**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AMANDA SANTOS GUSMÃO**

# Estudo químico e avaliação biológica das folhas de *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE)

**JEQUIÉ – BA**

**2019**

**AMANDA SANTOS GUSMÃO**

# Estudo químico e avaliação biológica das folhas de *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre(a) em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento

**JEQUIÉ – BA**

**2019**

G982e Gusmão, Amanda Santos

Estudo químico e avaliação biológica das folhas de Piper klotzschianum Kunth (PIPERACEAE) / Amanda Santos Gusmão.- Jequié, 2019.

93f.

(Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento)

1.Piper klotzschianum 2.Efeito tóxico 3.Atividade antimicrobiana 4.Amidas tipo piperina I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 547

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

# Amanda Santos Gusmão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **09/01/2019.**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento
(UFBA , Salvador-BA, (2011)
(Orientador)

Prof. Dr. Anderson Marques de Oliveira
(UFAL, Maceió-AL, 2012)

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira
(UFMG, Belo Horizonte-MG, 2012)

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho,*

*À Deus por te me sustentado em todos os momentos e me proporcionado a conclusão de mais um ciclo em minha vida.*

*Aos meus pais e meu irmão, por me apoiarem em todas as decisões, serem meus principais incentivadores, pelo amor e carinho.*

*E ao meu companheiro, Joaquim, por todo conselho, incentivo, compreensão, amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças para concluir mais uma etapa da minha vida e pela sua presença constante, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Marita e José Lenildo, e meu irmão, Lenildo, pelo amor, por todo apoio e incentivo durante todos esses anos e por terem me proporcionado sempre o melhor para que eu pudesse chegar até aqui. A minha avó, Júlia, por ser o meu maior e melhor exemplo de força e superação. A minha tia, Mariza, por ser minha segunda mãe, pelo apoio, incentivo e por ser mais um exemplo de garra e superação em minha vida. Ao meu namorado, Joaquim, pelo companheirismo, amor, carinho, pelos conselhos e por estar me apoiando em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento, agradeço pela orientação, pelo suporte que me deu, conhecimentos transmitidos, oportunidades oferecidas e auxílio.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Produtos Naturais Hion, Tiago e Anderson que me apoiaram e auxiliaram durante as atividades desenvolvidas na pesquisa e, em especial, a minha amiga Andressa por uma longa caminhada na graduação e estar presente em mais um ciclo me acompanhando e incentivando, obrigada por todo apoio.

Agradeço aos colegas Daniel, Maria da Luz e Thatiana por todo companheirismo, apoio e os momentos agradáveis que puderam me proporcionar durante nossas reuniões.

Aos meus colegas de turma: Adílio, Abad, Adonias, Carla, Lucas, Nael, Rosângela e Uillian; agradeço por estarem sempre dispostos a me ajudar e compartilharem experiências e saberes.

Aos professores do programa de pós-graduação: Vanderlúcia, Marcos, Cléber, Rosane, Djalma; agradeço pelos conhecimentos transmitidos através das aulas ministradas.

Ao Prof. Dr. Renato Fontana pela realização dos testes de atividade antimicrobiana.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UESB.

A CAPES pela bolsa cedida.

Aos membros da banca.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte de mais este ciclo da minha formação profissional, o meu muito obrigado.

## EPÍGRAFE

*“O correr da vida embrulha tudo.*
*A vida é assim: esquenta e esfria,*
*aperta e daí afrouxa,*
*sossega e depois desinquieta.*
*O que ela quer da gente é coragem.”*

**Guimarães Rosa**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição fitogeográfica do gênero *Piper*.....21
Figura 2: Fotos da espécie *Piper klotzschianum*.....28
Figura 3: (a) Cromatograma em CG-EM do esqualeno com pico majoritário em RT=37.469 min (b) Espectro de massa do esqualeno.....39
Figura 4: Principal fragmentação apresentada no EM do íon molecular do esqualeno .....39
Figura 5: Espectro de IV do esqualeno.....39
Figura 6: (a) Cromatograma em CG-EM do 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno com pico majoritário em RT=10.132 min (b) Espectro de massa 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno.....40
Figura 7: Principais fragmentações apresentadas no EM do 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno.....41
Figura 8: (a) Cromatograma em CG-EM da mistura de asaronas, (b) Espectro de massa do pico 1, (c) Espectro de massa do pico 2 e (d) Espectro de massa do pico 3.....43
Figura 9: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 500 MHz] da mistura de asaronas **[40]**, **[41]** e **[42]**.....44
Figura 10: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 500 MHz] ampliado (δ0,1 – 4,0) da mistura de asaronas **[40]**, **[41]** e **[42]**.....45
Figura 11: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 500 MHz] ampliado (δ4,8 – 7,5 ) da mistura de asaronas **[40]**, **[41]** e **[42]**.....46
Figura 12: RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 125 MHz] da mistura de asaronas **[40]**, **[41]** e **[42]**.....47
Figura 13: Espectro de IV da amostra EHFP4-1.....50
Figura 14: (a) Cromatograma em CG-EM da mistura de ésteres metílicos **[35-39]**; e (b) Cromatograma da mistura de padrão de ésteres metílicos.....50
Figura 15: (a) Cromatograma em CG-EM da amostra EHFP5-2; (b) EM do pico 1; (c) EM do pico 2; (d) EM do pico 3; e (e) EM do pico 4.....53
Figura 16: Principais fragmentações apresentadas no EM do éster etílico **[44]**..53
Figura 17: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] da mistura de ésteres etílicos **[44]**, **[45]**, **[46]** e **[47]**.....54

Figura 18: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 75 MHz] da mistura de ésteres etílicos **[44]**, **[45]**, **[46]** e **[47]**.....55
Figura 19: (a) Cromatograma em CG-EM da amostra EHFP5-5 com pico majoritário em RT=42.597 min (b) Espectro de massa do pico majoritário (*α*-tocoferol).....57
Figura 20: Principal fragmentação apresentada no EM do *α*-tocoferol.....57
Figura 21: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] do *α*-tocoferol...58
Figura 22: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] ampliado (δ0,5 – 2,8) do *α*-tocoferol.....59
Figura 23: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] ampliado (δ3,9 – 5,6) do *α*-tocoferol.....60
Figura 24: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 75 MHz] do *α*-tocoferol....61
Figura 25: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 75 MHz] ampliado (δ8 – 45) do *α*-tocoferol.....62
Figura 26: (a) Cromatograma em CG-EM da tetrahidropiperlonguminina (b) Espectro de massa da tetrahidropiperlonguminina.....63
Figura 27: Principais fragmentações apresentadas no EM para tetrahidropiperlonguminina.....64
Figura 28: (a) Cromatograma em CG-EM da mistura de amidas **[13]** e **[16]** (b) EM da 4,5-dihidropiperlonguminina (RT =30.532) (c) EM da piperovatina (RT= 32,522).....67
Figura 29: Espectro de IV da mistura das amidas **[13]** e **[16]**.....67
Figura 30: Principais fragmentações apresentadas no EM da mistura de amidas **[13]** e **[16]**.....68
Figura 31: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] da mistura das amidas **[13]** e **[16]**.....69
Figura 32: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] ampliado (δ0,6 – 4,0) da mistura das amidas **[13]** e **[16]**.....70
Figura 33: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] ampliado (δ4,6 – 8,4) da mistura das amidas **[13]** e **[16]**.....71
Figura 34: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 75 MHz] da mistura das amidas **[13]** e **[16]**.....72

Figura 35: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 500 MHz] da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**.....75
Figura 36: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$C_5D_5N$, δ (ppm) – 500 MHz] ampliado (δ0,0 – 3,0) da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**.....76
Figura 37: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 500 MHz] ampliado (δ3,6 – 9,0) da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**.....77
Figura 38: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 125 MHz] da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**.....78
Figura 39: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 125 MHz] ampliado (δ10 – 80) da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**.....79
Figura 40: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 125 MHz] ampliado (δ90–160) da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**.....80

## LISTA DE TABELAS

Tabela I - Constituintes químicos identificados nas raízes de *Piper klotschianum*.....36
Tabela II - Dados de RMN de $^{1}H$ e de RMN de $^{13}C$ da isoasarona, *cis*-asarona e *trans*-asarona comparados com a literatura.....48
Tabela III - Dados de RMN de $^{13}C$ da piperovatina e dihidropiperlonguminina comparados com a literatura.....73
Tabela IV - Valores de $CL_{50}$ obtidos na avaliação do efeito tóxico frente à *Artemia salina* para compostos isolados de *Piper klotzschianum*.....81
Tabela V - CIM das substâncias isoladas sobre os micro-organismos utilizados.....82
Tabela VI - CIM dos extratos brutos das folhas sobre os micro-organismos utilizados.....83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AAS | Ácido acetilsalicílico |
| AC | Amostra Clínica |
| AcOEt | Acetato de etila |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CC | Cromatografia em coluna |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| $CDCl_3$ | Clorofórmio deuterado |
| $C_5D_5N$ | Piridina deuterada |
| CG | Cromatografia gasosa |
| $CHCl_3$ | Clorofórmio |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| $CL_{50}$ | Concentração Letal de 50% |
| *d* | Dupleto |
| DCM | Diclorometano |
| *dd* | Duplo dupleto |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| *dq* | Duplo quarteto |
| EAFP | Extrato de acetato das folhas de *Piper* |
| ECFP | Extrato clorofórmico das folhas de *Piper* |
| ECFPK | Extrato Clorofórmico das folhas de *Piper klotzschianum* |
| EDFP | Extrato diclorometânico das folhas de *Piper* |
| EEFPK | Extrato etanólico das folhas de *Piper klotzschianum* |
| EHFP | Extrato hexânico das folhas de *Piper* |
| EHFPK | Extrato Hexânico das folhas de *Piper klotzschianum* |
| EM | Espectrometria de Massas |
| EMFP | Extrato metanólico das folhas de *Piper* |
| EMFPK | Extrato Metanólico das folhas de *Piper klotzschianum* |
| EtOH | Etanol |
| HCl | Ácido clorídrico |
| Hex | Hexano |
| IV | Infravermelho |

| | |
|---|---|
| *J* | Constante de acoplamento |
| KBr | Brometo de Potássio |
| *m* | Multipleto |
| MeOH | Metanol |
| MHz | Mega Hertz |
| mult. | Multiplicidade |
| $Na_2SO_4$ | Sulfato de sódio |
| RDA | Retro Diels-Alder |
| rH | Rearranjo de Hidrogênio |
| RF | Fator de Retenção, do inglês, Retention Factor |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RMN de $^{13}C$ | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |
| RMN de $^{1}H$ | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| RT | Tempo de Retenção, do inglês, Retention Time |
| *s* | Singleto |
| *t* | Tripleto |
| δ | Deslocamento químico |

