. aff. divaricatum</i>	85
TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (CIM – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CBM – CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA) PARA OS EXTRATOS DE <i>P. aff. divaricatum</i>	89
TABELA 13 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CIM E CBM PARA AS FRAÇÕES FHR-10, FHR-13 E FHR-14 DO EXTRATO DAS RAÍZES EM HEXANO DE <i>P. aff. divaricatum</i>	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

δ	–	Deslocamento Químico
%	–	Porcentagem
°C	–	Grau Celsius
μL	–	Microlitro
μm	–	Micrômetro
$J_{\text{H-C}}$	–	Correlação Direta H-C
ACP	–	Análise de Componentes Principais
AcOEt	–	Acetato de Etila
Aff.	–	Afinnis
CBM	–	Concentração Bactericida Mínima
CCDA	–	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	–	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	–	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência
CLSI	–	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
cm	–	Centímetros
COSY	–	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
Da	–	Dalton
DCM	–	Diclorometano
d	–	Dupleto
dd	–	Duplo Dupleto
DMAPP	–	Pirofosfato de Dimetilalila
FHR	–	Fração Hexânica de Raízes
G. Mey.	–	Giseke Meyer
g	–	Grama
h	–	Horas
Hz	–	Hertz
HEX	–	Hexano
HMBC	–	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	–	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IPP	–	Pirofosfato de Isopentenila
Kg	–	Quilogramas
L	–	Litro
MT	–	Mato Grosso

m	–	Multiplete
MeOH	–	Metanol
mg	–	Miligrama
MHz	–	Megahertz
min	–	Minuto
mL	–	Mililitro
mm	–	Milímetro
m/v	–	Razão Massa por Volume
nm	–	Nanômetro
OE	–	Óleo Essencial
OEs	–	Óleos Essenciais
ppm	–	Parte por Milhão
RMN	–	Ressonância Magnética Nuclear
RMN 1D	–	Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional
RMN 2D	–	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
s	–	Simpleto
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
UV	–	Ultravioleta
v	–	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	11
1.2 FAMÍLIA PIPERACEAE E GÊNERO <i>PIPER</i>	12
1.2.1 ESPÉCIE <i>Piper. aff. divaricatum</i>	13
1.3 METABOLISMO VEGETAL	14
1.3.1 MEROTERPENOS.....	16
1.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVOS GERAIS	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 MATERIAL.....	23
3.1.1 MATERIAL VEGETAL.....	23
3.1.2 SOLVENTES	23
3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS	23
3.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA E PREPARATIVA.....	23
3.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A VÁCUO.....	24
3.2.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	24
3.2.4 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA	25
3.2.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	26
3.2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS	26
3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>P. aff. divaricatum</i>	27
3.3.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS, GALHOS E RAÍZES.	27
3.3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	27
3.3.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE RAÍZES EM HEXANO POR COLUNA LÍQUIDA A VÁCUO.....	28
3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	30

3.4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	30
3.4.2 MICRORGANISMOS E MEIO DE CULTURA	30
3.4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 ANÁLISE PRELIMINAR DOS EXTRATOS BRUTOS.....	32
4.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1.....	37
4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 2.....	43
4.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS 3, 4 E 5.....	52
4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 6.....	77
4.6 FRAÇÕES FHR-03, FHR-09, FHR-15 E FHR-18.....	83
4.7 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE <i>P. aff. divaricatum</i>	84
4.8 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS BIOLÓGICOS	89
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	92
6 REFERÊNCIA.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde os tempos mais antigos o uso de produtos naturais pela humanidade vem sendo observado. O consumo de ervas e folhas possivelmente tenha sido umas das primeiras formas de utilização no tratamento de várias doenças, e este uso popular, juntamente com sua eficácia tornou-se relevante para o embasamento científico e tecnológico, buscando o entendimento de seu mecanismo de ação e o isolamento dos princípios ativos (SOUZA; ALBINO; LIMA, 2019). A medicina tradicional ainda é muito usada atualmente, por razões históricas e culturais mantém sua popularidade e, por esse motivo seu papel econômico vem crescendo (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021; RABELO et al., 2019; GUTIÉRREZ; GONZALEZ; HOYO-VADILLO, 2013).

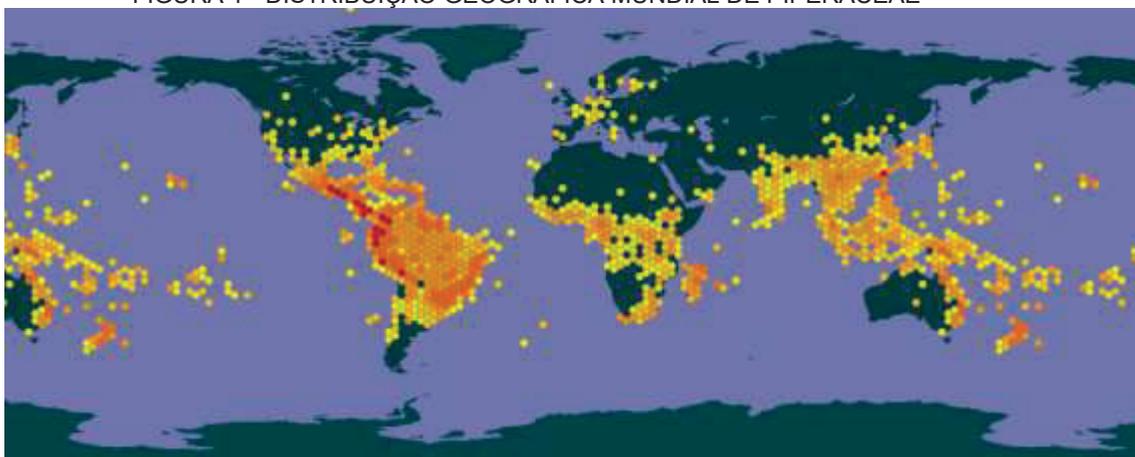
Os produtos naturais têm sido uma fonte valiosa de compostos bioativos com propriedades terapêuticas. Os relatos recentes destacam produtos naturais e fitoterápicos como área de interesse e progresso na busca por tratamentos para doenças, destacando as negligenciadas. Alguns pontos notáveis sobre esse avanço da pesquisa podem ser destacados pela grande biodiversidade da natureza, oferecendo um vasto repositório de compostos químicos, como também o envolvimento de muitas colaborações entre cientistas de diferentes países e instituições, permitindo a troca de conhecimentos e recursos, acelerando o progresso. O trabalho colaborativo e o compromisso com a conservação ambiental são fundamentais para o sucesso contínuo dessa área de pesquisa (MEIRELLES; RUPPELT, 2023; SALEHI et al., 2019; PICCIRILLO; AMARAL, 2018; CHEN et al., 2018).

O Brasil se destaca por possuir a maior biodiversidade genética de espécies de plantas do mundo, abriga cerca de 20%, é o país mais rico em diversidade biológica. São aproximadamente mais de 116 mil espécies de animais e 200 mil espécies de plantas, distribuídas entre os seis biomas terrestres - Pampa, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Caatinga e Amazônia – e nos três ecossistemas marinhos - lagos, rios e mares. No entanto, uma pequena fração dessa biodiversidade foi estudada em detalhes, avaliada em relação as suas características biológicas e, submetidas a estudos fitoquímicos detalhados (BRASIL, 2025, BERLINCK et al., 2017).

1.2 FAMÍLIA PIPERACEAE E GÊNERO *PIPER*

A família Piperaceae representa uma das maiores ordens de angiospermas basais, e compreende uma ampla diversidade de espécies em todo mundo. No Brasil, essa família é representada por uma variedade de gêneros e espécies, sendo os que abrangem maior número de espécie os gêneros *Piper* e *Peperomia*. São frequentemente encontradas em áreas de vegetação nativa, como na Floresta Atlântica e na Amazônia, onde desempenham papéis ecológicos importantes e são fontes valiosas de recursos naturais (FIGURA 1) (NASCIMENTO et al., 2022; GUIMARÃES et al., 2020; JARAMILLO; MANOS; ZIMMER, 2004).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA MUNDIAL DE PIPERACEAE



Presença de Piperaceae em destaque (amarelo, laranja e vermelho).
 FONTE: Global Biodiversity Information Center, 2025.

Essas plantas podem ser arbustivas, subarbustivas, ervas ou pequenas árvores, e frequentemente têm folhagem abundante. Muitas espécies dessa família vêm sendo exaustivamente estudadas por possuírem importância econômica, biológica e ecológica por meio da diversidade de compostos bioativos presentes em suas composições. Além da importância já mencionada, as plantas da família Piperaceae também têm importância cultural. Algumas espécies de *Piper* são conhecidas por suas propriedades medicinais e são usadas na medicina tradicional em várias partes do mundo (CARNEIRO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020; KATO e FURLAN, 2007).

Dentre os gêneros da família Piperaceae, o gênero mais representativo é *Piper* amplamente distribuído principalmente na região neotropical, o que inclui várias áreas do continente americano (WANKE et al., 2007). No Brasil, os gêneros da família Piperaceae, como *Piper*, são encontrados em diversos biomas, com destaque para Mata Atlântica e Amazônia (BFG, 2015; MONTEIRO, 2018).

De um modo geral, as espécies de *Piper* são conhecidas por serem produtoras de óleos voláteis que se acumulam nas estruturas secretoras, tal característica as classifica como plantas aromáticas. Esses óleos essenciais extraídos de espécies de *Piper* têm sido objeto de muitos estudos devido as suas diversas atividades biológicas para aplicações em áreas como medicina, agricultura e controle de doenças transmitidas por vetores (SANTOS et al., 2021; KRINSKI, FOERTER e DESCHAMPS, 2018; BRANQUINHO et al., 2017).

É um gênero de grande interesse tanto para a pesquisa botânica quanto para a pesquisa em medicamentos e tem importância em várias culturas ao redor do mundo devido ao seu uso tradicional na medicina e na culinária. Tal como a *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), uma das especiarias mais populares e amplamente utilizadas nas mais diversas culturas, possui altos teores de alcaloides em seus frutos, que lhe conferem o sabor picante (GAIA et al., 2007). Outras espécies são usadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, como a *P. amalago* (pariparoba) para aliviar dores estomacais, a *P. marginatum* (pimenta-do-mato) usada como sedativo em mordida de cobra e *P. cernuum* (pimenta-de-morcego) utilizada para combater cólicas abdominais (SILVA et al., 2017; NAKAMURA et al., 2006).

1.2.1 ESPÉCIE *Piper*. aff. *divaricatum*

A *P. aff. divaricatum* (FIGURA 2) é uma espécie recém-identificada, de ocorrência no município de Tangará da Serra, no estado Mato Grosso, região centro-oeste do Brasil. O uso da abreviatura “aff.” na nomenclatura é frequentemente usada para indicar uma afinidade morfológica entre uma espécie em estudo e outra já conhecida, no caso, a *P. divaricatum* Giseke Meyer, mas ainda existem diferenças ou incertezas que justificam essa distinção, com relação a sua composição (EMBRAPA, 2023).

Esta é a primeira vez que a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos da *P. aff. divaricatum* estão sendo estudadas. Isso representa uma oportunidade importante para entender melhor as propriedades químicas e biológicas dessa planta, bem como seu potencial uso em medicina, agricultura ou outras aplicações.

FIGURA 2 - *Piper aff. divaricatum* COLETA NO MUNICÍPIO DE TANGARÁ DA SERRA - MT

(Fotografado por Diones Krinski, 2021).

A semelhança geográfica e morfológica entre a nova espécie e a espécie previamente identificada, *Piper divaricatum*, é uma informação relevante para a classificação e caracterização da nova espécie, podendo fornecer pistas importantes sobre a taxonomia e a ecologia da *Piper aff. divaricatum*.

A pesquisa botânica, que envolve análises morfológicas, moleculares e químicas, é fundamental para determinar se a *Piper aff. divaricatum* é de fato uma espécie distinta ou uma variante da *Piper divaricatum*.

1.3 METABOLISMO VEGETAL

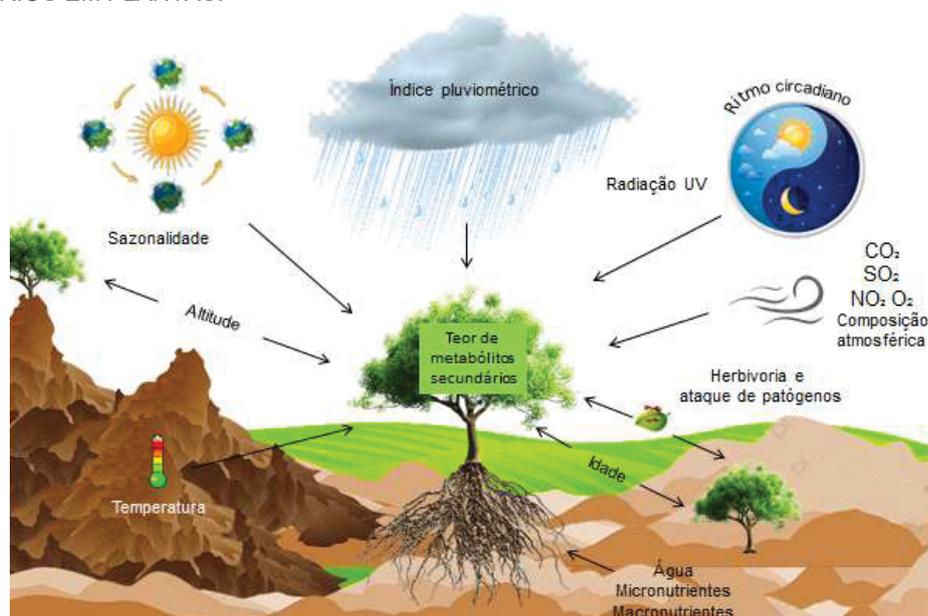
O metabolismo é um conjunto de todas as reações químicas que ocorrem nas células de um organismo vivo para manter a vida. Essas transformações são catalisadas por enzimas, que são proteínas que atuam para acelerar essas reações. Dessa forma, o metabolismo desempenha papel crucial no organismo, fornecendo energia, e renovando moléculas, garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO e TORRES, 2007).

As plantas biossintetizam substâncias com diversidade química. Essas substâncias são consideradas essenciais para sua manutenção e desenvolvimento e são classificadas em dois grandes grupos, metabólitos primários e secundários. O primeiro, comum a todos os organismos, é indispensável para a sobrevivência básica das plantas, estão envolvidos em funções vitais independentemente do ambiente em que crescem. Enquanto o segundo, aparentemente não apresenta relação com o crescimento e desenvolvimento da planta, e teoricamente, todas as plantas são capazes de produzir através de metabolismos específicos que desempenham papéis

importantes na adaptação, interação e defesa. A produção de metabólitos secundários é uma estratégia importante para a sobrevivência das plantas selvagens em condições variáveis e competitivas (SIMÕES et al., 2017; TAIZ et al., 2017; PEREIRA e CARDOSO, 2012; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010; PICHERSKY e GANG, 2000).

Os metabólitos secundários se distribuem pelos diferentes órgãos das plantas e suas quantidades podem sofrer variações durante seu crescimento, muitos deles funcionam como respostas das plantas a estímulos do ambiente. É uma das estratégias mais fascinantes e adaptativas das plantas ao ambiente em constante mudança (sazonalidade, ataques patogênicos, temperatura, índice pluviométrico, altitude). Portanto, a pesquisa sobre a regulação e função dos metabólitos secundários é fundamental para entender as estratégias de adaptação (FIGURA 3) (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

FIGURA 3 - FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR A PRODUÇÃO E ACÚMULO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS.



FONTE: Adaptado de GOBBO-NETO e LOPES, 2007.

Embora as substâncias produzidas pelas plantas tenham funções importantes para a própria planta, elas também desempenham papéis significativos do ponto de vista ecológico, e notável potencial para pesquisa em medicamentos, contribuindo para o desenvolvimento de terapias eficazes e inovações na indústria farmacêutica (MGBEAHURUIKE et al., 2017; VIZZOTTO, KROLOW, WEBER, 2010).

Neste contexto, destaca-se a importância da fotossíntese e do metabolismo da glicose como a origem básica de muitos metabólitos secundários em plantas, os quais

são derivados de intermediários metabólicos, como o ácido chiquímico e da via do acetato. Esses intermediários podem seguir vias biossintéticas que levam à produção de vários compostos secundários, tais como amidas, fenólicos, alcaloides, flavonoides, terpenos e meroterpenos, como os cromenos e derivados de ácidos benzoicos prenilados (PEREIRA e CARDOSO, 2012; BALDOQUI et al., 1999).

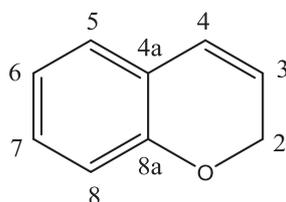
1.3.1 MEROTERPENOS

O termo “meroterpenoides” foi usado pela primeira vez por Cornforth em 1968 (CORNFORTH, 1968 apud NAZIR, 2021) para designar produtos naturais que combinam diferentes caminhos biossintéticos envolvendo terpenoides com componentes de outras origens químicas. Dessa forma, os meroterpenoides representam uma classe de produtos naturais formados por biossíntese mista, combinando policetídeos ou não-policetídeos com terpenoides (NAZIR, 2021).

Os cromenos são um exemplo característico da classe dos meroterpenos. Esses compostos estão amplamente distribuídos em diversas fontes naturais, especialmente nas plantas. Eles podem ser encontrados em famílias como Piperaceae, Rutaceae, Calophyllaceae, Koeberliniaceae e Asteraceae, ocorrendo em diferentes partes das plantas, como raízes, flores e frutos (ZULKIPLI et al., 2022; PRESLEY et al, 2018; COSTA et al., 2016; BATISTA JR et al., 2012; BALDOQUI et al., 1999; STEINBECK et al., 1996).

Trata-se de compostos orgânico formados por um anel benzeno conectado a um anel pirano. Além disso, possuem uma ligação dupla conjugada entre os carbonos C3 e C4 (FIGURA 4) (COSTA et al., 2016). Sua biossíntese está relacionada à presença de ácidos hidroxicinâmicos via chiquimato.

FIGURA 4 - SISTEMA HETEROCÍCLICO DO 2H-CROMENO

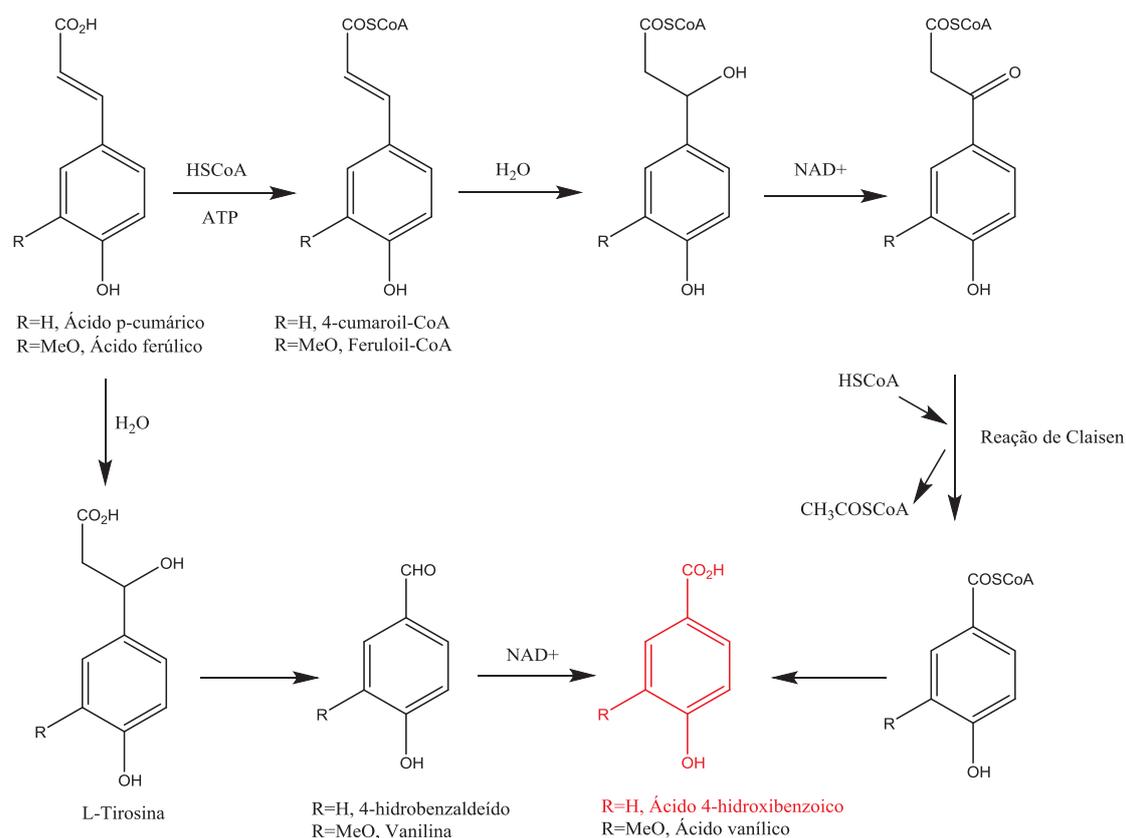


FONTE: Commission on Nomenclature of Organic Chemistry, 1993)

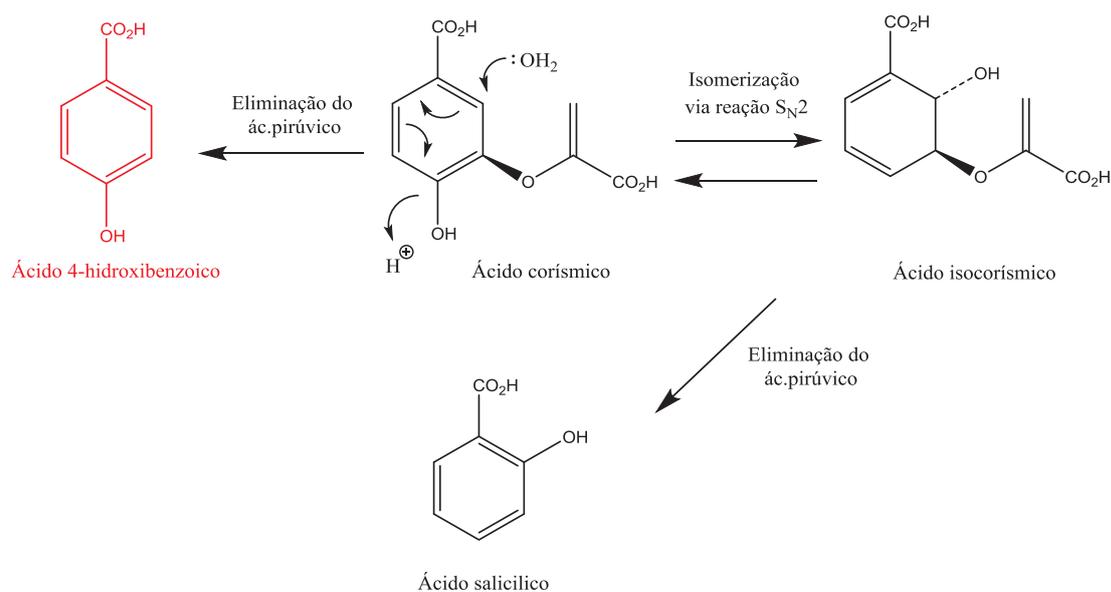
Os ácidos hidroxicinâmicos são formados a partir da via do chiquimato. Já os

compostos derivados dos ácidos benzoicos podem ser obtidos por duas formas: com a remoção do grupo tioéster de um dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (FIGURA 5) ou a geração de ácido hidroxibenzoico a partir de um dos intermediários da via do chiquimato, o ácido corísmico (FIGURA 6) (PAIVA, 2014; HERRMANN, 1995).

FIGURA 5 - BIOSÍNTESE DE DERIVADOS DOS ÁCIDOS BENZOICOS A PARTIR DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS

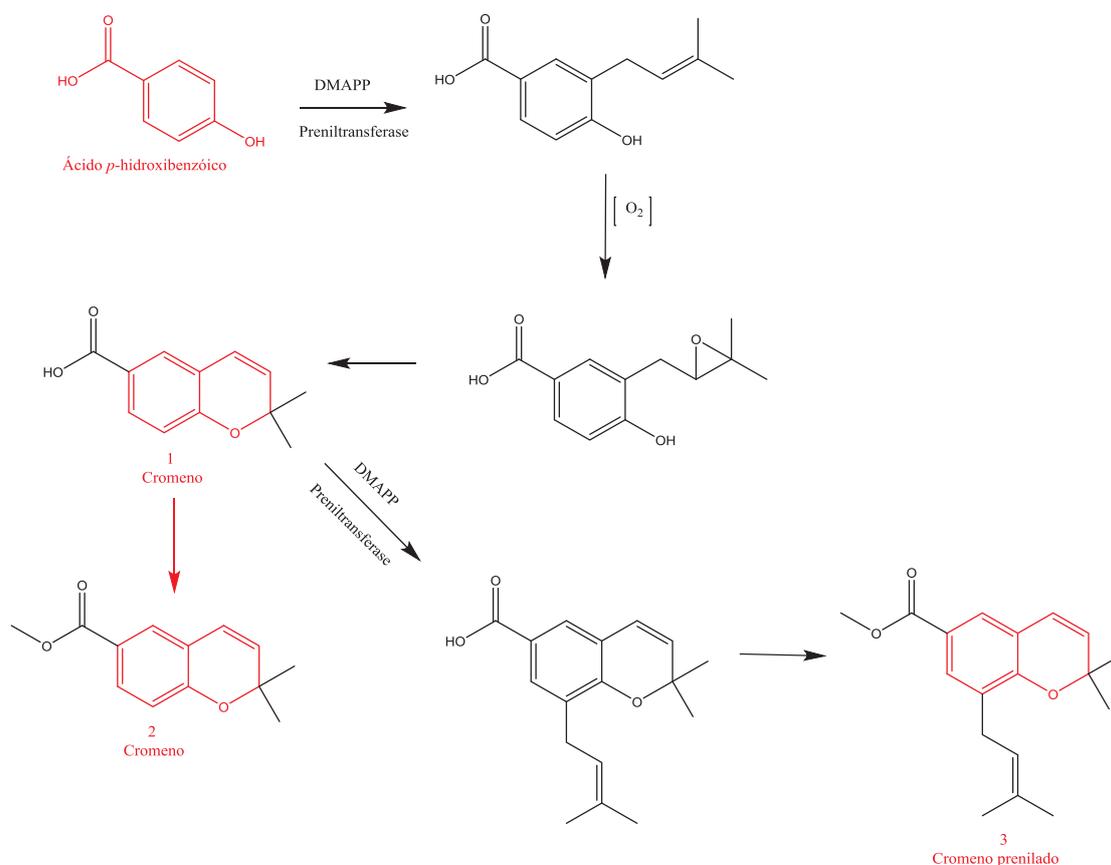


FONTE: DEWICK, 2002.

FIGURA 6 - BIOSÍNTESE DO ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO A PARTIR DO ÁCIDO CORÍSMICO.

FONTE: DEWICK, 2002.

No gênero *Piper*, a biossíntese dos cromenos ocorre predominantemente a partir de compostos derivados do ácido benzoico, com ênfase no ácido *para*-hidroxibenzoico e no ácido protocatecúico. Esse processo envolve a condensação de uma unidade de ácido *para*-hidroxibenzoico com uma unidade isoprênica (IPP e/ou DMAPP), seguida por uma etapa de ciclização que dá origem ao anel oxibenzílico. O núcleo benzopirano pode ser submetido a modificações adicionais, como reações de esterificação e prenilação (FIGURA 7) (LOPES et al., 2007).

FIGURA 7 - BIOSÍNTESE DOS CROMENOS A PARTIR DO ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO.

FONTE: DEWICK, 2002.

As prenilações são catalisadas por enzimas conhecidas como preniltransferases, que também desempenham um papel no processo de condensação das unidades isoprênicas (IPP e DMAPP). Esse mecanismo leva à formação de moléculas cíclicas e, por meio de reações de alquilação, origina compostos prenilados (FIGURA 7) (LOPES, 2008).

Pesquisas indicam que as unidades isoprênicas derivadas da via do mevalonato estão envolvidas na formação de sesquiterpenos e triterpenos, enquanto a via do 4-fosfato -metileritritol contribui para a biossíntese de monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos (ROHMER, 2010).

Do ponto de vista farmacológico, esta classe inclui metabólitos importantes, que desempenham atividades biológicas consideráveis, por exemplo, agentes anticâncer, agentes antimicrobianos e antivirais, anti-inflamatório, antioxidante e tratamento de Alzheimer (COSTA et al., 2016).

1.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

O aumento da resistência dos microrganismos frente aos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado é um problema global crescente que afeta a eficácia dos medicamentos tradicionais usados para tratar infecções causadas por bactérias, vírus, fungos e outros microrganismos. Sendo diversos os fatores responsáveis por isso como, desde a má administração como o uso repetido e contínuo de medicamentos. Para enfrentar essa resistência, a busca por novos tratamentos eficazes se torna necessária. Uma abordagem promissora é o uso de antibióticos de ocorrência natural. Vários estudos demonstram que plantas contêm uma grande variedade de compostos bioativos com potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (MELO et al., 2022; JUNIOR et al., 2016; CORDOVA et al., 2010; DUARTE et al., 2006).

Atualmente, 25% dos fármacos são de origem vegetal, ou seja, derivados de plantas medicinais que contêm princípios ativos responsáveis por seus efeitos terapêuticos. Cerca de 50% são de origem sintética, produzidos em laboratório sob condições controladas. Os 25% restantes provêm de fontes diversificadas, como microrganismos, animais e processos biotecnológicos, além de compostos semissintéticos, que combinam elementos naturais com modificações químicas para aprimorar sua eficácia e segurança. No entanto, muitos desses fármacos foram descobertos de forma direta ou indireta da fonte vegetal. É importante ressaltar que a pesquisa em compostos naturais requer abordagem científica rigorosa para isolar, caracterizar e testar a eficácia e a segurança desses compostos como medicamentos (MELO et al., 2022; MUGHAL et al., 2021).

Neste contexto, os extratos e óleos essenciais da família Piperaceae têm servido de base para diversos estudos relacionados às suas atividades biológicas, em função dos seus metabólitos secundários. Em estudos relacionados ao óleo essencial com atividades larvicida (SILVA et al., 2016a); inseticida (DORLA et al., 2017); antifúngica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante (COSTA et al., 2021), enquanto para os extratos brutos, observa-se atividades acaricidas (BRAGA et al., 2018); antimicrobianas (HASTUTI, UMMAH e KHASANAH, 2017) e antifúngicas (MACEDO et al., 2018).

Dessa forma, justificam-se os estudos com o objetivo de aprofundar o conhecimento das propriedades fitoterápicas de plantas de usos medicinais pela população da família Piperaceae. Contudo, é importante conduzir esses estudos de forma ética, científica e responsável seguindo protocolos rigorosos de pesquisa,

garantindo a segurança dos pacientes e promovendo a conservação das plantas medicinais e de seus habitats naturais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a composição química dos extratos brutos obtidos das folhas, galhos e raízes de *Piper aff. divaricatum*, assim como dos óleos essenciais da planta, e analisar a atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar e analisar os extratos brutos visando o isolamento de metabólitos secundários através de métodos cromatográficos: Cromatografia em Coluna (CC), Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE), entre outros;
- Realizar a extração dos óleos essenciais das folhas, galhos e raízes; e identificar os principais constituintes presentes no óleo essencial da espécie através da Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Elucidar os constituintes isolados dos extratos brutos utilizando métodos espectrométricos e espectroscópicos: Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY), Espectrometria de Massas (EM) e Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis (254 e 360 nm));
- Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) dos extratos brutos, do óleo essencial e constituintes isolados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 MATERIAL VEGETAL

A coleta do material botânico de *Piper* aff. *divaricatum*. foi realizada em 14/06/2021, na região de Tangará da Serra, no estado de Mato Grosso, coordenadas - 14°40'56"S 57°30'35"W e altura média de 426 metros. Esta espécie foi coletada e identificada pelo Prof. Dr. Diones Krinski da UNEMAT e a exsicata depositada no Herbário TANG, da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Tangará da Serra.

3.1.2 SOLVENTES

- Foram utilizados os solventes hexano (Anidrol), acetato de etila (Alphatec), metanol (Dipa), diclorometano (Dipa) previamente destilados;
- Acetona (Isofar), tolueno (Química Moderna) e éter etílico (Labsynth);
- Água purificada em sistema MILLI-Q da MILLIPORE;
- Acetonitrila (Bio-grade) e hexano (Carlo Erba);
- Clorofórmio deuterado (Sigma-Aldrich, 99,8%).

3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS

3.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA E PREPARATIVA

As análises de Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio recobertas por sílica gel 60 com indicador de fluorescência F254, tamanho original de 20 x 20 cm e espessura de 0,2 mm (Merck). Para a análise em Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) as placas foram preparadas espalhando uma suspensão de sílica gel 60 com indicador de fluorescência HF₂₅₄ (Merck, Germany) em água destilada em uma proporção de 15 g de sílica para 30 mL de água, sobre placas de vidro (20 x 20 cm) com espessura de 1,0 mm de fase estacionária. As placas foram secadas em temperatura ambiente e em seguida ativadas em estufa (110 °C por 1 h). Para as purificações, as amostras foram aplicadas sobre as placas, eluídas e observadas em luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e, quando necessárias reveladas com solução

de anisaldeído e aquecimento.

3.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A VÁCUO

Para o fracionamento do extrato bruto foi utilizada a Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) com aproximadamente 5 cm de altura de sílica gel 60 (Macherey-Nagel, Germany), com tamanho de partícula de 0,040-0,063 mm, como fase estacionária e um gradiente dos solventes hexano, acetato de etila e metanol, como fase móvel. A coluna utilizada é composta por um funil de Büchner de vidro com placa porosa sinterizada de 150 mL, com saída para vácuo, com 6,0 cm de diâmetro, segundo método proposto por Coll e Bowden (1986).

3.2.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para as análises por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizou o cromatógrafo WATERS, acoplado a um sistema de aquisição de dados Empower. Os solventes utilizados como fase móvel foram acetonitrila grau espectroscópico e água ultrapura. A condição de análise está descrita na TABELA 1. Na escala semi-preparativa o cálculo de escalonamento da coluna analítica para a coluna semi-preparativa utilizou o programa disponibilizado pela própria fabricante da Kinetex. Os métodos estão descritos na TABELA 2, sendo monitorada a detecção na faixa de 215 a 400 nm e, no caso da semi-preparativa as frações foram coletadas manualmente. O equipamento se encontra no Departamento de Química da UFPR.

TABELA 1- CONDIÇÕES DO CLAE UTILIZADAS NA ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *P. aff. divaricatum*

	Analítica	Semi-preparativa
Equipamento	WATERS	WATERS
Coluna	Coluna analítica fase reversa - Kinetex X-B C18 (250 x 4,6 mm, partícula de 4 µm)	Coluna semi-preparativa Kinetex C18 (150 x 10 mm, partículas de 5 µm)
Temp da coluna	25 °C	25 °C
Detector	Arranjo de fotodiodos modelo 2998 (215 a 400 nm)	Arranjo de fotodiodos modelo 2998 (215 a 400 nm)
Vazão de solvente	0,8 mL.min ⁻¹	3,8 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL	50 µL

TABELA 2 - MÉTODOS DESENVOLVIDOS PARA ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS POR CLAE EM COLUNA C18 ANALÍTICA E MÉTODO UTILIZADO NA SEPARAÇÃO EM COLUNA C18 SEMI-PREPARATIVA.

COLUNA C18 ANALÍTICA			
Tempo (min)	Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)	% H ₂ O-Milli-Q(v/v)	% ACN (v/v)
-	0,8	60	40
5	0,8	30	70
10	0,8	20	80
36	0,8	-	100
50	0,8	-	100
COLUNA C18 SEMI-PREPARATIVA			
-	3,8	60	40
9	3,8	20	80
18	3,8	5	95
19	3,8	-	100
20	3,8	-	100

3.2.4 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Os óleos essenciais e as substâncias isoladas foram diluídos a 1% (m v⁻¹) em hexano grau HPLC e analisados utilizando cromatógrafo CG-EM da marca Shimadzu modelo GC-2010 Plus, acoplado a detector de massas do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus para análises de amostras líquidas, gasosa (*headspace*) e microextração em fase sólida (SPME). As condições de análise estão descritas na TABELA 3.

TABELA 3 - CONDIÇÕES DE ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *P. aff. divaricatum* POR CG-MS

	OEs	Substâncias isolados
Equipamento	Shimadzu GCMS-TQ8040	Shimadzu GCMS-TQ8040
Coluna	Coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetil polisiloxano) com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	Coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetil polisiloxano) com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Temp da coluna	60 °C até 250 °C, com aquecimento de 3 °C min ⁻¹	100 °C até 270 °C, com aquecimento de 3 °C min ⁻¹
Temp do injetor	250 °C	250 °C
Gás de arraste	Hélio	Hélio
Vazão de gás de arraste	1,02 mL min ⁻¹	1,02 mL min ⁻¹
Tipo de injeção	split 1:90	split 1:90
Volume de injeção	1 µL	1 µL
Sistema de ionização	70 eV	70 eV

3.2.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A identificação das substâncias foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) utilizando os espectrômetros Bruker DPX 200, operando a 4,7 Teslas (200 MHz para o núcleo de ¹H e 50 MHz para o ¹³C), e/ou Bruker Avance III de 9,4 Teslas (400 MHz) e/ou Bruker Avance III de 14,1 Teslas (600 MHz). Foram obtidos os espectros unidimensionais de ¹H a 200, 400 e/ou 600 MHz e de carbono totalmente desacoplado (¹³C) em 50, 100 e/ou 150 MHz. Também foram realizados os experimentos bidimensionais, os mapas de correlações a ligação direta ¹H-¹³C (HSQC) e a longa distância ¹H-¹³C (HMBC), como também correlação ¹H-¹H (COSY). As amostras foram diluídas em clorofórmio deuterado (99,8%), tendo como padrão interno de referência o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm em relação ao TMS ($\delta = 0$ ppm).

3.2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS

Foram analisadas as diferenças e/ou semelhanças entre os extratos brutos, comparando-os por diferença de polaridade dos solventes utilizados (Hex, AcOEt, MeOH), e diferentes órgãos da planta (folhas, galhos e raízes) através de métodos

quimiométricos PCA. Foi realizado o devido tratamento dos resultados com o pacote PLS_toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) operado no software Matlab® v.7.0.1 (MathWorkInc®).

Para os dados obtidos por CLAE foi aplicado o pré-tratamento (alinhamento dos picos por *lcoshift*) e pré-processamento (dados na média) devido demonstrar resultado significativo quanto similaridade e/ou diferença. Os gráficos foram gerados utilizando os programas Origin 8.5 e Matlab® v.7.0.1.

3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DE *P. aff divaricatum*

3.3.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS, GALHOS E RAÍZES.

O material vegetal da espécie em estudo foi submetido primeiramente a uma pré-secagem à sombra em temperatura ambiente, seguido de secagem em estufa de circulação forçada de ar em temperatura de 50 °C e posteriormente foram trituradas em moinho de facas tipo Wiley em gramatura de 1 mm. Tendo o material vegetal seco, moído e pesado, foram submetidos à extração a frio com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol. O volume de solvente utilizado variou de 2 a 4 L, com renovação de solvente em intervalos de 24 horas, e uma média de três trocas sucessivas, finalizando com filtração e recolhimentos periódicos dos filtrados.

Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura de 40 °C. Após a secagem completa do extrato e de sua pesagem, foram calculados os rendimentos.

3.3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O material vegetal (folhas, galhos e raízes) após secos e moídos foram submetidos à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 4h (100 g em aproximadamente 1L de água destilada para as amostras de folhas e galhos e 50 g para as raízes), em triplicata. Essas extrações foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal - UFPR, Campus Agrárias, devido à infraestrutura disponível, permitindo realizar várias extrações simultaneamente. Ao finalizar a extração, o óleo essencial das folhas foi coletado e os óleos essenciais dos galhos e raízes não foram obtidos em quantidade significativa, portanto optou-se por coletar o hidrolato. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada.

Para a identificação dos componentes dos OEs foi utilizado o índice aritmético (IA), o qual é possível calcular através da Equação de Van den Dool e Kratz (1) utilizando uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados, contendo de 8 a 30 átomos de carbono, injetados nas mesmas condições cromatográficas e comparação dos espectros de massas com a literatura (ADAMS, 2007).

$$IA = 100 \times (C_n - C_{n-1}) \times \left(\frac{T_x - T_{n-1}}{T_n - T_{n-1}} \right) + 100 \times C_{n-1} \quad (1)$$

Sendo:

C_n : número de átomos de carbono do n -alcano cujo tempo de retenção é imediatamente superior ao tempo de retenção do analito;

C_{n-1} : número de átomos de carbono do n -alcano cujo tempo de retenção é imediatamente inferior ao tempo de retenção do analito;

T_x : tempo de retenção do analito;

T_n : tempo de retenção do alcano C_n ;

T_{n-1} : tempo de retenção do alcano C_{n-1} .

Para a quantificação dos constituintes foi necessário à normalização das áreas dos picos, sendo identificados os picos com concentração superior a 0,1%.

3.3.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE RAÍZES EM HEXANO POR COLUNA LÍQUIDA A VÁCUO

Baseando-se nos resultados das atividades antimicrobianas realizadas com os extratos de raízes, galhos e folhas nas três polaridades, optou-se purificar inicialmente o extrato de raízes em hexano, por apresentar um dos melhores resultados e maior quantidade de extrato.

Para a preparação da coluna foram utilizados 5,0 gramas do extrato bruto de raízes em hexano. A amostra foi eluída com gradiente de solventes: Hex. (100%), Hex:DCM (95:5), Hex:DCM (90:10), Hex:DCM (80:20), Hex:DCM (70:30), Hex:DCM (60:40), Hex:DCM (50:50), Hex:DCM (40:60), Hex:DCM (30:70), Hex:DCM (20:80), Hex:DCM (10:90), DCM (100%), DCM: MeOH (90:10), DCM: MeOH (80:20), DCM: MeOH (70:30), DCM: MeOH (60:40), DCM: MeOH (50:50), DCM: MeOH (40:60), DCM: MeOH (30:70), DCM: MeOH (20:80), DCM: MeOH (10:90), MeOH (100%), sendo recolhido um total de 21 frações, de aproximadamente 100 mL cada.

As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador a 40 °C sob pressão

reduzida e transferidas para frascos identificados. Após foram analisadas em CCDA, observadas sob lâmpada UV (254-336 nm) e reveladas com solução de anisaldeído, em seguida agrupadas de acordo com seus fatores de retenção (R_f), resultando em 10 frações. Essas frações resultantes estão mostradas na TABELA 4 abaixo, juntamente com suas respectivas massas.

TABELA 4 - FRAÇÕES AGRUPADAS DO FRACIONAMENTO POR COLUNA À VÁCUO DO EXTRATO DE RAÍZES EM HEXANO

Fração	Código	Massa (mg)	Substância identificada
1-3	FHR-03	82,1	
4	FHR-04	53,0	1, 6
5-6	FHR-05	37,8	2
7-8	FHR-07	65,4	2, 3
9	FHR-09*	85,3	
10-11	FHR-10	696,3	3, 4, 5
12-13	FHR-13	3300	3, 4
14	FHR-14	510,8	3, 4
15-17	FHR-15	27,9	
18-21	FHR-18	57,9	

NOTA: Em negrito a fração que originou a substância identificada.

A fração FHR-04 foi submetida à CCDP, eluída com hexano:éter etílico (90:10), resultando em 6 faixas. A faixa FHR-04-05 resultou no isolamento da substância **1** (3,3 mg). A fração FHR-04-06 foi submetida à CCDP, eluída com hexano:éter etílico (90:10) 2 vezes, resultando em 6 faixas. A faixa FHR-04-06-03 resultou no isolamento da substância **6** (4,0 mg).

A fração FHR-05 foi submetida à CCDP, eluída com tolueno:hexano (70:30) 2 vezes, resultando em 10 faixas. A faixa FHR-05-07 foi submetida à CCDP, resultando em 7 faixas. A faixa FHR-05-07-03 resultou no isolamento da substância **2** (0,9 mg).

A fração FHR-07 foi submetida à CCDP, eluída com hexano:éter etílico (80:20) 2 vezes, resultando em 11 faixas. As faixas FHR-07-09 e FHR-07-08 foram submetidas à CCDP, eluídas com hexano: éter etílico (80:20) 2 vezes, resultando ambas 3 faixas cada. Sendo a FHR-07-09-03 e FHR-07-08-03 isoladas e identificadas como substância **2** (2,3 mg) e **3** (8,0 mg), respectivamente.

As frações FHR-10, FHR-13 e FHR-14 por apresentarem certa similaridade quando analisadas pela técnica de CLAE (FIGURA 27), optou-se por trabalhar apenas com a fração FHR-10 purificando através de CLAE semi-preparativa para a coleta dos picos com maior intensidade. Foram coletados sete picos correspondentes aos tempos de retenção 19,63; 21,86; 23,55; 27,35; 28,37; 30,38 e 32,50 min. As alíquotas

recolhidas passaram por evaporador rotativo à pressão reduzida para a retirada do solvente orgânico e em seguida levadas ao refrigerador e ao processo de liofilização. Os picos coletados foram analisados por CCDA e posteriormente por RMN, resultando no isolamento das substâncias **3**, **4** e **5** (26,0 mg, 1,4 mg e 0,9 mg respectivamente).

A fração FHR-18 foi purificada utilizando duas cromatofolhas de alumínio recobertas com sílica 60, com indicador de fluorescência F254, tamanho de 20 x 20 cm e espessura de 200 µm (SiliCycle, Canadá) impregnadas com solução de AgNO₃. Para a impregnação, foi utilizada uma solução de AgNO₃ 10% (m v⁻¹) com água deionizada, na qual as cromatofolhas foram mergulhadas por 15 min e em seguida secadas em estufa por 3 dias a 75 °C para ativação, metodologia adaptada de Andreão et al. (2010) (FLUXOGRAMA 5, p. 80).

As frações FHR-03, FHR-09 e FHR-15 foram submetidas à CCDA para a definição de um sistema de solvente para melhor separação das substâncias presentes e em seguida submetidas à CCDP para a purificação (FLUXOGRAMA 5, p. 84).

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os extratos brutos e o óleo essencial de *P. aff. divaricatum* foram avaliados quanto à sua atividade antifúngica e antibacteriana. Os testes antimicrobianos foram realizados na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP tendo como colaboradora a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

3.4.2 MICRORGANISMOS E MEIO DE CULTURA

Para a realização da atividade antimicrobiana foram utilizadas levedura, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas oriundas da *American Type Culture Collection* (ATCC), Coleção de Culturas Tropicais (CCT) e de origem clínica: *Bacillus subtilis* (CCT 2576), *Escherichia coli* (CCT 0547), *Staphylococcus aureus* (CCT 2740), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella choleraesuis* (CCT 4296) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Candida albicans* (CCT 776).

Os meios de cultura utilizados para os ensaios com as bactérias foram Nutrient Agar (Merk) e para levedura Sabouraud Dextrose Agar. A preparação dos inóculos

para os ensaios foi realizada por diluição de uma massa de células raspadas em solução de NaCl (0,85%), ajustado à solução padrão de McFarland 0,5 e confirmado pela leitura em espectrofotômetro a 625 nm para bactérias ou 530 nm para leveduras.

3.4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes foram conduzidos conforme as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005), foi utilizado o caldo Mueller-Hinton, considerado ideal para testes rotineiros de sensibilidade contra bactérias não fastidiosas, e o caldo RPMI-1640 para estudos de fermentação, ambos preparados em microplacas esterilizadas de 96 poços. A solução estoque dos extratos brutos foi diluída com até 5% de DMSO (dimetilsulfóxido) e transferida para o primeiro poço, onde foram realizadas diluições seriadas, resultando em concentrações na faixa de 1,0 a 0,015 mg.mL⁻¹. Os testes foram conduzidos em triplicata. Como controles de referência, foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e nistatina (Merck), com concentrações variando entre 0,25 e 0,002 mg.mL⁻¹. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas a 35 °C por um período de 48 horas.

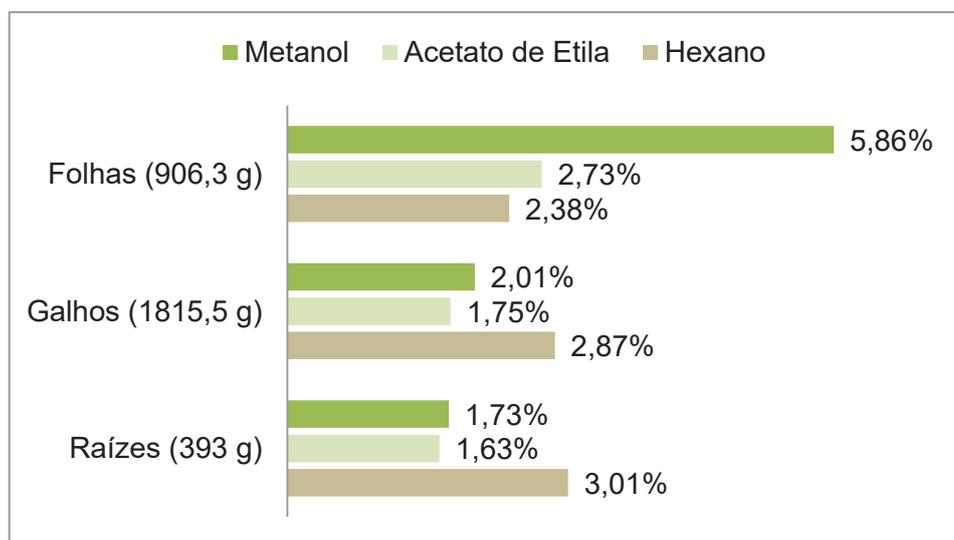
A atividade antibacteriana foi avaliada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa a 0,5% de TTC (cloreto de trifetil tetrazólio, Merck). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de impedir totalmente o crescimento do organismo, observado a olho nu, conforme indicado pela coloração gerada pelo TTC (células inviáveis não apresentam coloração). Para a levedura *Candida albicans*, após o período de incubação, foi observada uma mudança na coloração do meio RPMI-1640, que passou de rosa (cor original) para amarelo. Essa alteração indica a acidificação do meio devido ao crescimento dos microrganismos.

Para determinar as concentrações bactericidas mínimas (CBM) e fungicidas mínimas (CFM), foi realizado o plaqueamento de 10 µL do conteúdo do poço correspondente à CIM, assim como dos três poços subsequentes com maiores concentrações, em meios sólidos específicos para cada microrganismo. Em seguida, as placas contendo bactérias e leveduras foram incubadas nas temperaturas apropriadas para cada espécie. As CBM e CFM foram definidas como as menores concentrações capazes de inibir completamente o crescimento bacteriano ou fúngico (99,9%) nos meios de cultura sólidos, conforme especificado pelo CLSI.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos brutos preparados dos três órgãos da planta com três solventes de extração tiveram seus rendimentos calculados a partir da massa de extrato bruto seco obtido em relação à massa de material vegetal utilizado, conforme mostra a FIGURA 8. Os maiores rendimentos foram as extrações das folhas, enquanto os menores foram dos galhos.

FIGURA 8 - RENDIMENTOS DOS EXTRATOS BRUTOS *P. aff. divaricatum*



FONTE: A autora (2021)

4.1 ANÁLISE PRELIMINAR DOS EXTRATOS BRUTOS

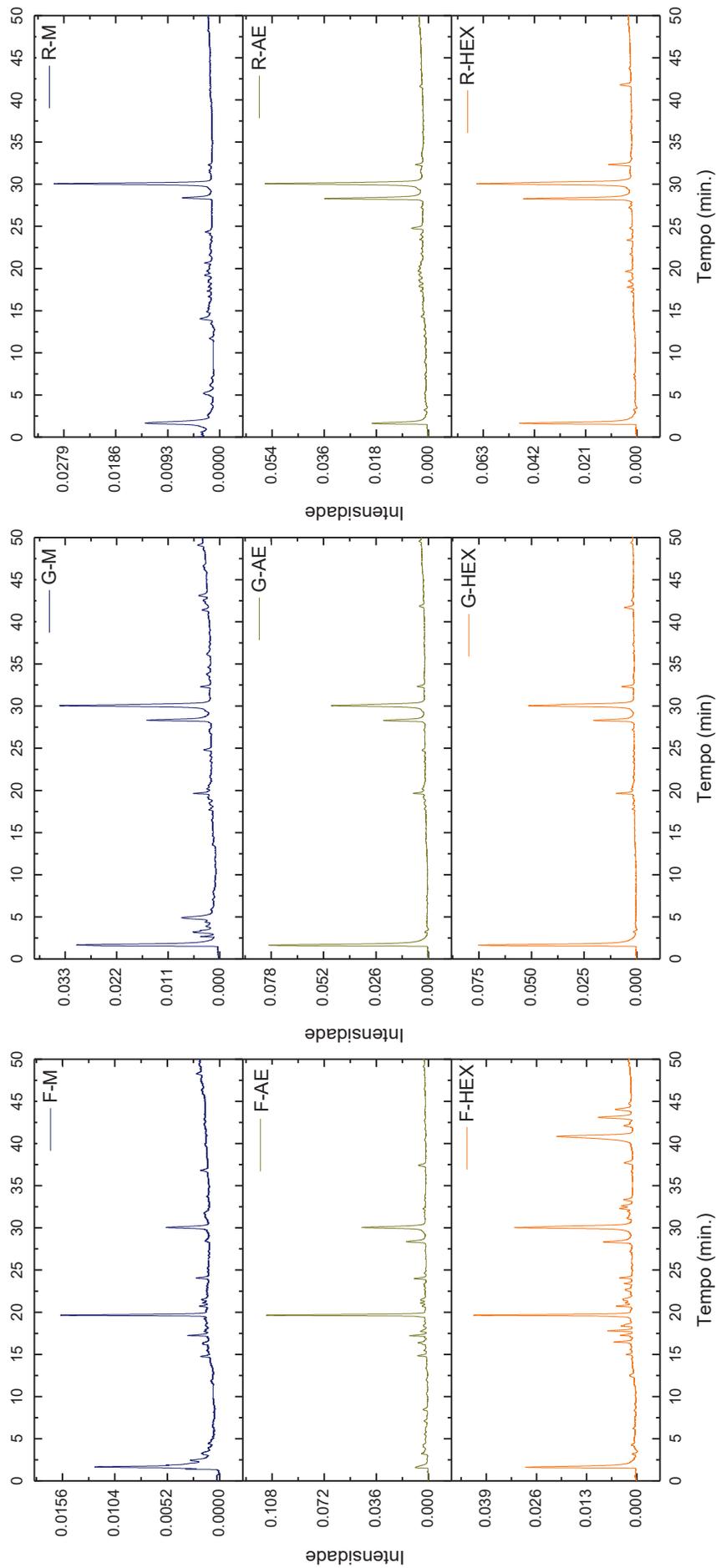
Os extratos brutos das folhas, galhos e raízes em hexano, acetato de etila e metanol foram analisados por CLAE em coluna analítica fase reversa. Os cromatogramas obtidos são mostrados na FIGURA 9.

As análises foram realizadas de acordo com o descrito no item 3.2.3, portanto, todos os extratos foram analisados nas mesmas condições cromatográficas e concentrações.

A utilização da impressão digital cromatográfica (*fingerprint*) de um produto natural é uma técnica cromatográfica tradicional que estabelece uma relação entre as características compartilhadas dos componentes de uma amostra vegetal, evidenciando suas semelhanças e diferenças. Para obter essas informações, é

essencial considerar fatores relacionados à separação cromatográfica, à quantidade e à concentração dos compostos presentes, assegurando, dessa forma, a precisão e a confiabilidade dos resultados (SCHANEBERG et al., 2003; GONG, et al., 2003; OBRADOVIC, et al., 2007).

FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS DE *P. aff. divaricatum* DAS FOLHAS, GALHOS E RAÍZES EM HEXANO, ACETATO DE ETILA E METANOL ($\lambda = 254 \text{ nm}$).



F = folhas; G = galhos; R = raízes; HEX = hexano; AE = acetato de etila e M = metanol.
 FONTE: A autora (2021)

Nota-se ao analisar os extratos em relação aos órgãos vegetativos, que há pouca diferença no que diz respeito ao perfil químico nos diferentes solventes utilizados na extração para as folhas, diferenciando na ausência ou presença de alguns sinais e suas intensidades. Isso pode ser observado entre 0-5 min e 40-45 min e, também é possível destacar a presença de um pico majoritário nos extratos em aproximadamente 19 min, tendo a maior intensidade em acetato de etila e a menor em metanol.

Quando se compara o perfil químico dos extratos de galhos, observa-se muita similaridade entre os extratos de polaridades diferentes (hexano, acetato de etila e metanol). A única diferença observada é no cromatograma do extrato de galhos em metanol, no qual se observa a concentração de sinais (2-7 min) referentes a compostos mais polares e que não são encontrados nos demais extratos. A diferença mais significativa está relacionada à intensidade dos sinais, indicando poucas diferenças no que diz respeito à variedade de compostos.

Em uma análise geral, os extratos das raízes mostram algumas diferenças no que diz respeito ao perfil químico. Observa-se que o extrato em metanol apresenta concentração de sinais no início (0-10 min), indicativo de compostos polares, e que não é observado nos demais extratos e, a outra diferença está relacionada a um sinal em aproximadamente 42-43 min em hexano, caracterizando suas diferenças. No entanto, novamente, a diferença mais significativa está relacionada à intensidade dos sinais.

Os dados obtidos pelas análises de CLAE foram submetidos à Análise de Componentes Principais (ACP) para avaliação das diferenças ou similaridades entre os seus perfis químicos, identificando quais regiões de sinais são responsáveis pela variação.

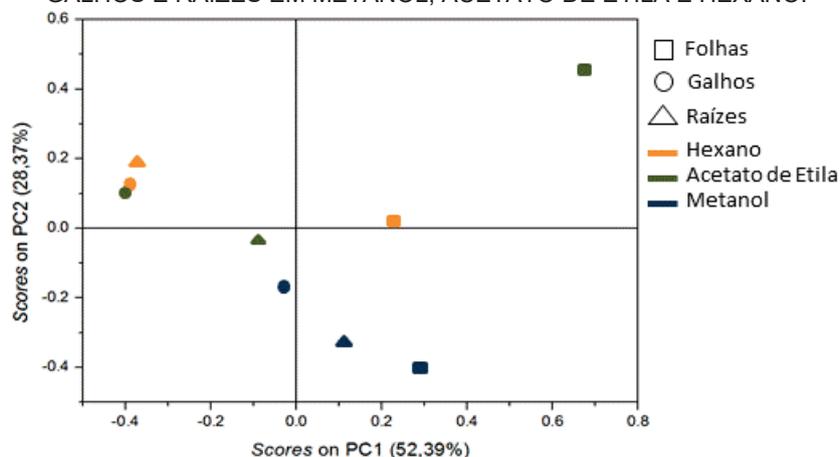
A primeira componente (PC1) da ACP, explica 52,39% das informações, enquanto a segunda componente (PC2) explica 28,37%, assim PC1 x PC2 representa a variância de 80,76% do conjunto de dados (FIGURA 10).

Observando o gráfico de *Scores* PC1 (52,39%) (FIGURA 10), é possível ver a separação dos extratos com relação ao órgão vegetativo da espécie. Os extratos obtidos das folhas encontram-se no quadrante positivo dessa PC, enquanto os extratos obtidos dos galhos e raízes, exceto raízes em metanol, encontram-se no quadrante negativo dessa PC.

De acordo com a PC2 (28,37%) (FIGURA 10) é possível notar separação em relação à polaridade do solvente utilizado na extração. Os extratos obtidos em hexano e acetato de etila, exceto raízes em acetato de etila, encontram-se no quadrante positivo dessa PC. Enquanto, os extratos obtidos em metanol estão no quadrante

negativo.

FIGURA 10 - SCORES OBTIDO POR ACP DOS DADOS DE CLAE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS, GALHOS E RAÍZES EM METANOL, ACETATO DE ETILA E HEXANO.

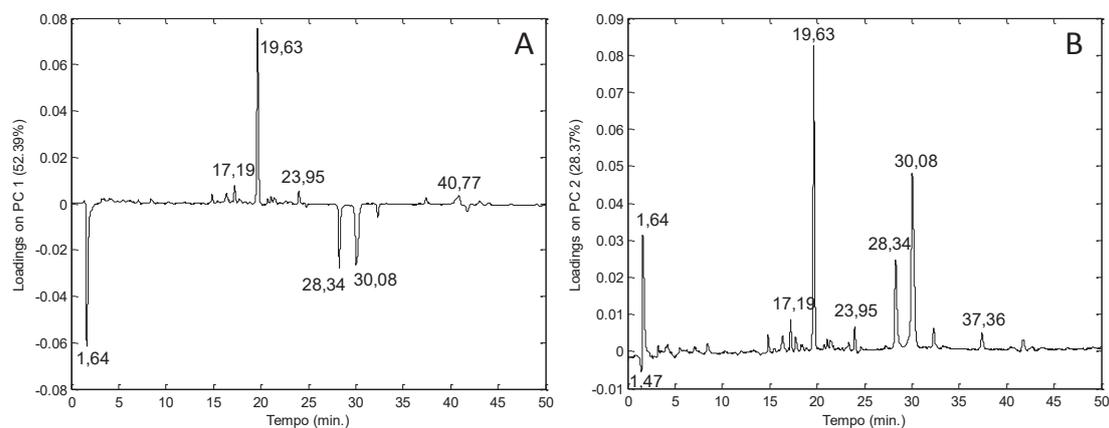


FONTE: A autora (2021)

Para avaliar as correlações observadas no gráfico da ACP, também foi analisado o gráfico de *loadings* (FIGURA 11) o qual justifica os agrupamentos das amostras, de acordo com influência causadas pelas bandas cromatográficas.

O gráfico de *loadings* (FIGURA 11 (A)), ajuda a explicar a separação das amostras de *Scores* positivos na PC1. Os extratos de folhas nas três polaridades e raízes em metanol são caracterizados, principalmente, pelas bandas cromatográficas no tempo de retenção de 17,19; 19,63; 23,95 e 40,77 min, portanto, esses extratos se separam dos demais devido à presença desses sinais mais intensos. As amostras de *Scores* negativos, extratos de galhos e raízes, exceto raízes metanol, tem influência das bandas cromatográficas no tempo de retenção de 1,64; 28,34 e 30,08 min.

Pelo gráfico de *loadings* (FIGURA 11 (B)), pode-se afirmar que as amostras de *Scores* positivos na PC2, os extratos em hexano e acetato de etila, exceto raízes em acetato de etila, as bandas cromatográficas responsáveis pela correlação possuem tempo de retenção 1,64; 17,19; 19,63; 23,95; 28,34; 30,08 e 37,6 min. Por outro lado, as amostras de *Scores* negativos na PC2, os extratos em metanol e raízes acetato de etila, apresentam maior influência das bandas cromatográficas no tempo de retenção 1,47 min.

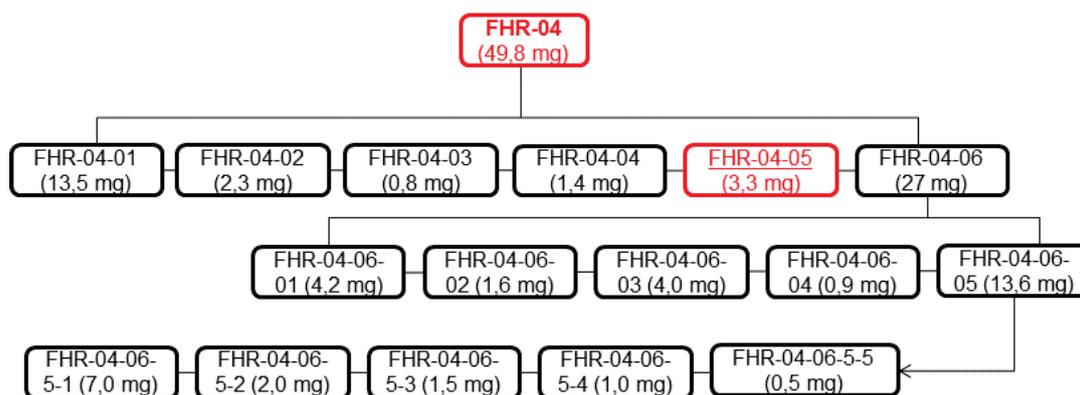
FIGURA 11 - GRÁFICO DE *LOADINGS* - PC1 (A) E PC2 (B).

FONTE: A autora (2021)

4.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1.

A substância **1** da fração FHR-04-05 (3,3 mg) resultante da fração FHR-04 (FLUXOGRAMA 1), foi identificada em mistura e, trata-se do composto asaricina (FIGURA 12). Foi isolada como uma substância viscosa, de cor marrom alaranjada, sendo identificada pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D. Os dados do RMN de ^1H e ^{13}C da substância **1** estão na TABELA 5.

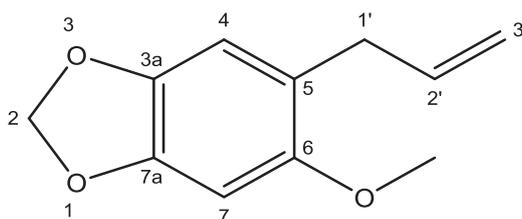
FLUXOGRAMA 1 - FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CCDP PARA A SUBSTÂNCIA 1.



NOTA: Em vermelho fração inicial e em vermelho sublinhado fração identificada.

FONTE: A autora (2024).

FIGURA 12 - ESTRUTURA IDENTIFICADA COMO ASARICINA



FONTE: A autora (2023)

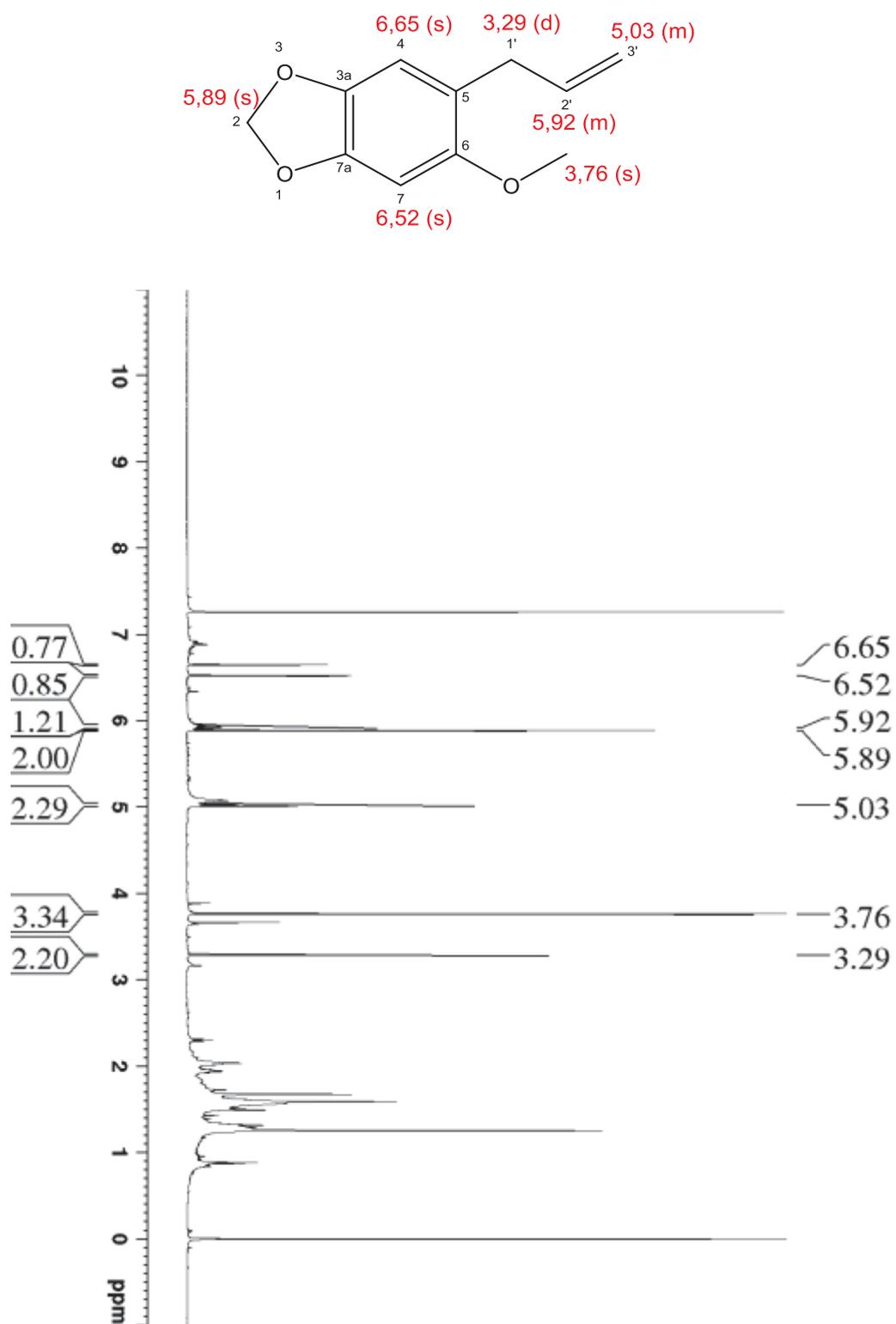
TABELA 5 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 1 E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA

SUBSTÂNCIA 1					
FHR-04-05		HMBC		Literatura*	
Nº	^1H	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$	($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	^1H	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$
1	-	-	-	-	-
2	5,89 (2H, s)	100,9	-	5,96 (2H, m)	101,3
3	-	-	-	-	-
3a	-	140,9	-	-	141,34
4	6,64 (1H, s)	109,6	-	6,67 (1H, s)	110,0
5	-	120,8	-	-	121,2
6	-	152,1	-	-	152,5
7	6,52 (1H, s)	94,9	-	6,55 (1H, s)	95,4
7a	-	146,3	-	-	146,7
1'	3,29 (2H, d, $J=6,53$ Hz)	33,9	-	3,32 (2H, d)	34,3
2'	5,92 (1H, m)	137,2	-	5,95 (1H, m)	137,6
3'	5,03 (2H, m)	115,2	-	5,06 (2H, m)	115,6
-	3,76 (3H, s)	56,5	-	3,78 (3H, s)	56,9

NOTA: Experimento realizado a 600,13 MHz para ^1H e HMBC e, 150,90 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .

* LORENZO et al., (2000). FONTE: A autora (2023)

A análise do espectro RMN de ^1H (FIGURA 13) mostra sinais referentes a dois hidrogênios aromáticos em δ 6,52 ppm (H-7; s) e δ 6,64 ppm (H-4; s) respectivamente, indicando um anel aromático tetrassubstituído e os hidrogênios em posição *para*. A presença de um duplete em δ 3,29 ppm (H-1', $J=6,53$ Hz), e de dois multipletos nas regiões de δ 5,92 ppm (H-2') e δ 5,03 ppm (H-3') correspondentes a um e dois hidrogênios, respectivamente, indicam a presença de uma cadeia alílica ligada ao anel aromático. Pode-se observar, também, o sinal dos hidrogênios do grupo metilenodióxi (OCH_2O) em δ 5,89 ppm (s, 2H) e do grupo metoxila (OCH_3) em δ 3,76 ppm (s, 3H).

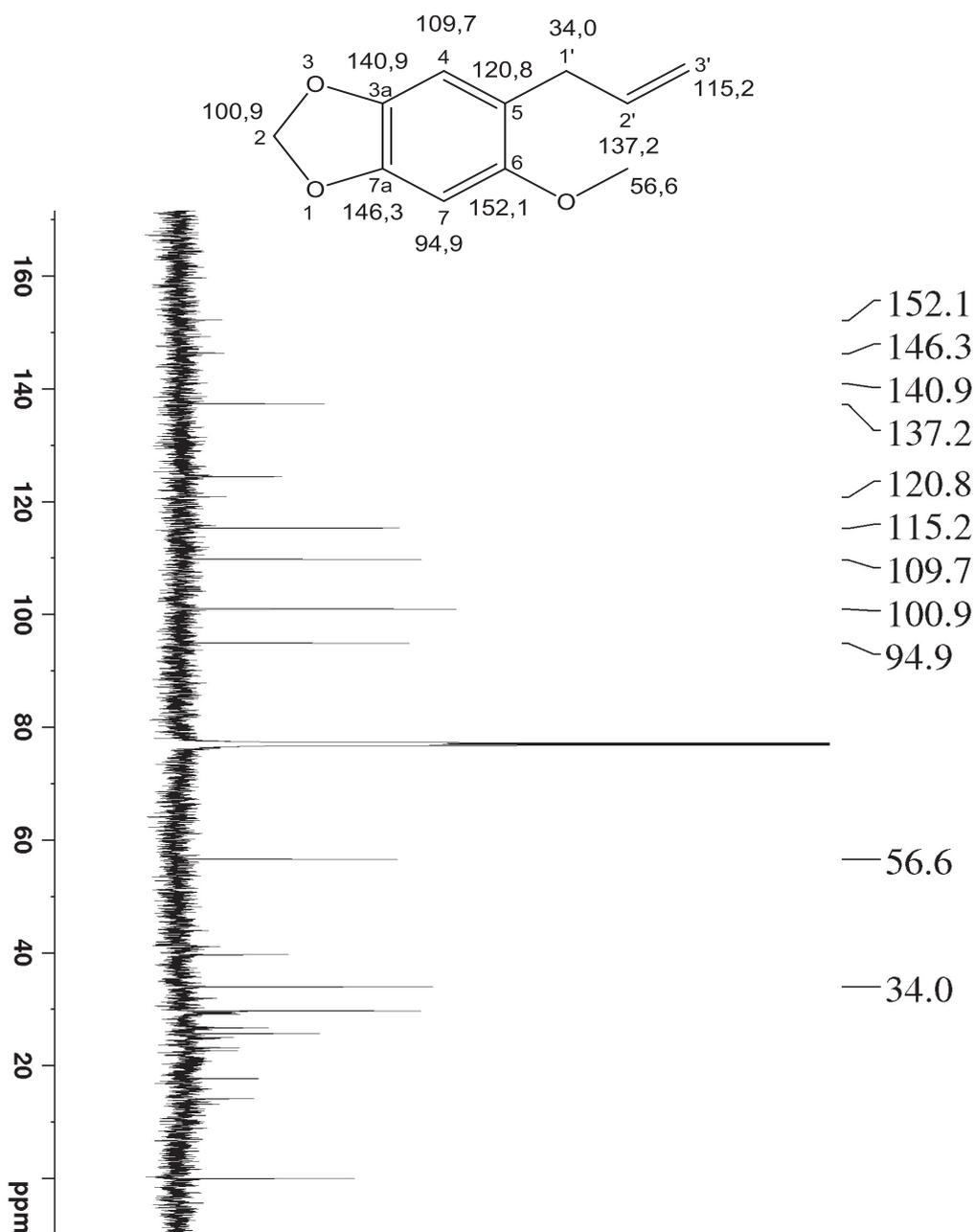
FIGURA 13- ESPECTRO DE RMN ^1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 1

FONTE: A autora (2023)

Através da análise de RMN de ^{13}C (FIGURA 14), foi observada a presença de

11 átomos de carbono, sendo 8 sp^2 localizados na região de δ 94,9 ppm a δ 152,1 ppm, e outros 3, sp^3 . Pelo mapa de correlação direta 1H - ^{13}C (HSQC), foi possível observar a correlação do sinal do hidrogênio aromático em δ 6,52 ppm (H-7) com o sinal do carbono em δ 94,9 ppm, bem como do sinal em δ 5,92 ppm (H-2') com o sinal de carbono em δ 137,2 ppm e, do sinal em δ 5,03 ppm (H-3') com o sinal de carbono em δ 115,2 ppm, correspondentes aos carbonos da ligação dupla terminal do grupo alila.

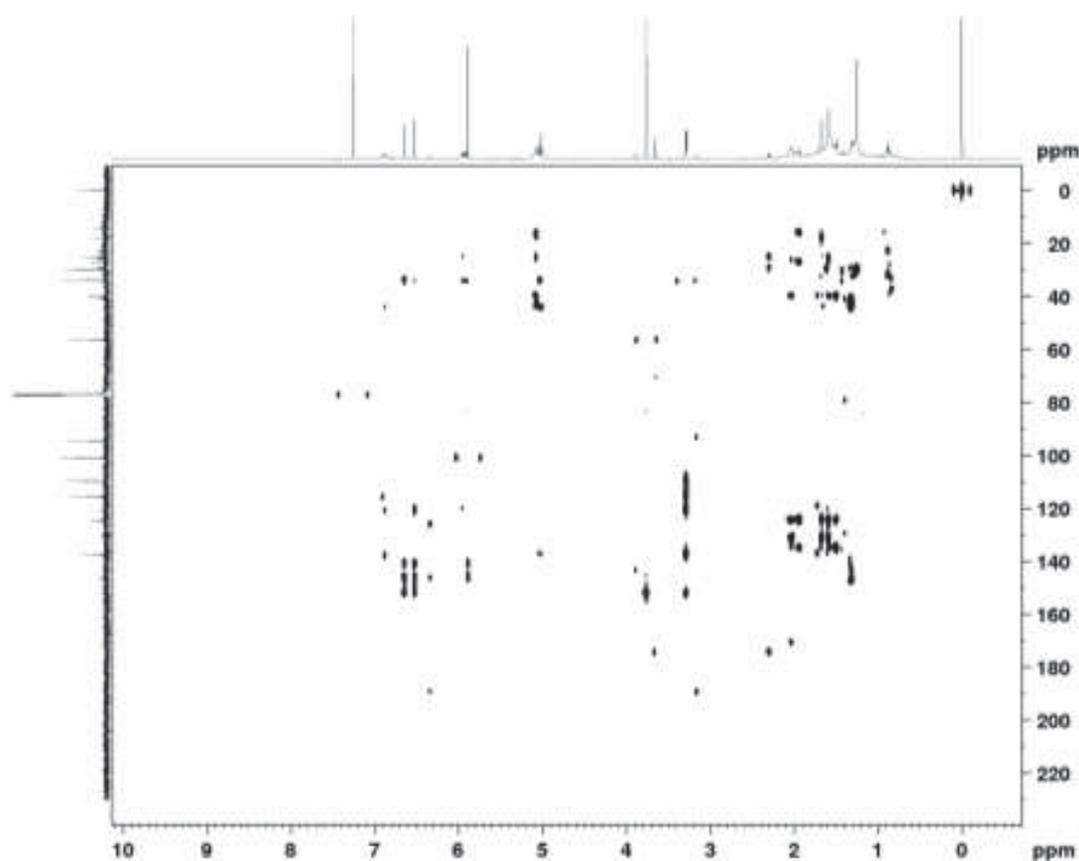
FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DESACOPLADO ($CDCl_3$, 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 1.