**Estudo químico e avaliação biológica das folhas de *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE)**

Autor: Amanda Santos Gusmão
Orientador: Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento

**RESUMO:** Este trabalho relata a investigação fitoquímica de *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE) em especial os constituintes fixos do extrato etanólico das folhas da planta. A toxicidade do extrato bruto e das amostras EHFP3-3 e EHFP5-2 foi avaliada através dos testes de letalidade com *Artemia salina*, foi também realizada a avaliação antimicrobiana. Do extrato etanólico das folhas da *Piper* foi possível isolar três amidas; a tetra-hidropiperlonguminina a piperovatina e a 4,5-dihidropiperlonguminina. Foi identificado também uma mistura de isômeros de asaronas, uma mistura de ésteres etílicos e uma mistura dos esteroides β-sitosterol-*3-O-β-D*-glicosídeo e estigmasterol-*3-O-β-D*-glicosídeo. A partir da transesterificação da amostra EHFP4-1 foi possível obter uma mistura de ésteres metílicos. Além dessas substâncias, também foram isoladas/identificadas: esqualeno, 1-butil-3,4-metilenodioxidobenzeno e vitamina E. Todas as substâncias purificadas/identificadas foram elucidadas através das técnicas de CG-EM, IV e RMN de $^{13}C$ e de $^{1}H$ e auxilio de dados disponíveis na literatura. A toxicidade frente a *Artemia salina* mostrou $CL_{50}$=217,86 µg.mL$^{-1}$ em 24h e $CL_{50}$=148,96 µg.mL$^{-1}$ em 48h para o extrato etanólico bruto, $CL_{50}$=89,06 µg.mL$^{-1}$ em 24h e $CL_{50}$=66,82 µg.mL$^{-1}$ em 48h para a mistura de asaronas e $CL_{50}$=192,86 µg.mL$^{-1}$ em 24h para os ésteres etílicos, é valido ressaltar que os resultados para a mistura de asaronas é um forte indicadora para uma possível atividade antitumoral, larvicida ou inseticida devido da alta toxidade apresentada pela mesma. A avaliação antimicrobiana mostrou que os micro-organismos foram resistentes para todas as amostras testadas e o extrato ECFPK apresentou atividade antimicrobiana para os três micro-organismos Gram-positivos testados (*S. aureus* CBAM 324, *S. aureus* AC e *S. epidermidis* ATCC 35984).

**Palavras-chaves:** *Piper klotzschianum*, efeito tóxico, atividade antimicrobiana, amidas tipo piperina

**Chemical study and biological evaluation of the leaves of *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE)**

Author: Amanda Santos Gusmão
Advisor: Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento

**ABSTRACT:** This work reports the phytochemical investigation of *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE) in particular the fixed constituents of the ethanolic extract of the leaves of the plant. The toxicity of the crude extract and of the EHFP3-3 and EHFP5-2 samples was evaluated by means of the Artemia salina lethality tests, the antimicrobial evaluation was also carried out. From the ethanolic extract of the *Piper* leaves it was possible to isolate three amides; to tetrahydropyperlonguminine is piperovatine and 4,5-dihydropiperluminumine. A mixture of asaronas isomers, a mixture of ethyl esters and a mixture of steroids *β*-sitosterol-3-*O*-*β*-*D*-glycoside and stigmasterol-3-*O*-*β*-*D*-glycoside were also identified. From the transesterification of sample EHFP4-1 it was possible to obtain a mixture of methyl esters. In addition to these substances, squalene, 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene and vitamin E were also isolated. All purified/identified substances were elucidated by GC-MS, IR and $^{13}C$ and $^{1}H$-NMR techniques and information available in the literature. Toxicity to *Artemia salina* showed $LC_{50}$ = 217,86 μg.mL$^{-1}$ in 24h and $LC_{50}$ = 148,96 μg.mL$^{-1}$ in 48h for crude ethanolic extract, $LC_{50}$ = 89,06μg.mL$^{-1}$ in 24h and $LC_{50}$ = 66,82μg.mL$^{-1}$ in 48h for the mixture of asaronas and $LC_{50}$ = 192,86 μg.mL$^{-1}$ in 24h for the ethyl esters, it is worth noting that the results for the mixture of asaronas is a strong indicative of a possible antitumor activity, larvicide or insecticide due to the high toxicity presented by it. The antimicrobial evaluation showed that the microorganisms were resistant to all the samples tested and the ECFPK extract showed antimicrobial activity for the three Gram-positive microorganisms tested (*S. aureus* CBAM 324, *S. aureus* AC and *S. epidermidis* ATCC 35984).

**Keywords:** *Piper klotzschianum*, toxic effect, antimicrobial activity, piperine type amides.

SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO** ..... 19

**2. OBJETIVOS** ..... 26

2.1 Objetivo Geral ..... 26

2.2 Objetivos específicos ..... 26

**3. MATERIAIS E MÉTODOS** ..... 27

3.1 Materiais e equipamentos utilizados ..... 27

3.2 Coleta do Material Vegetal e Identificação da Espécie ..... 28

3.3 Preparo dos Extratos ..... 28

3.4 Isolamento dos constituintes químicos das folhas de *P. klotzschianum* . 29

3.4.1 Fracionamento do Extrato Hexânico das Folhas - EHFP ..... 29

3.4.1.1 Purificação da fração EHFP1-2 ..... 29

3.4.1.2 Purificação das frações EHFP2-10 e EHFP2-11 ..... 30

3.4.1.3 Purificação da fração EHFP2-14 ..... 31

3.4.1.4 Purificação da fração EHFP4-3 ..... 31

3.4.2 Fracionamento do Extrato Clorofórmico das Folhas - ECFP ..... 31

3.4.2.1 Purificação da fração ECFP6-5 ..... 32

3.4.2.2 Purificação da fração ECFP8-3 ..... 32

3.4.4 Fracionamento do Extrato Metanólico das Folhas - EMFP ..... 32

3.4.4.1 Purificação da fração EMFP2-8 ..... 33

3.5 Ensaios biológicos ..... 33

3.5.1 Avaliação da atividade tóxica frente à *Artemia salina* ..... 33

3.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana ..... 34

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... 35

4.1 Identificação e elucidação estrutural ..... 38

4.1.1 Elucidação do esqualeno **[33]** ..... 38

4.1.2 Elucidação do 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno **[34]** ..... 40

4.1.3 Elucidação da mistura de isoasarona **[40]**, *cis*-asarona **[41]** e *trans*-asarona **[42]** ..... 41
4.1.4 Elucidação dos ésteres metílicos: decanoato de metila **[35]**, palmitato de metila **[36]**, linoleato de metila **[37]**, oleato de metila **[38]** e estearato de metila **[39]** ..... 49
4.1.5 Elucidação dos ésteres etílicos: pentadecanoato de etila **[44]**, *(9Z,12Z)*-octadeca-9,12-dienoato de etila **[45]**, *(Z)*-octadec-9-enoato de etila **[46]** e octadecanoato de etila **[47]** ..... 51
4.1.6 Elucidação do *α*-tocoferol (vitamina E) **[43]** ..... 56
4.1.7 Elucidação da tetrahidropiperlonguminina **[15]** ..... 63
4.1.8 Elucidação da mistura de piperovatina **[13]** e 4,5-dihidropiperlonguminina **[16]** ..... 64
4.1.9 Elucidação da mistura de esteroides glicosilados: daucosterol (*β*-sitosterol-3-*O*-*β*-*D*-glicosídeo) **[48]** e estigmasterol-3-*O*-*β*-*D*-glicosídeo **[49]** ..... 73
4.2 Ensaios biológicos ..... 81
4.2.1 Avaliação do efeito tóxico frente à *Artemia salina* ..... 81
4.2.2 Atividade Antimicrobiana ..... 82

**5. CONSIDERAÇÕES FINAIS** ..... 83

**REFERÊNCIAS** ..... 85

# 1. INTRODUÇÃO

A transformação do conhecimento popular em conhecimento científico, aliada a uma sustentada preservação da natureza e sua biodiversidade é de fundamental importância para o desenvolvimento sustentável de um país (BRAZ FILHO, 2010). Desde a antiguidade as plantas vêm sendo utilizadas com propósitos terapêuticos, sendo que as propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas pelo homem durante suas buscas por alimentos (CROTEAU *et al*., 2000).

As plantas medicinais são importantes fontes de novos medicamentos, conforme vem sendo confirmado nos últimos anos por meio de pesquisas cientificas, especialmente nas áreas de ciências farmacêuticas, biologia, química, farmacologia e medicina (CECHINEL FILHO, 2015). Durante muito tempo foram o principal recurso terapêutico utilizado para tratar a saúde das pessoas e suas famílias (BADKE *et al.*, 2011).

No século XIX, em razão do avanço ocorridos no meio técnico-científico, no desenvolvimento da química analítica, da existência de uma sólida medicina tradicional fundamentada em farmacopeias estabelecidas ao longo de muito tempo, os fármacos são obtidos fundamentalmente de plantas medicinais (BADKE *et al.*, 2011; CECHINEL FILHO; YUNES, 2016). Em diversas regiões do mundo, várias plantas ainda continuam sendo utilizadas como alternativa de tratamento e cura de inúmeras enfermidades, tendo como motivos a facilidade de acesso, baixo custo e a ausência ou mínimo efeito colateral.

Apesar da inserção de medicamentos industrializados no cotidiano das pessoas, que foram gradativamente introduzidos no cotidiano das pessoas modernas com a promessa de cura das mais diversas doenças e não foi suficiente para resolver os problemas de saúde da maior parte da população, o uso das plantas medicinais não deixou de estar presente no tratamento e cura de doenças em várias famílias no Brasil (BADKE *et al.*, 2011; PATWARDHAN, 2005).

Uma vez que grande parte de importantes fármacos é oriunda de produtos naturais ou foram obtidos considerando um produto natural como protótipo, além do fato de que para a maioria dos fármacos sintéticos existem produtos naturais

que possuem o mesmo modo de ação, nos permitem estabelecer algumas hipóteses sobre o motivo de os produtos naturais continuarem sendo uma fonte de protótipos e possíveis fármacos (CECHINEL FILHO; YUNES, 2016). Dentre esta vasta gama de fármacos importantes, podemos citar a descoberta do ácido acetil-salicílico (AAS), em 1898, quando Felix Hofmann pesquisava a cura para a artrite que afligia seu pai, que era sensível aos efeitos colaterais do salicilato de sódio, mas mantendo a propriedade analgésica desejada (VIEGAS JUNIOR *et al.,* 2006). Além disso, os antibióticos desenvolveram-se sobremaneira desde o reconhecimento das propriedades antibacterianas da penicilina-G em 1932 (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Em razão da biodiversidade brasileira possuir uma grande magnitude, ainda pode ser considerado pequeno a quantidade de espécies investigadas. O Brasil, por possuir rica biodiversidade e conhecimentos tradicionais abundantes, abriga uma grande potencialidade no ramo farmacêutico para o desenvolvimento de novos medicamentos à base de plantas e extratos de vegetais (FUNARI, 2003).

A vasta biodiversidade nos leva a estabelecer outros fatores que favorecem o estudo das plantas medicinais, dentre os quais estão: a quase infinita diversidade de estruturas moleculares que podem ser determinadas, uma vez que a natureza fornece moléculas de complexidade estrutural dificilmente imaginadas ou elaboradas através de síntese; o fato dos metabolitos existentes nas plantas poderem ter surpreendentes estruturas moleculares como mecanismos de ação, já que eles interferem em complexas interações de sinalização; além do importante efeito de sinergismo que é observado nos extratos de plantas medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 2016; HARVEY, 2000).

Outro fator que vale ressaltar e tem papel importante na descoberta de novos fármacos são estudos envolvendo a cooperação multidisciplinar, como a botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a rica e inesgotável fonte de produtos naturais que o Brasil possui (MACIEL *et al*., 2002).

Diante disso, há a necessidade de estudos sobre novas espécies e das que ainda não foram estudas, bem como a continuação da pesquisa de outras

partes, que ainda não foram investigadas, das plantas estudas e o reestudo de espécies pesquisadas a décadas atrás.

O presente estudo relata sobre uma espécie da família Piperaceae. Piperaceae, pertencente à ordem Piperales, é uma das maiores famílias dentre as Angiospermas basais, somando aproximadamente 3.000 espécies de distribuição pantropical (BORNSTEIN, 1989); os membros da família ocorrem em todo o trópico de ambos os hemisférios, com grandes concentrações e centros de dispersão ocorrendo na América Latina e na Malásia; no Brasil são encontradas aproximadamente 500 espécies (YUNCKER, 1972, 1973, 1974).

A família Piperaceae está dividida em cinco gêneros: *Macropiper, Zippelia, Piper, Peperomia* e *Manekia*, sendo o gênero *Piper* o maior representante da família incluindo mais de 1000 espécies, nos quais poucas espécies foram estudadas do ponto de vista fitoquímico. As espécies de *Piper* assumem a forma de arbustos, ervas e lianas comuns no sotão das florestas úmidas das terras baixas, possuindo maior diversidade de espécies nos trópicos americanos (700) seguido pelo sul da Ásia (300), no Brasil estão distribuídas na Floresta Amazônica e Atlântica (JARAMILLO *et al*., 2004; JARAMILLO & MANOS, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2011).

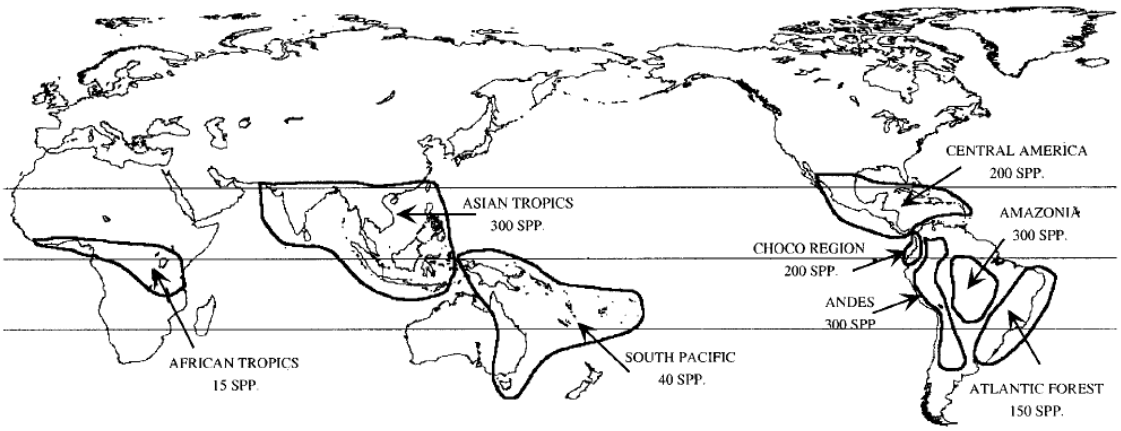


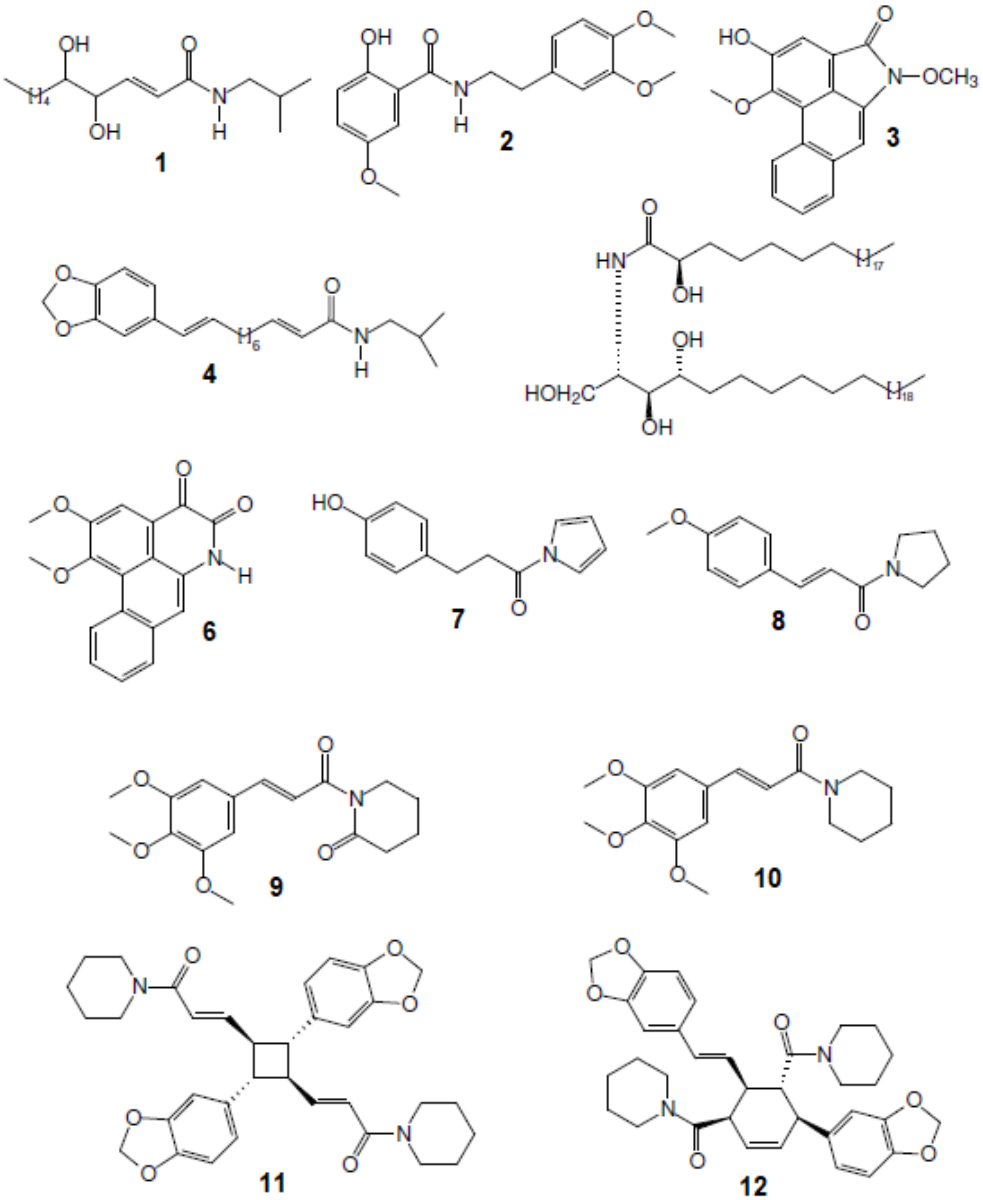

Figura 1: Distribuição fitogeográfica do gênero Piper. (JARAMILLO & MANOS, 2001).

A maioria das substâncias isoladas do gênero *Piper* possuem atividade inseticida, porém diversas outras atividades vêm sendo atribuídas as substâncias isoladas das espécies deste gênero, como: antimicrobiana (REBELO *et al*., 2012), antileishmania, tripanocida (FIGUEREDO *et al.*, 2014),

antioxidante (SILVA *et al.*, 2014), larvicida (SIQUEIRA *et al.*, 2014), fungicida (AIRES; LIMA, 2014), antidepressiva (ZIMATH *et al.*, 2017), antiviral (MAZZEU, 2014), acaricida (SANTOS *et al.*, 2010), anticancerígena, vasodilatadora, anti-histamínica, anti-inflamatória, analgésica (PISSURNO; LAURENTIZ, 2017), entre outras.

Várias classes de metabólitos secundários já foram identificadas, como flavonas, lignanas, terpenos (FURLAN *et al.*, 2009), amidas/alcaloides, esteroides (FACUNDO *et al.*, 2008), fenilalcanoides/benzenoides (LAGO et al., 2009), cumarinas (GONÇALVES; LIMA, 2016), flavonoides (PORTET et al., 2008), chalconas/diidrochalconas (PORTET et al., 2007 e 2008), hidroquinonas (YAMAGUCHI et al., 2006), cromonas (KITAMURA et al., 2006), ácidos graxos (KIJJOA et al., 1989), ceramidas (HUANG et al., 2010), -tornando vasta a diversidade da constituição química apresentada pelo gênero *Piper*.

Várias espécies do gênero *Piper* apresentam amidas como principais constituintes. É sabido que alcaloides são compostos contendo átomo de nitrogênio em nível de oxidação negativo: -3 para aminas, amidas, e sais de amônio, e -1 para óxidos de amina. (PELLETIER, 1983). As amidas isoladas de qualquer espécie *Piper* são chamadas de piperamidas, sendo dividadas em amidas/alcalóides de cadeia aberta - exemplo: silvanamida [**1**], alcamidas – taiwanamida A [**2**], aristolactamas – piperlactama S [**3**], amidas com grupo metilenodioxi – piperchabamida D [**4**], ceramidas - (2*S*,3*S*,4*R*)-2-*N*-[(2'*R*)-2'-hidroxipentacosanoilamino]-nonacosano-1,3,4-triol [**5**]), 4,5-dioxoporfirinas – norcefaradiona B [**6**], amidas com grupos pirrol – piperlotina E [**7**], pirrolidina – piperlotina A [**8**], piperidona - piplatina [**9**] e piperidina - puberulumina [**10**], ciclobutanamidas – dipiperamida A [**11**] e ciclohexanamidas – nigramida B [**12**].