Para a definição da posição da cadeia alílica, do grupo metilenodióxi e do grupo metoxila foi utilizado o mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC, FIGURA 15). O hidrogênio em δ 3,29 ppm (H-1') correlacionou-se com os sinais em δ 109,7 ppm (C-4) e δ 152,1 ppm (C-6), definindo assim a posição da cadeia alílica. Os hidrogênios aromáticos (H-7) em δ 6,52 ppm correlacionou a 3J com os sinais δ 140,9 ppm (C-3a) e δ 120,8 ppm (C-5), e a 2J com os sinais em δ 146,3 ppm (C-7a) e δ 152,1 ppm (C-6) (FIGURA 15).

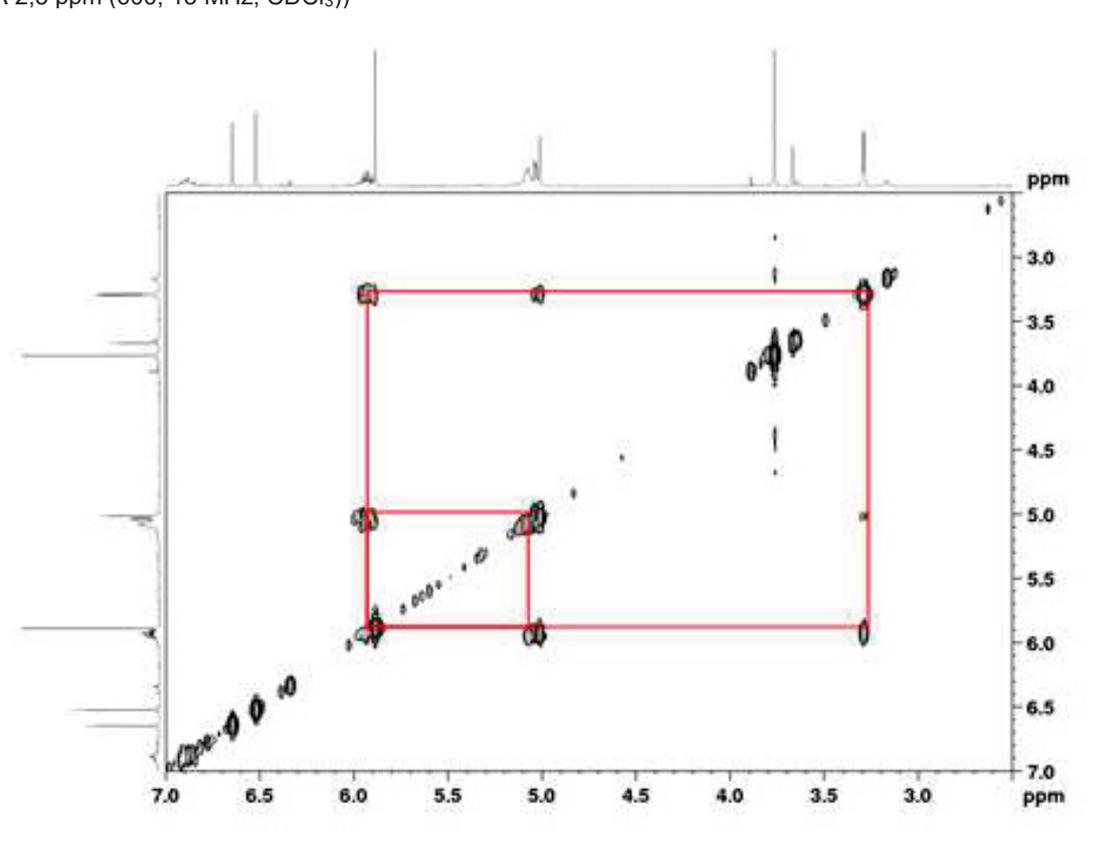
Ao analisar o espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY, FIGURA 16), pode observar que o H-2' se correlaciona com H-1' e H-3' permitindo afirmar a posição terminal da ligação dupla (FIGURA 17).

FIGURA 15 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS PARA A SUBSTÂNCIA 1 NO EXPERIMENTO HMBC (CDCl_3)



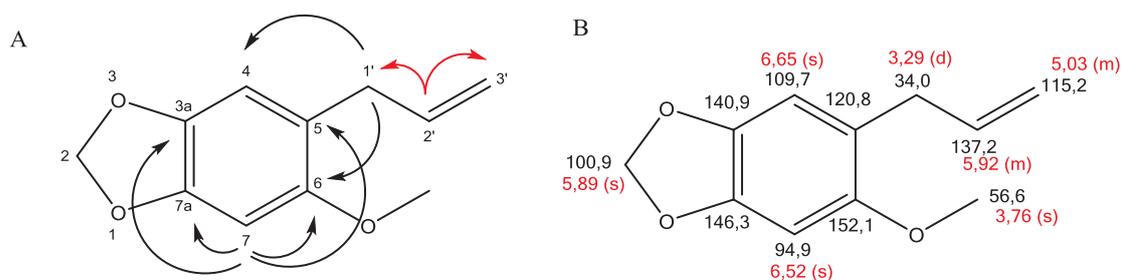
FONTE: A autora (2023)

FIGURA 16 – EXPERIMENTO DE COSY PARA SUBSTÂNCIA 1 (AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 7,0 A 2,5 ppm (600, 13 MHz, CDCl₃))



FONTE: A autora (2023)

FIGURA 17 – EM (A) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS PRETAS) E COSY (SETAS VERMELHAS); EM (B) ESTRUTURA COM SEUS RESPECTIVOS CARBONOS (PRETO) E HIDROGÊNIOS (VERMELHO) PARA A SUBSTÂNCIA 1.



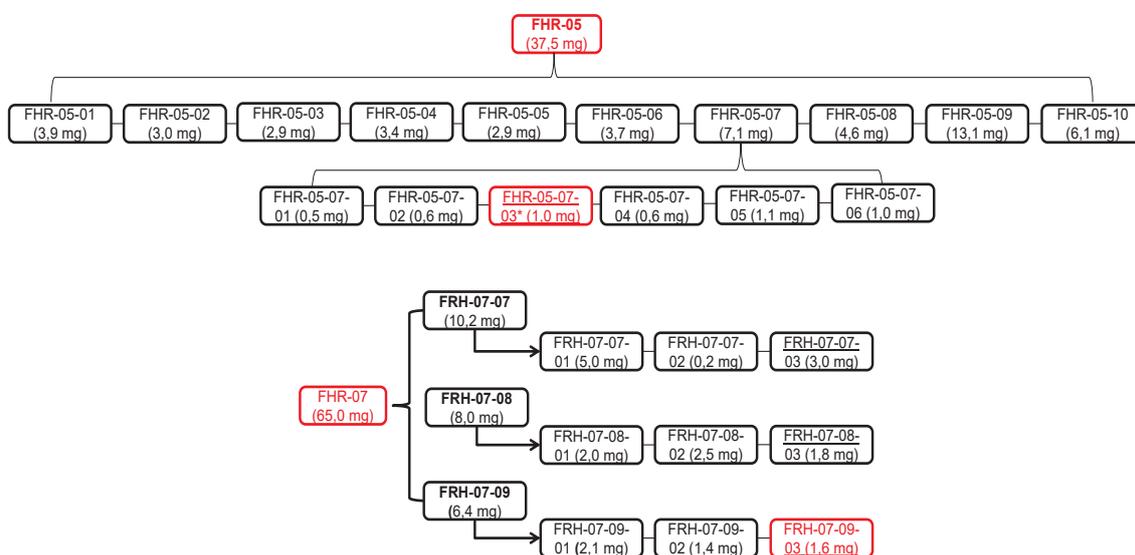
FONTE: A autora (2023)

A asaricina já foi identificada nos óleos essenciais das folhas de *P. solmsianum* C.DC. (SIQUEIRA et al., 2014), das folhas secas e frescas de *P. aduncum* L. (CASAPULA, 2018). Da parte aérea de *P. marginatum* Jacq. e *P. callosum* (SILVA et al., 2016b) e no extrato metanólico de raízes de *P. sarmentosum*, em que demonstrou ter atividade promissora contra o câncer de mama, apresentou efeitos significativos em ensaios *in vitro*, como a inibição da proliferação celular, indução de apoptose ou redução da viabilidade de células tumorais (HEMATPOOR et al., 2018).

4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 2

A substância **2** isolada nas frações FHR-05-07-03 (1,0 mg) e FHR-07-09-03 (1,6 mg) oriundas das frações FHR-05 e FHR-07 (FLUXOGRAMA 2), foi identificada como o composto (*E*)-2-(4',8'-dimetilnona-3',7'-dien-1-il)-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila (FIGURA 18). Foi isolada como uma substância viscosa, de cor alaranjada, e identificada pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D. Os dados do RMN de ^1H e ^{13}C estão na TABELA 6.

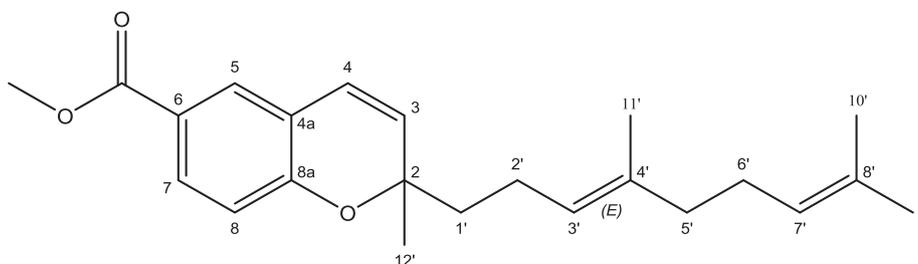
FLUXOGRAMA 2 - FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CCDP PARA A SUBSTÂNCIA 2.



NOTA: Em vermelho fração inicial e em vermelho sublinhado fração identificada.

FONTE: A autora (2024)

FIGURA 18 - ESTRUTURA IDENTIFICADA DAS FRAÇÕES FHR-05-07-03 E FHR-07-09, (*E*)-2-(4',8'-DIMETILNONA-3',7'-DIEN-1-IL)-2-METIL-2*H*-CROMENO-6-CARBOXILATO DE METILA



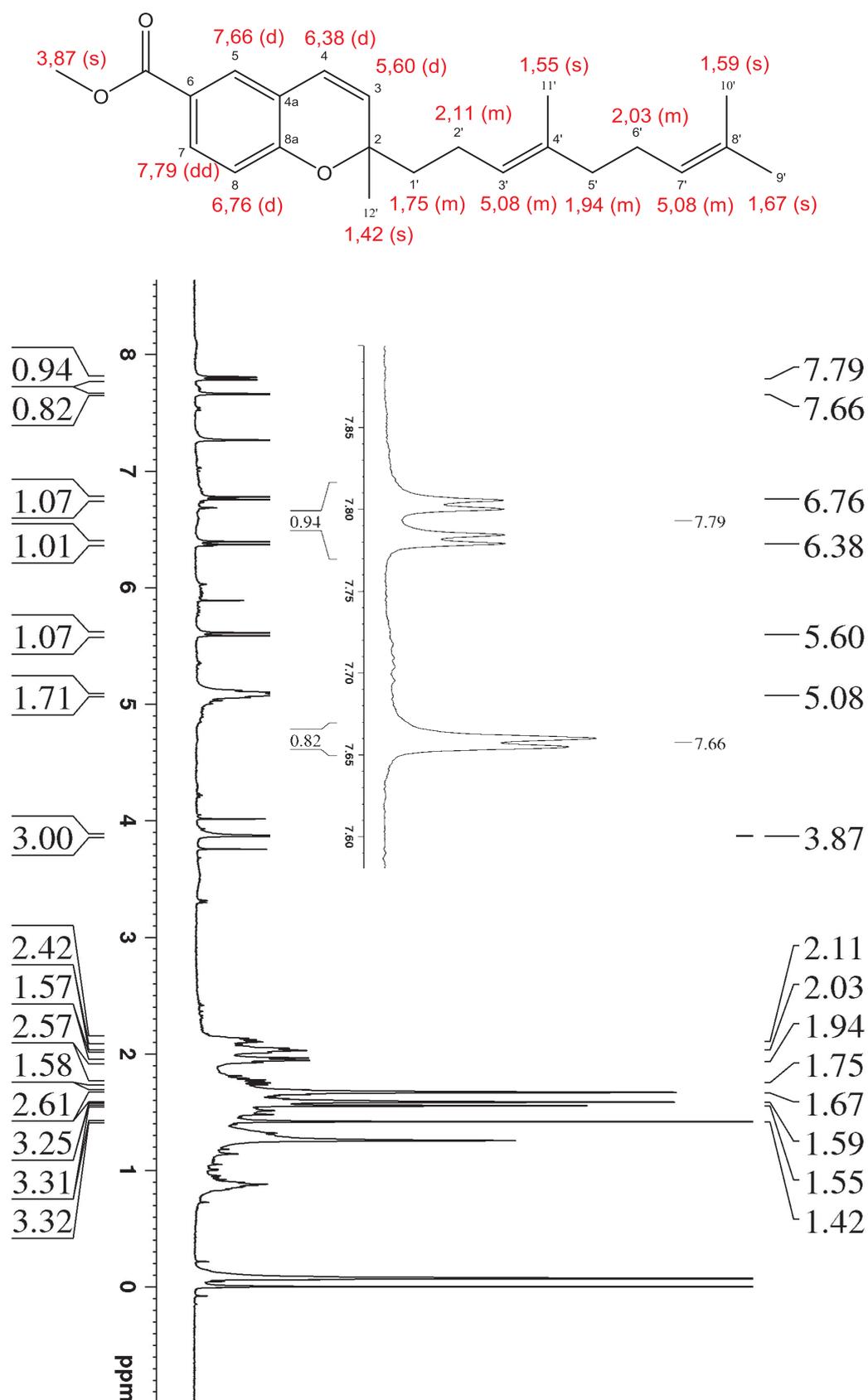
FONTE: A autora (2023)

TABELA 6 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 2.

SUBSTÂNCIA 2			
FHR-07-09-03			HMBC
Nº	^1H	$^1J_{\text{H-C}}$	($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	-	-	-
2	-	79,9	-
3	5,60 (1H, d, $J=10$ Hz)	130,0	2, 4, 4a
4	6,38 (1H, d, $J=10$ Hz)	122,4	2, 4, 4a
4a	-	120,5	2, 4a, 5, 8a
5	7,66 (1H, d, $J=2$ Hz)	128,1	-
6	-	122,3	7, 8
7	7,79 (1H, dd, $J=8,5$ e $J=2$ Hz)	131,2	-
8	6,76 (1H, d, $J=8,5$ Hz)	115,9	5, CO
8a	-	157,6	-
1'	1,75 (2H, m)	41,7	-
2'	2,11 (2H, m)	22,6	2', 2, 3
3'	5,08 (1H, m)	124,3	1', 3', 4'
4'	-	135,6	11', 5'
5'	1,94 (2H, m)	39,7	-
6'	2,03 (2H, m)	26,7	11', 6', 3'
7'	5,08 (m, 1H)	124,4	5', 7', 8'
8'	-	131,4	5'
9'	1,67 (3H, m)	25,7	-
10'	1,59 (3H, m)	17,7	10', 7', 8'
11'	1,55 (3H, s)	16,0	7', 8', 9'
12'	1,41 (3H, s)	27,1	5', 3'
CO	-	166,9	-
OCH ₃	3,87 (3H, s)	51,8	-

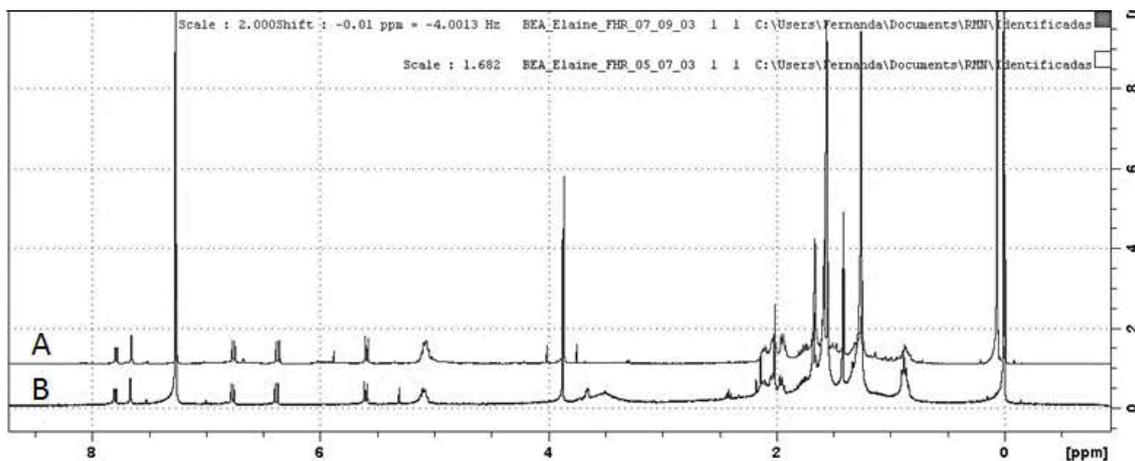
NOTA: Experimento realizado a 600,13 MHz para ^1H e HMBC e, 150,90 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .
 FONTE: A autora (2024)

Os espectros de ^1H de RMN das frações FHR-05-07-03 e FHR-07-09-03 apresentaram em geral o mesmo padrão de sinais e acoplamentos (FIGURA 20). Observou-se sinais do conjunto de três acoplamentos aromáticos δ 7,79 ppm (H-7), δ 6,76 ppm (H-8) e δ 7,66 ppm (H-5), em que o H-7 acopla em *orto* ($J=8,5$ Hz) com H-8 e em *meta* ($J=2$ Hz) com H-5, sugerindo a presença de um anel benzênico 1,3,4-substituído. Um segundo conjunto de sinais δ 6,38 e δ 5,60 ppm acoplado em *orto* ($J=10$ Hz) indicou uma olefina *cis*-dissubstituída (FIGURA 19).

FIGURA 19- ESPECTRO DE RMN ^1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 2

NOTA: Espectro para a fração FHR-07-09-03
 FONTE: A autora (2023)

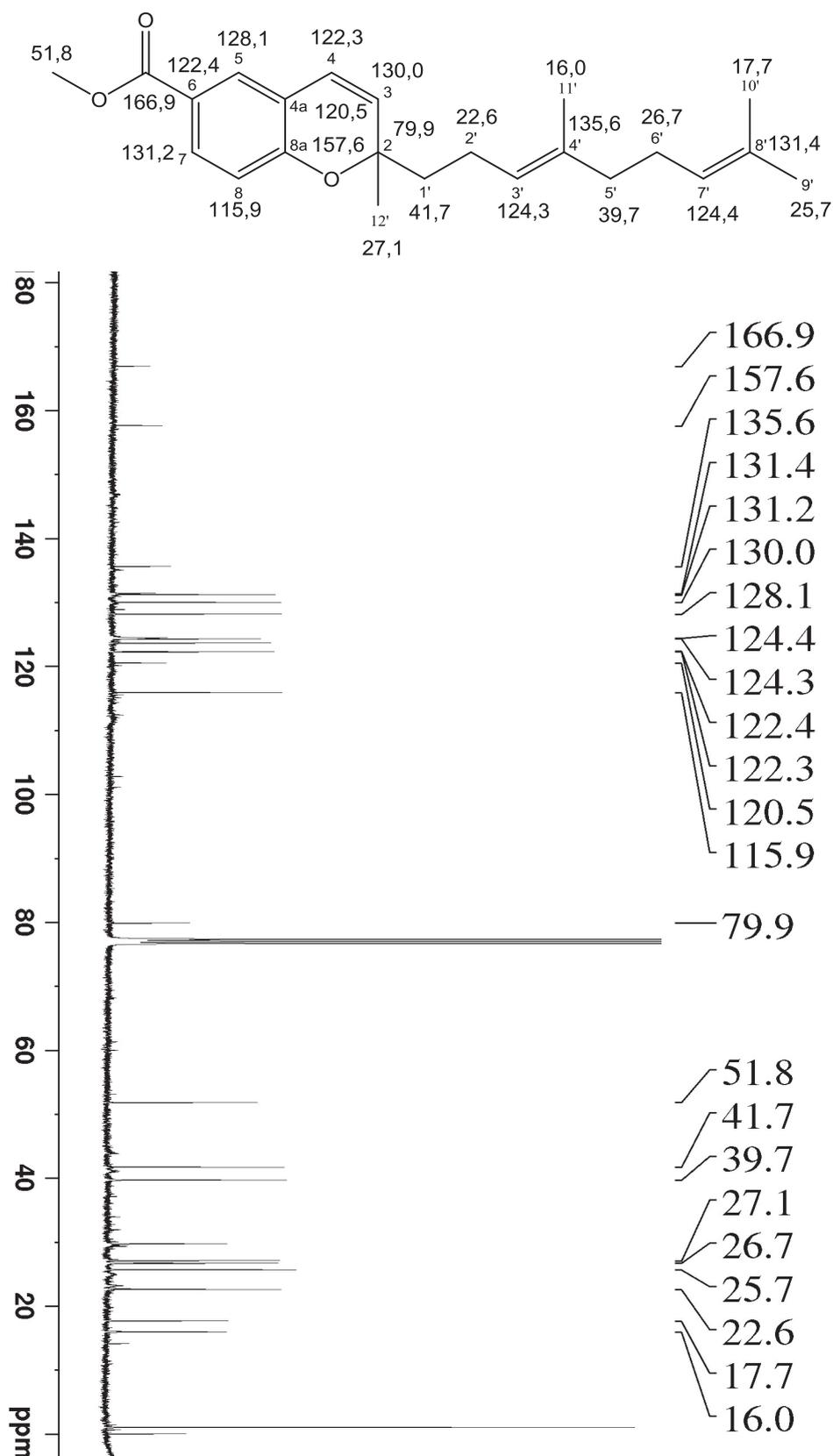
FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN ^1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl_3) DE AMBAS AS FRAÇÕES, FHR-07-09-03 (A) E FHR-05-07-03 (B) PARA COMPARAÇÃO.



FONTE: A autora (2023)

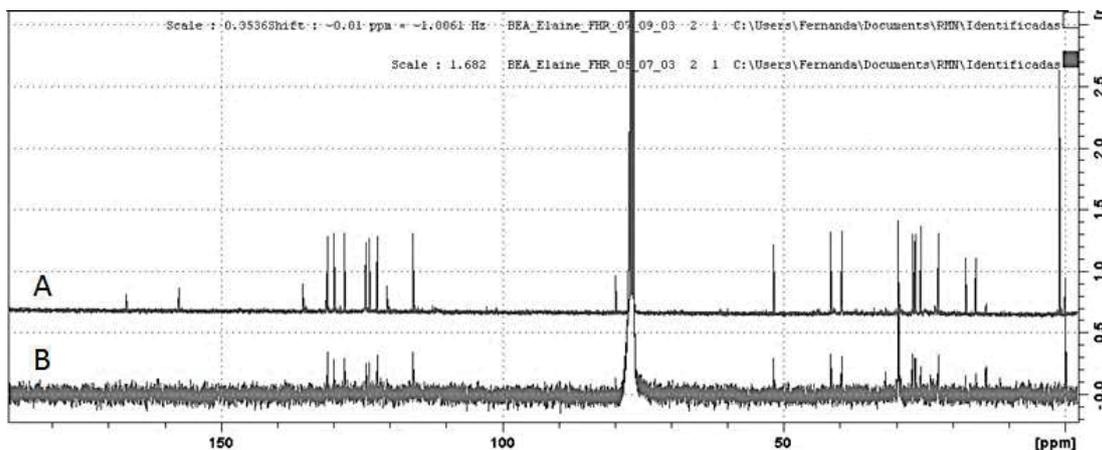
Através da análise de RMN de ^{13}C (FIGURA 21 e 22) foi observada a presença de 21 átomos de carbono do cromeno. Os sinais adicionais foram atribuídos à presença dos ésteres metílicos através dos sinais em δ 166,9/51,8 ppm. O sinal correspondente ao carbono carbinólico foi confirmado pelo sinal 79,9 ppm.

FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DESACOPLADO (CDCl_3 , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 2 (FHR-07-09-03).



NOTA: Espectro para a fração FHR-07-09-03
 FONTE: A autora (2023)

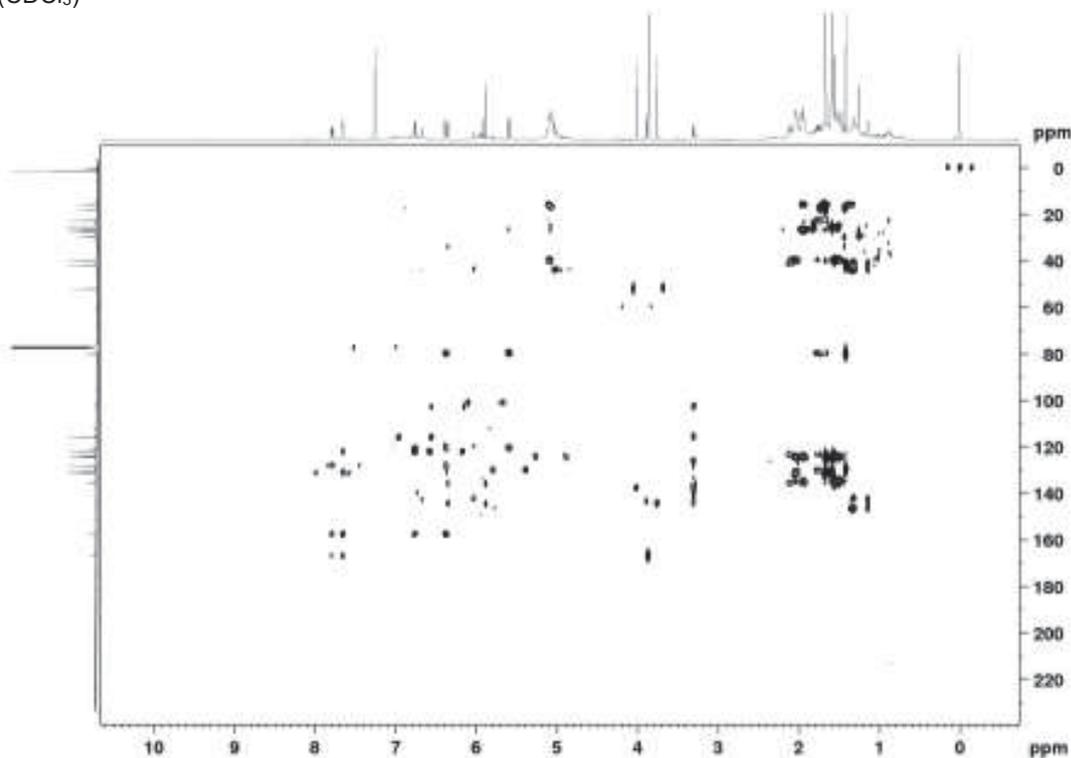
FIGURA 22 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DESACOPLADO (CDCl_3 , 150,90 MHz) DE AMBAS AS FRAÇÕES, FHR-07-09-03 (A) E FHR-05-07-03 (B) PARA COMPARAÇÃO.



Fonte: A autora (2023)

Pela análise do mapa de correlação a longa distância (HMBC, FIGURA 23) permitiu confirmar e atribuir a posição do grupo correspondente ao anel heterocíclico do cromeno através das correlações entre o hidrogênio H-3 e o carbono C-2, entre o hidrogênio H-4 e os carbonos C-2, C-5 e C-8a.

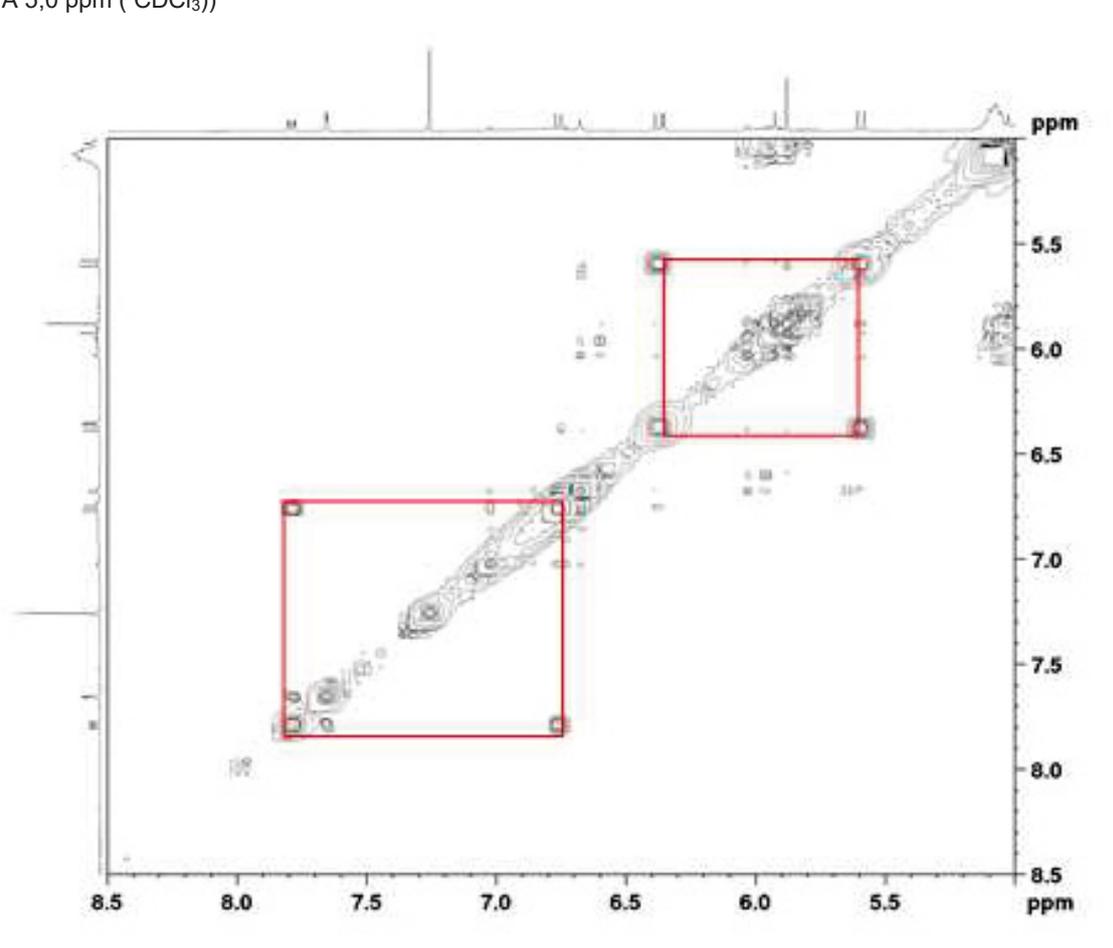
FIGURA 23 - CORRELAÇÕES OBSERVADAS PARA A SUBSTÂNCIA 2 NO EXPERIMENTO HMBC (CDCl_3)



NOTA: HMBC da fração FHR-07-09-03.
FONTE: A autora (2024)

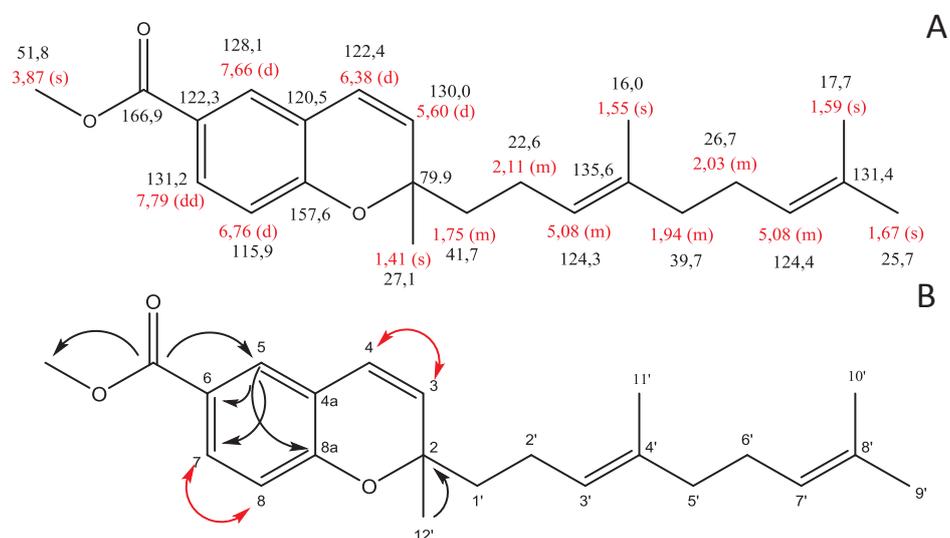
Através do espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY, FIGURA 24), pode observar que o H-8 se correlaciona com H-7 e H-4 se correlaciona com H-3 permitindo afirmar a posição no anel benzeno 1,3,4-trissubstituído. Assim foi possível propor a estrutura a seguir (FIGURA 25).

FIGURA 24 - EXPERIMENTO DE COSY PARA SUBSTÂNCIA 2, (AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 8,0 A 5,0 ppm (CDCl_3))



NOTA: COSY da fração FHR-07-09-03
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 25 - EM (A) A ESTRUTURA COM OS DESLOCAMENTOS CORRESPONDENTES, (CARBONOS EM PRETO E HIDROGÊNIOS EM VERMELHO). EM (B), AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES IDENTIFICADAS NOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS PRETAS) E COSY (SETAS VERMELHAS) PARA A SUBSTÂNCIA 2.

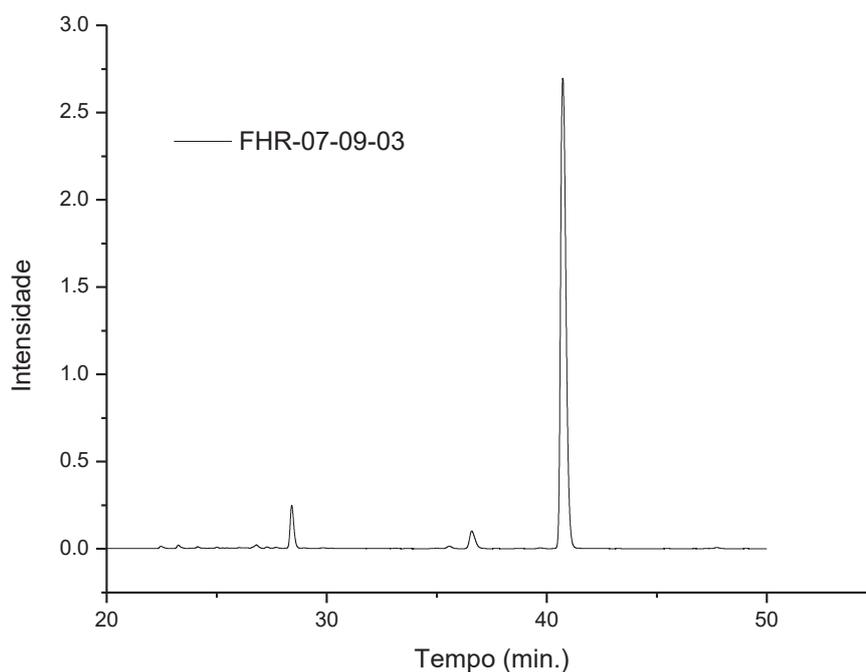


FONTE: A autora (2024)

Para confirmar o isolamento do composto, foi realizada uma análise por CLAE e CG-MS empregando o mesmo método utilizado para os extratos descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4, respectivamente. O cromatograma obtido pela técnica CLAE está apresentado na FIGURA 26.

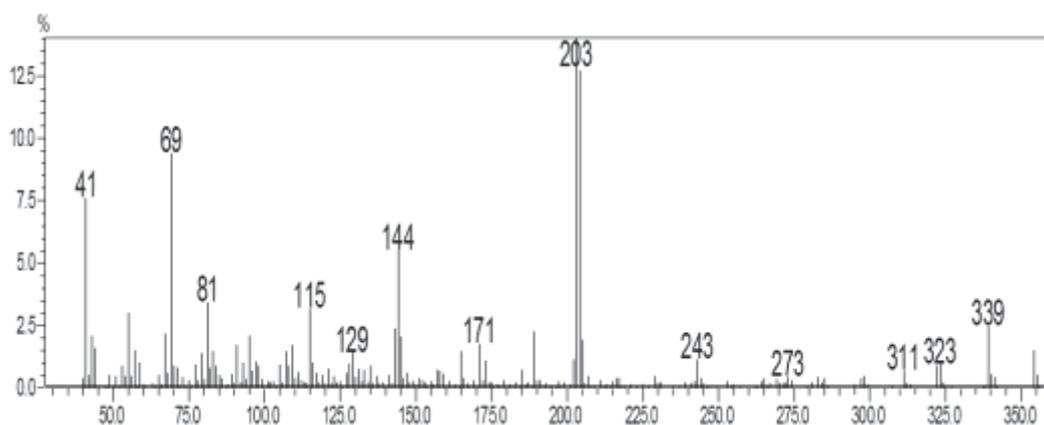
A análise do espectro de massas obtido por CG-MS revelou um pico em m/z 354 Da, correspondente a $[M]^{+}$, confirmando a fórmula molecular proposta $C_{23}H_{30}O_3$. Além disso, o íon fragmentário em m/z 339 Da (íon molecular) indica a perda de um radical metila. O pico base m/z 203 demonstra a perda do radical $C_{11}H_{19}$, que se refere à cadeia lateral ligada ao carbono 2 (FIGURA 27).

FIGURA 26 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO IDENTIFICADO COMO (*E*)-2-(4',8'-DIMETILNONA-3',7'-DIEN-1-IL)-2-METIL-2*H*-CROMENO-6-CARBOXILATO DE METILA ($\lambda=254$ nm)



Fonte: A autora (2024)

FIGURA 27 - ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA 2



NOTA: Espectro para a fração FHR-07-09-03. Fonte: A autora (2025)

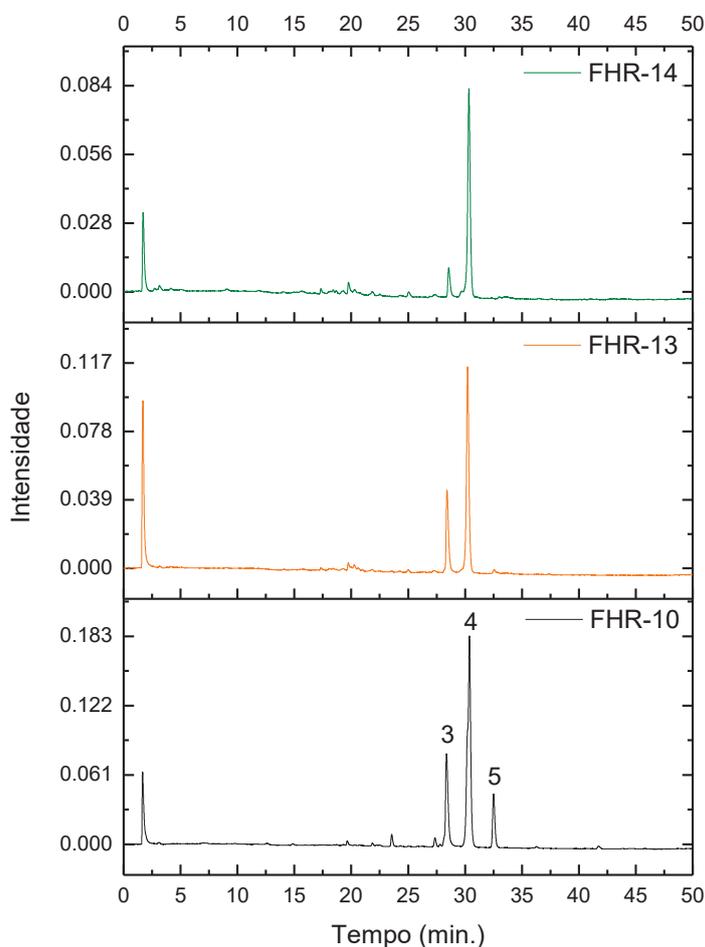
O composto (*E*)-2-(4',8'-dimetilnona-3',7'-dien-1-il)-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila está sendo descrito pela primeira vez na literatura como produto natural. Cromenos semelhantes já foram descritos por Ampofo e colaboradores (1987), isolado de *Piper auritum*, no entanto, com diferença na função orgânica. O estudo mencionado identificou o cromeno na forma ácida, que após reação de esterificação, obteve o éster metílico.

As informações relativas à RMN ^1H e ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY para a fração FHR-05-07-03 podem ser encontradas no ANEXO, FIG. 63-67, p. 103-107.

4.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS 3, 4 E 5.

As substâncias identificadas como **3**, **4** e **5** foram obtidas por meio do isolamento utilizando CLAE em modo semi-preparativo, conforme detalhado no item 3.2.3, como também por meio de CCDP (item 3.2.1). A seguir, são apresentados os cromatogramas das frações FHR-10, FHR-13 e FHR-14, e os respectivos picos coletados e identificados (FIGURA 28).

FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES FHR-10, FHR-13 E FHR-14 ($\lambda=254$ nm).

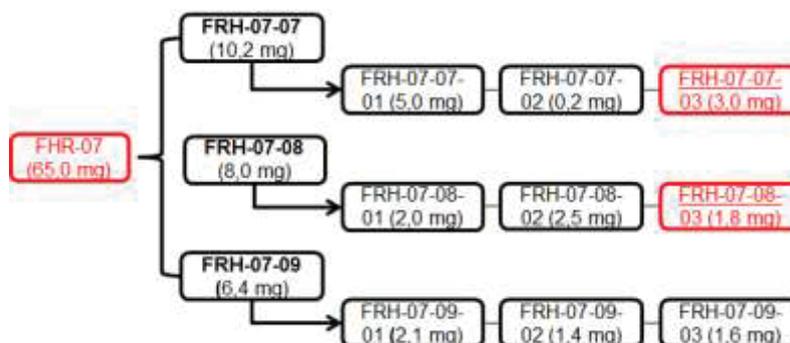


FONTE: A autora (2022)

A substância **3** foi isolada nas frações FHR-10-04 (26,0 mg) e FHR-07-07-03 (3,0 mg), oriundas das frações FHR10 e FHR-07 (FLUXOGRAMA 3) e, trata-se do composto 4-nerolidilcatecol (FIGURA 29) apresentando cor marrom. Através das

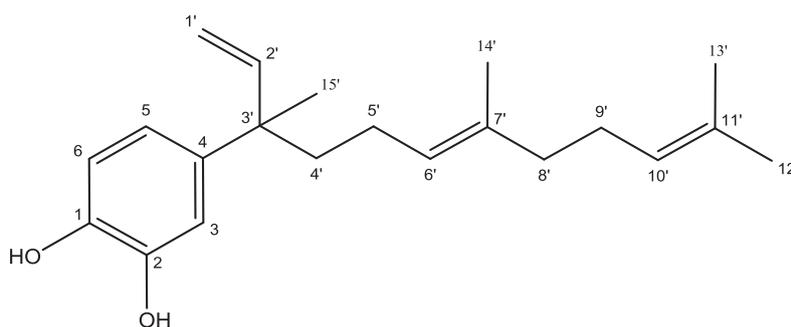
análises dos espectros de RMN 1D e 2D foi possível propor a estrutura. Os dados do RMN de ^1H e ^{13}C da substância **3** estão na TABELA 7.

FLUXOGRAMA 3 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CCDP PARA A SUBSTÂNCIA **3**.



NOTA: Em vermelho fração inicial e em vermelho sublinhado fração identificada.
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 29 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A SUBSTÂNCIA **3** (4-NEROLIDILCATECOL)



FONTE: A autora (2023)

TABELA 7- DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA **3**.

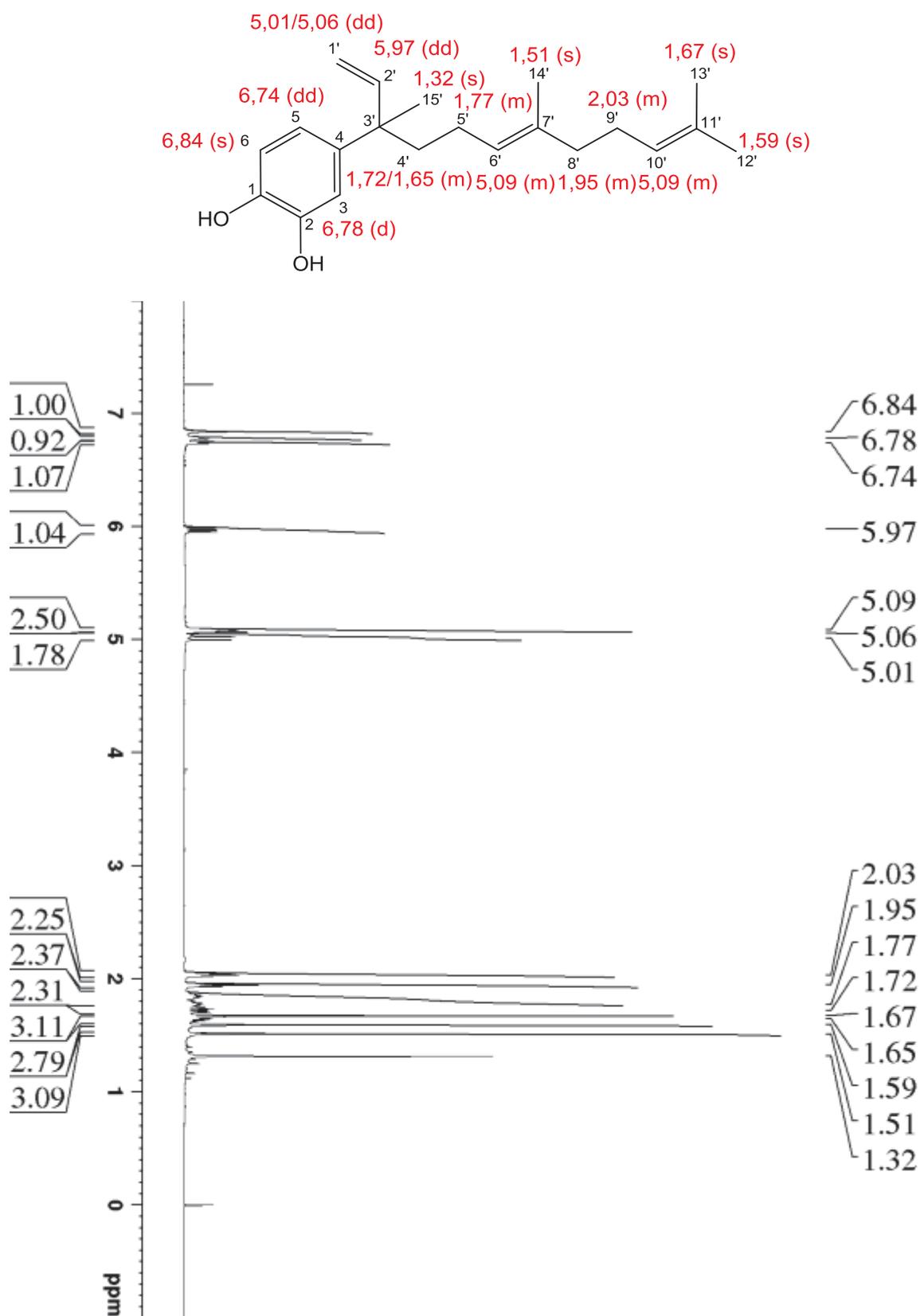
FHR-10-04		HMBC		LITERATURA*	
Nº	^1H	$^1J_{\text{H-C}}$	($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	^1H	$^1J_{\text{H-C}}$
1	-	141,3	-	-	141,1
2	-	143,1	-	-	143,2
3	6,84 (1H, m)	114,2	3', 1, 5	6,83 (1H, d, $J=2$ Hz)	115,1
4	-	140,9	-	-	141,4
5	6,74 (1H, dd, $J=8,5$ e 2,0 Hz)	119,1	3	6,73 (1H, dd, $J=8,0$ e 2,0 Hz)	119,3
6	6,78 (1H, d, $J=8,5$)	116,0	2, 4	6,78 (1H, d, $J=8,0$ Hz)	114,4
1'	5,01 (1Ha, dd, $J=18$ e 1,3 Hz) 5,06 (1Hb, dd, $J=10$ e 1,3 Hz)	111,5	2', 3'	5,00 (1Ha, dd, $J=17$ e 1,3 Hz) 5,05 (1Hb, dd, $J=10,5$ e 1,3 Hz)	111,6
2'	5,97 (1H, dd, $J=18$ e 10 Hz)	147,0	1', 4'	5,97 (1H, dd, $J=17$ e 10,5 Hz)	147,1
3'	-	43,8	-	-	43,8
4'	1,72/1,65 (2H, m)	41,1	2', 4'	1,90 (2H, m)	41,2
5'	1,77 (2H, m)	23,2	6', 7'	1,60 (2H, m)	23,2
6'	5,09 (1H, m)	124,4	14'	5,08 (1H, t, $J=7,5$ Hz)	124,5
7'	-	135,0	-	-	135,1
8'	1,95 (2H, m)	39,7	6', 7', 9', 10'	2,10 (2H, m)	39,7
9'	2,03 (2H, m)	26,7	7', 8', 10', 11'	1,90 (2H, m)	26,8
10'	5,09 (1H, m)	124,5	9', 12', 13'	5,09 (1H, t, $J=7,5$ Hz)	124,7
11'	-	131,3	-	-	131,4
12'	1,67 (3H, s)	25,7	11', 13'	1,51 (3H, s)	25,7
13'	1,59 (3H, s)	17,7	11', 12'	1,59 (3H, s)	17,7
14'	1,51 (3H, s)	15,9	6', 7, 8'	1,67 (3H, s)	15,9
15'	1,32 (3H, s)	24,9	2', 4'	1,30 (3H, s)	25,0

NOTA: Experimento realizado a 600,13 MHz para ^1H e HMBC e, 150,90 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .

*KIJOA et al., (1980). FONTE: A autora (2024)

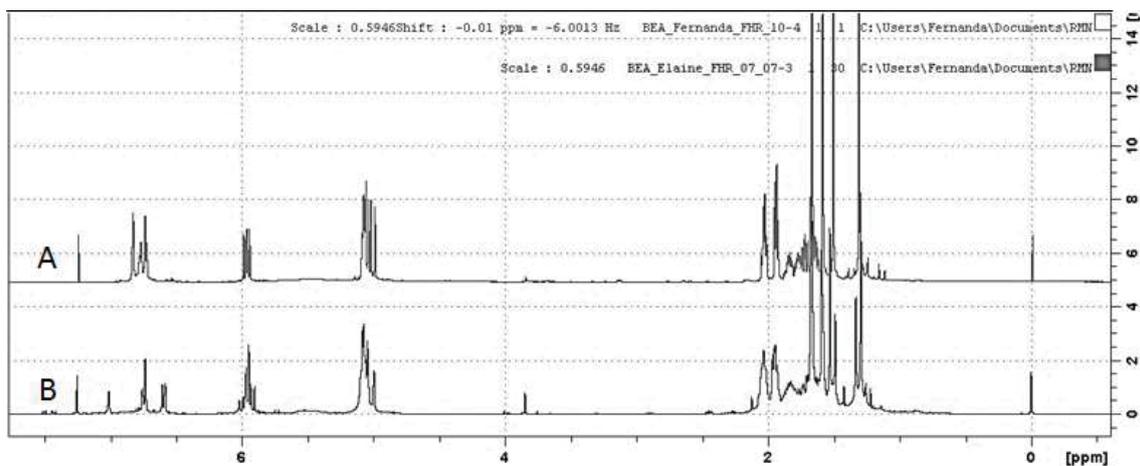
O espectro de RMN de ^1H da substância **3** (FIGURA 30) apresenta sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos em δ 6,74 ppm (H-5) acoplado em *orto* com δ 6,84 ppm (H-6) e o hidrogênio em δ 6,78 ppm (H-3), com acoplamento *meta* com H-6, indicando presença de um anel aromático trissubstituído. Observa-se simpletos correspondentes a grupos metílicos em δ 1,59, 1,67, 1,51 e 1,32 ppm (H-12', H-13', H-14', H-15' respectivamente). Quanto à confirmação da ligação dupla terminal, foi possível através dos sinais com acoplamento geminal de Ha-1' em δ 5,01 ppm ($J=18$ Hz, 1,3 Hz) e Hb-1' 5,06 ppm ($J=10$ Hz, 1,3 Hz) vicinal com H-2' em δ 5,97 ppm, mostrando acoplamento *Z* e *E* ($J=10$ Hz, 18 Hz).

Na FIGURA 31 é apresentada a comparação entre as frações FHR-10-04 e FHR-07-07-03, realizada por meio da técnica de RMN de ^1H desacoplado.

FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN ^1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 3

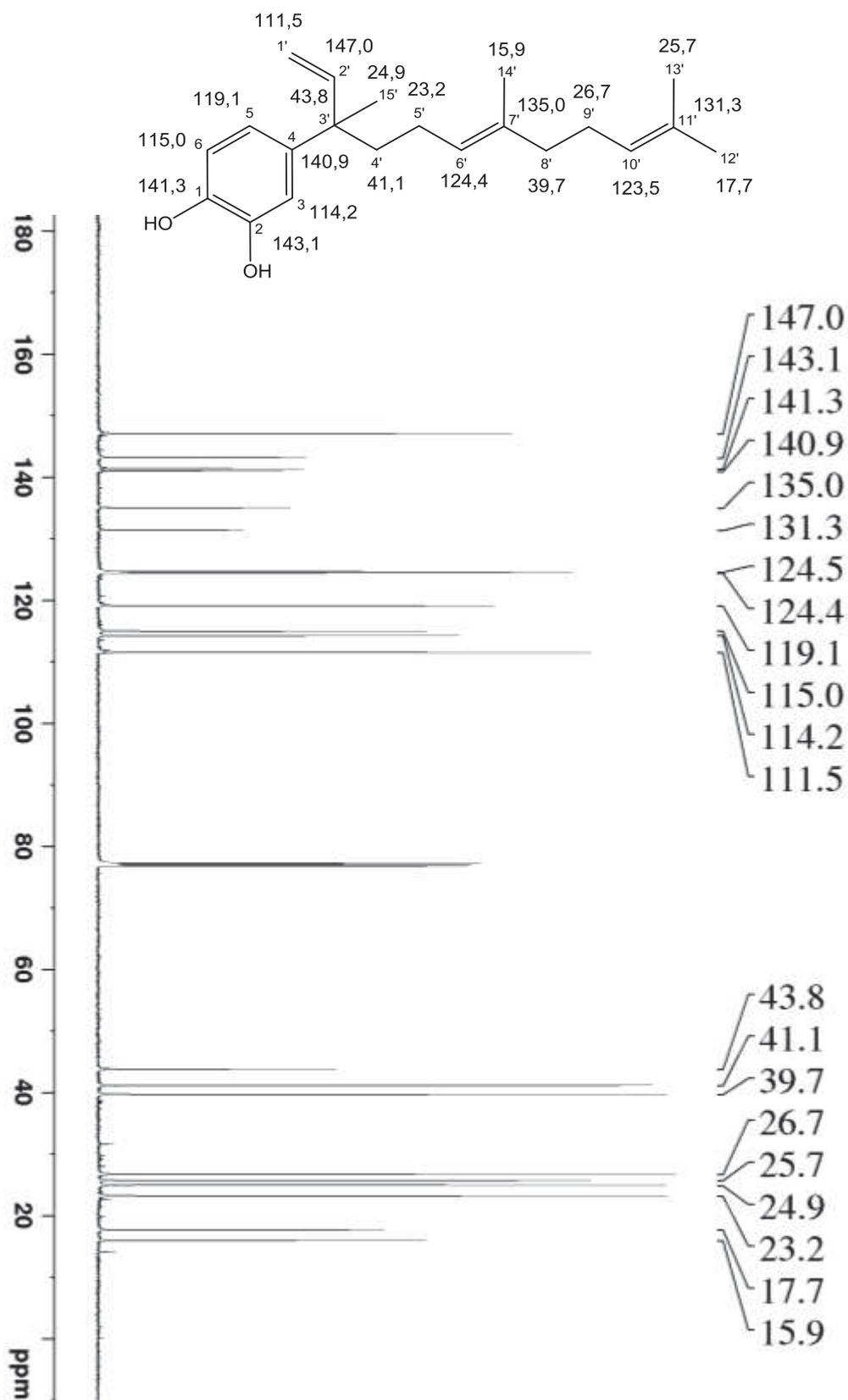
NOTA: Espectro da fração FHR-10-04
 FONTE: A autora (2023)

FIGURA 31 - ESPECTROS DE RMN ^1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl_3) DE AMBAS AS FRAÇÕES, FHR-10-04 (A) E FHR-07-07-03 (B) PARA COMPARAÇÃO.



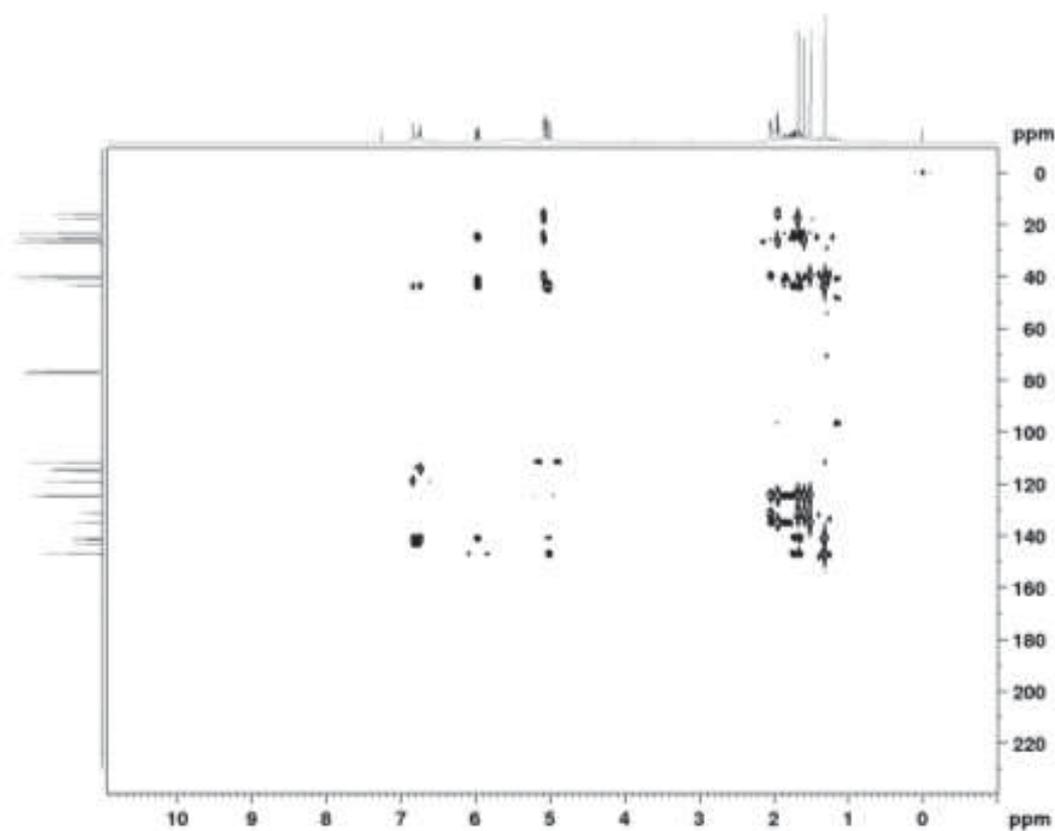
FONTE: A autora (2023)

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 32), foi observada a presença de 21 átomos de carbono. Os sinais correspondentes a δ 141,2 e δ 143,1 ppm, C-1 e C-2, respectivamente são referentes aos carbonos com grupos hidroxilas como substituinte. Esses carbonos tiveram seus posicionamentos inferidos pelos dados observados nos espectros de HMBC (TABELA 7, FIGURA 33) através das correlações entre C-3 com C-1, C-2 e C-4.

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DESACOPLADO (CDCl_3 , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 3.

NOTA: Espectro da fração FHR-10-04
FONTE: A autora (2023)

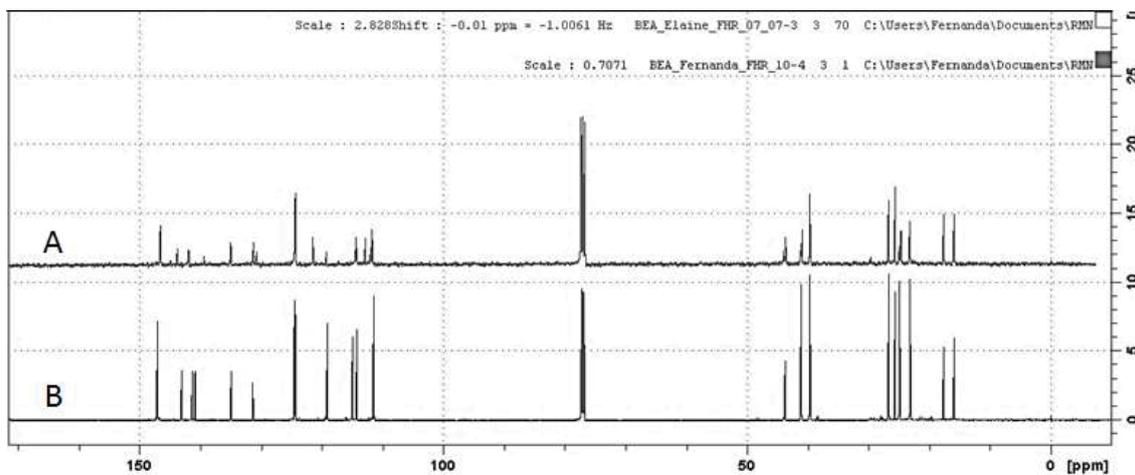
FIGURA 33 - CORRELAÇÃO DE HMBC DA SUBSTÂNCIA 3.



FONTE: A autora (2023)

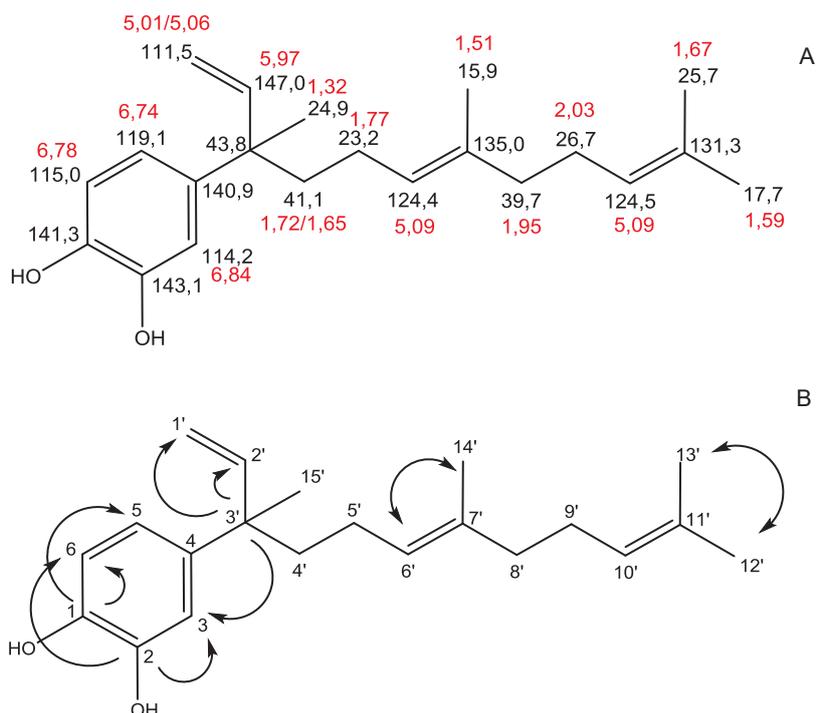
As substâncias foram isoladas por meio de duas técnicas cromatográficas diferentes: CLAE para a FHR-10-04 e CCDP para a FHR-07-07-03. Ambas as abordagens resultaram na obtenção do mesmo composto. A FIGURA 34 mostra o espectro de ^{13}C das duas frações, juntamente com a proposta estrutural ilustrada na FIGURA 35.

FIGURA 34 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DESACOPLADO (CDCl_3 , 150,90 MHz) DE AMBAS AS FRAÇÕES, FHR-10-04 (A) E FHR-07-07-03 (B) PARA COMPARAÇÃO.



FONTE: A autora (2023)

FIGURA 35 - EM (A) ESTRUTURA COM DESLOCAMENTOS PARA A SUBSTÂNCIA 3 (CARBONOS EM PRETO E HIDROGÊNIOS EM VERMELHO). EM (B) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC.

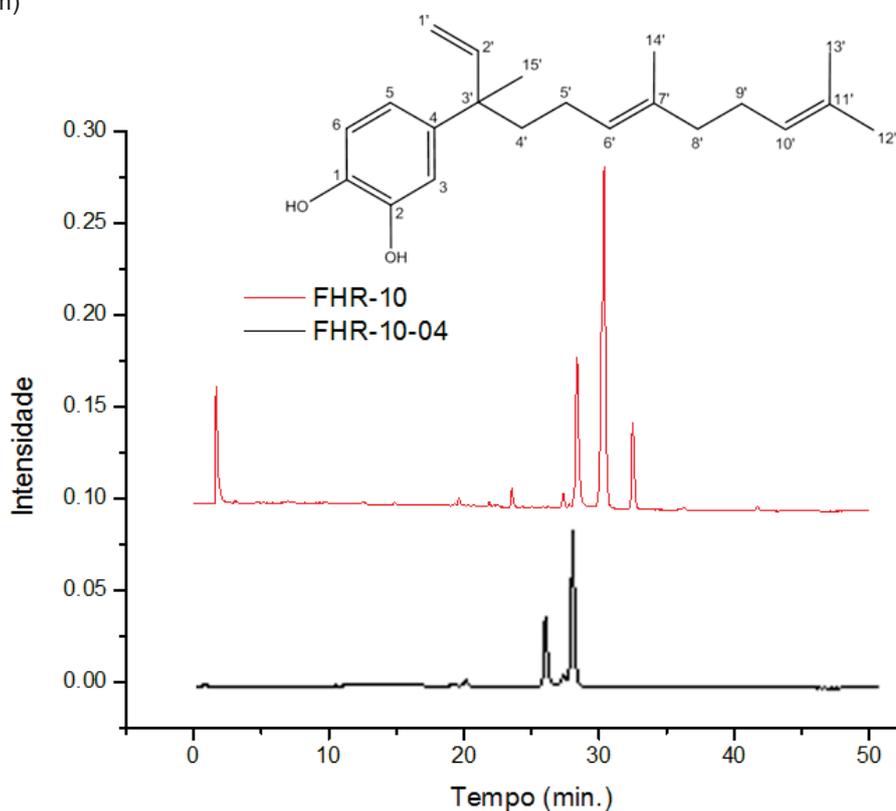


FONTE: A autora (2024)

Para confirmar o isolamento do composto, foi realizada uma análise por CLAE e CG-EM empregando o mesmo método utilizado para os extratos descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4, respectivamente. O cromatograma obtido por CLAE está apresentado na FIGURA 36.

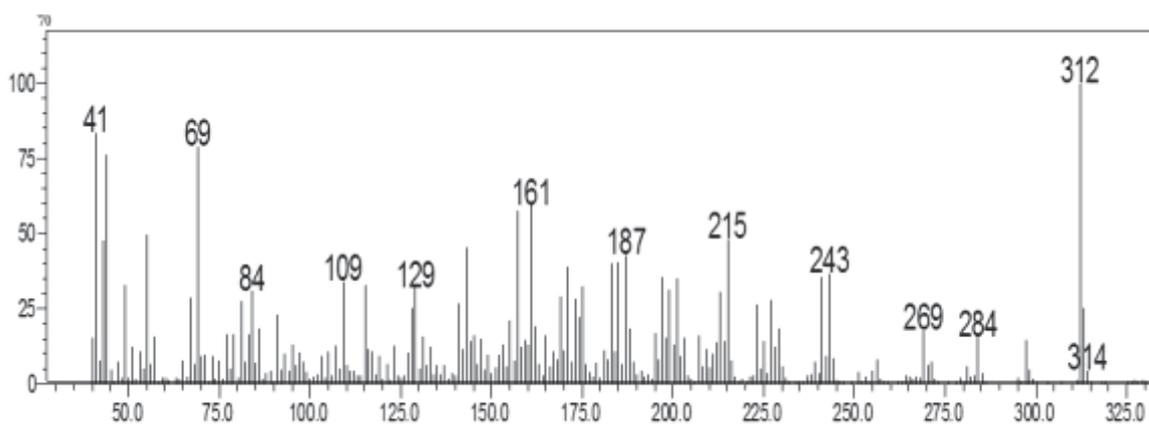
Na análise do espectro de massas obtido por CG-MS foi identificado um pico em m/z 314 Da correspondente a $[M]^{+}$, o que está de acordo com a fórmula molecular proposta $C_{21}H_{30}O_2$ (FIGURA 37). Tem como pico base m/z 312 Da, possivelmente a inserção de uma ligação dupla.

FIGURA 36 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO IDENTIFICADO COMO 4-NEROLIDILCATECOL ($\lambda=254$ nm)



FONTE: A autora (2023)

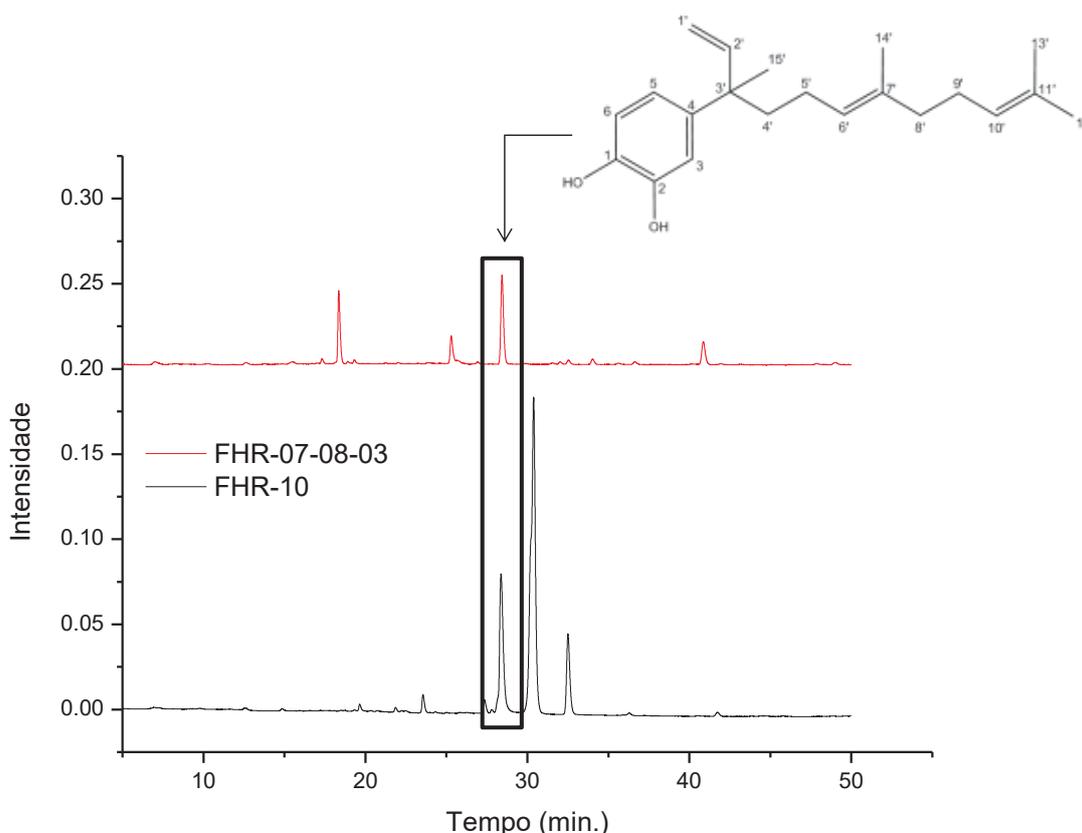
FIGURA 37 - ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA 3.



NOTA: Espectro da fração FHR-10-04
FONTE: a autora (2025).

Outra fração, a FHR-07-08-03, foi analisada utilizando a técnica de CLAE, revelando três picos de maior intensidade nos tempos de retenção de 18,35, 25,29 e 28,37 minutos. Dentre eles, o pico registrado em 28,37 minutos corresponde à substância **3**, denominada 4-nerolidilcatecol (FIGURA 38). Dessa forma, foi possível identificar essa fração como uma mistura. O composto obtido apresenta coloração marrom, com uma massa de 6,0 mg, e sua identificação foi realizada por meio da análise dos espectros de RMN 1D e 2D.

FIGURA 38 - CROMATOGRAMA DE COMPARAÇÃO ENTRE AS FRAÇÕES FHR-07-08-03 E FHR-10.



FONTE: A autora (2024)

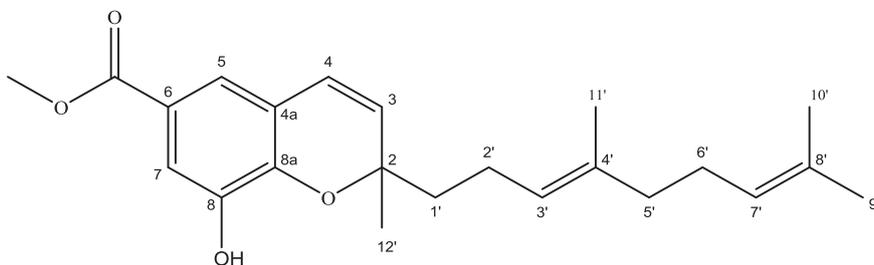
Sendo assim, o composto 4-nerolidilcatecol foi isolado e/ou identificado em três frações diferentes. Trata-se de um metabólito secundário de plantas encontrado pela primeira vez no extrato das folhas e raízes em hexano de *P. umbellatum* (KIJJOA et al., 1980). É facilmente encontrado em *P. umbellatum* L. (sin. *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., da família Piperaceae. Também já foi relatado em *P. peltatum*, no extrato metanólico das folhas, demonstrando diversas propriedades biológicas, como antioxidantes, citotóxica, inseticida, antiinflamatórias, antifúngicos *in vitro*, leishmanicida *in vitro* e antimaláricas (LIMA et al., 2013; PINTO et

al., 2010; NUNEZ et al., 2005).

As informações relativas à RMN ^1H e ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY para as frações FHR-07-07-03 e FHR-07-08-03 podem ser encontradas no ANEXO, FIG.68-75, p. 108-115.

A substância **4** da fração FHR-10-06 (1,4 mg), foi caracterizada como (*E*)-2-(4',8'-dimetilnona-3',7'-dien-1-il)-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila. Foi isolada como uma substância viscosa, de cor marrom alaranjada, sendo identificada pela análise dos espectros de RMN 1D e 2D. Os dados do RMN de ^1H e ^{13}C da substância **4** estão na TABELA 8 (FIGURA 39).

FIGURA 39 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A FHR-10-06, (*E*)-2-(4',8'-DIMETILNONA-3',7'-DIEN-1-IL)-8-HIDROXI-2-METIL-2*H*-CROMENO-6-CARBOXILATO DE METILA.



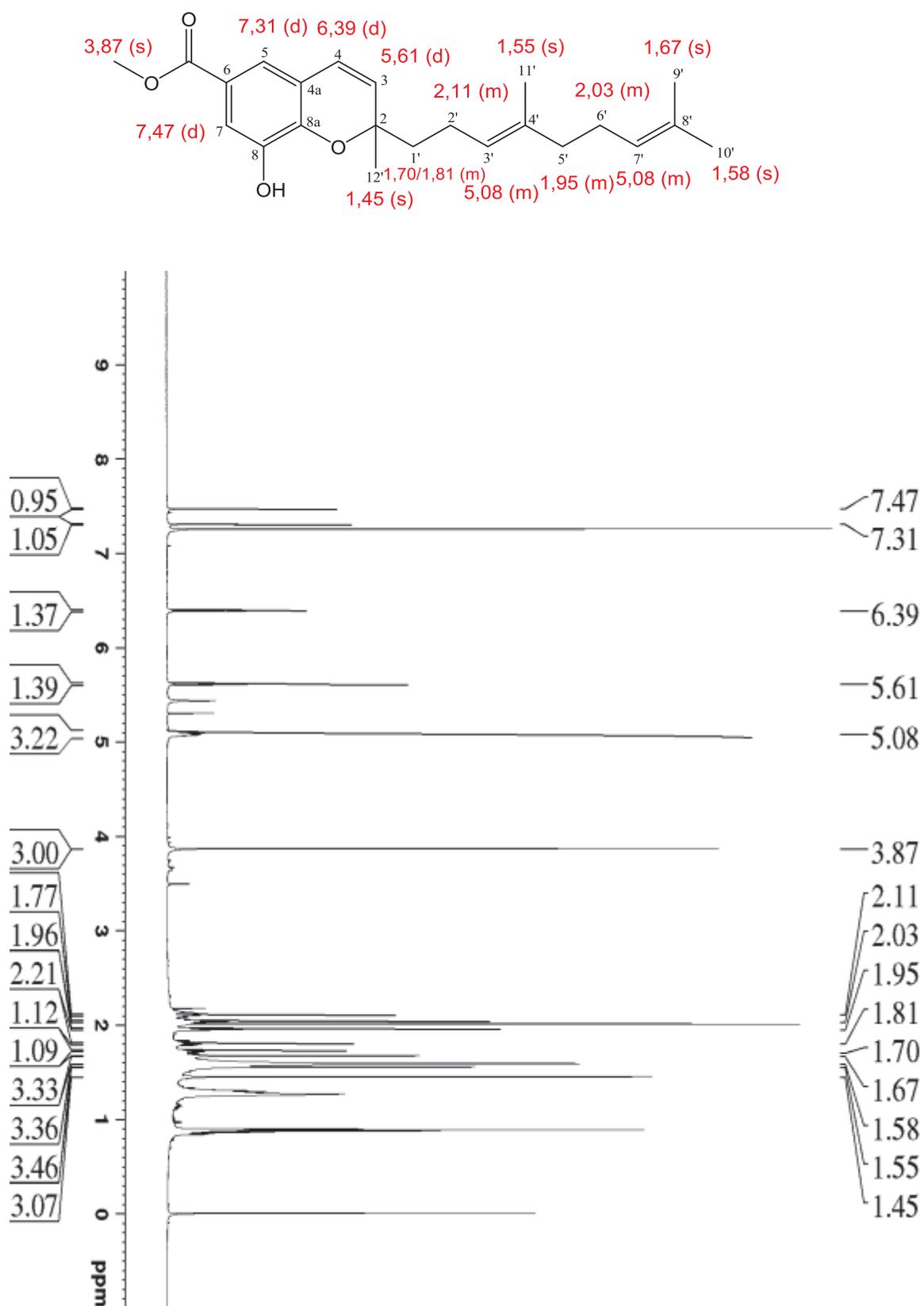
FONTE: A autora (2023)

TABELA 8 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 4.