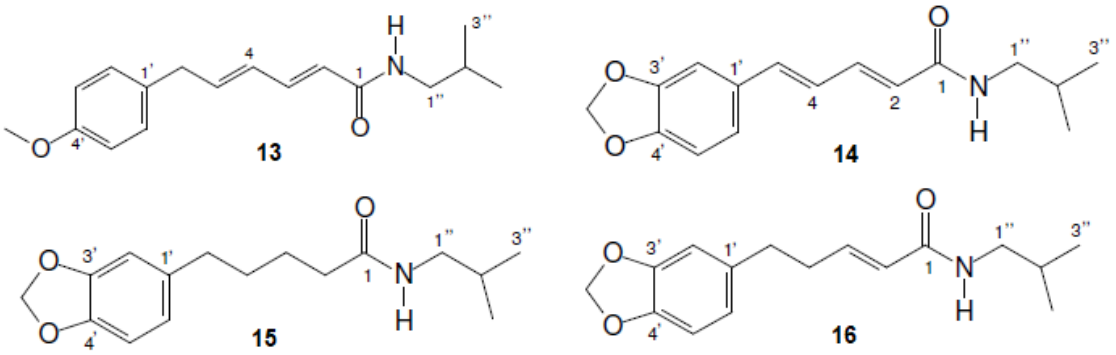


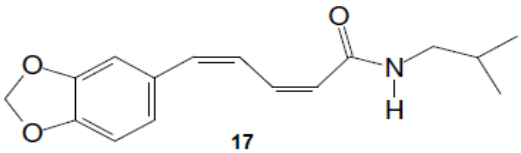

Em uma revisão feita por NASCIMENTO *et al.* (2012), foram listadas 182 amidas isoladas de várias espécies do gênero *Piper*. De acordo com o mesmo autor anteriormente foi publicada, por SCOTT *et al.* (2008), uma revisão das amidas naturais e sintéticas com atividade inseticida. Na revisão de NASCIMENTO *et al.* (2012), foram relatadas uma ampla gama de outras atividades biológicas atribuídas a amidas isoladas do gênero *Piper*.

As raízes da espécie *Piper klotzchianum* já foram estudadas por NASCIMENTO (2011), sendo isoladas algumas piperamidas, assim chamadas por serem amidas comumente encontradas em plantas do gênero *Piper*, como a piperovatina [**13**], piperlonguminina [**14**], tetrahidropiperlonguminina [**15**], 4,5-dihidropiperlonguminina [**16**], isopiperlonguminina [**17**], hoffmannseggiamida A

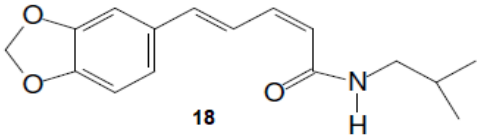
[**18**], além das isobutilamidas [**19**-**26**]. Também foram isoladas das raízes de *P. klotschianum*, por NASCIMENTO (2011), as cromanonas (2*S*,3*S*)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [**27**], (2*S*,3*R*)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [**28**] e (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [**29**], além dos ácidos *trans*-feruloiloxidocosanóico [**30**], *trans*-feruloiloxitetracosanóico [**31**] e *trans*-feruloiloxihexacosanóico [**32**].

Visando contribuir ainda mais com o estudo fitoquímico e biológico da espécie, o presente trabalho descreve o isolamento e caracterização de substâncias das folhas de *Piper klozstchianum*. A avaliação do efeito tóxico frente *Artemia salina* e a atividade antimicrobiana foram investigadas. Os testes frente *Artemia salina* tem relevância devido a contribuição para descoberta de nas substâncias ativas com propriedades tóxicas para futuras realizações de testes fungicida, larvicida, antitumoral e quaisquer outros testes que visem a mortalidade de algum tipo de micro-organismo. Já o teste antimicrobiano tem como relevância a descoberta de novos fármacos com potencial para combater bactérias que possuem resistência as substâncias com atividade antimicrobiana comprovada.

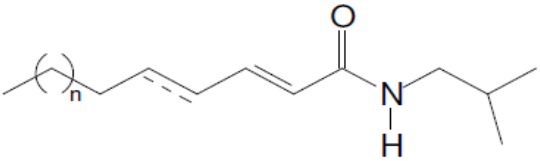




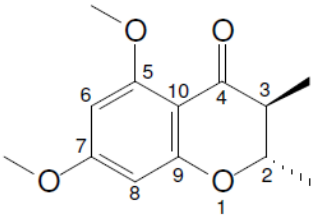
**17**



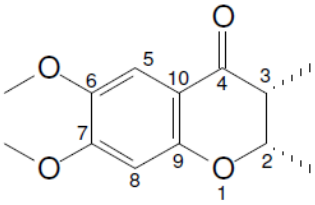
**18**



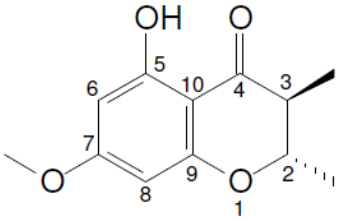
n = 1 **[19]** - (2E,4E)-*N*-isobutilocta-2,4-dienamida
n = 3 **[20]** - (2E,4E)-*N*-isobutildeca-2,4-dienamida
n = 4 **[21]** - (2E,4E)-*N*-isobutilundeca-2,4-dienamida
n = 5 **[22]** - (2E,4E)-*N*-isobutildodeca-2,4-dienamida
n = 6 **[23]** - (2E,4E)-*N*-isobutiltrideca-2,4-dienamida
n = 7 **[24]** - (2E,4E)-*N*-isobutiltetradeca-2,4-dienamida
n = 9 **[25]** - (2E,4E)-*N*-isobutilhexadeca-2,4-dienamida
n = 9 **[26]** - (2E)-*N*-isobutilhexadeca-2-dienamida



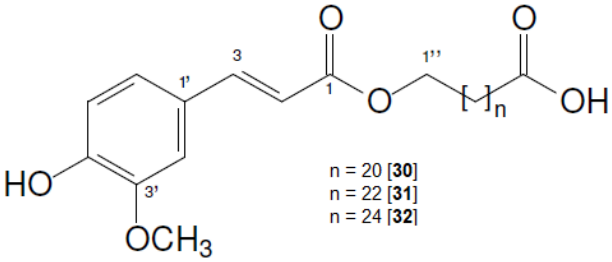
**27**



**28**



**29**



n = 20 [**30**]
n = 22 [**31**]
n = 24 [**32**]

# 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo dos componentes fixos das folhas de *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE) e avaliar a atividade biológica dos extratos e das substâncias isoladas.

## 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade e o perfil cromatográfico dos extratos das raízes dos espécimes de *Piper klotzschianum* visando o estudo guiado por bioensaio;
- Serão estudados os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico das folhas de *Piper klotzschianum* através de técnicas clássicas de cromatografia;
- Identificar os diferentes metabólitos isolados utilizando técnicas espectroscópicas (RMN, UV, IV) e espectrométrica (EM);
- Avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias isoladas de *Piper klotzschianum* contra:
    - um coco Gram-positivo aeróbio, *Staphylococcus aureus CBAM 324*, *Staphylococcus aureus* AC, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984;
    - um bacilo Gram-negativo fermentador aeróbio, *Escherichia coli* CBAM 002, *Escherichia coli* EPEC, *Proteus mirabilis* ATCC 15920;
    - um bacilo Gram-negativo não fermentador aeróbio *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25003 e uma levedura *Candida kruzei* ATCC 6258.
- Avaliar o efeito tóxico dos extratos e das substâncias isoladas frente à *Artemia salina*.
- Colaborar com a pesquisa em busca de novos compostos naturais com bioatividade que possam servir de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 Materiais e equipamentos utilizados

- Os solventes utilizados para o preparo dos extratos, solubilização das amostras e eluições em cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em coluna (CC) foram: metanol, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, éter etílico e hexano. Todos estes solventes foram de grau analítico (procedência Química Moderna, Vetec, Quemis, Synth e Cromoline).
- Nos processos de separação e purificação em CC foi utilizada como fase estacionária sílica-gel 60 (0,063-0,200 mm e 0,040-0,063 mm- "sílica flash") da Aldrich. Para as análises em CCD foram utilizadas placas de vidro com 1 mm de sílica-gel com indicador de fluorescência $UV_{254}$, da Fluka e Vetec, ativadas em estufa a 120 ºC por 2 horas.
- Os reveladores utilizados nas análises de CCD foram: exposição das placas a radiação em câmara de luz ultravioleta de 254 e 365 nm (BOITTON – Modelo BOIT-GAB01); vapor de iodo em cuba apropriada.
- O evaporador rotatório utilizado para evaporação de solventes sob pressão reduzida foi da marca Fisatom, modelo 801, com temperatura em geral entre 35 e 60 ºC.
- Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em um Espectrofotômetro de IV por Transformada de Fourier (FTIR), da marca Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR. Os espectros foram obtidos pelo método ATR com amostras sólidas e/ou gelatinosas/oleosas.
- As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho da Shimadzu modelo QP2010 SE. As condições de análise por CG-EM foram: temperaturas do injetor e da interface, 290 °C, temperatura inicial da coluna 100 °C, durante 1 min, sendo aumentada 5 °C $min^{-1}$, até atingir 285 °C; fluxo do gás de arraste (He) foi de 1,8 $mL.min^{-1}$.
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), uni e bidimensionais de 300 e 500 MHz para RMN de $^{13}C$ e 75 e 125 MHz para RMN de $^{1}H$, foram adquiridos em um espectrômetro Varian-Mercury 300 MHz do Laboratório de RMN da Universidade Federal de Viçosa (UFV),

em um espectrômetro Varian GEMINI 2000 e Varian Inova 500 (UFBA), um espectrômetro Agilent Technologies, modelo 500/54 Premium Shielded, da Universidade de São Paulo (USP) de São Carlos.