SUBSTÂNCIA 4					
FHR-10-06			HMBC	LITERATURA*	
Nº	^1H	$^1J_{\text{H-C}}$	($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	^1H	$^1J_{\text{H-C}}$
1	-	-	-	-	-
2	-	81,0	-	-	81,0
3	5,61 (1H, d, $J=10$ Hz)	129,8	2, 4a	5,61 (1H, d, $J=10,4$ Hz)	129,7
4	6,39 (1H, d, $J=10$ Hz)	122,3	2, 4a, 6, 8a	6,39 (1H, d, $J=10,4$ Hz)	122,2
4a	-	120,6	-	-	120,3
5	7,31 (1H, d, $J=2$ Hz)	120,0	7, 8	7,31 (1H, d, $J=1,6$ Hz)	119,9
6	-	122,6	-	-	122,6
7	7,47 (1H, d, $J=2$ Hz)	116,3	5, CO	7,48 (1H, d, $J=1,6$ Hz)	116,3
8	-	143,9	-	-	143,9
8a	-	143,7	-	-	143,7
1'	1,70/1,81 (2H, m)	41,5	2', 2, 3	1,70/1,82 (2H, m)	41,5
2'	2,11 (2H, m)	22,6	1', 3', 4'	2,10 (2H, m)	22,6
3'	5,08 (1H, m)	123,4	11', 5'	5,08 (1H, m)	123,4
4'	-	135,8	-	-	135,8
5'	1,95 (2H, m)	39,6	11', 6', 3'	1,95 (2H, m)	39,5
6'	2,03 (2H, m)	26,6	5', 7', 8'	2,03 (2H, m)	26,6
7'	5,08 (1H, m)	124,2	5'	5,08 (1H, m)	124,2
8'	-	131,4	-	-	131,4
9'	1,58 (3H, s)	17,7	7', 8', 10'	1,59 (3H, s)	17,7
10'	1,67 (3H, s)	25,7	7', 8', 9'	1,67 (3H, s)	25,7
11'	1,55 (3H, s)	16,0	5', 3'	1,55 (3H, s)	16,0
12'	1,45 (3H, s)	27,0	1', 2, 3	1,45 (3H, s)	27,0
MeO	3,86 (3H, s)	52,0	-	3,87 (3H, s)	51,9
CO	-	166,7	-	-	166,8

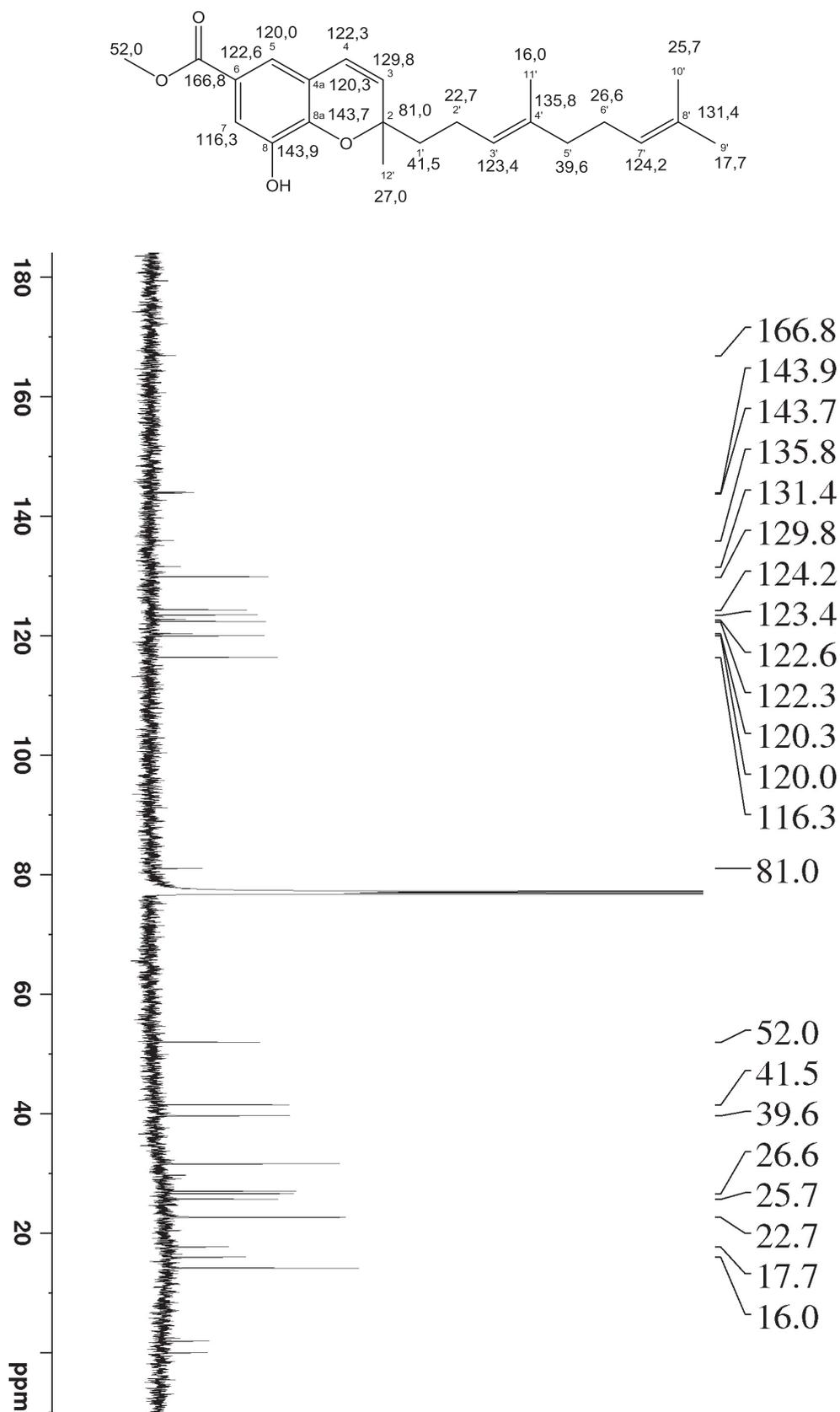
NOTA: Experimento realizado a 600,13 MHz para ^1H e HMBC e, 150,90 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .
*NUNEZ et al., (2005). FONTE: A autora (2023)

No espectro de RMN de ^1H para a substância 4 foram observados dupletos em δ 5,61 ppm ($J=10$ Hz) e δ 6,39 ppm ($J=10$ Hz) característicos do anel pirano insaturado dos 2H-cromenos, que se referem aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente. É possível também observar na região de hidrogênios aromáticos dois dupletos em δ 7,31 ppm ($J=2$ Hz) e δ 7,47 ppm ($J=2$ Hz), com constantes de acoplamento características de acoplamento *meta*, referentes aos hidrogênios H-5 e H-7, respectivamente (FIGURA 40)

FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN ^1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 4.

FONTE: A autora (2023)

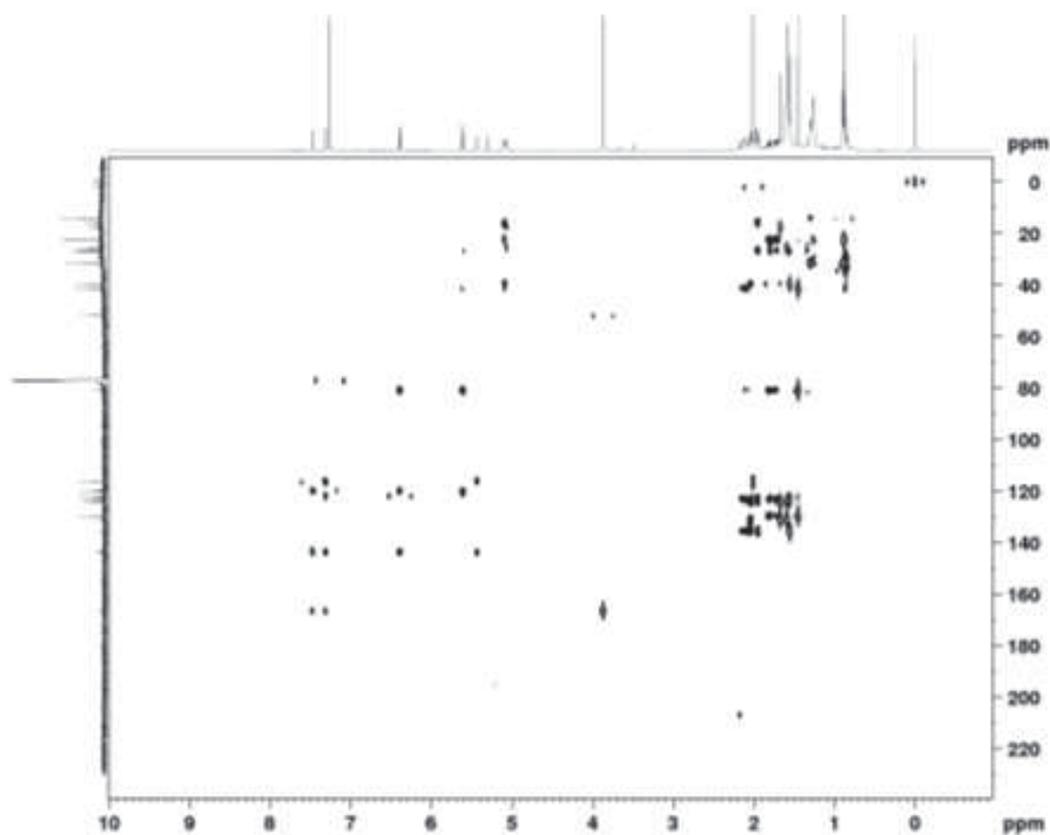
No espectro de ^{13}C observou-se a presença do par de sinais em δ 166,8/52,0 ppm confirmando a presença do éster metílico. Além disso, pôde-se confirmar a presença da unidade ligada ao anel pelos sinais δ 41,5, 22,7, 123,4, 135,8, 39,6, 26,6, 124,2, 131,4 ppm que correspondem respectivamente a C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-8' e, em δ 17,7, 25,7, 16,0 e 27,0 ppm atribuídos aos grupos metílicos em C-9', C-10', C-11' e C-12' respectivamente (FIGURA 41).

FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DESACOPLADO (CDCl_3 , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 4.

FONTE: A autora (2023)

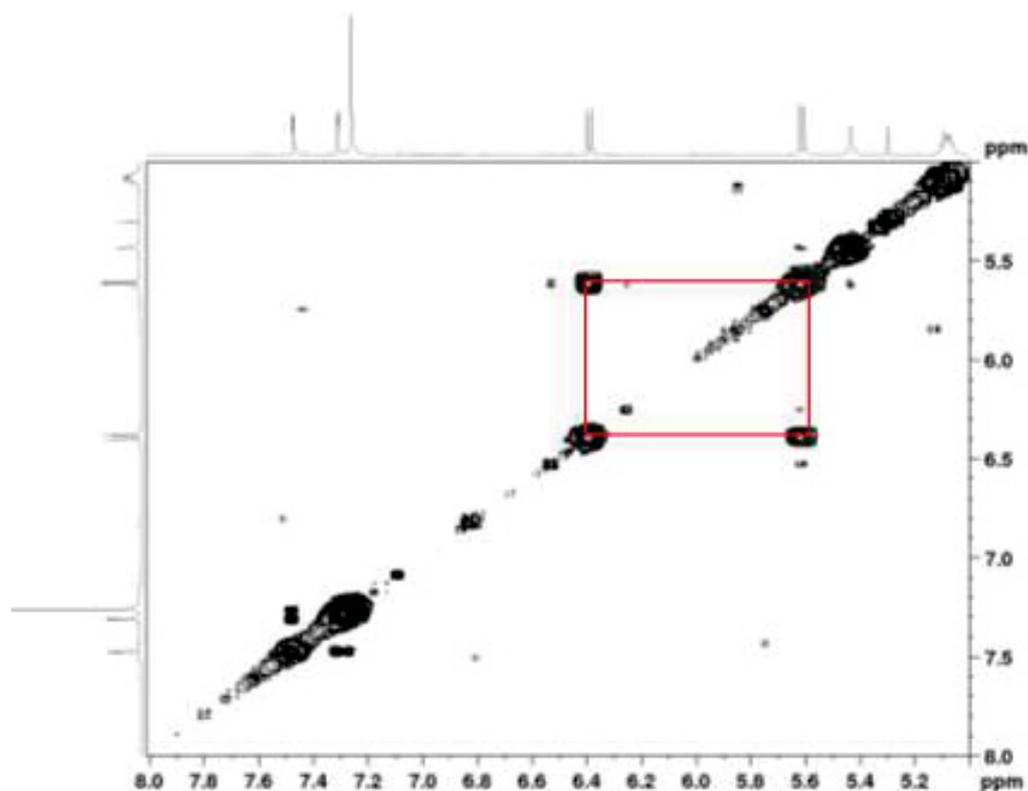
Pela análise do mapa de correlação a longa distância (HMBC, FIGURA 42) e correlação ^1H - ^1H (COSY, FIGURA 43) foi possível atribuir à posição de todos os átomos e assim propor uma estrutura para a substância **4** (FIGURA 44).

FIGURA 42 - CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA A SUBSTÂNCIA **4**.



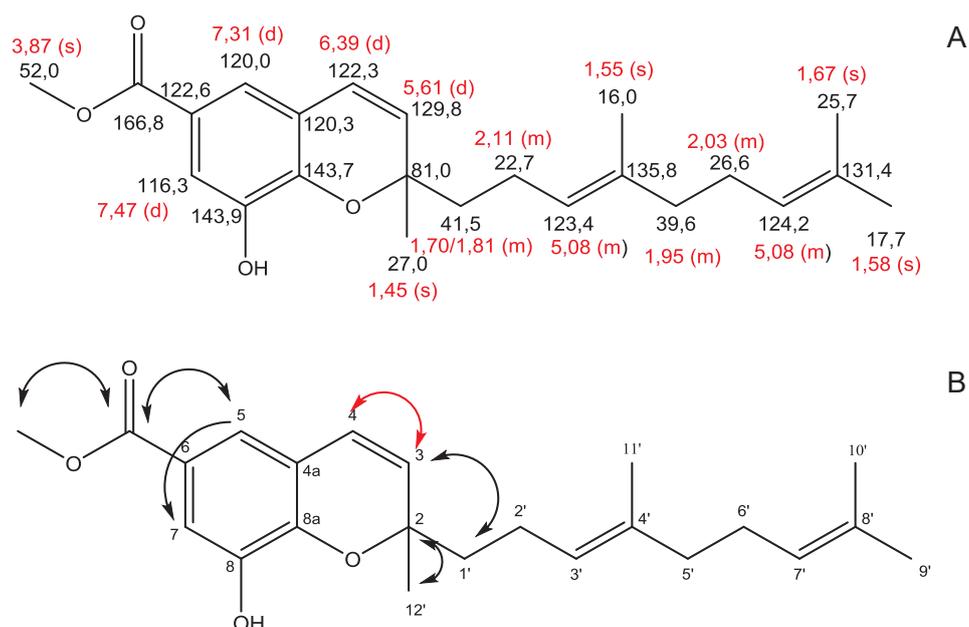
FONTE: A autora (2023)

FIGURA 43 - MAPA DE CONTOURNO DO EXPERIMENTO COSY DA SUBSTÂNCIA 4 (AMPLIAÇÃO NA REGIÃO DE 8,0 A 5,0 ppm (600, 13 MHz, CDCl₃))



FONTE: A autora (2023)

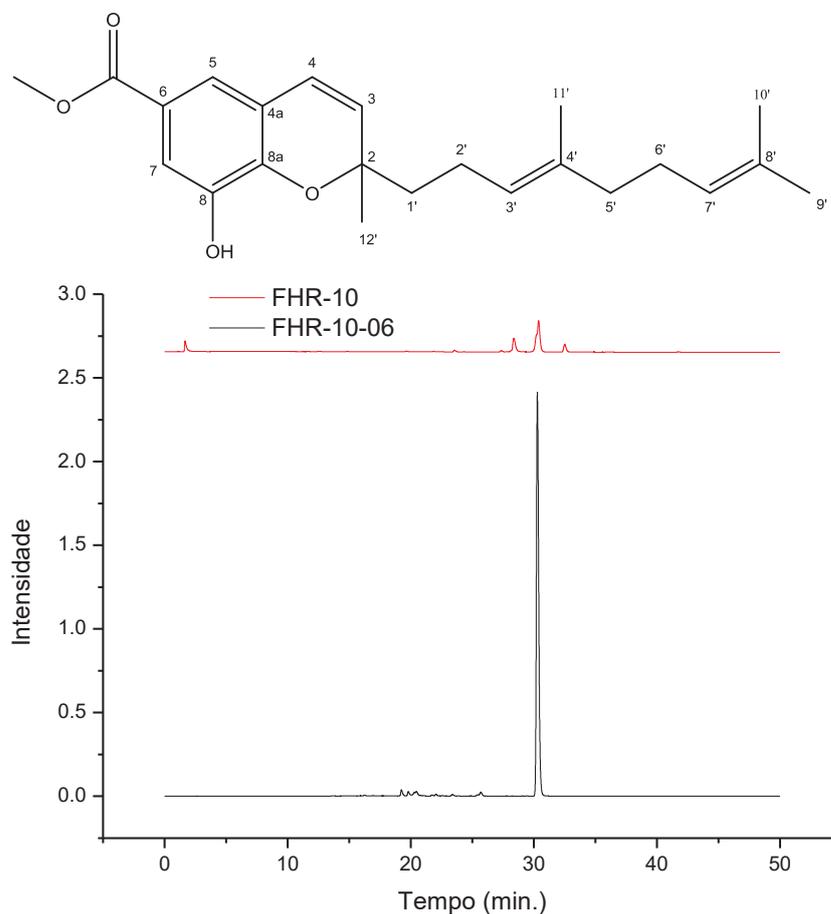
FIGURA 44 - EM (A) ESTRUTURA COM SEUS RESPECTIVOS CARBONOS (PRETO) E HIDROGÊNIOS (VERMELHO). EM (B) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS PRETAS) E COSY (SETAS VERMELHAS) PARA A SUBSTÂNCIA 4.



FONTE: A autora (2023)

A análise por CLAE foi realizada utilizando o mesmo método aplicado aos extratos descritos no item 3.2.3, com o objetivo de validar o isolamento do composto. O cromatograma resultante está ilustrado na FIGURA 45.

FIGURA 45 - CROMATOGRAMA OBTIDO DO ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA **4**, (*E*)-2-(4',8'-DIMETILNONA-3',7'-DIEN-1-IL)-8-HIDROXI-2-METIL-2*H*-CROMENO-6-CARBOXILATO DE METILA ($\lambda=254$ nm)

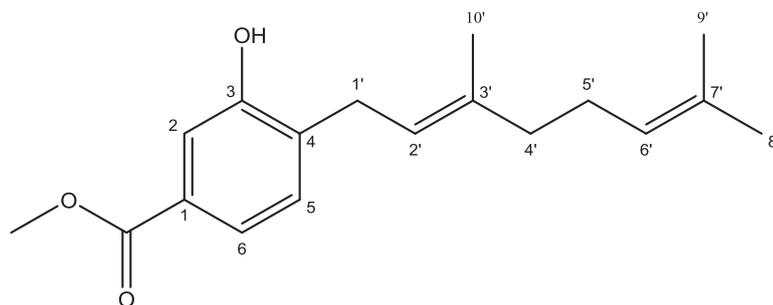


FONTE: A autora (2024)

O composto isolado e identificado pela técnica de RMN trata-se da (*E*)-2-(4',8'-dimetilnona-3',7'-dien-1-il)-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila. Substância já identificada em outras espécies de *Piper*, como em *P. umbellatum* e *P. peltatum* (NUNEZ et al., 2005).

A substância **5** isolada na fração FHR-10-07 (0,9 mg), como uma substância de cor vermelho claro e identificada como (*E*)-4-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1-il)-3-hidroxibenzoato de metila (FIGURA 46). Através das análises dos espectros de RMN 1D e 2D foi possível propor uma estrutura. Os dados do RMN de ^1H e ^{13}C da substância estão na TABELA 9.

FIGURA 46 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A SUBSTÂNCIA 5 (E)-4-(3',7'-DIMETILOCTA-2',6'-DIEN-1-IL)-3-HIDROXIBENZOATO DE METILA



FONTE: A autora (2023)

TABELA 9 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 5.

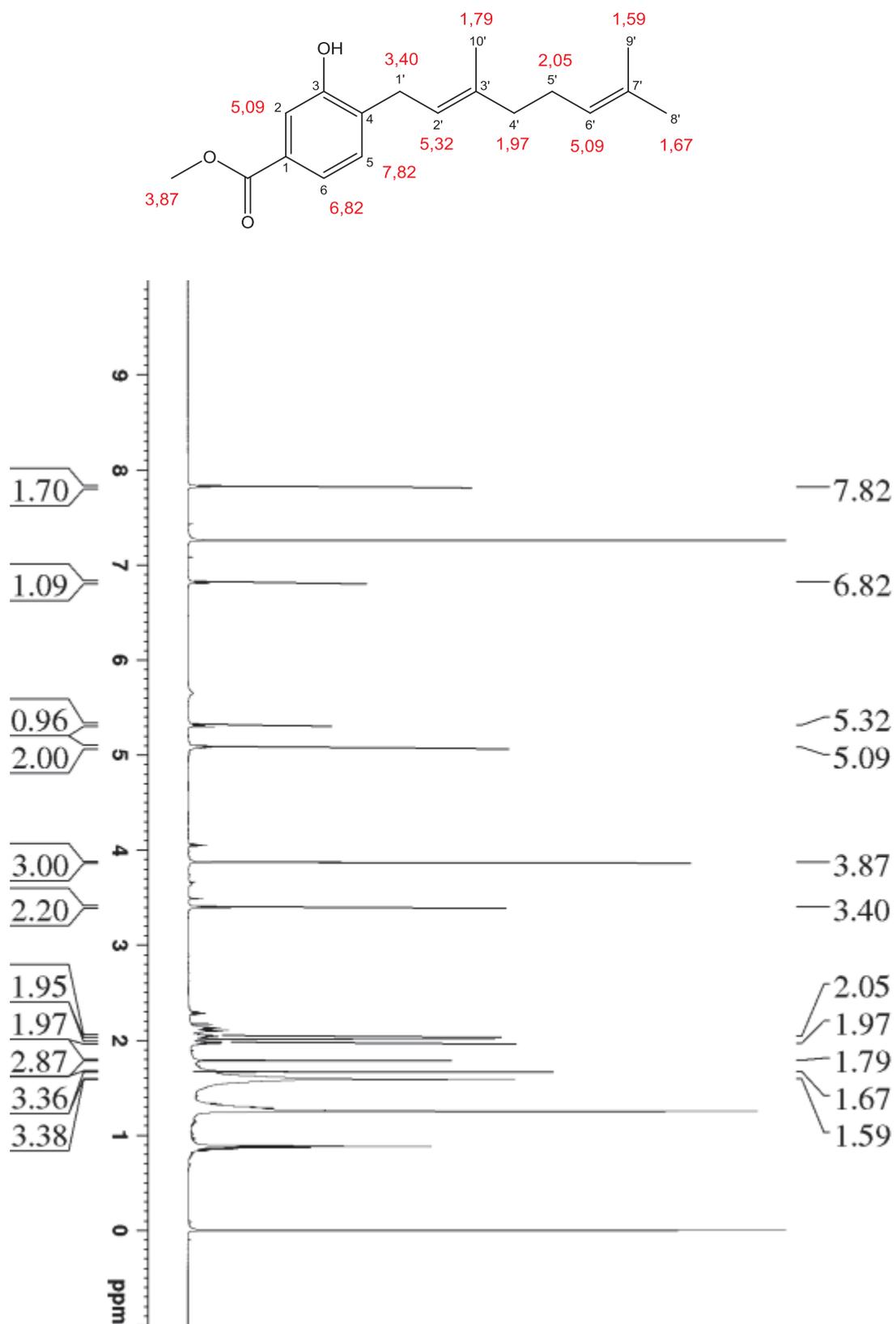
SUBSTÂNCIA 5					
FHR-10-07			HMBC	LITERATURA*	
Nº	^1H	$^1J_{\text{H-C}}$	($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	^1H	$^1J_{\text{H-C}}$
1	-	135,6	-	-	132,9
2	5,09 (1H, m)	123,5	4, CO	7,51 (1H, d, $J=1,3$ Hz)	122,1
3	-	158,8	5, 1'	-	154,3
4	-	126,6	-	-	129,4
5	7,82 (1H, m)	129,8	1'	7,17 (1H, d, $J=7,7$ Hz)	129,8
6	6,82 (1H, dd, $J=6,0$ e $2,5$ Hz)	115,7	2, CO	7,54 (1H, dd, $J=7,7$ e $1,3$ Hz)	116,6
1'	3,40 (2H, m)	29,8	2', 3', 3, 4, 6	3,41 (2H, m)	29,5
2'	5,32 (1H, m)	120,9	1', 4', 10'	5,31 (1H, t, $J=7,0$ Hz)	120,8
3'	-	139,5	-	-	139,0
4'	1,97 (2H, m)	39,7	2', 5', 10'	2,09 (2H, m)	39,7
5'	2,05 (2H, m)	26,7	4', 6', 7'	2,12 (2H, m)	26,5
6'	5,09 (1H, m)	124,3	4'	5,07 (1H, t, $J=5,4$ Hz)	123,9
7'	-	131,9	-	-	132,0
8'	1,67 (3H, s)	25,7	8'	1,69 (3H, s)	25,7
9'	1,59 (3H, s)	17,7	9'	1,60 (3H, s)	17,7
10'	1,79 (3H, s)	16,3	2'	1,15 (3H, s)	16,2
OCH ₃	3,87 (3H, s)	51,8	-	3,89 (3H, s)	52,1
CO	-	169,2	-	-	167,1

NOTA: Experimento realizado a 600,13 MHz para ^1H e HMBC e, 150,90 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . *TSUDA et al., (1999). FONTE: A autora (2023).

Os espectros de RMN de ^1H (FIGURA 47) da substância 5 apresentam no geral o mesmo padrão de sinais e acoplamentos com relação a prenilação das substâncias já discutidas anteriormente. Observam-se sinais relativos ao anel aromático em δ 6,82 ppm (H-6), δ 7,82 ppm (H-5) e δ 5,09 ppm (H-2) indicando presença de um anel aromático trissubstituído. Observa-se simpletos correspondentes a grupos metílicos

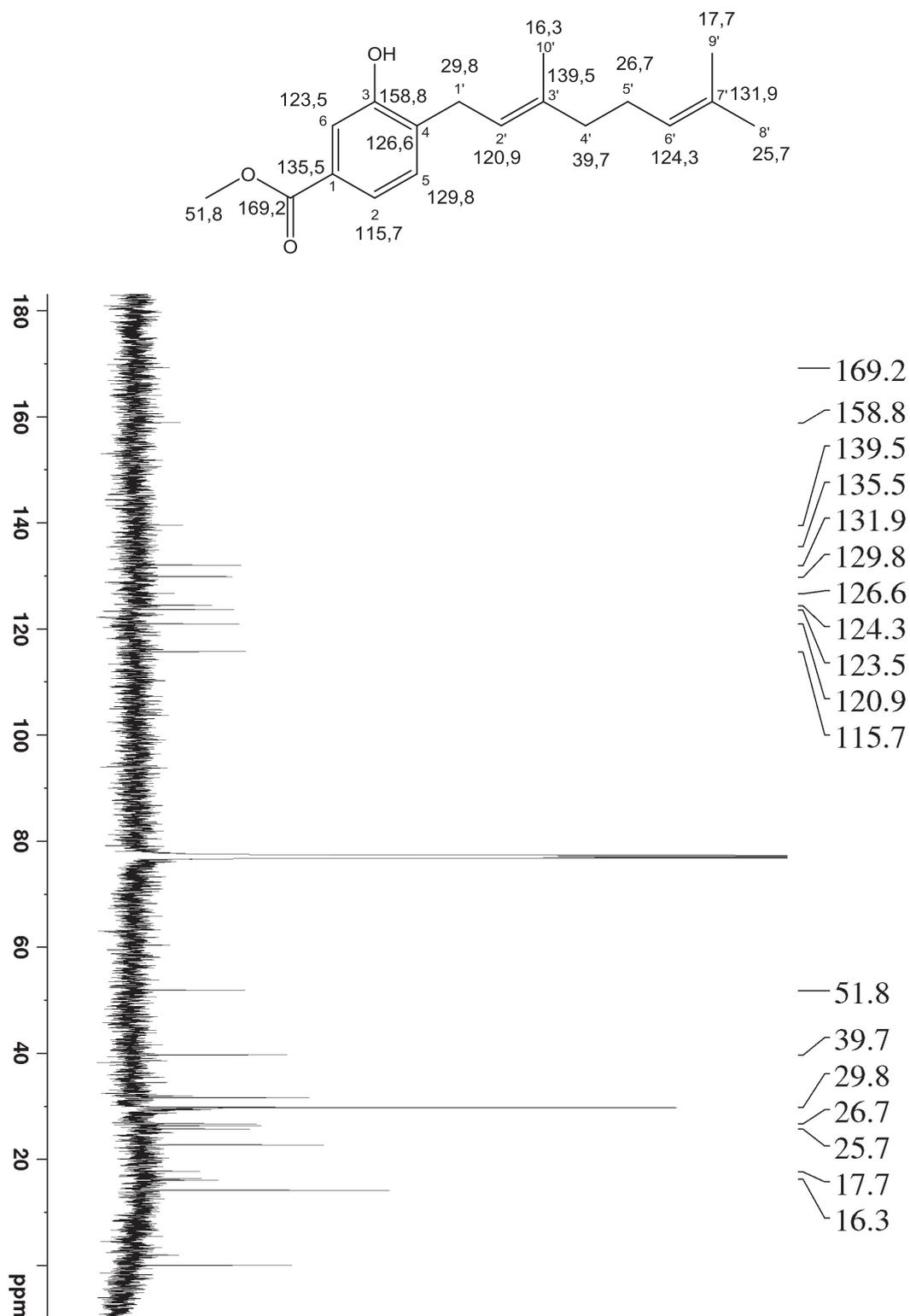
em δ 1,67, 1,59 e 1,79 ppm (H-8', H-9', e H-10', respectivamente).

FIGURA 47 - ESPECTRO DE RMN ^1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 5.



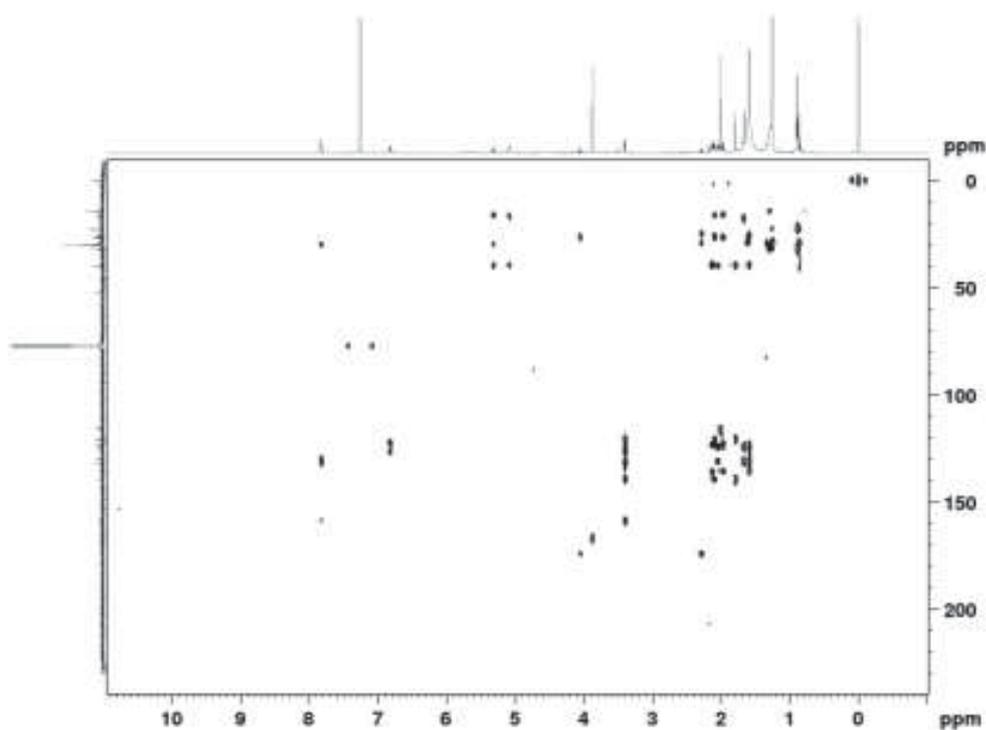
FONTE: A autora (2023)

Através da análise de RMN de ^{13}C (FIGURA 48), foi observada a presença de 16 átomos de carbono. Os sinais adicionais foram atribuídos a presença do éster metílico através dos pares de sinais em δ 169,2/51,8 ppm. O sinal correspondente a δ 158,8 ppm, é referente ao C-3 com um grupo hidroxila como substituinte. Esse grupo teve seu posicionamento inferido pelos dados observados nos espectros de HMBC (TABELA 9, FIGURA 49) através das correlações, sendo possível propor a estrutura (FIGURA 50).

FIGURA 48 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DESACOPLADO (CDCl_3 , 150,90 MHz) DA SUBSTÂNCIA 5.

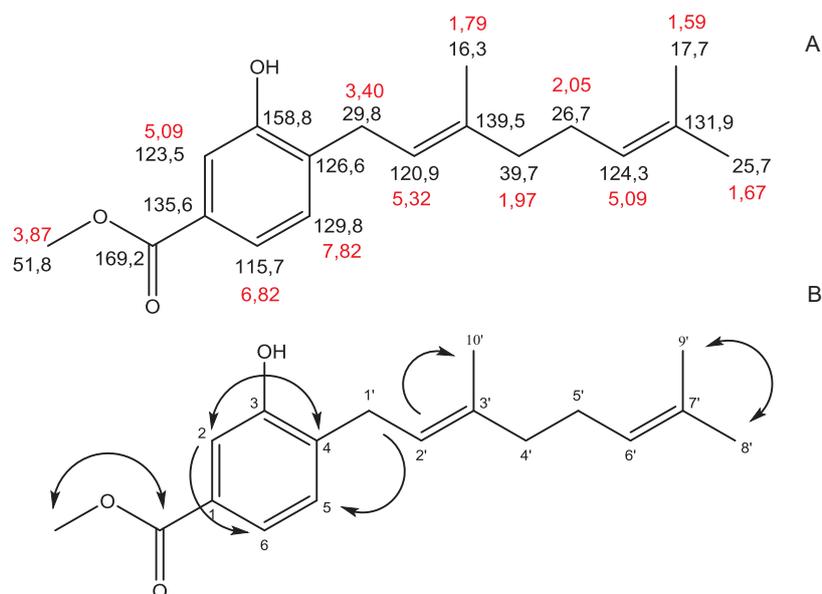
FONTE: A autora (2023)

FIGURA 49 - CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA SUBSTÂNCIA 5.



FONTE: A autora (2023)

FIGURA 50 - EM (A) ESTRUTURA COM SEUS RESPECTIVOS CARBONOS (PRETO) E HIDROGÊNIOS (VERMELHO). EM (B) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELO EXPERIMENTO DE HMBC (SETAS PRETAS) PARA A SUBSTÂNCIA 5

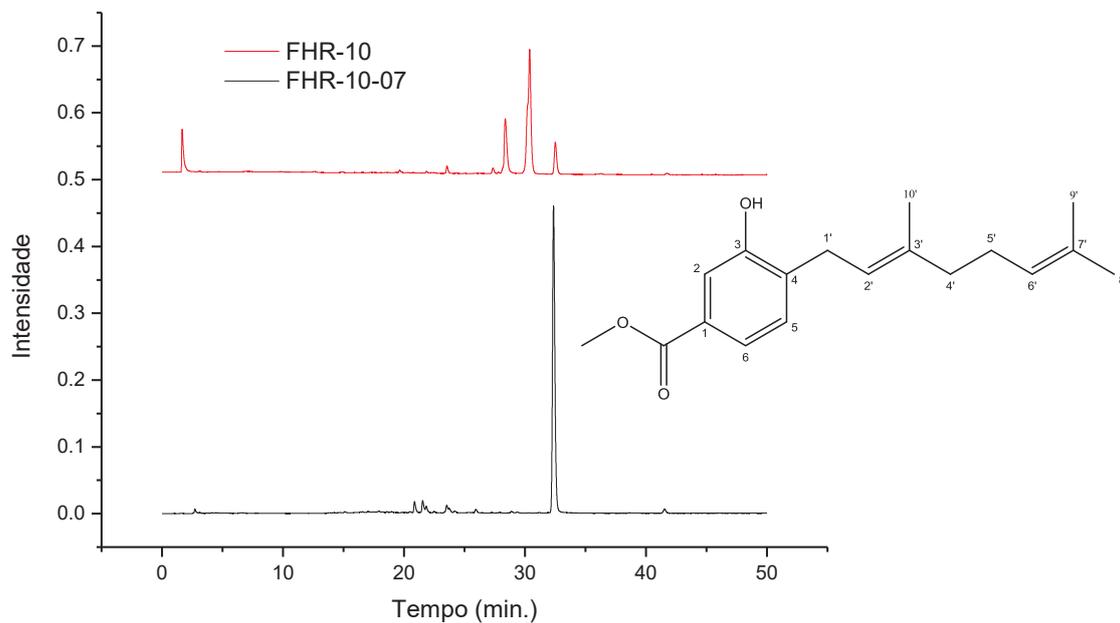


FONTE: A autora (2023)

Com o propósito de confirmar o isolamento do composto, realizou-se uma análise por CLAE utilizando o mesmo método aplicado aos extratos mencionados no

item 3.2.3. O cromatograma obtido encontra-se apresentado na FIGURA 51.