## 3.2 Coleta do Material Vegetal e Identificação da Espécie

As folhas de *Piper klotzschianum* (Figura 2, p.28) foram coletadas em 02 de Janeiro de 2013, em Vila do Riacho-Aracruz, ES. As suas exsicatas foram preparadas e encaminhadas para o Jardim Botânico do Rio de Janeiro e foram identificadas pela Profa. Dra. Elzie Flanklim Guimarães e se encontram depositadas no Herbário do Jardim Botânico com registro nº 480408, 480409 e 480410.

Figura 2: Fotos da espécie *Piper klotzschianum*. Fonte: (Nascimento, 2011)

## 3.3 Preparo dos Extratos

As folhas de *P. klotzschianum* (361,50 g) foram submetidas ao processo de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger, para obtenção do óleo essencial, segundo a metodologia de PEREIRA 2015. Os óleos essenciais extraídos foram estudados por outro pesquisador. Após extração dos voláteis, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar à 40ºC. Em seguida foram trituradas em liquidificador industrial.

Após a trituração das folhas, 281,85 g do pó obtido foi submetido a uma extração a frio utilizando EtOH como solvente extrator por 7 dias, depois dos quais o solvente foi removido utilizando um evaporador rotatório sob pressão reduzida para obtenção do extrato etanólico. Quando totalmente seco, o extrato etanólico bruto das folhas (EEFPK) apresentou massa igual a 19,0 g.

O extrato bruto foi fracionado a partir de uma extração líquido-líquido (ELL) para obtenção dos extratos hexânicos (EHFP), diclorometânico (EDFP) e acetato de etila (EAFP). A ELL foi realizada utilizando uma mistura de MeOH:$H_2O$ (8:2) para dissolver o extrato. Em seguida foram realizadas as extrações com hexano, diclorometano e acetato, sendo obtidos os extratos EHFP= 16,0 g, EDFP= 64,5 mg e EAFP= 5,4 mg. Como se obteve uma maior massa com a extração em hexano, o EHFP foi o extrato escolhido para ser trabalhado.

## 3.4 Isolamento dos constituintes químicos das folhas de *P. klotzschianum*

### 3.4.1 Fracionamento do Extrato Hexânico das Folhas - EHFP

A fração hexânica (16,02 g) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando sílica-gel 60 como fase estacionária e os solventes Hex, $CHCl_3$, DCM, AcOEt e MeOH. A coluna foi iniciada com 500 mL de Hex, seguido por 400 mL de $CHCl_3$, 2 L de DCM, 800 mL de AcOEt e 800 mL de MeOH.

Foram coletadas: 9 frações de aproximadamente 55 mL com o solvente Hex, sendo nomeadas como EHFP1 (1-9), além das frações ECFP, EDFP, EAFP e EMFP que também foram obtidas com os solventes $CHCl_3$, DCM, AcOEt e MeOH, respectivamente.

#### 3.4.1.1 Purificação da fração EHFP1-2

O material da fração EHFP1-2 (1,0 g) foi incorporado a sílica-gel 60 e submetido a purificação por CC sob sílica-gel 60, utilizando como fase móvel mistura dos solventes Hex e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. A

coluna possuía 65 cm de altura, 2 cm de diâmetro e contendo sílica na altura de 35 cm. A coluna foi iniciada utilizando 550 mL de Hex, seguido por 210 mL de Hex:AcOEt (20:1), 160 mL de Hex:AcOEt (15:1), 130 mL de Hex:AcOEt (12:1) e finalizada com 200 mL de Hex:AcOEt (9:1). Foram coletadas 33 subfrações de aproximadamente 40 mL de cada que, após comparação por CCD, foram reunidas em 18 frações, dentre elas as frações EHFP2-2 (17,9 mg) e EHFP2-4 (3,6 mg). Análise de IV, CG-EM, RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$ e comparação com dados da literatura permitiram identificar a subfração EHFP2-2 como sendo um triterpenoide [**33**] e a EHFP2-4 como sendo um butilpropanoide [**34**].

#### 3.4.1.2 Purificação das frações EHFP2-10 e EHFP2-11

As frações EHFP2-10 (90,0 mg) e EHFP2-11 (31,1 mg) foram agrupadas e submetida à CC sobre sílica-gel 60 e fase móvel mistura dos solventes Hex e AcOEt, iniciando com 300 mL de Hex:AcOEt (20:1) e finalizando com 60 mL de Hex:AcOEt (1:1). A coluna possuía 30 cm de altura, 1,5 cm de diâmetro e contendo sílica na altura de 22 cm. Foram coletadas 9 subfrações de aproximadamente 40 mL e após comparação por CCD foram reunidas em 7 frações. Foi realizada IV da fração EHFP4-1 (26,5 mg), depois da análise do espectro foi possível identificar a função éster e chegar à conclusão de que a amostra era composta por triacilglicerol. Foi realizada reação de transesterificação.

A transesterificação da fração EHFP4-1 foi realizada apenas com 10 mg da amostra. Essa quantidade foi dissolvida em 1 mL de solução de metóxido de sódio 0,8M em um tubo de ensaio. O tubo foi aquecido a 100 ºC durante 5 minutos, em seguida, foi adicionado 0,4 mL de uma mistura de HCl (36%) e MeOH numa proporção de 4:1 (v/v) e aquecido novamente a 100 ºC por mais 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 2 mL de água destilada. Os ésteres metílicos obtidos foram extraídos através de uma extração líquido-líquido utilizando 5 mL de hexano e repetido por 3 vezes. A fase orgânica foi submetida a secagem com $Na_2SO_4$ anidro e em seguida filtrada.

Após a reação de transesterificação, a amostra foi analisada por CG-EM podendo ser confirmada a mistura de cinco ésteres metílicos [**35** a **39**].

#### 3.4.1.3 Purificação da fração EHFP2-14

A fração EHFP2-14 (130,9 mg) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica-gel 60 e como fase móvel os solventes Hex, DCM e AcOEt. A coluna possuía 30 cm de altura, 1,5 cm de diâmetro e contendo sílica na altura de 12 cm. Foi iniciada a coluna com 300 mL de Hex:DCM, na proporção 6:4, em seguida 100 mL de DCM e finalizada com 100 mL de AcOEt. Foram coletadas 10 subfrações de aproximadamente 40 mL e após comparação em CCD foram reunidas em 8 frações. A fração EHFP3-3 (10,8 mg) foi submetida a análise de CG-EM e RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$, sendo identificada como uma mistura de três isômeros de asarona [**40** a **42**].

#### 3.4.1.4 Purificação da fração EHFP4-3

Essa fração (61,4 mg) foi submetida à CC sobre sílica-gel 60, utilizando como fase móvel os solventes Hex e AcOEt. A coluna foi realizada utilizando 100 mL de Hex:AcOEt (15:1) e finalizada com 50 mL de AcOEt, sendo coletadas 7 frações de aproximadamente 20 mL. A coluna possuía 30 cm de altura, 1,5 cm de diâmetro e contendo sílica na altura de 23 cm. A fração EHFP5-2 (22,8 mg) foi analisada por CG-EM e RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$, sendo identificada como a vitamina E [**43**]; já a EHFP5-5 (7,8 mg) uma mistura de quatro ésteres etílicos [**44** a **47**].

### 3.4.2 Fracionamento do Extrato Clorofórmico das Folhas - ECFP

A fração clorofórmica (737,3 mg) foi submetida à CC utilizando como fase móvel sílica-gel 60 e os solventes Hex, AcOEt e MeOH como fase móvel. A coluna foi iniciada com 500 mL de Hex:AcOEt (5:2), seguido por 200 mL de Hex:AcOEt (1:1) e finalizada com 200 mL de MeOH. Foram coletadas 16 subfrações de aproximadamente 55 mL, as quais foram submetidas à sucessivas CC.

#### 3.4.2.1 Purificação da fração ECFP6-5

A fração ECFP6-5 (22,0 mg) foi purificada através de cromatografia em coluna sobre sílica flash utilizando como fase móvel os solventes Hex, AcOEt e MeOH. A coluna utilizada possuía 29 cm de altura, 1,5 cm de diâmetro e contendo sílica flash na altura de 14,5 cm. A CC foi iniciada com 90 mL de Hex:AcOEt (2:1), seguido por 50 mL de Hex:AcOEt (1:1) e finalizada com 30 mL de MeOH. Foram coletadas 9 subfrações de aproximadamente 19 mL e após comparação por CCD foram reunidas em 7 frações. As frações ECFP7-4 (9,3 mg) e ECFP7-5 (1,9 mg) foram analisadas por CG-EM e comparação com dados da literatura, sendo identificada como a tetrahidropiperlonguminina [**15**].

#### 3.4.2.2 Purificação da fração ECFP8-3

A fração ECFP8-3 (30 mg) foi submetida à CC para purificação, utilizando como fase estacionária sílica flash e como fase móvel os solventes Hex, AcOEt e MeOH. A coluna utilizada possuía 29 cm de altura, 1,5 cm de diâmetro e contendo sílica flash na altura de 19,7 cm. A coluna foi iniciada com 110 mL de Hex:AcOEt (2:1), seguido por 30 mL de AcOEt e finalizada com 40 mL de MeOH. Foram coletadas 6 subfrações de aproximadamente 30 mL e após comparação por CCD foram reunidas em 3 frações. Análise de CG-EM, RMN de $^{1}H$, de $^{13}C$ e comparação com dados da literatura permitiram identificar a fração ECFP10-2 como uma mistura das amidas piperovatina [**13**] e 4,5-dihidropiperlonguminina [**16**].

### 3.4.4 Fracionamento do Extrato Metanólico das Folhas - EMFP

A fração EMFP (1,731 g) foi submetido a cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica-gel 60 e como fase móvel os solventes $CHCl_3$ e MeOH. A coluna foi iniciada com 1,2 L de $CHCl_3$:MeOH (9:1), seguido por 400 mL de $CHCl_3$:MeOH (8,5:1,5), 200 mL de $CHCl_3$:MeOH (8:2), 100 mL de $CHCl_3$:MeOH (7:3), 500 mL de $CHCl_3$:MeOH (1:1) e finalizada com 300 mL de MeOH. Foram coletadas 30 frações de aproximadamente 90 mL, após

comparação por CCD foram reunidas em 18 frações, as quais foram submetidas à sucessivas CC.

#### 3.4.4.1 Purificação da fração EMFP2-8

A fração EMFP2-8 (29,5 mg) foi lavada com éter etílico para separação de um sólido branco. O sólido obtido a partir da lavagem da fração foi nomeado de EMFP2-8S (11,4 mg). O sobrenadante foi reunido a mais três frações (EMFP2-6, EMFP2-7 e EMFP2-9) e submetido à cromatografia em coluna. Análise de RMN de $^{1}H$, de $^{13}C$ e comparação com dados da literatura permitiram identificar a fração EMFP2-8S como sendo uma mistura dos esteróides daucosterol (β-sitosterol-3-O-β-D-glicosídeo) [**48**] e estigmasterol-3-O-β-D-glicosídeo [**49**].