FIGURA 51 - CROMATOGRAMA OBTIDO DA SUBSTÂNCIA 5, (*E*)-4-(3',7'-DIMETILOCTA-2',6'-DIEN-1-IL)-3-HIDROXIBENZOATO DE METILA ($\lambda=254$ nm)

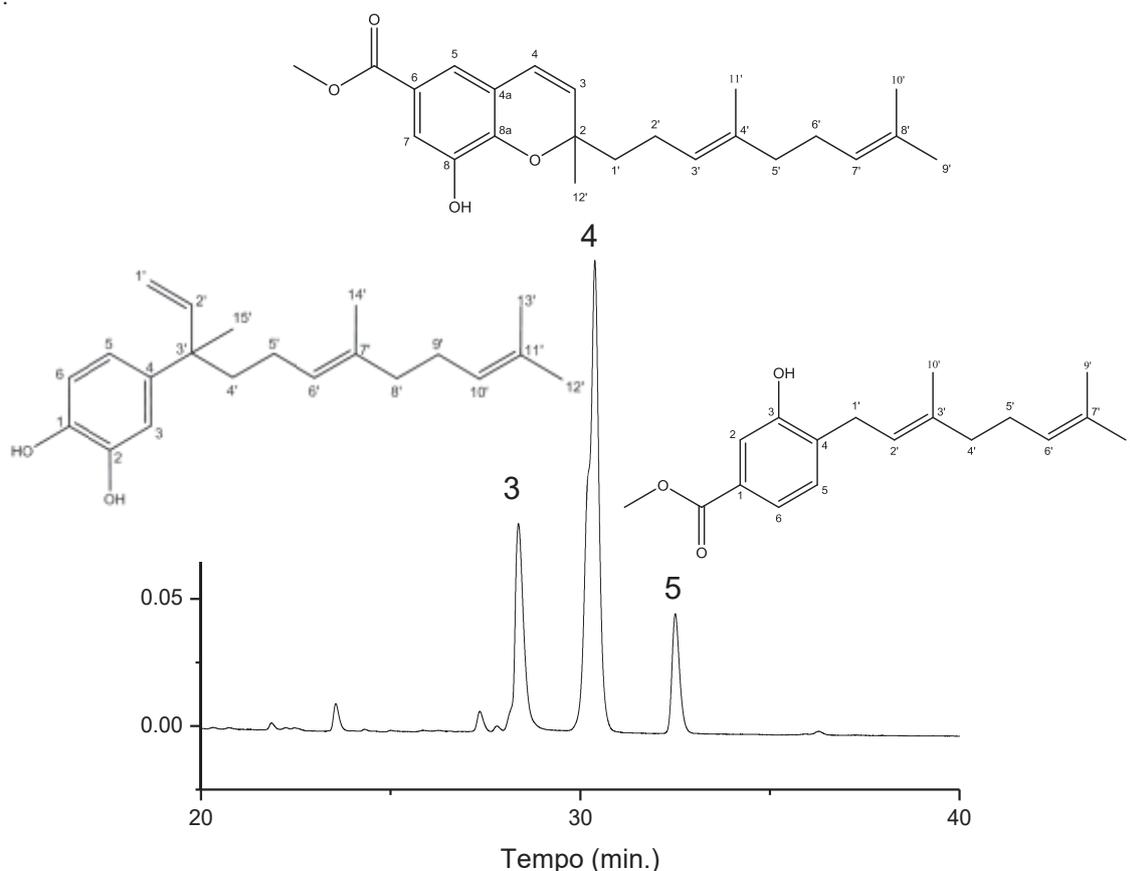


FONTE: A autora (2024)

O composto (*E*)-4-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1-il)-3-hidroxi benzoato de metila foi previamente relatado nos estudos de Tsuda e colaboradores (1999), onde foi isolado e identificado no extrato da bactéria *Nocardia brasiliensis*. Essa bactéria é conhecida por causar infecções, principalmente pulmonares, embora possa afetar outros órgãos. É também associada a uma doença cutânea bastante comum, geralmente tratada com antibióticos. Não há evidências na literatura que indiquem a sobrevivência dessa bactéria após os processos de extração descritos neste estudo, o que descarta a possibilidade de contaminação.

Conforme mencionado no item 3.2.3, foram coletadas sete amostras em diferentes tempos de retenção. No entanto, foi possível identificar apenas três dessas amostras, correspondentes aos tempos de 28,37; 30,38 e 32,50 minutos (FIGURA 52).

FIGURA 52 – CROMATOGRAMA AMPLIADO NA REGIÃO DE 20 A 40 MIN. DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS, JUNTAMENTE COM SUAS ESTRUTURAS ($\lambda=254$ nm)

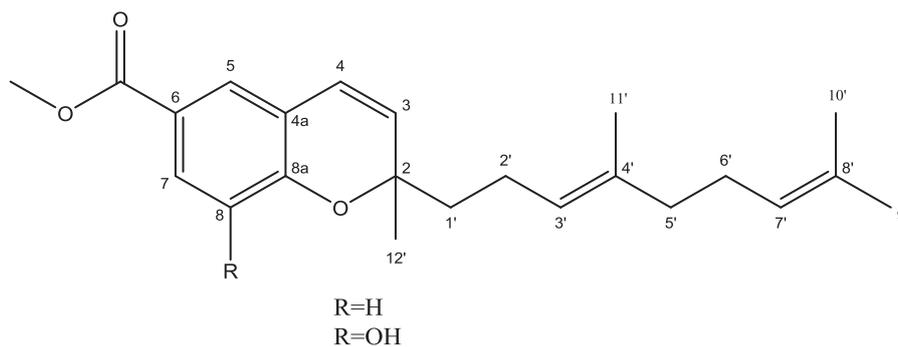


FONTE: A autora (2024)

Essas substâncias apresentam tempos de retenção muito próximos, sugerindo que foram eluídas em condições semelhantes, neste caso, a quase 100% de acetonitrila. No entanto, é possível notar diferenças em suas funções químicas e estruturas, que influenciaram a maneira como interagiram com a fase móvel e seu tempo de retenção.

Nesse contexto, é relevante discutir a semelhança entre as substâncias **2** e **4** (FIGURA 53). As estruturas diferem no substituinte do C-8, o que resulta em um valor de deslocamento químico maior para a substância **4** em relação à substância **2**. Essa diferença influencia o deslocamento químico do ^{13}C de maneira semelhante ao efeito observado no ^1H . Isso ocorre devido à eletronegatividade do ligante, que provoca um efeito de desblindagem na RMN tanto do carbono quanto do hidrogênio. O deslocamento no ^{13}C é mais pronunciado do que no ^1H porque o átomo eletronegativo está diretamente ligado ao ^{13}C por uma ligação simples. No caso dos prótons, os átomos eletronegativos estão conectados ao carbono e não diretamente ao hidrogênio, fazendo com que o efeito seja transmitido por duas ligações (H-C-X) em vez de apenas uma (PAVIA, 2010).

FIGURA 53 - ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 2 E 4.

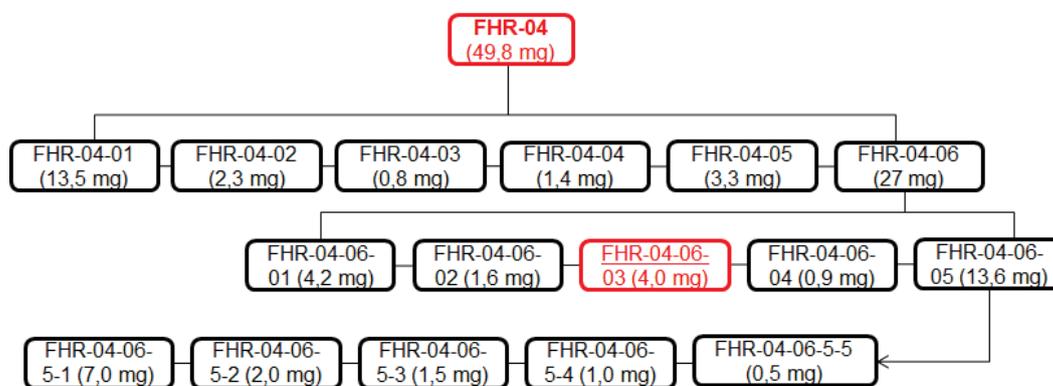


FONTE: A autora (2024)

4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 6

A substância **6** foi isolada na fração FHR-04-06-03 (4,0 mg), oriunda da fração FHR-04 (FLUXOGRAMA 4) trata-se do composto (*E*)-nerolidol (FIGURA 54) um sólido marrom claro. Através das análises dos espectros de RMN 1D e 2D foi possível propor a estrutura. Os dados do RMN de ^1H e ^{13}C da substância **6** estão na TABELA 10.

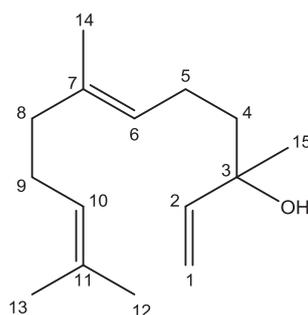
FLUXOGRAMA 4- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SUBSTÂNCIA 6



NOTA: Em vermelho fração inicial e em vermelho sublinhado fração identificada.

FONTE: A autora (2024)

FIGURA 54 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A SUBSTÂNCIA 6 ((E)-NEROLIDOL)



FONTE: A autora (2024)

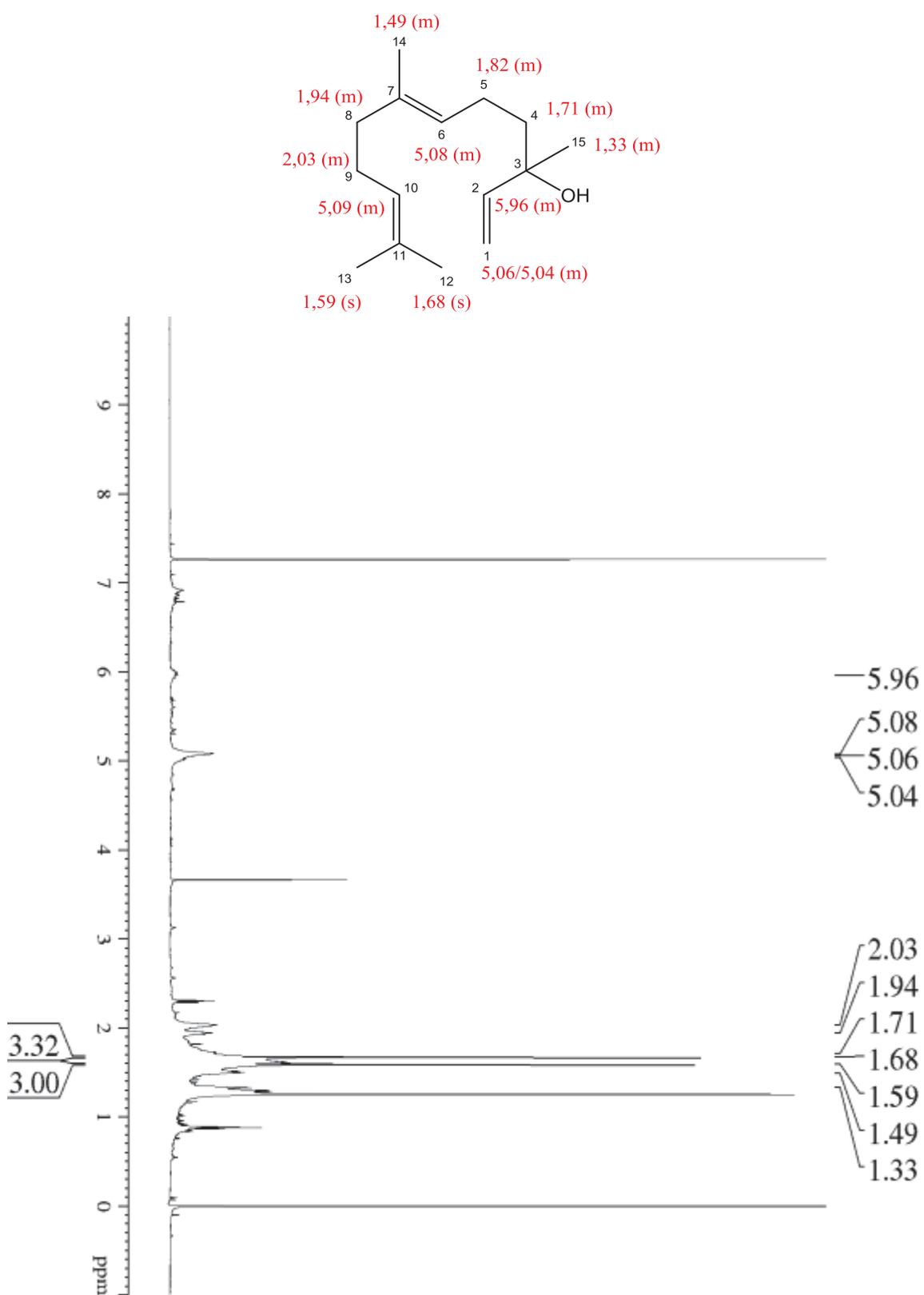
TABELA 10 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C , CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC), CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (HMBC) DA SUBSTÂNCIA 6.

SUBSTÂNCIA 6				
FHR-04-06-03			HMBC	*LITERATURA
Nº	^1H	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$	($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	$^1\text{J}_{\text{H-C}}$
1	5,06 e 5,04 (2H, m)	111,1	2, 3	111,5
2	5,96 (1H, m)	146,9	1, 4	144,9
3	-	75,2	-	73,0
4	1,71 (2H, m)	41,2	2, 4	41,9
5	1,82 (2H, m)	23,2	6, 7	22,6
6	5,08 (1H, m)	124,3	14	124,1
7	-	134,1	-	134,6
8	1,94 (2H, m)	39,8	6, 7, 9, 10	39,5
9	2,03 (2H, m)	26,8	7, 8, 10, 11	26,4
10	5,09 (1H, m)	124,4	9, 12, 13	124,1
11	-	130,3	-	130,8
12	1,68 (3H, s)	25,8	11, 13	25,4
13	1,59 (3H, s)	17,7	11, 12	17,3
14	1,49 (3H, m)	15,9	6, 7, 8	15,7
15	1,33 (3H, m)	25,1	2, 4	27,4

NOTA: Experimento realizado a 600,13 MHz para ^1H e HMBC e, 150,90 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .

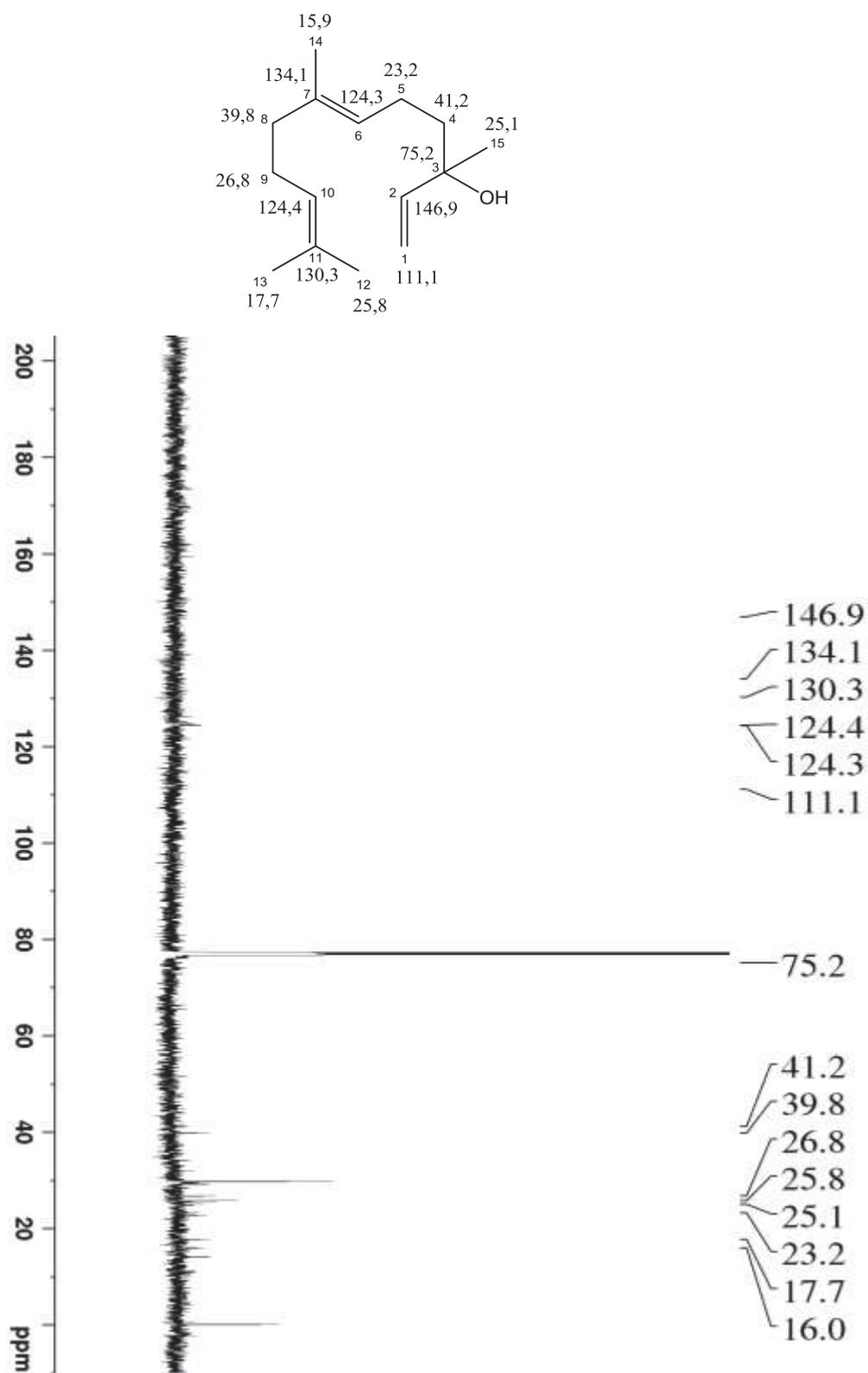
*MACHADO et al., (1998). FONTE: A autora (2024)

O espectro de RMN de ^1H da substância 6 (FIGURA 55) apresenta sinais característicos de hidrogênios de grupos metílicos em δ 1,68, 1,59, 1,49 e 1,33 ppm, correspondentes a H-12', H-13', H-14', H-15', respectivamente. A estrutura sugerida apresenta uma ligação dupla terminal, evidenciado pelo acoplamento geminal entre os átomos H-1 em δ 5,05 e 5,04 ppm, além do acoplamento vicinal destes com o H-2 detectado em δ 5,96 ppm. No entanto, não foi possível determinar os valores exatos das constantes de acoplamento.

FIGURA 55 - ESPECTRO DE RMN 1H DESACOPLADO (600,13 MHz, CDCl₃) DA SUBSTÂNCIA 6

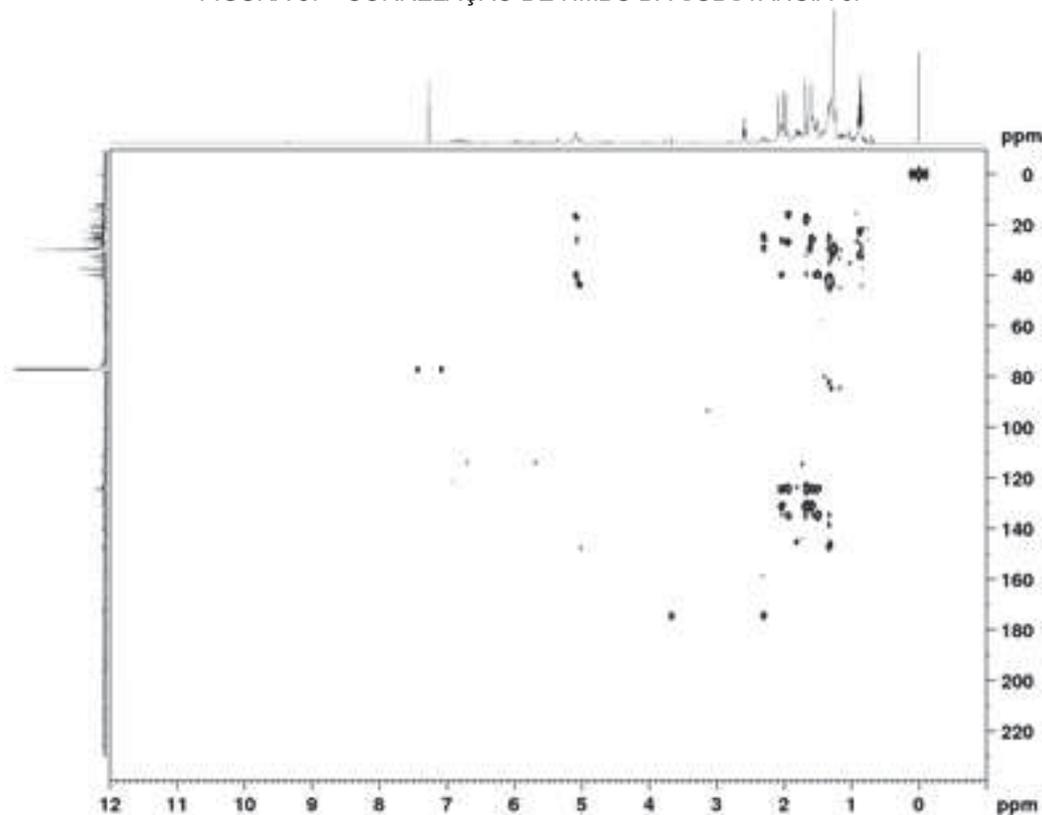
FONTE: A autora (2024)

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 56), foram identificados 15 átomos de carbono. Os sinais δ 111,1 e δ 146,9, δ 124,3, δ 134,1, δ 124,4 e δ 130,3 ppm correspondem a carbonos envolvidos em ligações duplas. Seus deslocamentos são influenciados pelos efeitos de hibridização e anisotropia. Devido à natureza da ligação C-H sp^2 , o carbono possui maior caráter s (33% s) tornando-o mais eletronegativo em comparação a um carbono sp^3 (25% s). Além disso, o efeito anisotrópico reduz a blindagem dos hidrogênios ligados às ligações duplas, justificando seus deslocamentos químicos (PAVIA, 2010). Esses carbonos tiveram seus posicionamentos inferidos pelos dados observados nos espectros de HMBC (TABELA 10, FIGURA 57).

FIGURA 56 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DESACOPLADO (150,90 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 6.

FONTE: A autora (2024)

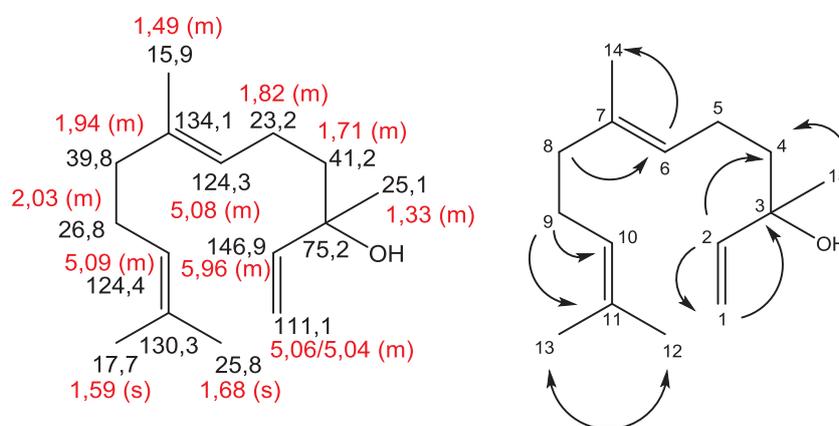
FIGURA 57 - CORRELAÇÃO DE HMBC DA SUBSTÂNCIA 6.



FONTE: A autora (2024)

Assim, foi possível propor uma estrutura para a fração FHR-04-06-03 (FIGURA 58) com base em comparações com a literatura. Neste caso, com o estudo realizado por Machado e colaboradores (1998), sendo identificado o isômero *E* no óleo essencial de uma amostra de *Siparuna guianensis* Aublet coletada na floresta amazônica, no Brasil.

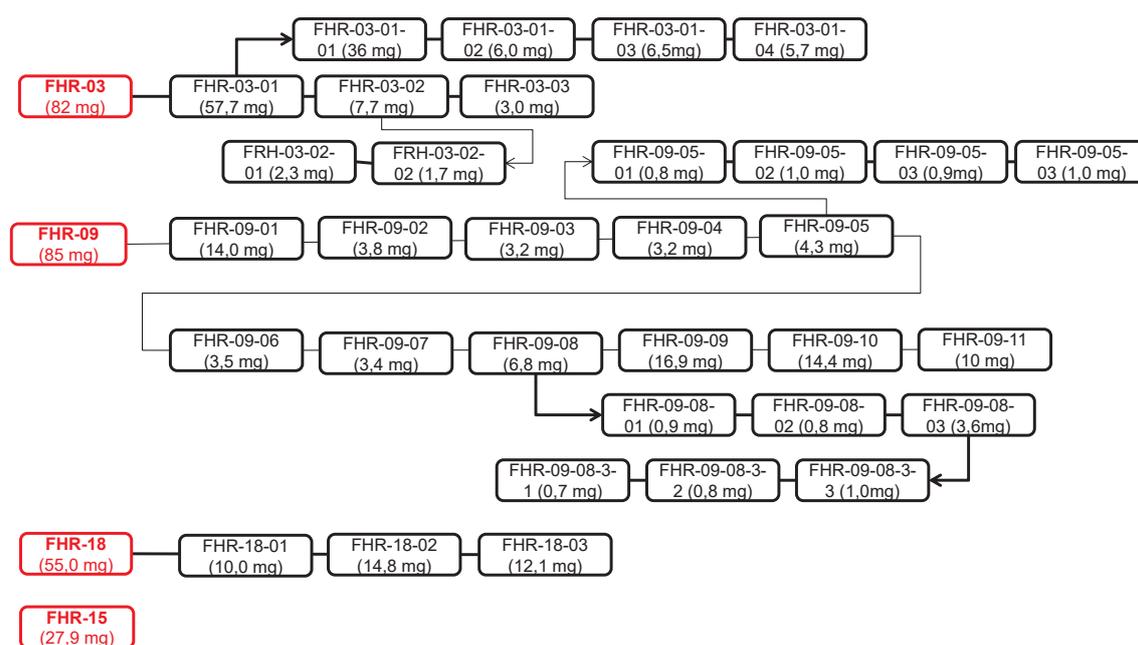
FIGURA 58 - EM (A) ESTRUTURA COM SEUS RESPECTIVOS CARBONOS (PRETO) E HIDROGÊNIOS (VERMELHO). EM (B) AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELOS EXPERIMENTOS DE HMBC (SETAS PRETAS) PARA A SUBSTÂNCIA 6.



FONTE: A autora (2024)

Ag(l), que estão incorporados na fase estacionária, seguem prioridades específicas. Esse mecanismo tem demonstrado ser altamente eficaz na separação desses compostos. (ANDREÃO et al., 2010; SHERMA, 2008). Foi utilizado como fase móvel hexano:acetona (50:50) e as placas foram eluídas por duas vezes. Resultou em duas frações: FHR-18-2 e FHR-18-3. No entanto, não foi possível dar continuidade para a identificação de ambas pelo mesmo motivo citado acima (FLUXOGRAMA 5).

FLUXOGRAMA 5 – FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES FHR-03, FHR-09, FHR-15 E FHR-18.



NOTA: Em vermelho fração de partida.

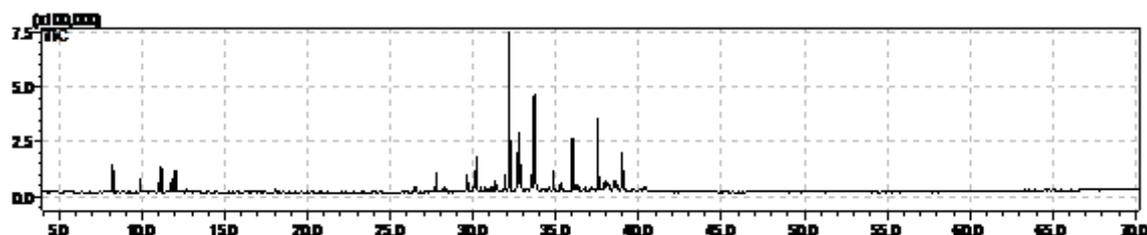
FONTE: A autora (2025).

4.7 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *P. aff. divaricatum*.

As extrações foram realizadas com os três órgãos vegetativos da espécie (folhas, galhos e raízes), porém apenas as folhas apresentaram óleo essencial em quantidade (0,13%). O rendimento das extrações dos óleos essenciais foi calculado com base na massa do óleo essencial em relação à massa total das folhas utilizadas na extração (100 g).

O cromatograma resultante da análise por CG-EM do óleo essencial de das folhas de *P. aff. divaricatum* está representado na FIGURA 60, e os nomes dos principais constituintes identificados incluindo seus respectivos índices aritméticos e porcentagens, estão na TABELA 11.

FIGURA 60 - CROMTOGRAMA OBTIDO POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *P. aff. divaricatum*.



FONTE: A autora (2021)

TABELA 11 - ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *P. aff. divaricatum*

IA CAL	IA ADAMS	Média (%)	DP	Compostos	Classe
933	932	1,65	0,31	α -pineno	monoterpeno
979	974	1,08	0,01	β -pineno	monoterpeno
989	988	0,23	0,14	mirreno	monoterpeno
1007	1002	0,89	0,11	α -felandreno	monoterpeno
1010	1008	2,22	0,14	3- δ -careno	monoterpeno
1024	1020	1,14	0,05	ρ -cimeno	monoterpeno
1029	1024	1,80	0,06	limoneno	monoterpeno
1031	1025	0,43	0,30	β -felandreno	monoterpeno
1045	1044	0,41	0,13	(E)- β -ocimeno	monoterpeno
1348	1348	0,63	0,11	α -cubebeno	sesquiterpeno
1377	1387	1,99	0,19	β -cubebeno	sesquiterpeno
1421	1417	2,19	0,17	(E)-cariofileno	sesquiterpeno
1432	1430	1,25	0,14	β -copaeno	sesquiterpeno
1434	1432	3,09	0,25	α-trans-bergamoteno	sesquiterpeno
1441	1439	0,40	0,09	aromadendreno	sesquiterpeno
1447	1442	0,40	0,10	6,9-guaiadieno	sesquiterpeno
1451	1448	0,21	0,05	cis-muurola-3,5-dieno	sesquiterpeno
1457	1452	0,40	0,05	α -humuleno	sesquiterpeno
1462	1458	0,45	0,06	allo-aromadendreno	sesquiterpeno
1477	1478	1,47	0,13	γ -muuroleno	sesquiterpeno
1483	1480	16,30	0,97	germacreno D	sesquiterpeno
1494	1495	4,04	0,72	asaricina	arilpropanoide
1497	1500	6,13	0,58	biclogermacreno	sesquiterpeno
1508	1505	0,30	0,03	(E,E)- α -farneseno	sesquiterpeno
1515	1513	1,80	0,18	γ -cadineno	sesquiterpeno
1520	1517	8,94	0,21	miristicina	arilpropanoide
1523	1521	0,42	0,05	trans-calameneno	sesquiterpeno
1534	1533	0,34	0,04	trans-cadina-1,4-dieno	sesquiterpeno

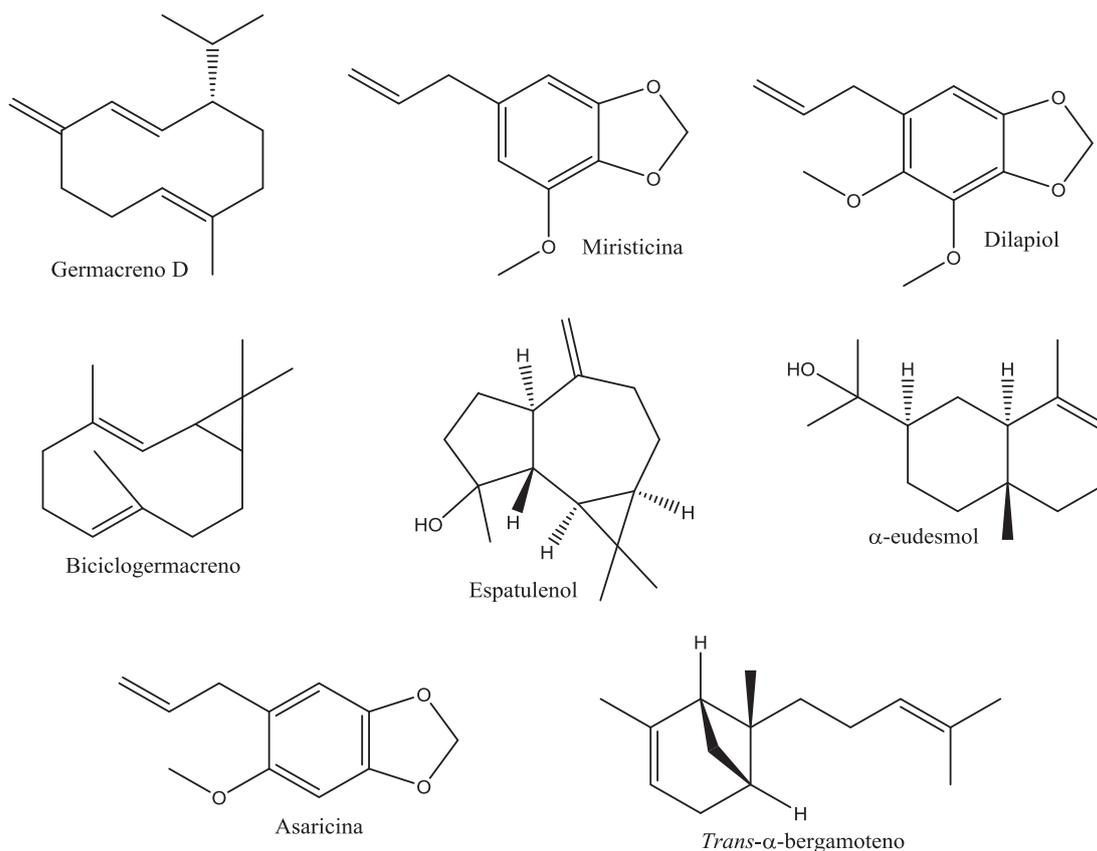
Continua

1539	1537	0,27	0,06	α -cadineno	sesquiterpeno
1543	1544	0,55	0,07	α -calacoreno	sesquiterpeno
1549	1548	1,99	0,38	elemol	Sesquiterpeno oxigenado
1579	1577	5,54	0,41	espatulenol	Sesquiterpeno oxigenado
1619	1620	7,23	0,81	dilapiol	arilpropanoide
1635	1630	1,38	0,38	γ -eudesmol	Sesquiterpeno oxigenado
1646	1640	1,41	0,14	<i>epi</i> - α -muurolol	Sesquiterpeno oxigenado
1649	1644	0,74	0,32	α -muurolol	Sesquiterpeno oxigenado
1658	1652	4,97	0,90	α-eudesmol	Sesquiterpeno oxigenado
1692	1687	0,33	0,03	eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol	Sesquiterpeno oxigenado
Classe dos compostos					
Monoterpenos		9,85			
Sesquiterpenos		38,59			
Sesquiterpenos oxigenados		16,36			
Arilpropanoide		20,21			
Total		85,01			

NOTA: ^a Índice aritmético calculado, ^b Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2007). DP - Desvio padrão. *Compostos majoritários encontram-se em negrito. FONTE: A autora (2021).

Pela análise CG-EM identificou-se 38 constituintes perfazendo a maior parte da composição do óleo (85,01%). O óleo essencial revelou ser constituído predominantemente por sesquiterpenos (38,59%), seguido de arilpropanoide (20,21%), sesquiterpenos oxigenados (16,36%) e em menor proporção monoterpenos (9,85%).

Os compostos majoritários identificados foram germacreno D (16,30%), miristicina (8,94%), dilapiol (7,23%), biclogermacreno (6,13%), espatulenol (5,54%), α -eudesmol (4,97%), asaricina (4,04%) e *trans*- α -bergamoteno (3,09%) (FIGURA 61). Os demais constituintes ocorrem em menores concentrações.

FIGURA 61 - COMPONENTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. aff. divaricatum*

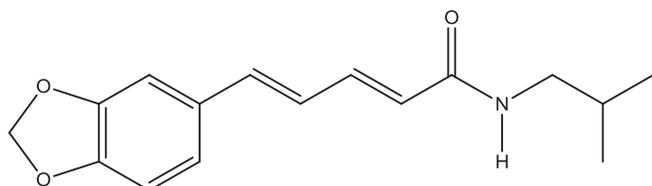
FONTE: A autora (2021).

Em comparação com *Piper divaricatum*, os principais compostos descritos na literatura foram os arilpropanoides metileugenol e eugenol, metabólitos secundários frequentemente identificados nos óleos essenciais dessa espécie. Essas substâncias têm sido associadas a diversas atividades biológicas, como ações antibacteriana, antioxidante e antifúngica (CORPES, 2019; OLIVEIRA et al., 2019; MEIRELES et al., 2016; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2010). No entanto, outro exemplar de *P. divaricatum* apresentou óleo essencial das folhas com alto teor de safrol, indicando a possível existência de um quimiotipo distinto. Esse óleo demonstrou atividade positiva contra bactérias gram-negativas (BARBOSA et al., 2012). Além disso, Vilhena et al. (2019) relataram o uso do óleo como agente anestésico na sedação de peixes, enquanto Jaramillo-Colorado et al. (2019) evidenciaram seu forte potencial herbicida contra *Lolium perene*.

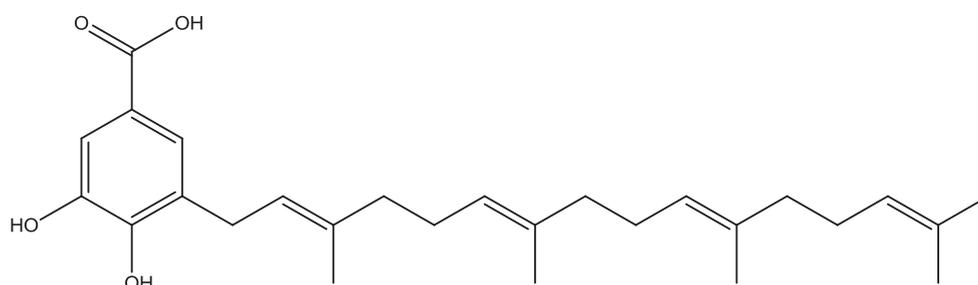
Há poucos relatos de estudos fitoquímicos e biológicos com extratos brutos de *P. divaricatum*. Três substâncias foram isoladas por Chaves (2018) dos extratos hex:AcOEt das raízes: piperlonguminina, cujo nome químico é (2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)-*N*-(2-metilpropil)-2,4-pentadienamida, o ácido 5-(2'*E*,6'*E*,10'*E*)-

3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'tetraenil)-3,4-dihidroxi benzoico e ácido 5-(2'E,6'Z,10'E)-7'-(hidroximetil)-3',11',15',-trimetil-hexadeca-2',6',10',14'-tetraenil)-3,4-dihidroxi benzoico (FIGURA 62).

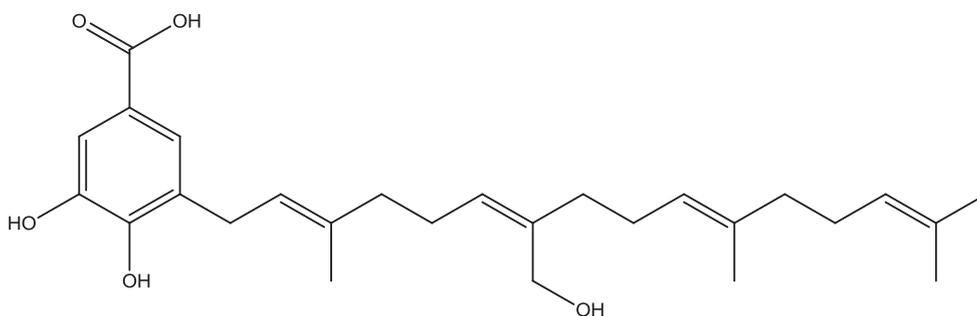
FIGURA 62 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS ORIUNDOS DO EXTRATO DE *P. divaricatum*



(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5il)-N-(2-metilpropil)-2,4-pentadienamida



Ácido 5-(2'E,6'E,10'E)-3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'tetraenil)-3,4-dihidroxi benzoico



Ácido 5-(2'E,6'Z,10'E)-7'-(hidroximetil)-3',11',15',-trimetil-hexadeca-2',6',10',14'-tetraenil)-3,4-dihidroxi benzoico

A composição do óleo essencial, embora forneça informações relevantes sobre os metabólitos voláteis presentes em uma espécie não são suficientes, por si só, para a diferenciação precisa entre espécies do gênero *Piper*. Por outro lado, os extratos brutos, obtidos por solventes orgânicos, apresentam uma variedade mais ampla de compostos, incluindo metabólitos polares e não voláteis, como alcaloides, flavonoides e amidas. Essa característica os torna mais adequados para estudos quimiotaxonômicos, como apontado por Facundo et al. (2008).

4.8 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS BIOLÓGICOS

A análise antibacteriana dos extratos e óleo essencial de *P. aff. divaricatum* mostrou atividade promissora para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, conforme mostrado na TABELA 12. Foram inativos para os microrganismos *B. subtilis*, *S. choterasuis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* até a concentração de 2,0 mg mL⁻¹.

TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (CIM – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CBM – CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA) PARA OS EXTRATOS DE *P. aff. divaricatum*.

Amostras	CIM mg mL ⁻¹		
	Microrganismos		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Folhas - Hexano	0,500	1,000	0,500
Folhas - Acetato de Etila	0,062	0,500	0,250
Folhas - Metanol	*	*	*
Galhos - Hexano	0,062	0,500	0,031
Galhos - Acetato de Etila	0,031	0,250	0,250
Galhos - Metanol	0,062	0,500	0,500
Raízes - Hexano	0,015	0,062	0,031
Raízes - Acetato de Etila	0,015	0,031	0,031
Raízes - Metanol	0,125	2,000	0,500
Óleo Essencial	0,125	0,500	0,500
Cloranfenicol/nistatina	0,008	0,008	0,004
Amostras	CBM mg mL ⁻¹		
Folhas - Hexano	0,500	*	2,000
Folhas - Acetato de Etila	0,050	2,000	0,250
Folhas - Metanol	*	*	*
Galhos - Hexano	0,062	2,000	0,250
Galhos - Acetato de Etila	0,062	1,000	0,031
Galhos - Metanol	0,062	0,500	0,250
Raízes - Hexano	0,015	0,062	0,031
Raízes - Acetato de Etila	0,015	0,031	0,031
Raízes - Metanol	0,125	2,000	0,500
Óleo Essencial	0,125	1,000	1,000

NOTA: CBM e CIM >2,0 mg mL⁻¹; *amostras não apresentaram atividades.
 FONTE: A autora (2021).

Segundo Duarte (2006) pode ser considerado promissores e demonstram atividade antimicrobiana quando a CIM é até 500 µg mL⁻¹ forte inibição, valores entre 600 e 1500 µg mL⁻¹ é moderada, e acima de 1600 µg mL⁻¹ é fraca inibição.

Pode ser observado que o maior efeito exercido sobre os microrganismos, conseqüentemente a menor concentração para a inibição completa do crescimento

dos organismos, foi frente à bactéria Gram-positiva *S. aureus* (TABELA 12). Em concentrações menores como 0,500 mg mL⁻¹ do extrato em hexano – folhas e, 0,015 mg mL⁻¹ para os extratos em hexano e acetato de etila – raízes, ocorreu a ação inibitória mínima, destacando assim a atividade bactericida do extrato e do OE de *P. aff. divaricatum*.

Com relação à concentração bactericida mínima (CBM) novamente *S. aureus* apresentou inibição com a menor concentração, sendo de 0,015 mg mL⁻¹ nos extratos de hexano e acetato de etila – raízes.

É possível observar que *S. aureus* teve a maior inibição e com os menores teores de concentrações, se mostrando mais sensível frente aos extratos e OE testados.

As frações do extrato de raízes em hexano foram submetidas a ensaios de atividade antimicrobiana (TABELA 13) e se mostraram promissoras. Para *B. subtilis* e *P. aeruginosa* foram inativas até a concentração de 2,0 mg mL⁻¹.

TABELA 13 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CIM E CBM PARA AS FRAÇÕES FHR-10, FHR-13 E FHR-14 DO EXTRATO DAS RAÍZES EM HEXANO DE *P. aff. divaricatum*.

Amostras	CIM mg mL ⁻¹					
	Microrganismos					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermides</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	
FHR-10	0,015	0,125	0,50	0,0078	*	
FHR-13	0,0078	0,125	1,00	0,0620	*	
FHR-14	0,031	2,00	2,00	*	2,00	
Cloranfenicol/ nistatina	0,008	0,008	0,004	0,002	0,004	
	CBM mg mL ⁻¹					
	FHR-10	*	*	1,00	0,0078	*
	FHR-13	*	*	2,00	0,0620	*
	FHR-14	*	*	*	*	*

NOTA: CBM e CIM >2,0 mg mL⁻¹, *amostras não apresentaram atividades.

FONTE: A autora (2021).

As frações FHR-10, FHR-13 e FHR-14 mostraram-se eficientes na inibição ao crescimento frente à espécie de bactéria Gram-positiva *S. aureus* (0,015 e 0,0078 e 0,031 mg mL⁻¹, respectivamente). No entanto, apenas a fração FHR-14 foi seletiva na inibição desse microrganismo. Observou-se forte inibição de *C. albicans* nos testes com as frações FHR-10 e FHR-13. Estas frações são muito promissoras para o controle desses dois microrganismos, com valores de CIM próximos ao controle.

Considerando a CBM e CFM, somente a Gram-negativa *E. coli* e a levedura *C. albicans* apresentaram inibição, sendo as menores concentrações para a levedura *C. albicans* (0,0078 e 0,00620 mg mL⁻¹).

Cabe destacar a importância das frações resultantes do extrato bruto das raízes em hexano e inibições observadas. Em alguns casos a inibição ocorreu em concentrações menores, exemplo a fração FHR-13 ($0,0078 \text{ mg mL}^{-1}$) e, em outros casos foram muito similares quando comparadas com o extrato bruto. As frações conseguiram inibir um número maior de microrganismos quando comparados ao extrato bruto, no entanto, apenas dois microrganismos, *E. coli* e *C. albicans* apresentaram CBM e CFM.

Estudos envolvendo óleos essenciais e extratos brutos de espécies do gênero *Piper* têm apresentado resultados promissores, evidenciando ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, corroborando com os resultados obtidos. Tal feito foi observado, por exemplo, nos óleos essenciais e extratos de folhas de *P.abutilodes*, *P. aduncum*, *P. marginatum*, *P.molicomum*, *P. rivinoides* Kunth, *P. tuberculatum* e *P. regnellii* (BASTOS, et al., 2023; LEAL et al., 2019; LIMA et al., 2018; DA SILVA, et al., 2017; PESSINI et al., 2003; FIGUEIRA et al., 2003).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A análise dos perfis químicos dos extratos das folhas, galhos e raízes em hexano, acetato de etila e metanol foram feitos utilizando a técnica de CLAE. Podem ser observadas diferenças em relação ao solvente extrator e o órgão vegetativo e pelas análises quimiométricas (ACP) foi possível observar os sinais responsáveis pela influência nos extratos.

O estudo do extrato de raízes em hexano resultou em seis substâncias identificadas entre elas, destacam-se dois meroterpenoides, (*E*)-2-(4',8'-dimetilnona-3',7'-dien-1-il)-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila (substância 2) e (*E*)-2-(4',8'-dimetilnona-3',7'-dien-1-il)-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila (substância 4), ambos descritos pela primeira vez na literatura. Além disso, foram encontrados dois derivados de ácido benzoico, 4-nerolidilcatecol (substância 3) e (*E*)-4-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dien-1-il)-3-hidroxibenzoato de metila (substância 5), bem como um arilpropanoide, a asaricina (substância 1), e um sesquiterpeno acíclico oxigenado, o (*E*) nerolidol (substância 6).

Na atividade antimicrobiana, os resultados foram excelentes para o extrato hexânico de raízes, considerando a concentração utilizada para a inibição dos microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. As frações desse extrato também foram muito ativas para os mesmos microrganismos, além dos já citados, para *C. albicans* e *Salmonella choleraesuis*, havendo inibição com alguns teores inferiores ao extrato bruto.

No óleo essencial foram identificados 38 constituintes perfazendo a maior parte da sua composição (85,01%). O óleo essencial revelou ser constituído predominantemente por sesquiterpenos, seguido de arilpropanoides, sesquiterpenos oxigenados e em menor proporção monoterpenos.

Os compostos majoritários identificados foram germacreno D, miristicina, dilapiol, biciclogermacreno, espatulenol, asaricina, α -eudesmol e *trans*- α -bergamoteno. Desta maneira, tendo em vista os resultados apresentados quanto suas atividades biológicas, a continuidade desde estudo é de grande importância e apresenta um enorme potencial de descobrimento de substâncias bioativas.

6 REFERÊNCIA

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography, Mass Spectroscopy**. 4.1th ed. Alfred Publishing Corporation, p. 804, 2007.
- ANDREÃO, P. S. S.; GIACOMINI, R. A.; STUMBO, A. M.; WALDMAN, W. R.; BRAZ-FILHO, R. Utilização e recuperação de sílica gel impregnada com nitrato de prata. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 212-215, 2010.
- AMPOFO, S.; ROUSSIS, V.; WIEMER, D. F. New Prenylated Phenolics from *Piper auritum*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8. p. 2367-2370, 1987.
- BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.51, p. 899-902, 1999.
- BARBOSA, Q. P.S; CÂMARA, C. A. G. da; RAMOS, C. S. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1806-1808, 2012.
- BASTOS, J. S. F.; FONSECA, A. S.DA.; FERNANDES, C. DE F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ZULIANI, J. P. Gênero *Piper*: aspectos botânicos, químicos e biológicos de suas espécies. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. Ed. 12, v. 3, p. 127-159, 2023.
- BATISTA JR, J. M.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LÓPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 6051–6054, 2012.
- BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. de S; SCOTT, M. T.; VIEIRA, P.C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.
- BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.
- BRAGA, A. G. S.; SOUZA, K. F. A.; BARBIERI, F. S.; FERNANDES, C. F.; ROCHA, R. B.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; LACERDA, C. L.; CELESTINO, C. O.; FACUNDO, V. A.; BRITO, L. G. Acaricidal activity of extracts from different structures of *Piper tuberculatum* against larvae and adults of *Rhipicephalus microplus*. **Acta Amazonica**, v. 48, p. 57-62, 2018.
- BRANQUINHO, L.S.; SANTOS, J. A.; CARDOSO, C. A. L.; MOTA, J. da S.; LANZA JUNIOR, U.; KASSUYA, C. A. L.; ARENA, A. C. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 372-378, 2017.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade**. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-ebiomas/biodiversidade1>. Acesso em: jan. 2025.

CASAPULA, I. **Caracterização química de óleos essenciais de *Piper* e avaliação de suas atividades contra o fitopatógeno do morango *Botrytis cinerea***. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, Curitiba, 2018.

CARNEIRO, J. N. P.; CRUZ, R. P. da; CAMPINA, F. F.; COSTA, M. D. S.; SANTOS, A. T. L. dos; SALES, D. L.; BEZERRA, C. F.; SILVA, L.E. da; ARAUJO, J.P. de; AMARAL, W. do; REBELO, R. A.; BEGNINI, I. M.; LIMA, L. F. de.; MELO, C. H. D.; BEZERRA, M. B. M. F. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. Essential oil. **Food Chemical Toxicology Journal**, n. 135, p. 1-8, 2020.

CHAVES, J. H. **Contribuição ao estudo químico de *Piper divaricatum* e *Schinus terebinthifolius***. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, Fortaleza, 2018.

CHEN, Y.; LOMANA, M. G. de.; FRIEDRICH, N. O.; KIRCHMAIR, J. Characterization of the Chemical Space of Known and Readily Obtainable Natural Products. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, p. 1518–1532, 2018.

COLL, J. C.; BOWDEN, B. F. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 934–936, 1986.

CORDOVA, S. M. de.; BENFATTI, C. S.; MAGINA, M. D. A.; GUEES, A. CORDOVA, C. M. M. de. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 4, p. 241-244, 2010.

CORPES, R.; MONTEIRO, L.; ANDRADE, E.H.; MAIA, J. G.; MENEZES, I.; SETZER, W. N.; RAMOS, A. R.; SILVA, J. K. R. da. Comparison of volatile profile and antioxidant activity of *Piper divaricatum* G. Meyer (Piperaceae) using cuttings and cell tissue. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2291-2298, 2019.

COSTA, Í. C.; AZEVEDO, S. G.; SANCHES, E. A.; FONSECA FILHO, H. D. da. Caracterização de nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de *Piper nigrum* por microscopia de força atômica. **Revista Matéria**, v.26, n.2, p 1-10, 2021.

COSTA, M.; DIAS, T. A.; BRITO, A.; PROENÇA, F. Biological importance of structurally diversified chromenes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 487-507, 2016.

Comission on nomenclature of organic chemistry. A guide to IUPAC, nomenclature of compounds, Ed. Internacional union of pure and applied chemistry organic chemistry division, p. 166, 1993.

CLSI. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada** – Sexta Edição. Norma M7-A6, v. 23, 2005.

DA SILVA, M. A.; PASSARINI, G. M.; MARTINEZ, L. DO N.; FACUNDO, V. A.; TELES, C. G. B.; KUEHN, C. C. Chemical constituents and bioactivities of essential oils from plants of the genus *Piper l.* (piperaceae): a review. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**. v. 6, n. 2, p. 776-817, 2019.

DA SILVA, J. K.; TRINDADE, R. DA; ALVES, N. S.; FIGUEIREDO, P. L.; MAIA, J. G. S.; SETZER, W. Essential Oils from Neotropical *Piper* Species and Their Biological Activities. Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2571, 2017.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 2 ed, p.514, 2009.

DORLA, E.; GAUVIN-BIALECKI, DEUSCHER, Z.; ALLIBERT, A.; GRONDIN, I.; DEGUINE, J. P.; LAURENT, P. Insecticidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Peperomia borbonensis* Miq. (Piperaceae) and Its Major Components against the Melon Fly *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, p. 1-9, 2017.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, v. 7, 2006.

EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/manual-de-producao-editorial/nomes-cientificos-e-comuns>. Acesso em: fev. 2023.

FACUNDO, V.A.; POLLI, A.R.; RODRIGUES, R.V.; MILITÃO, J.S.L.T.; STABELLI, R.G.; CARDOSO, C.T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazonica**, v. 38, n.4, p. 743–748, 2008.

FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; SILVA, C. A. L.; DELARMELENA, C. Atividade antimicrobiana do extrato e do óleo essencial de *Piper* spp cultivadas na coleção de germoplasmas do CPQBA-Unicamp. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p.403, 2003.

GAIA J.M.D.; MOTA M.G.C.; DERBYSHIRE M.T.V.C; OLIVEIRA V.R.; COSTA M.R.; MARTINS C.S.; POLTRONIERI M.C. Caracterização de acessos de pimenta-do-reino com base em sistemas enzimáticos. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n.3, p. 333-342, 2007.

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

GONG, F.; LIANG, Y.; XIE, P.; CHAU, F. Information theory applied to chromatographic *fingerprint* of herbal medicine for quality control. **Journal of Chromatography A**, V. 1002, p.25-40, 2003.

Global Biodiversity Information Center (GBIF). Disponível em: <https://www.gbif.org/> Acesso em fev.2025.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from *Piper*: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 163-193, 2013.

GUIMARÃES, E.F.; CARVALHO-SILVA, M.; MEDEIROS, E.V.S.S.; MONTEIRO, D.; QUEIROZ, G.A. 2020. *Piperaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB190>>. Acesso em: 06 jan. 2024.

HASTUTI, U. S.; UMMAH, Y.P. I.; KHASANAH, H. N. Antifungal activity of *Piper aduncum* and *Peperomia pellucida* leaf ethanol extract against *Candida albicans*. **AIP Conference Proceedings**, v. 10, p. 1-8, 2017.

HEMATPOOR, A.; PAYDAR, M., LIEW, S. Y.; SIVASOTHY, Y.; MOHEBALI, N.; LOOI, C. Y.; WONG, W. F.; AZIRUM, M. S.; AWANG, K. Phenylpropanoids isolated from *Piper sarmentosum* Roxb. induce apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species and mitochondrial-dependent pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 210-218, 2018.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: early steps in biosynthesis of aromatic compounds. **Plant cell**, v. 7, p. 907–919, 1995.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic Relationships of the PerianthlessPiperaleae: Reconstructing the Evolution of Floral Development. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. 3, p. 403-416, 2004.

JARAMILLO-COLORADO, B. E.; PINO-BENITEZ, N.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Volatile composition and biocidal (antifeedant and phytotoxic) activity of the essential oils of four Piperaceae species from Choco-Colombia. **Industrial Crops & Products**, v. 138, 2019.

JUNIOR, M. S. B.; ESMERINO, L. A.; SILVA, R. Z. da.; VOLPATO, A. M. Efeitos da atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico da *Piper solmsianum* e *Equisetum arvense*. **Eletronic Journal of Pharmacy**, v. 13, n. 2, p. 100-106, 2016.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v.79, p. 529-538, 2007.

KIJOA, A.; GFFISBRECHT, A.M.; AKISSUE, M.K.; GOTTLIEB, A.R.; GOTTLIEB, H.E. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Médica**, v.39, p.85-87, 1980.

KRINSKI, D.; FOERTER, L. A.; DESCHAMPS, C. Efeito ovicida dos óleos essenciais de 18 brasileiros *Piper* espécie: controle *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidae) no estágio inicial de desenvolvimento. **Acta Scientiarum. Agronomia**, v.40, 2018.

LEAL, A. L. A. B.; MACHADO, A. J. T.; BEZERRA, C. F.; INÁCIO, C. E. S.; ROCHA, J. E.; SALES, D. L.; FREITAS, T. S. DE; ALMEIDA, W. DE O.; AMARAL, W. DO; DA SILVA, L. E.; FERRIANI, A. P.; MAIA, B. H. L. N. S.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; BARRETO, H. M.; COUTINHO, H. D. M. Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE). **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, p. 110559, 2019.

LIMA, E. S.; PINTO, A. C. S.; NOGUEIRA, K. L.; SILVA, L. F. R.; ALMEIDA, P. D. O. de.; VASCONCELLOS, M. C. de.; CHAVES, F. C.M.; TADEI, W. P.; POHLIT, A. M. Stability and Antioxidant Activity of Semi-synthetic Derivatives of 4-Nerolidylcatechol. **Molecules**, v. 18, p. 178-189, 2013.

LOPES, A. A.; BALDOQUI, D. C.; LÓPEZ, S. N.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 15, p. 2053-2058, 2007.

LORENZO, D.; LOAYZA, I.; LEIGUE, L.; FRIZZO, C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Asaricin, the Main Component of *Ocotea opifera* Mart. Essential Oil. **Natural Product Letters**, v. 15, n. 3, p. 163-170, 2000.

MACÊDO, C. G.; SOUSA, B. C. M.; FRAGA, S. S.; LOURIDO, K. A.; LUSTOSA, D. C.; SILVA, E. O.; CASTRO, K. C. F. Fitoquímica e atividade antifúngica do extrato de folhas de *Piper marginatum* no controle de fitopatógenos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 6, p. 70-77, 2018.

MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, V. A. F. A.; MILITÃO, J. S.; MORAIS, S. M.; MACHADO, M. I. L. Seasonal variation of (*E*)-Nerolidol in *Sipauna guianensis* Aublet and ¹³C-NMR spectral assignments of (*E*)- and (*Z*)-Nerolidol. **Journal of Essential Oil Research**, n. 10, p.708-710, 1998.

MARQUES, A. M.; BARRETO, A. L. S.; CURVELO, A. DA R.; ROMANOS, M. T. V.; SOARES, R. M. DE A.; KAPLAN, M. A. C. Antileishmanial activity of nerolidol-rich essential oil from *Piper claussenianum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n. 5, p. 908-914, 2011.

MARZZOCO, A. E TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MEIRELLES, G.; RUPPELT, B. M. **Revista Fitos**, v.17, n.4, p. 236-259, 2023.

MEIRELES, E.N; XAVIER, L. P.; RAMOS, A. R.; GUILHERME, J. M.S.; SETZER, W. N.; SILVA, K. da JR. Phenylpropanoids produced by *Piper divaricatum*, A resistant species to infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the pathogenic agent of Fusariosis in black Pepper. **Journal Plant Pathol Microbiol**, v. 7, n. 2, 2016.

MELO, E. G.; MEDONÇA, C. M. S. de; NUNES, L. E.; ARAUJO, I. D. R. de. Antimicrobial activity of the species *Azadirachta indica* A. Juss (indian Nim) – an integrative review. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, p. 2615-2636, 2022.

MGBEAHURUIKE, E. E.; YRJÖNEN, T.; VUORELA, H.; HOLM, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54-69. 2017.

MONTEIRO, D. Flora of the *canga* of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Piperaceae **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1285-1309, 2018.

MOURA, D. F.DE.; MARTINS, R. D.; DA SILVA, M. V. Nerolidol: Phytoconstituent of essential oils of Caatinga plants. **Brazilian Journal of Development**. v.5, n.12, p. 33402-33416, 2020.

MUGHAL, T. A.; ALI, S.; HASSAN, A.; KAZMI, S. A. R.; SALEEM, M. Z.; SHAKIR, H. A.; NAZER, S.; FAROOQ, M. A.; AWAN, M. Z.; KHAN, M. A.; ANDLEEB, S.; MUMTAZ, S.; TAHIR, H. M.; GULZAR, N. Phytochemical screening, antimicrobial activity, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Berberis lycium* Royle root bark extract. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p.1-10, 2021.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, P. S. L.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. *var. pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p. 61-66, 2006.

NASCIMENTO, E. V. do.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. de.; NASCIMENTO, Y. A. P. do.; VIEIRA, M. I. C.; FARIAS, I. B. M.; NASCIMENTO, S.F.do.; LIMA, F. R. A. de. Ocorrências e usos da Família Piperaceae, em especial no Estado do Ceará: Revisão e nova identificação geográfica. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 183-205, 2022.

NAZIR, M.; SALEEM, M.; TOUSIF, M. I.; ANWAR, M. A.; SURUP, F.; ALI, I.; WANG, D.; MAMADALIEVA, N. Z.; ALSHAMMARI, E.; ASHOUR, M.; ASHOUR, A. M.; AHMED, I.; ELIZBIT; GREEN, I. R.; HUSSAIN, H. Meroterpenoids: A comprehensive update insight on structural diversity and biology. **Biomolecules**, v. 11, n. 957, 2021.

NÚÑEZ, V.; Castro, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1017–1025, 2005.

OBRADOVIC, M.; KRAJESEK, S.S.; DERMASTIA, M.; KREFT, S. A new method for the authentication of plant samples by analysing fingerprint chromatograms. **Phytochemical analysis**, v. 8, p. 123-132, 2007.

OLIVEIRA, M. de L. B. de.; FRANÇA, T. A. R. de.; CAVALCANTE, F. S. A.; LIMA, R. A. O gênero *Piper* no Brasil: o estado da arte da pesquisa. **Biodiversidade**, v.19, n.3, p. 198, 2020.

OLIVEIRA, M. S. de.; CRUZ, J. N. da.; SILVA, S. G.; COSTA, W. A. da.; SOUSA, S. H. B. de.; BEZERRA, F. W. F.; TEIXEIRA, E.; SILVA, N. J. N. da.; ANDRADE, E. H. de A.; CHAVES NETO, A. M. de J.; CARVALHO JUNIOR, R. N. de. Phytochemical profile, antioxidant activity, inhibition of acetylcholinesterase and interaction mechanism of the major components of the *Piper divaricatum* essential oil obtained by supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, p. 74–84, 2019.

PAIVA, C. L. **Ácidos fenólicos e amins bioativas livres e conjugadas em sorgo: teores e atividade antioxidante**. 2014. 191 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**, Cengage Learning, 4 ed., p. 708, 2010.

PEDROSO, R. S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, 2021.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24, 2003.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M das G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. do. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

PINTO, A.; CHAVES, F.; DOS SANTOS, P.; NUNEZ, C.; TADEI, W.; POHLIT, A. Biomass and 4-Nerolidylcatechol Production. **Planta Médica**, v.76, n.13, p. 1473–1476, 2010.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v.5, p. 439-445, 2000.

PRESLEY, C. C.; VALENCIANO, A. L.; Fernández-Murga, M. L.; DU, Y.; SHANAIAH, N.; CASSERA, M. B.; GOETZ, M.; CLEMENT, J. A.; and KINGSTON, D. G. I. Antiplasmodial Chromanes and Chromenes from the Monotypic Plant Species *Koerberlinia spinosa*. **Journal of Natural Products**, n. 81, p. 475–483, 2018.

RABELO, V. W. H.; VIEGAS, D. D. J.; TUCCI, E. M. N.; ROMEIRO, N. C.; ABREU, P. A. Virtual screening and drug repositioning as strategies for the discovery of new antifungal inhibitors of oxidosqualene cyclase. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, n.185, p.189-199, 2019.

ROHMER, M. Methylerythritol phosphate pathway. In: BARTON, S. D.; NAKANISHI, K. (Ed.). *Comprehensive natural products II: polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. **Amsterdam: Elsevier**, v. 1, cap. 14, p. 517-555, 2010.

SANTOS V. L. P dos; RODRIGUES, I. C. G.; BERTÉ, R.; RAMAN, V.; MESSIAS-REASON, I. J.; BUDEL, J. M. Review of *Piper* species growing in the Brazilian State of Paraná with emphasize on the vegetative anatomy and biological activities. **The Botanical Review**, v. 87, n. 1, p. 23-54, 2021.

SALEHI, B.; ZACARIA, Z. A.; GYWALL, R.; IBRAHIM, S. A.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYER, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T. B.; FIDALGO, L. M.; MARTORELLI, M.; SETZER, W. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p.1364, 2019.

SCHANEBERG, B. T.; CROCKETT, S.; BEDIR, E.; KHAN, I. A. The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra. **Phytochemistry**, v.62, p.911-918, 2003

SHERMA, J. Modern Thin-Layer Chromatography. **Sherma: Journal of AOAC International**, v. 91, n. 5, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: do produto ao medicamento**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017.

SILVA, J. K. da.; TRINDADE R. da.; ALVES, N. S.; FIGUEIREO, P. L.; MAIA, J. G. S.; SETZER, W. Essential Oils from Neotropical *Piper* Species and Their Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2571, 2017.

SILVA, M. F. R.; BEZERRA-SILVA, P. C.; LIRA, C. S.; ALBUQUERQUE, B. N. L.; AGRA NETO, A. C.; PONTUAL, E. V.; MACIEL, J. R.; PONTUAL, E. V.; MACIEL, J. R.; PAIVA, P. M. G. P.; NAVARRO, D. M. A. F. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 64-70, 2016a.

SILVA, J. K. da; SILVA, N. N. S.; SANTANA, J.F. S.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; SETZER, W. N. Phenylpropanoid-rich Essential Oils of *Piper* Species from the Amazon and their Antifungal and Anti-cholinesterase Activities. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 12, p. 1907-1911, 2016b.

SILVA, J. K. R.; SILVA, J. R. A.; NASCIMENTO, S. B.; LUZ, S. F. M.; MEIRELES, E. N.; ALVES, C. N.; RAMOS, A. R.; MAIA, J. G. S. Antifungal Activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* Infection in Black Pepper. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17926-17942, 2014.

SILVA, J. K. R da.; ANDRADE, E. H.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. Essential Oil Composition, Antioxidant Capacity and Antifungal Activity of *Piper divaricatum*. **Natural Product Communication**, v. 5, n. 3, p. 477-480, 2010.

SINGH, A.; SINGH, L. Acyclic sesquiterpenes nerolidol and farnesol: mechanistic insights into their neuroprotective potential (Review). **Pharmacological Reports**, n.77, p.31-42, 2025.

SIQUEIRA, M. P.; CANDIDO, F. S.; AMARAL, T. M. do.; MOREIRA, D. de L. Atividade larvicida de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de Piperaceae do Estado do Rio de Janeiro. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 35-43, 2014.

SOUZA, P. G.; ALBINO, A. M.; LIMA, R. Identificação de metabólitos secundários no extrato etanólico das inflorescências de *Piper arboreum* Aubl. e seu potencial candidacida. **Biota Amazônia**, v. 9, n. 2, p. 32-34, 2019.

SPEROTTO, A. R. M.; MOURA, D. J.; PÉRES, V. F.; DAMASCENO, F. C.; CARAMÃO, E. B.; HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**. n. 57, p. 57-68, 2013.

STEINBECK, C.; SPITZER, V.; STAROSTA, M.; VON POSER, G. Identification of Two Chromenes from *Calea serrata* by Semiautomatic Structure Elucidation. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 6, p.627-628, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6ª ed. 2017.

TSUDA, M.; NEMOTO, A.; KOMAKI, H.; TANAKA, Y.; YAZAWA, K.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Nocarasin A-C and Brasiliquinone D, New Metabolites from the Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 12, p. 1640-1642, 1999.

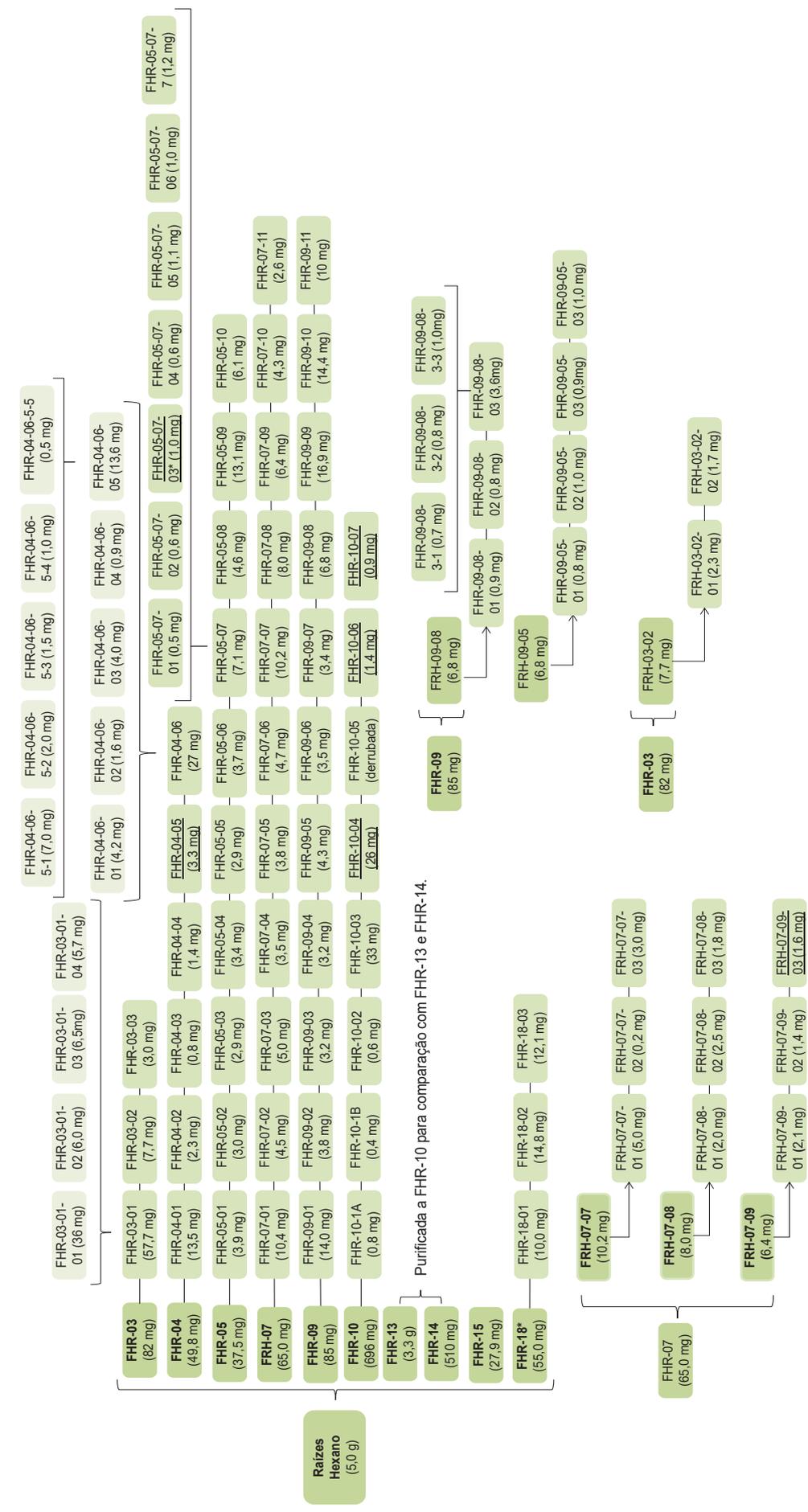
VILHENA, C. S.; NASCIMENTO, L. A. S. do.; ANDRADE, E. H. de A.; SILVA, J. K. do R. da.; HAMOY, M.; TORRES, M. F.; BRBAS, L. A. L. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 510, p. 169-175, 2019.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documento 316, p.16, 2010.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH T.; SAMAIN, M. D. Q.; NEINHUIS C. Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 2, p. 477-497, 2007.

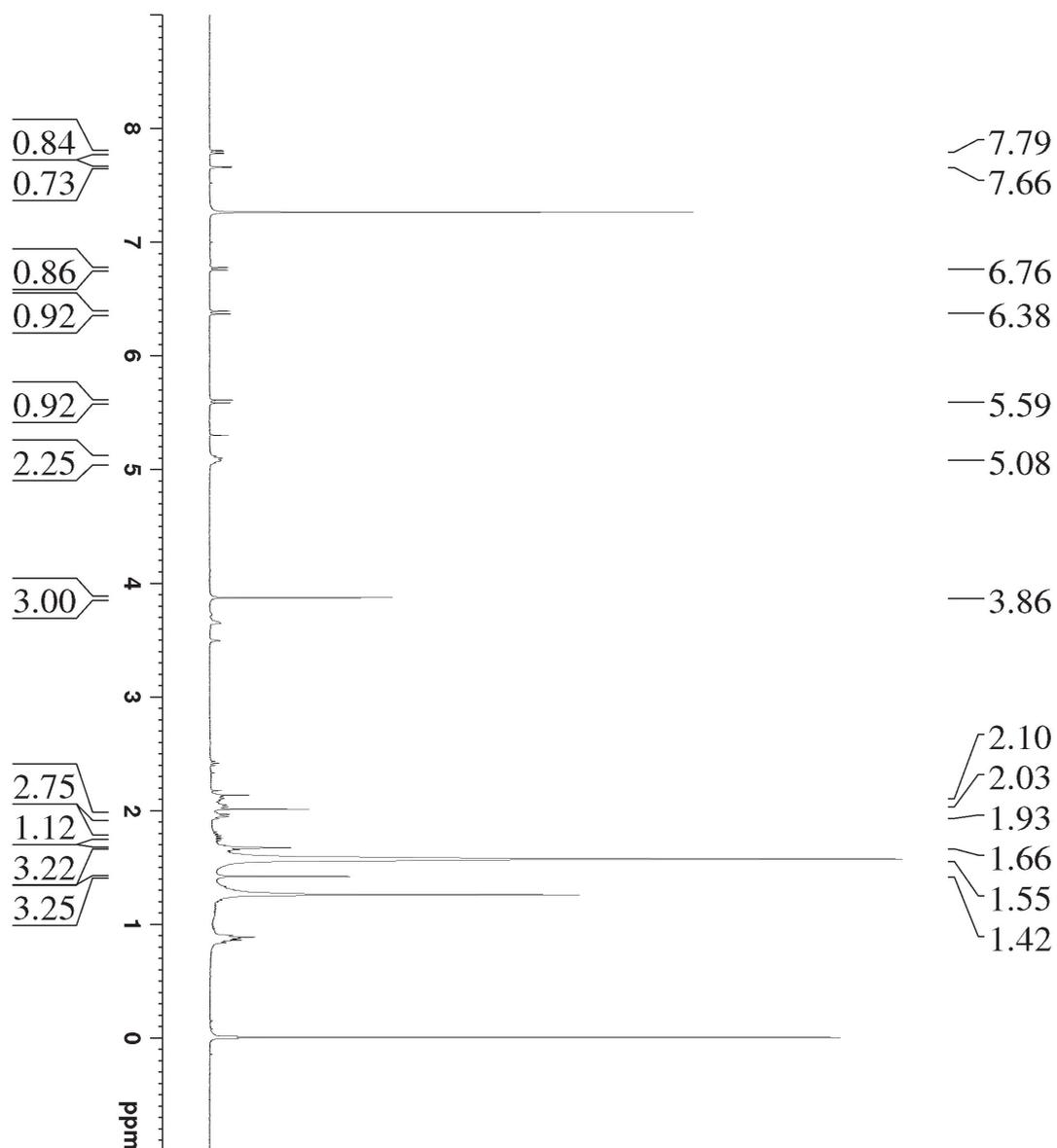
ZULKIPLI, M.; MAHBUB N.; FATIMA, A; WAN-LIN, S. L.; 1, KHOO, T. J.; MAHBOOB, T.; RAJAGOPAL, M.; SAMUDI ,C.; KATHIRVALU ,G.; ABDULLAH, N. H.; PINHO, A. R.; OLIVEIRA, S. M. R.; PEREIRA, M de L.; RAHMATULLAH, M.; HASAN, A.; PAUL, A. K.; BUTLER,, M. S.; NAWAZ, M.; WILAIRATANA, P.; NISSAPATORN, V.; WIART, C. Isolation and Characterization of Werneria Chromene and Dihydroxyacidissimol from *Burkillanthus malaccensis* (Ridl.) Swingle. **Plants** , v.11, n.1388, p.21, 2022.