## 3.5 Ensaios biológicos

### 3.5.1 Avaliação da atividade tóxica frente à *Artemia salina*

Para realização do teste de toxicidade dos extratos frente à *Artemia salina* foi utilizado o método desenvolvido por MEYER et al. 1982 e adaptado por SERRANO *et al*. 1996. Para execução do teste, os ovos do microcrustáceo foram adquiridos em uma loja de produtos para aquários.

Os ovos adquiridos foram colocados na parte escura de um aquário adaptado dividido em dois compartimentos assimétricos com uma pequena interligação entre eles, contendo água do mar artificial preparada com 120g de sal marinho em 3L de água destilada. O compartimento maior do aquário foi iluminado, com uma lâmpada florescente de 60 W, para tornar o meio propício para eclosão dos ovos fazendo com que as larvas recém-eclodidas migrassem para esse compartimento a fim de serem recolhidos com maior facilidade. Para manter a oxigenação da água foi utilizada uma bomba comum de aquário. Depois de 48 h, os náuplios foram utilizadas no bioensaio.

A solução estoque foi preparada dissolvendo-se 4 mg das amostras pura em cinco gotas de Tween-80 e completado para 5,0 mL com água do mar

artificial previamente filtrada, obtendo uma solução de concentração igual a 0,8 $mg.mL^{-1}$. As demais soluções de concentração inferior (5, 10, 20, 30, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$), foram obtidas a partir da diluição da solução estoque. Para o extrato, a solução teste foi preparada dissolvendo-se 20 mg em cinco gotas de Tween-80 e completado para 5,0 mL com água do mar artificial previamente filtrada, resultando em uma solução de concentração igual a 4 $mg.mL^{-1}$ e foi considerada a solução estoque. As demais soluções de concentração inferior (5, 10, 20, 30, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$), foram obtidas a partir da diluição da solução estoque.

Dez larvas recém eclodidas de *A. salina* foram adicionadas em cada um dos seis frascos, contendo as soluções das amostras pura e extrato, nas concentrações anteriormente citadas. Cada frasco teve seu volume completado para 5 mL da água do mar artificial, para que se pudesse chegar às concentrações, que foram previamente descritas aqui, em $\mu g.mL^{-1}$.

As análises foram realizadas em triplicatas para cada concentração e para o controle negativo. Como controle negativo foi utilizado uma solução contendo apenas Twenn-80. Os frascos foram mantidos sob iluminação e as larvas sobreviventes foram contadas após 24 h e 48 h. Os náuplios foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com o programa Microsoft Office Excel 2016. A $CL_{50}$ foi estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração das amostras e extratos testados.

### 3.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os microrganismos utilizados para o teste de atividade antimicrobiana foram conservados em meio de Lignieri (BEER, 1985) numa temperatura de 5ºC. A atividade antimicrobiana foi avaliada frete aos microrganismos Gram positivos, *Staphylococcus aureus (*AC e CBAM 324) e *S. epidermidis*; Gram negativos, *Escherichia coli* (EPEC e CBAM 002), *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa e* uma espécie de levedura: *Candida kruzei*. Um dia antes da realização dos testes os microrganismos foram semeados em placas de Petri

contendo meio de Müeller-Hinton e incubados a 36ºC em estufa bacteriológica durante 24 h. Ao final do período de incubação, as placas foram retiradas e as colônias utilizadas no preparo da suspensão microbiana.

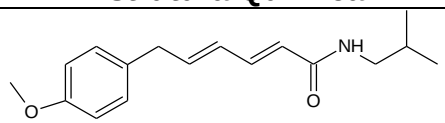
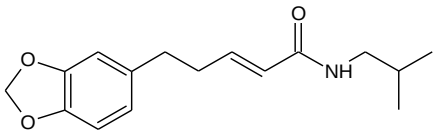
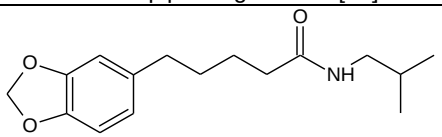
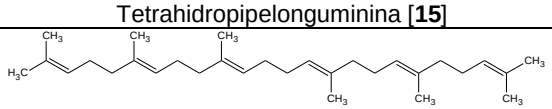
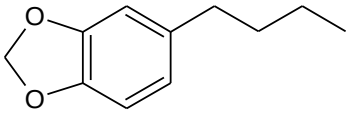
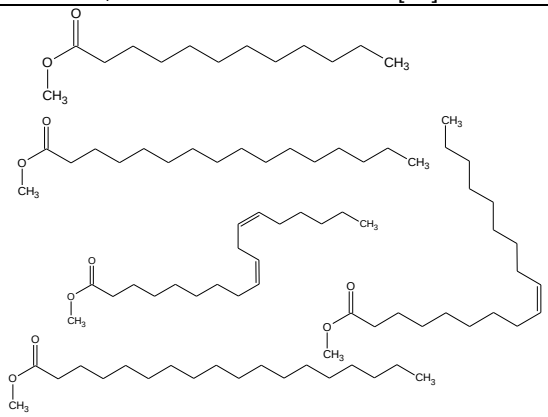
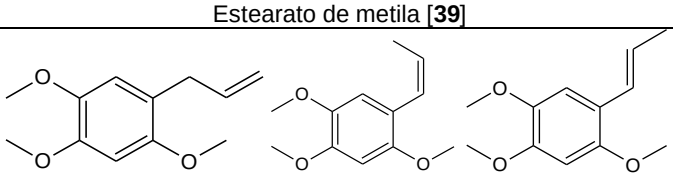
*Preparo da suspensão microbiana*: após a ativação, uma ou duas colônias do microrganismo em estudo foram retiradas da placa de Petri, com o auxílio de uma alça de platina, e inoculada em um tubo de vidro contendo 2 mL de caldo de Müeller-Hinton esterilizado. Este procedimento foi realizado para todos os microrganismos utilizados no ensaio. Para medir a turbidez e comparar com a escala de MacFarland (BEER, 1985) foi realizada a homogeneização da suspensão de cada tubo. Posteriormente, os tubos foram incubados a 36 ºC durante 1 h e depois novamente a sua turbidez foi comparada com a escala de MacFarland, sendo acrescentado mais inoculo ou diluindo a suspensão adicionando meio de cultura até chegar a turbidez adequada para se utilizar a suspensão na determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

*Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)*: o ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado em placas estéreis para cultura de tecido de 96 orifícios (TPP®). A cada orifício foram adicionados 187 µL de caldo Müeller-Hinton, 10 µL da solução de cada amostra, na diluição apropriada a ser testada, e 3 µL da suspensão bacteriana ou da levedura, totalizando um volume de 200 µL. Todas as amostras foram diluídas em DMSO e a menor concentração final testada em cada ensaio foi de 34,0 $\mu g.mL^{-1}$ e a maior concentração foi de 1300,0 $\mu g.mL^{-1}$. Para o controle do crescimento microbiano, a mesma quantidade da suspensão microbiana foi inoculada em 187 µL de caldo de Müeller-Hinton mais 10 µL de DMSO. No controle negativo, nenhum microrganismo foi inoculado no orifício contendo 188 µL de meio de cultura e 10 µL de DMSO. A microplaca foi incubada durante 24 h, em estufa a 36 ºC.

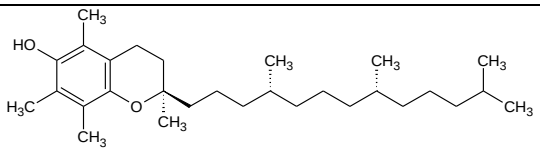
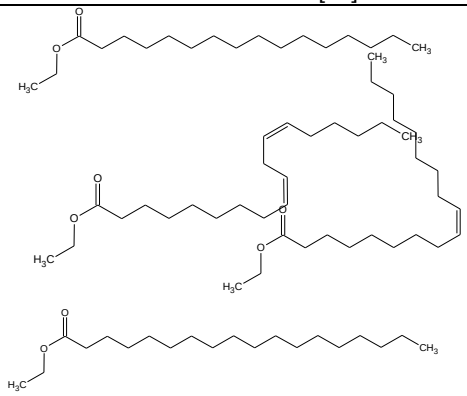
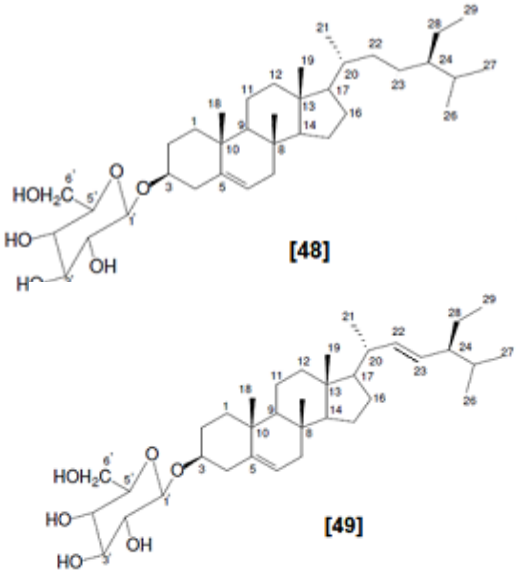
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela I (p. 36) estão apresentados os constituintes isolados dos extratos hexânicos, clorofórmico e metanólico das folhas de *P. klotzschianum*, bem como os experimentos realizados para a identificação dos mesmos.

Tabela I - Constituintes químicos identificados nas raízes de *Piper klotzschianum*

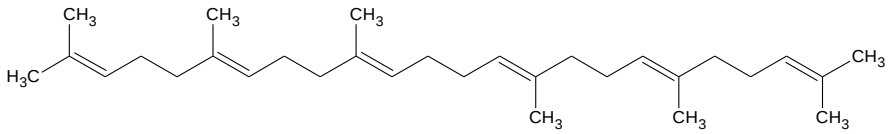
| Estrutura Química | Experimentos realizados |
|---|---|
|   Piperovatina [**13**]<br>Dihidropiperlonguminina [**16**] | IV, CG-EM e RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$ |
|  Tetrahidropipelonguminina [**15**] | CG-EM |
|  Esqualeno [**33**] | IV e CG-EM |
|  1-butil-3,4-metilenodioxidobenzeno [**34**] | CG-EM |
|  Dodecanoato de metila [**35**]<br>Palmitato de metila [**36**]<br>Linoleato de metila [**37**]<br>Oleato de metila [**38**]<br>Estearato de metila [**39**] | IV e CG-EM |
|  Isoasarona [**40**]<br>*cis*-asarona [**41**]<br>*trans*-asarona [**42**] | CG-EM, RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$ |

*Cont. Tabela I*

| | |
|---|---|
|  <br>Vitamina E [**43**] | CG-EM |
|  <br>Pentadecanoato de etila [**44**]<br>(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de etila [**45**]<br>(Z)-octadec-9-enoato de etila [**46**]<br>Octadecanoato de etila [**47**] | CG-EM, RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$ |
|  <br>**[48]**<br>**[49]** | CG-EM e RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$ |

## 4.1 Identificação e elucidação estrutural

### 4.1.1 Elucidação do esqualeno [33]




**[33]**

A identificação do esqualeno ($C_{30}H_{50}$) na subfração EHFP2-2, de aspecto oleoso e coloração amarelada, foi realizada através da análise do cromatograma realizado em CG-EM (Figura 3, p.39), comparando o espectro de massas presente na amostra com os das bibliotecas NIST14 e WILEY7, obtendo 95% de similaridade.

O íon molecular do esqualeno (*m/z* 410) sofre fragmentação (Figura 4, p.39) através de clivagem homolítica de uma ligação simples produzindo cátion alílico (*m/z* 69) que é estabilizado por ressonância.

O espectro de IV (Figura 5, p.39) apresentou sinais característicos de hidrocarbonetos alifáticos insaturados. Apresentaram bandas intensas em 2966,4 $cm^{-1}$, 2913,5 $cm^{-1}$ e 2851,5 $cm^{-1}$ característicos de deformações axiais de grupos metila ($–CH_3$), metilênicos ($–CH_2$) e metinícos (–CH), devido à grande quantidade desses grupos presente na molécula; em 1439,7 $cm^{-1}$ pode ser verificado banda de deformação angular de $CH_2$ e em 1376,6 $cm^{-1}$ banda de deformação angular de $CH_3$. Além da banda intensa em 833,4 $cm^{-1}$, referente a deformação de grupos =C-H. Os sinais das deformações axiais de C=C não apareceram devido a simetria da molécula.

O esqualeno já foi identificado no extrato das folhas de *P. klotzschianum* por Lima (2014), utilizando extração com fluido supercrítico.

O esqualeno, um triterpeno intermediário na biossíntese de esteróis e triterpenos pentacíclicos, apresenta atividade antioxidante e propriedades preventivas de vários tipos de câncer. Amplamente distribuído na natureza, o esqualeno recebe esse nome devido a sua ocorrência em grandes quantidades no óleo de fígado de tubarão do gênero *Squalus sp*. Ensaios in vitro e em

modelos animais mostraram que o esqualeno pode inibir os processos tumorais do cólon, pulmões e pele em roedores e é o principal fator responsável pela redução do risco de cancro em comparação com outros ingredientes alimentares usados naqueles ensaios (BATISTA *et al.*,2014; NAKAMURA, 1997).

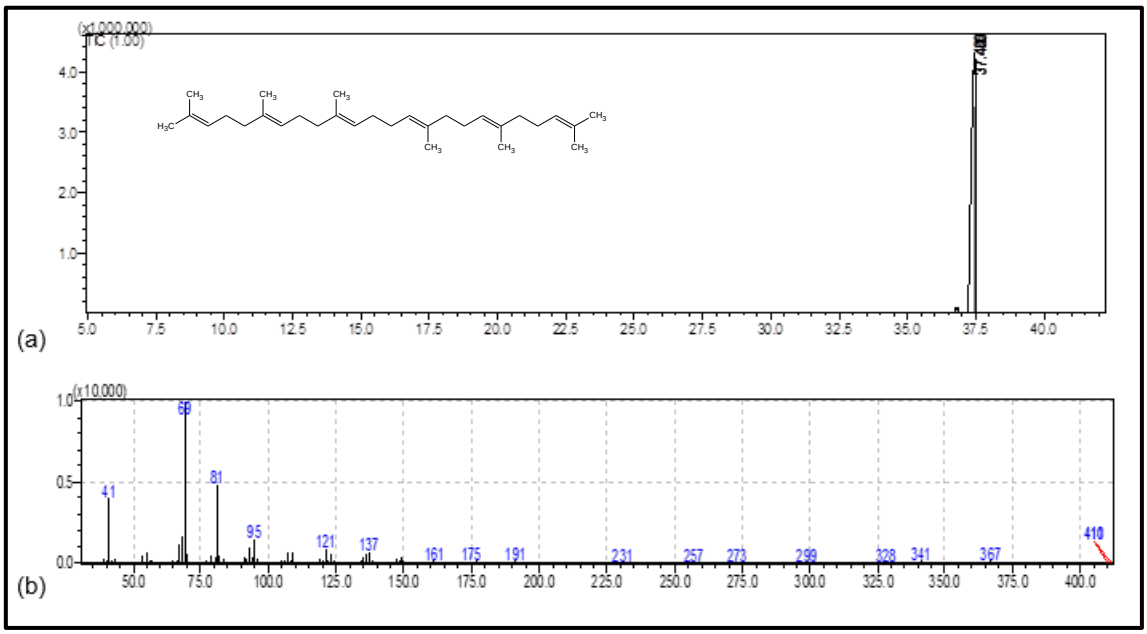



Figura 3: (a) Cromatograma em CG-EM do esqualeno com pico majoritário em RT=37.469 min (b) Espectro de massa do esqualeno

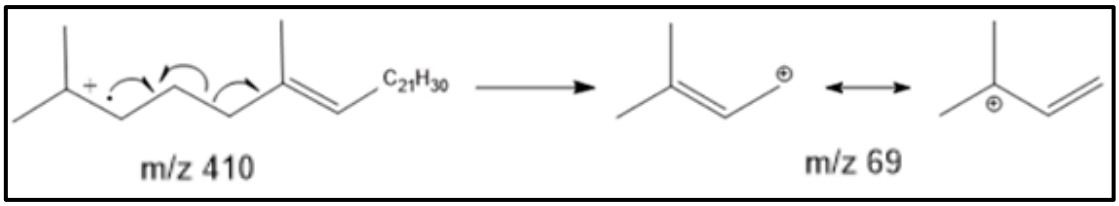



Figura 4: Principal fragmentação apresentada no EM do íon molecular do esqualeno

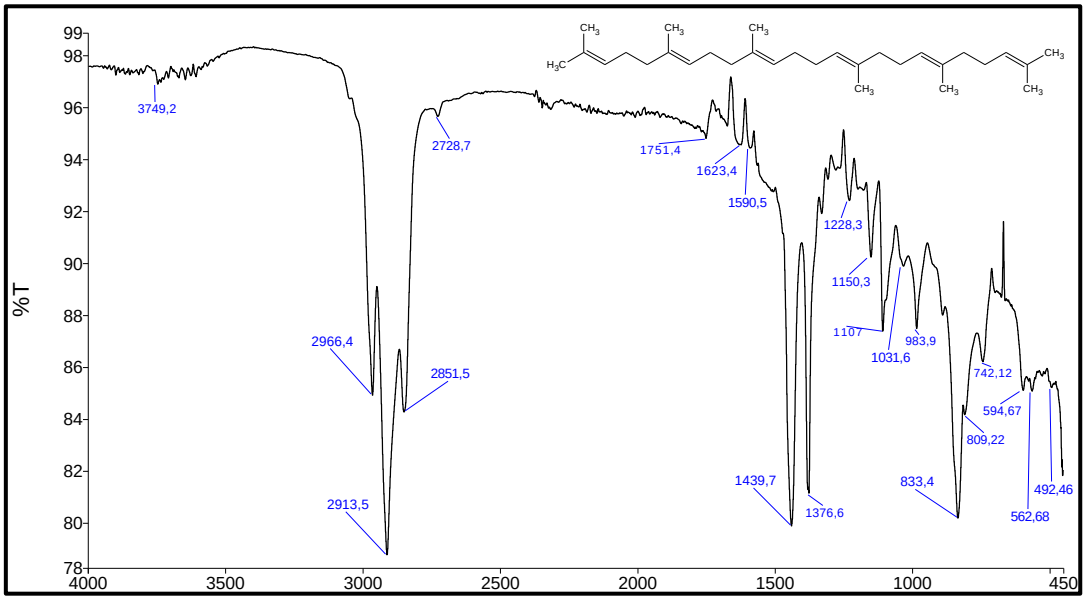
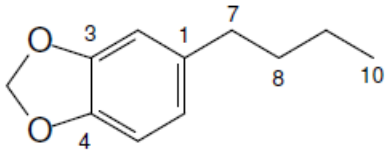



Figura 5: Espectro de IV do esqualeno

### 4.1.2 Elucidação do 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno [34]




**[34]**

Ao analisar o CG-EM da fração EHFP2-4 (Figura 6, p.40), percebe-se que apesar da substância majoritária (pico 1), ela não apresenta um bom grau de pureza. Foram comparados o tempo de retenção e o espectro de massas de íons totais, que foram idênticos ao do padrão 4-butil-1,2-metilenodioxi-benzeno relatado anteriormente por Nascimento (2011) como um dos principais constituintes voláteis presentes nas raízes, caules, sementes e folhas da *P. klotzschianum*. Também foram comparados o RF com padrão autentico, além do aroma característico da substância.

O íon molecular do 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno (*m/z* 178) sofre fragmentação através de clivagem heterolítica de uma ligação simples de C7 com C8 produzindo um cátion que é estabilizado através de um rearranjo formando um íon tropílio substituído com o grupo metilenodióxido (*m/z* 135), com intensidade relativa de 100%. Esse principal íon molecular está em acordo com o relatado por NASCIMENTO (2011) para esta substância. Os principais fragmentos gerados são mostrados na Figura 7 (p.41).