FLUXOGRAMA 6 - PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DA COLUNA DE RAÍZES EM HEXANO



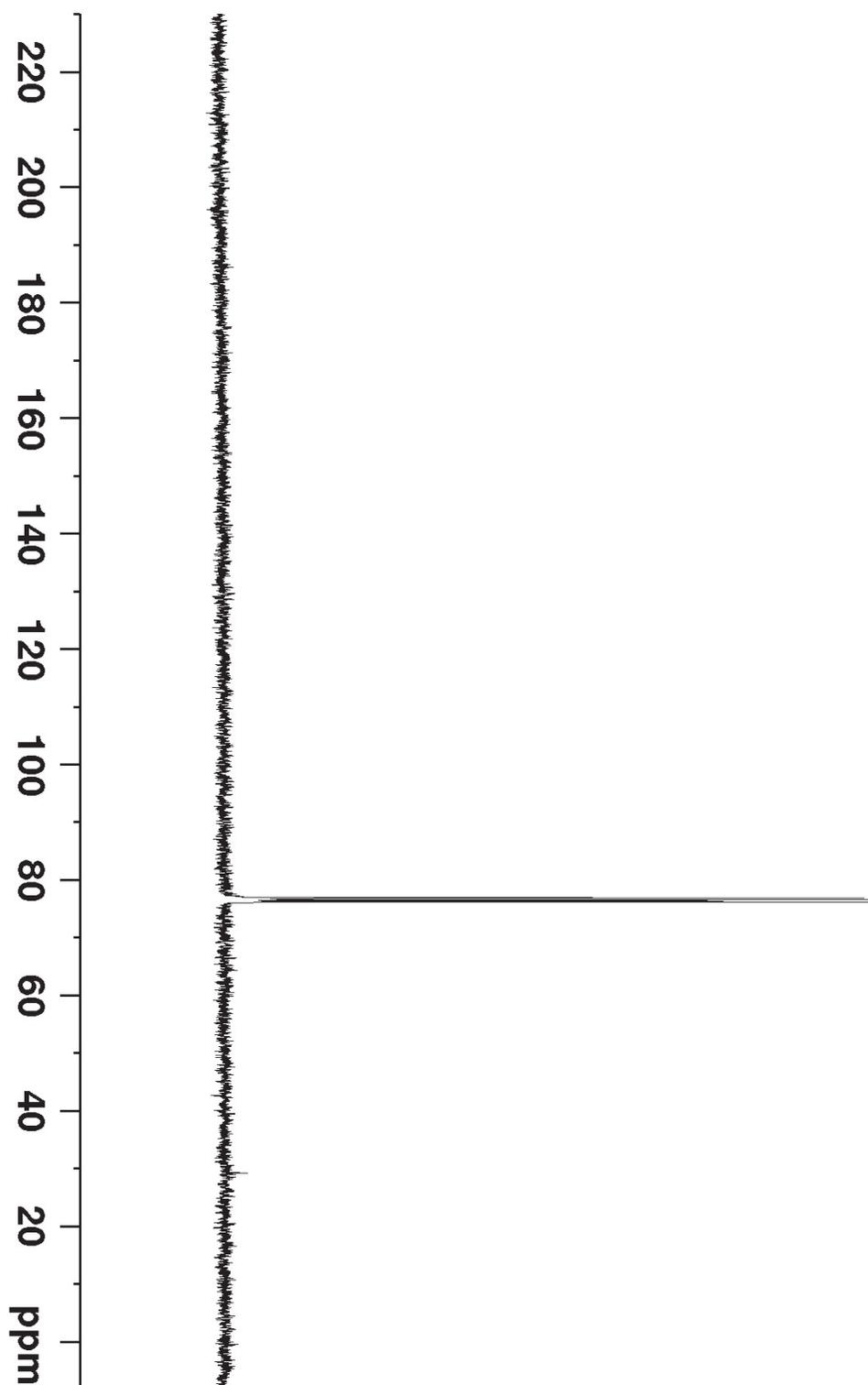
Nota: Em negrito as frações que originaram as subfrações, e sublinhado as frações identificadas. FONTE: A autora (2024)

FIGURA 63 - ESPECTRO DE RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03



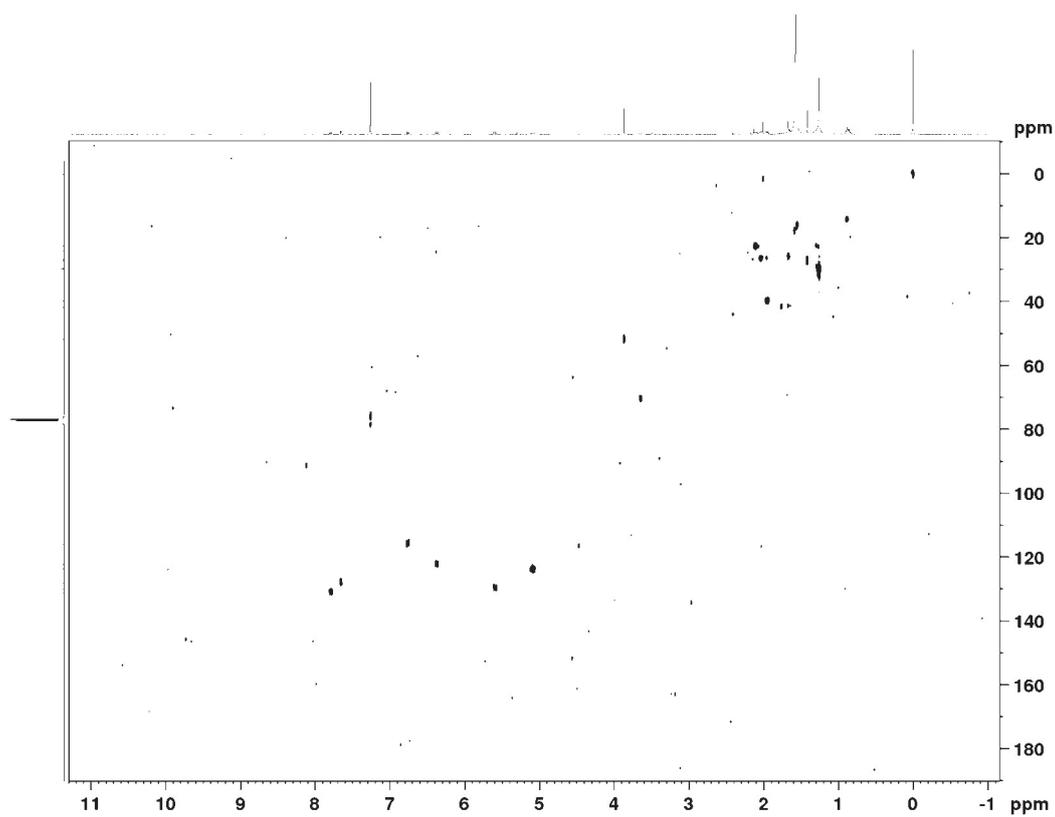
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 64 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **2**, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03



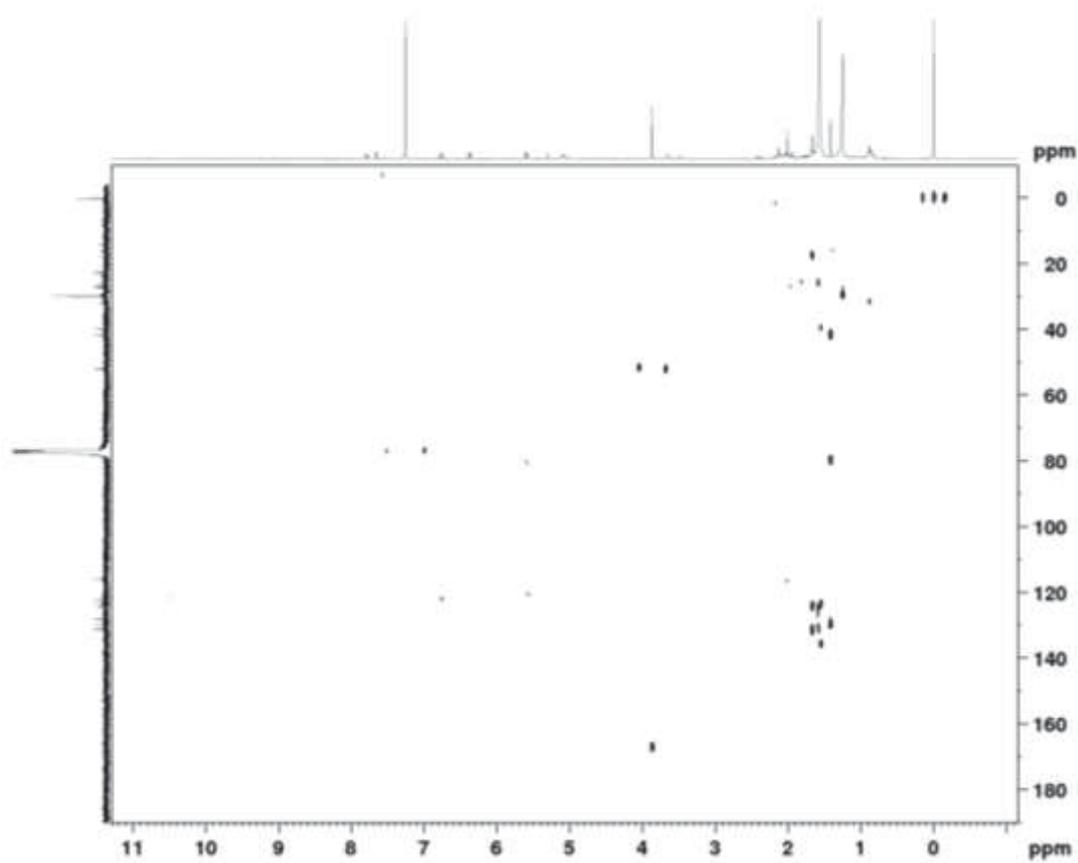
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 65 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03



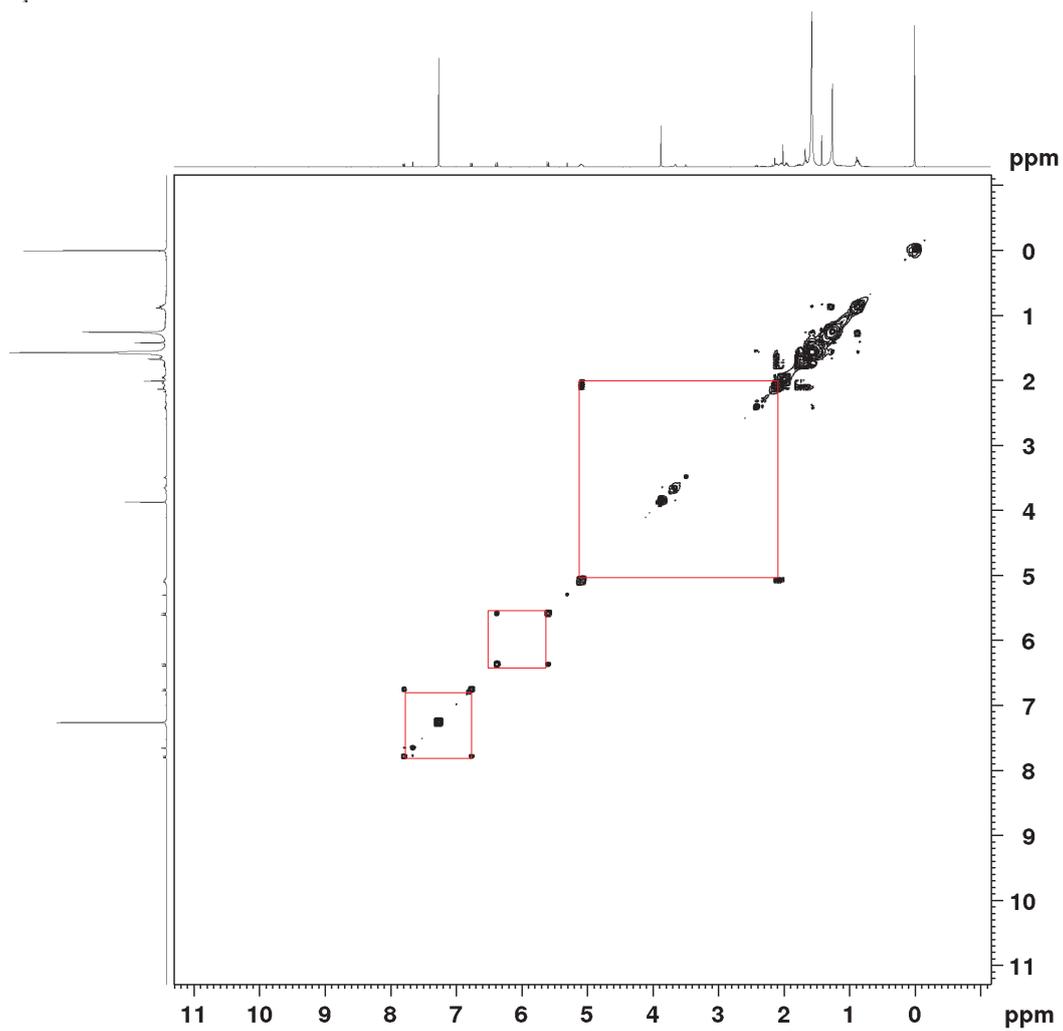
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 66 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03



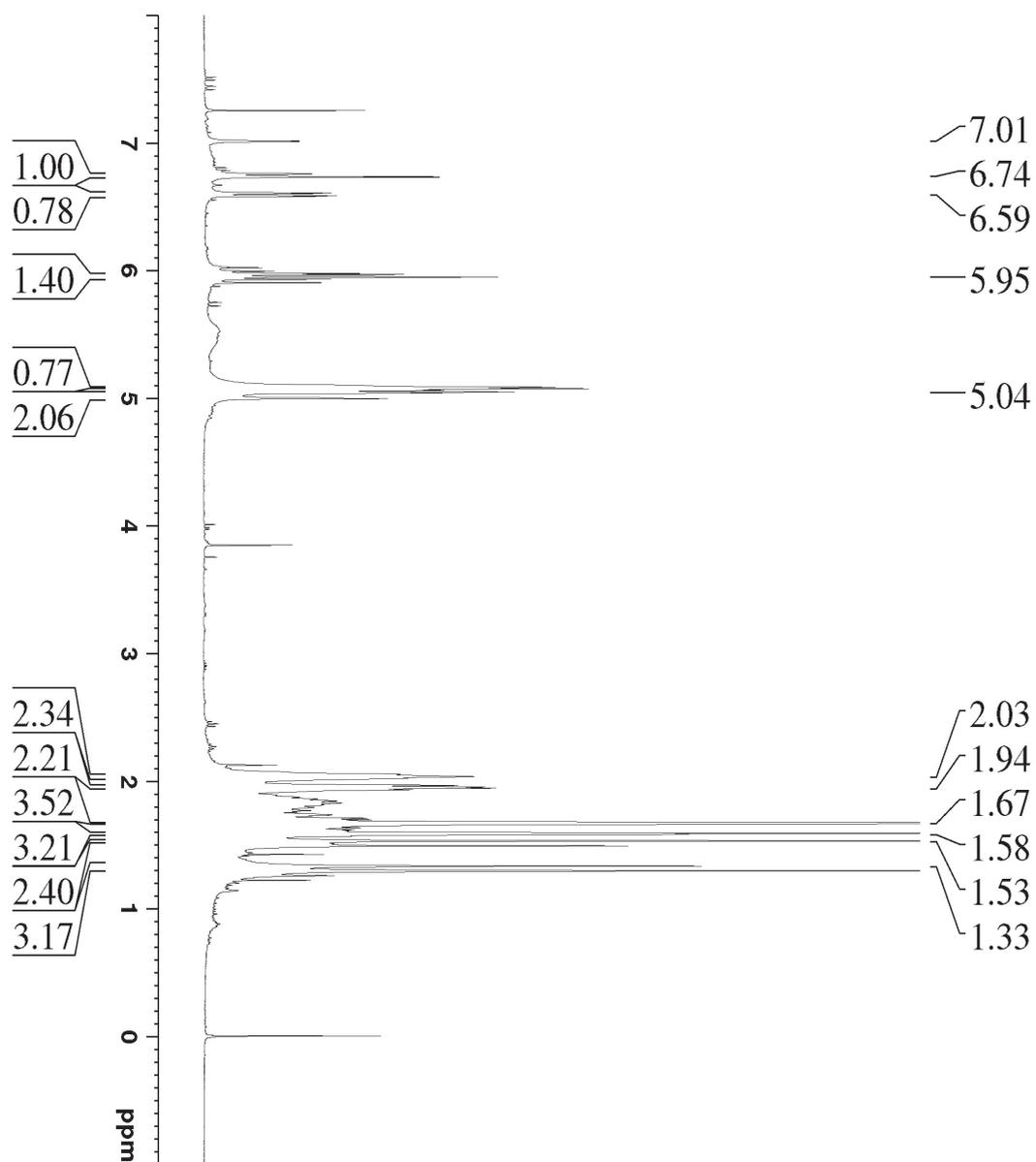
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 67 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 2, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-05-07-03



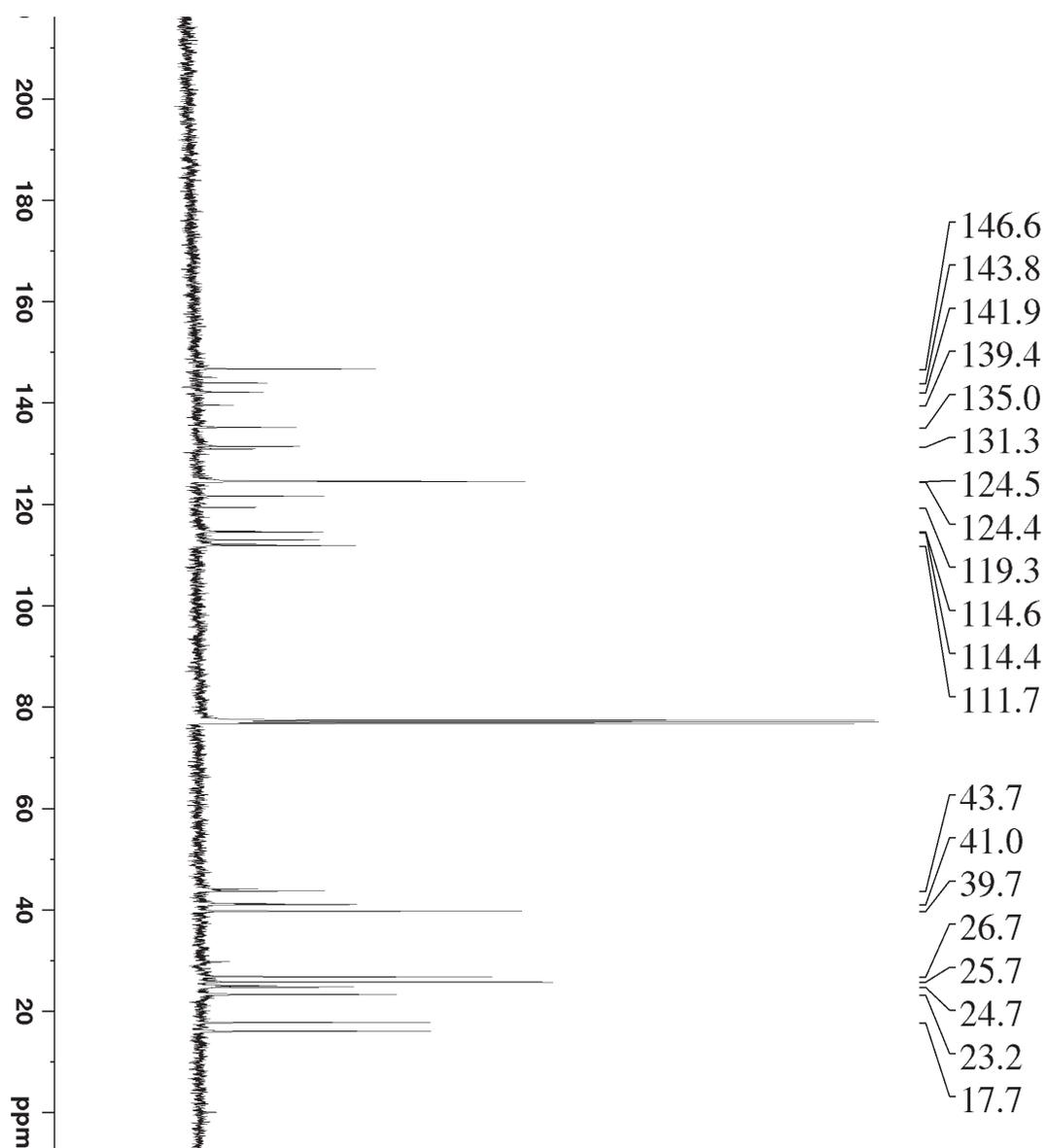
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 68 - ESPECTRO DE RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-07-03



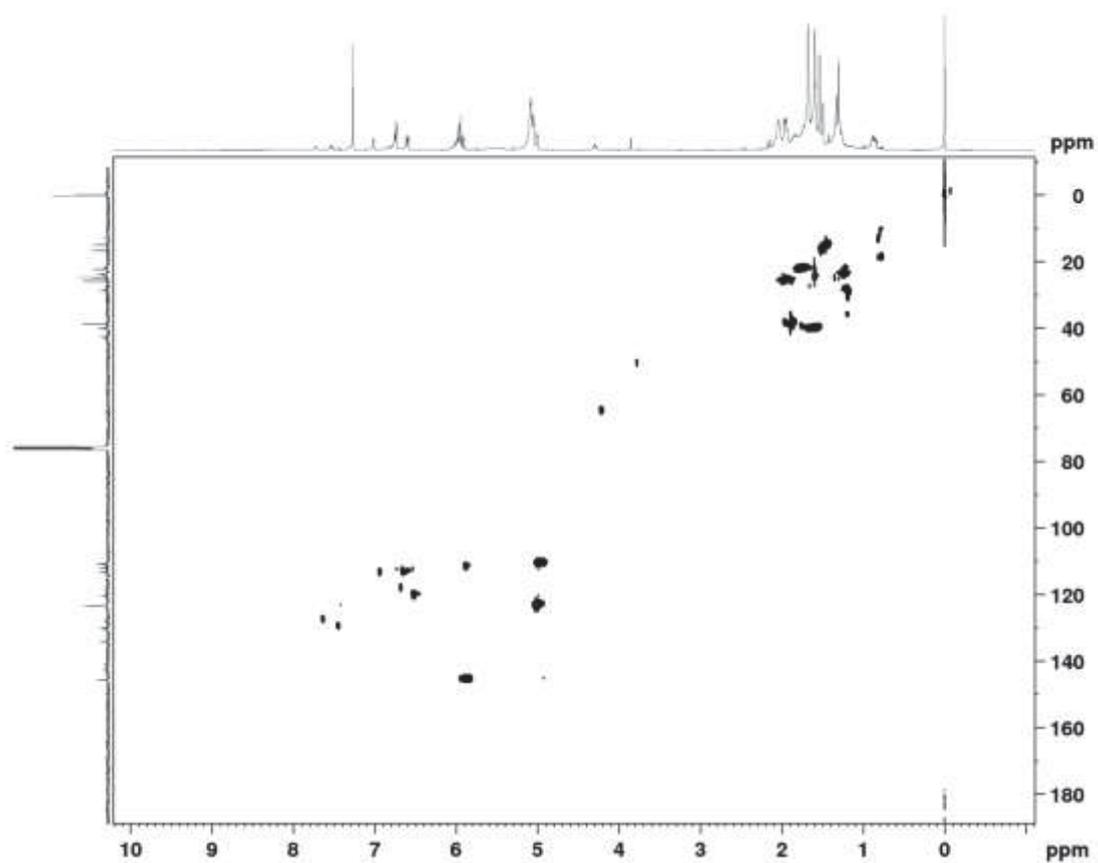
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 69 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **3**, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-07-03



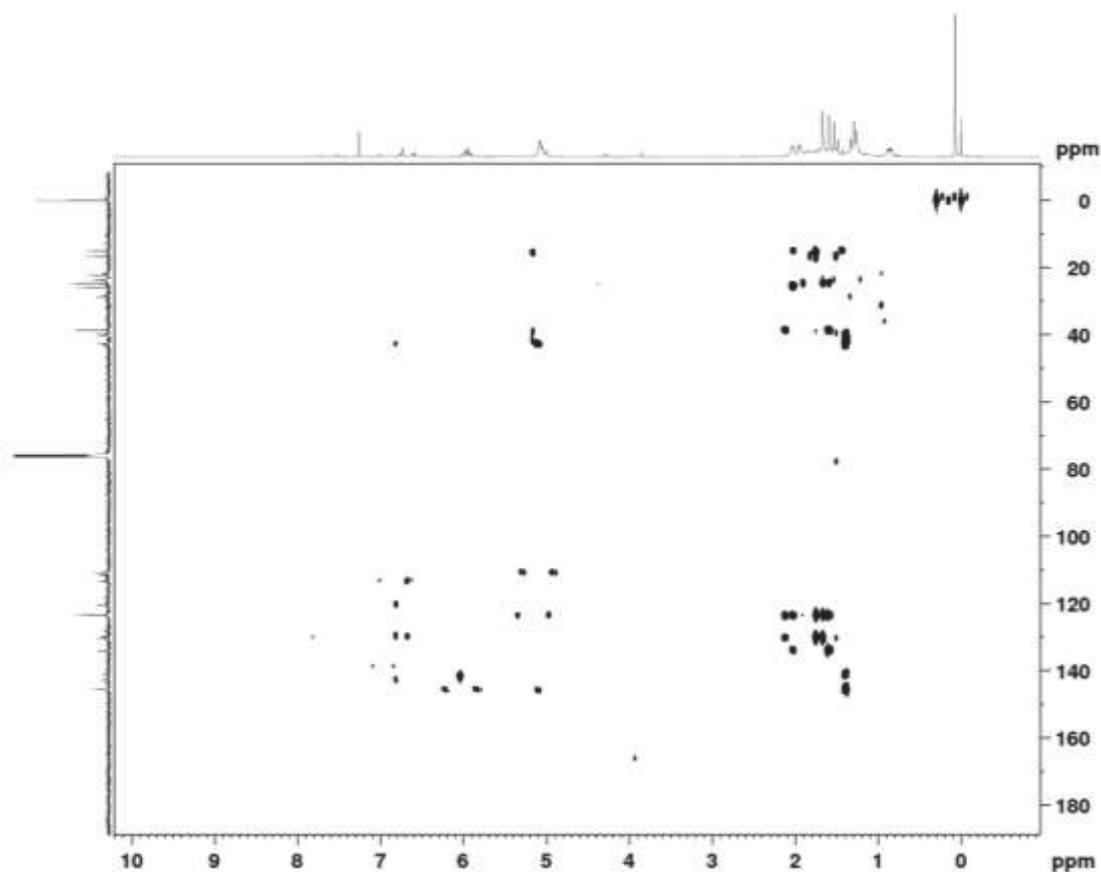
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 70 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-07-03

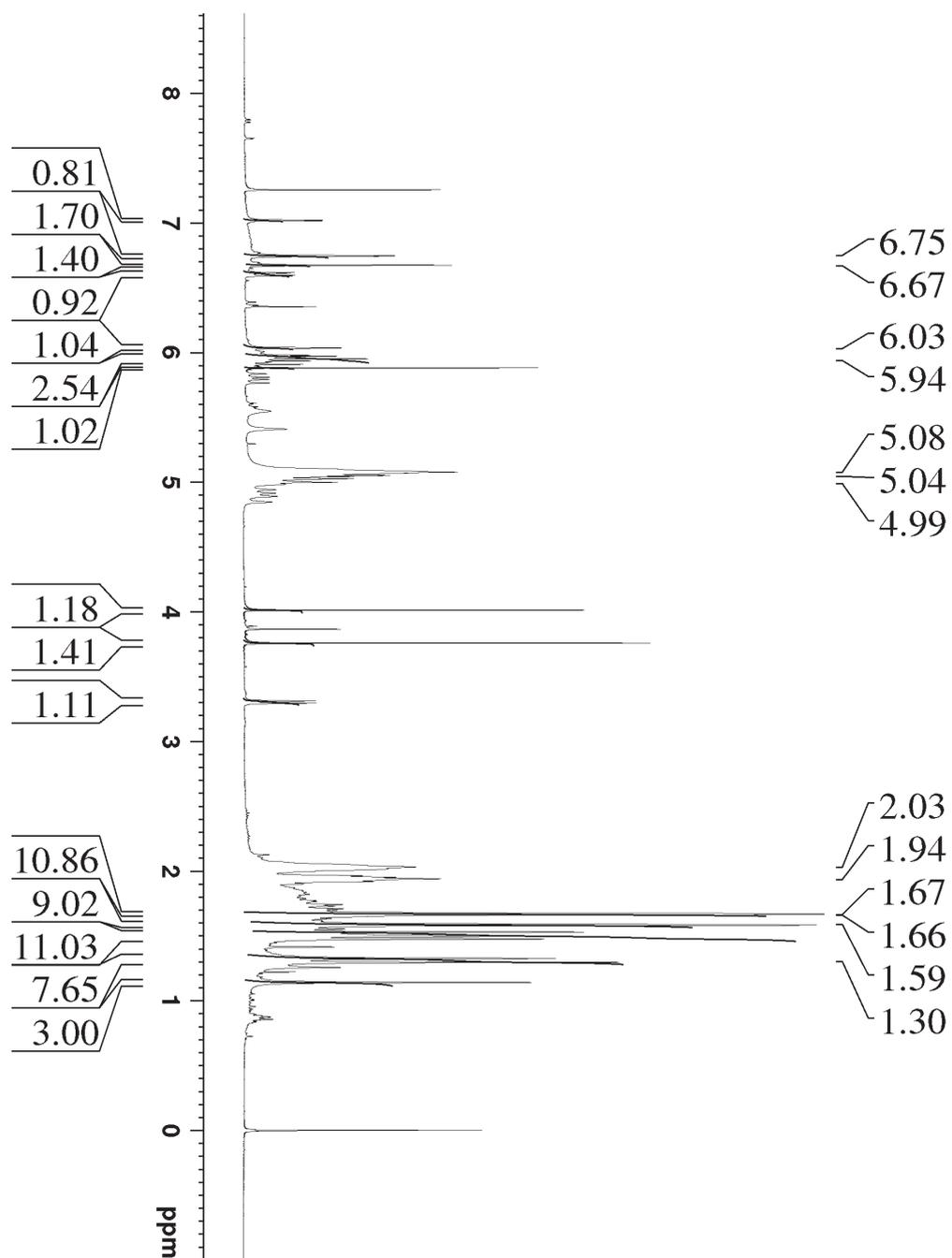


FONTE: A autora (2024)

FIGURA 71 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-07-03

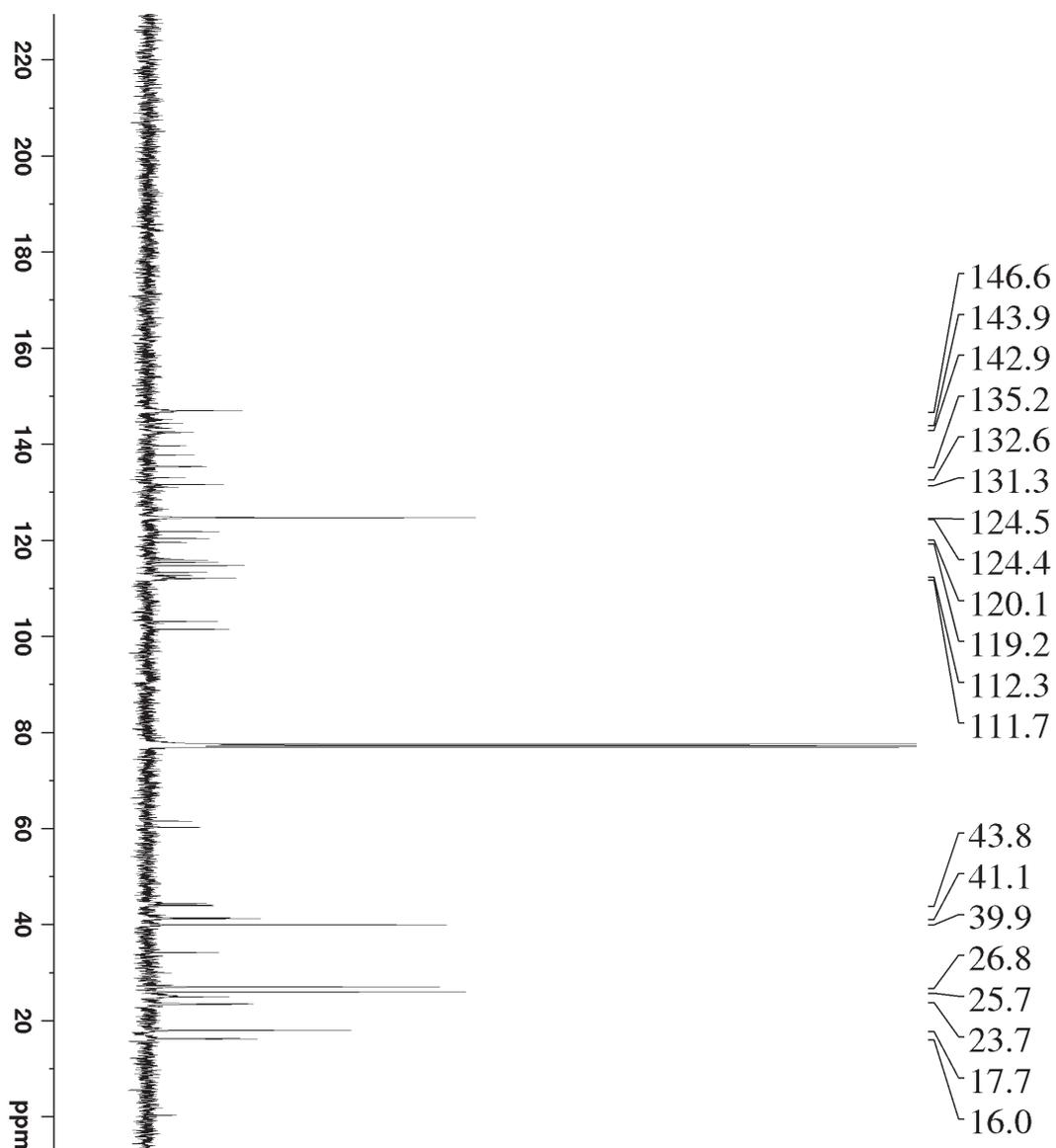


FONTE: A autora (2024)

FIGURA 72 - ESPECTRO DE RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-08-03

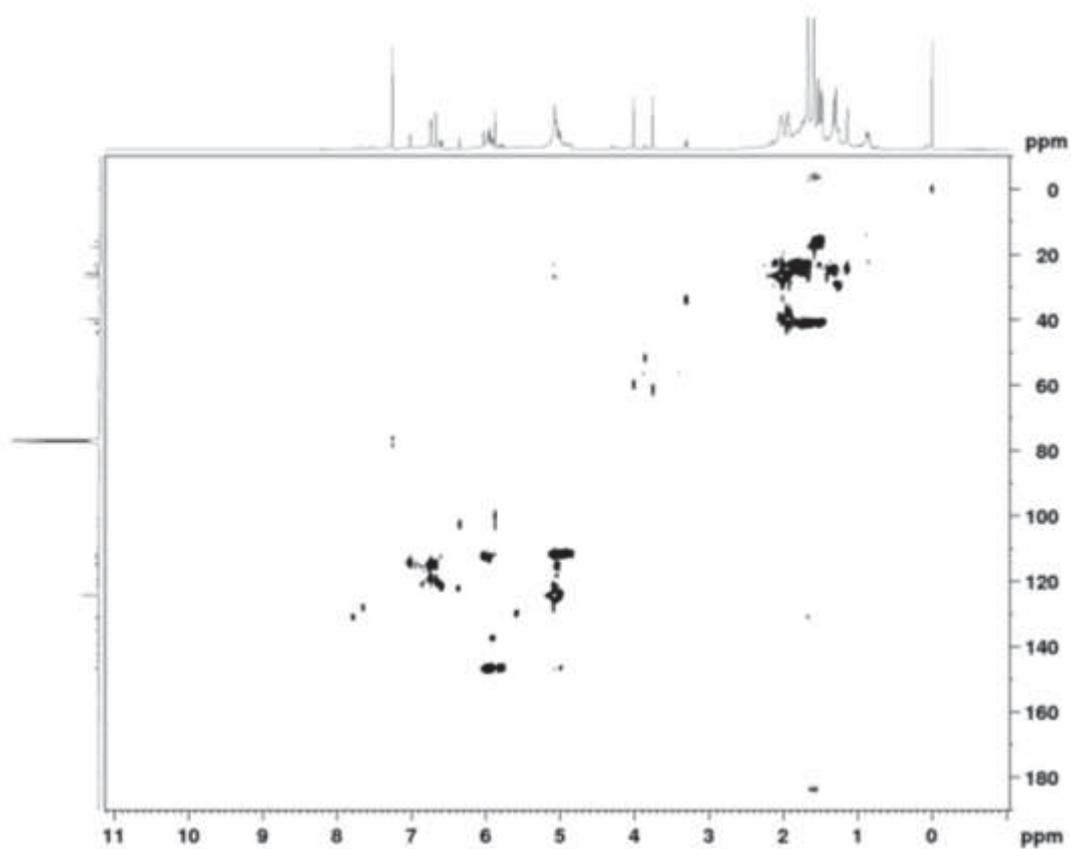
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 73 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **3**, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-08-03



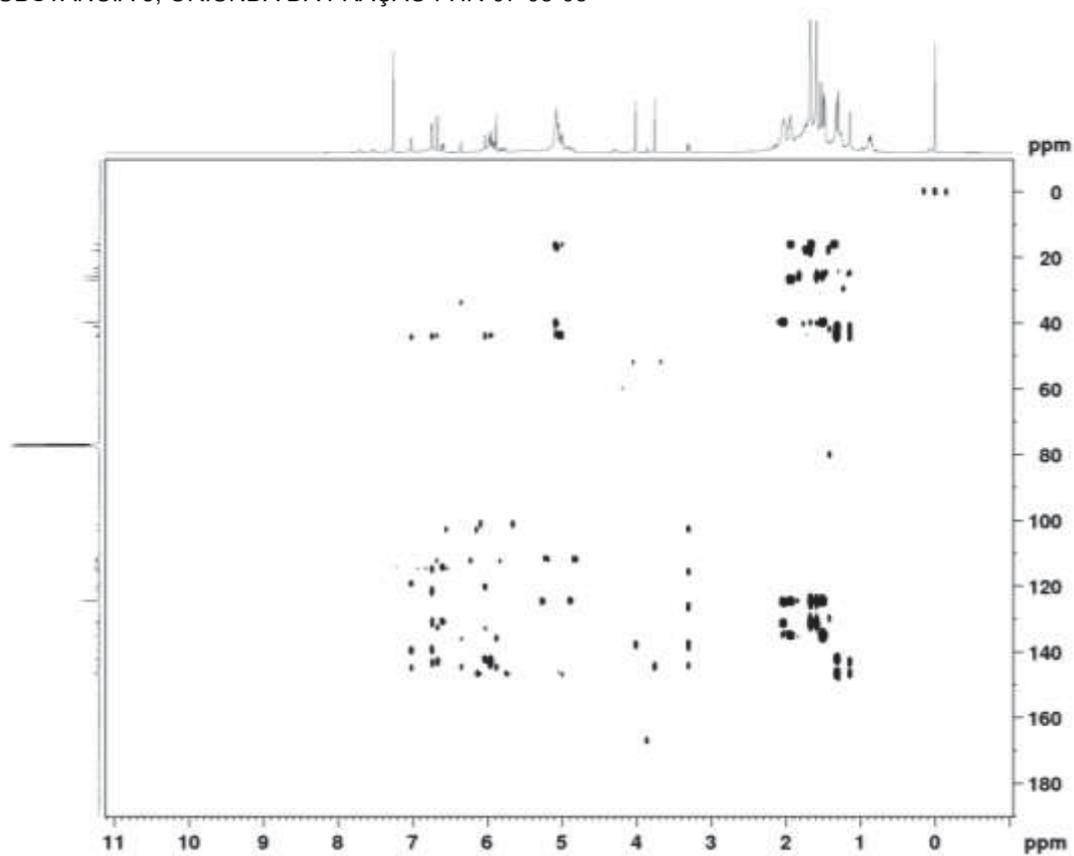
FONTE: A autora (2024)

FIGURA 74 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA 3, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-08-03



FONTE: A autora (2024)

FIGURA 75 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTANCIA (400 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **3**, ORIUNDA DA FRAÇÃO FHR-07-08-03



FONTE: A autora (2024)