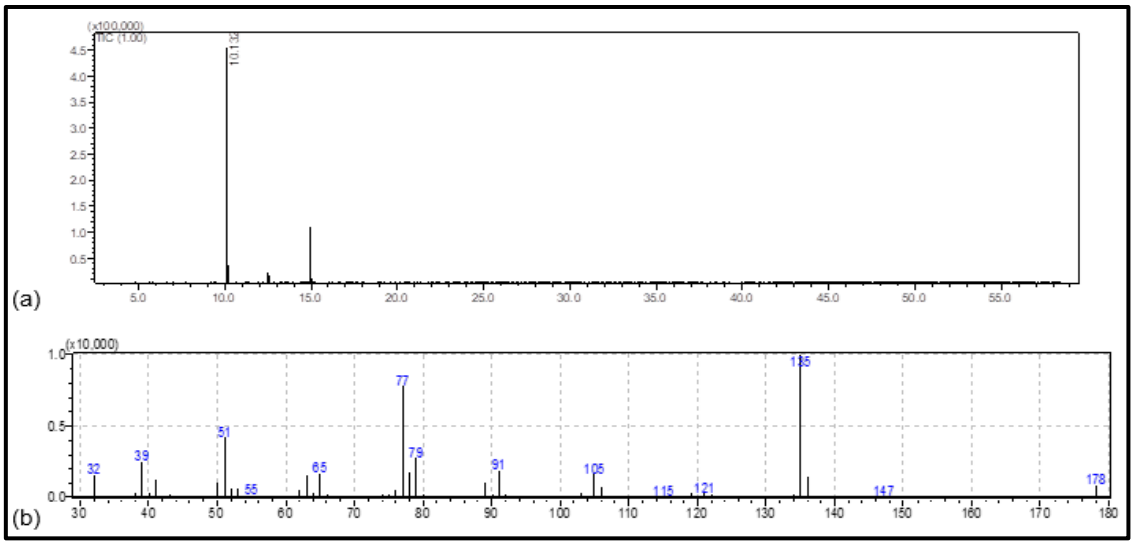



Figura 6: (a) Cromatograma em CG-EM do 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno com pico majoritário em RT=10.132 min (b) Espectro de massa 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno

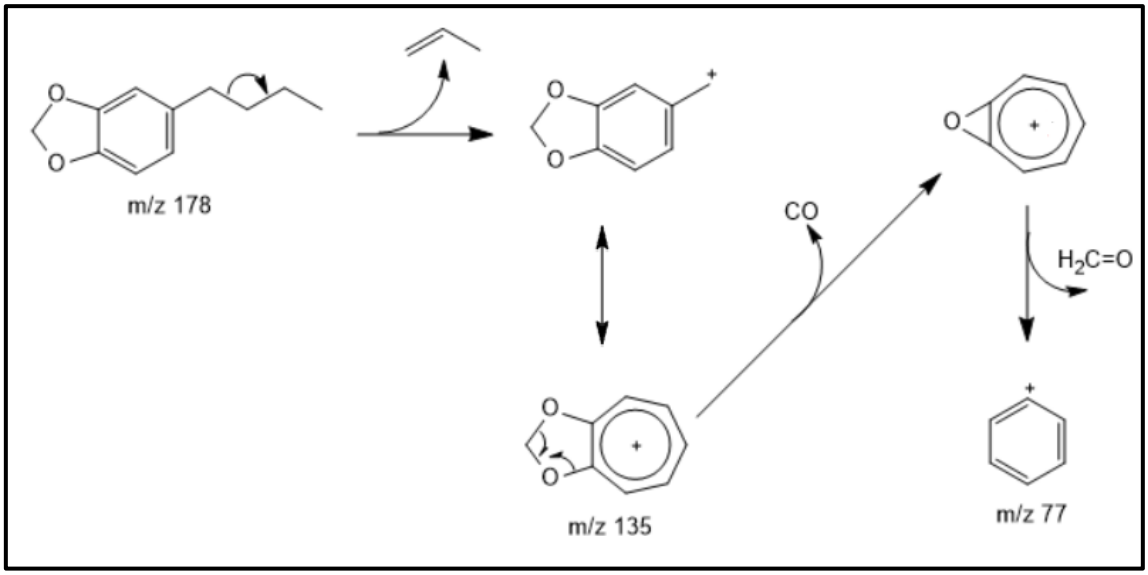
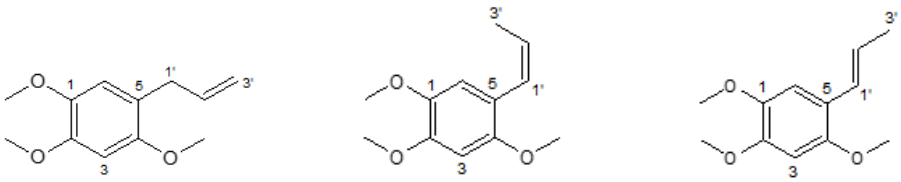



Figura 7: Principais fragmentações apresentadas no EM do 1-butil-3,4-metilenodioxi-benzeno

### 4.1.3 Elucidação da mistura de isoasarona [40], *cis*-asarona [41] e *trans*-asarona [42]



**[40]** **[41]** **[42]**

As substâncias foram identificadas como três isômeros através de dados de CG-EM (Figura 8, p.43) e RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$. A partir da análise do cromatograma obtido em CG-EM e comparação com a literatura, podemos confirmar que a isoasarona é a substância majoritária.

O espectro de massas mostrou os íons moleculares em *m/z* 208. A isoasarona apresentam os picos *m/z* 91 e *m/z* 69 como as principais fragmentações; já a *cis* e a *trans*-asarona mostram o pico em *m/z* 32 como principal fragmentação.

Os dados de RMN de $^{1}H$ (Figuras 9-11, p.44-46) apresentaram nove singletos com sinais próximos, entre δ3,81 - δ3,91, que foram atribuídos as

metoxilas ligadas ao anel aromático das três substâncias. Além disso, apresentou três singletos integrados para 1H entre δ6,51 - δ6,54 e mais três singletos, também integrado para 1H, entre δ6,86 - δ6,96, característicos de um padrão tetra-substituído 1,2,4,5. Esses singletos foram atribuídos aos hidrogênios H6 e H3 dos isômeros.

Os dados de RMN de $^{13}C$ (Figura 12, p.47) apresentaram sinais entre δ56,1 – δ56,7, característicos de carbonos aromáticos ligados a metoxila. Os sinais em δ33,6 (C1') e δ115,1 (C3') foram atribuídos aos carbonos metilênicos, sendo um saturado e outro insaturado, respectivamente, da isoasarona. Para a *cis* e a *trans* asarona foram atribuídos os sinais em δ14,7 e δ18,8 para C3' e δ125,8 e δ124,8 para C1', respectivamente. Com a comparação dos dados obtidos com a literatura (Tabela II, p.48), as substâncias foram identificadas como isoasarona, *cis*-asarona e *trans*-asarona.

A isoasarona é um componente volátil, pertencente à classe dos fenilpropanóides e foi isolada, por Nascimento (2011), no extrato hexânico das raízes da espécie *P. klotzschianum* e, relatos da literatura mostram que também já foi identificada no óleo essencial das folhas. A *cis*-asarona e a *trans*-asarona, que são também compostos voláteis, foram identificados por Autran *et al*. (2009) como componentes majoritários do óleo essencial das folhas e caules da espécie *Piper marginatum*. Elas foram relatadas pela primeira vez na espécie *P. klotzschianum* por Santos (2017).

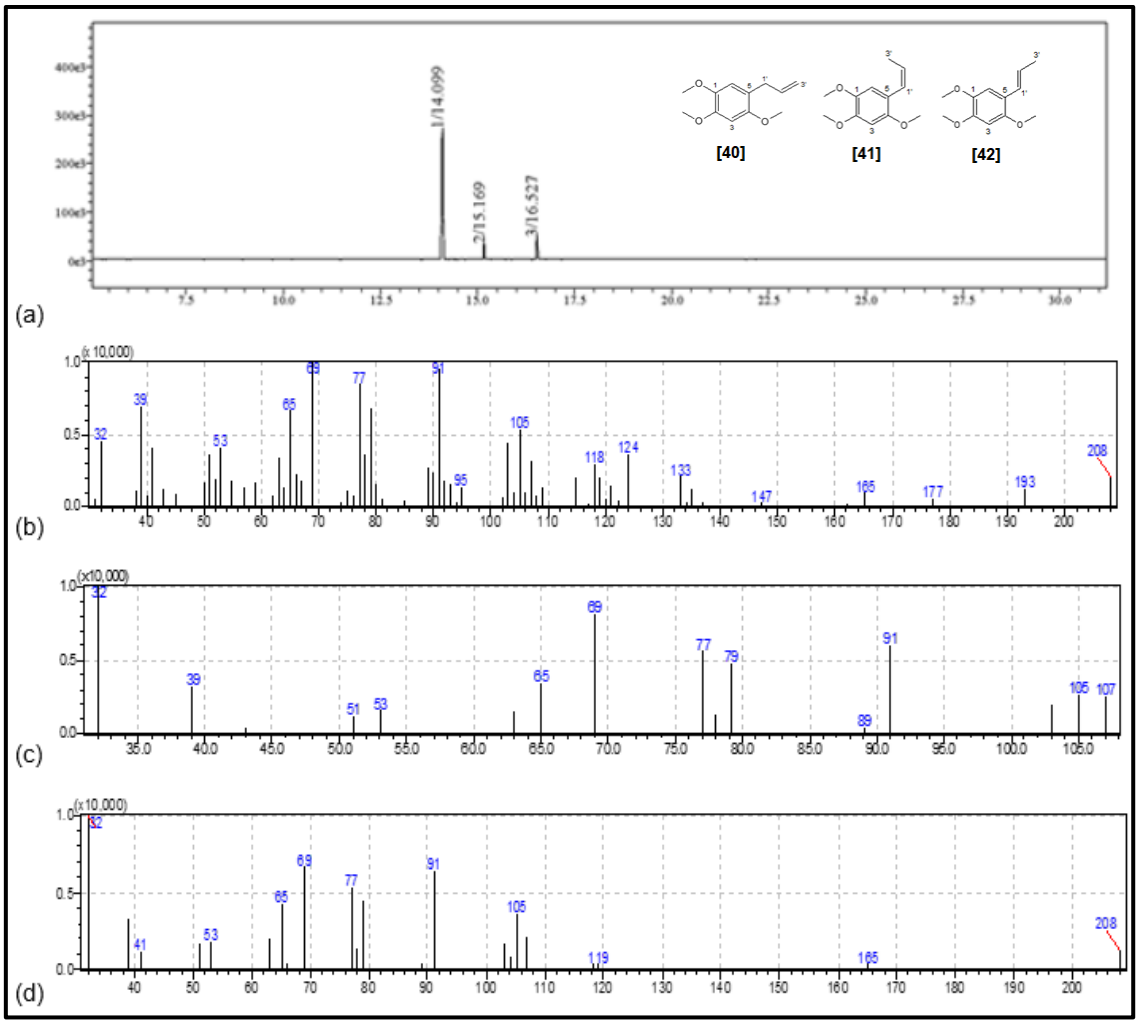



Figura 8: (a) Cromatograma em CG-EM da mistura de asaronas, (b) Espectro de massa do pico 1, (c) Espectro de massa do pico 2 e (d) Espectro de massa do pico 3.

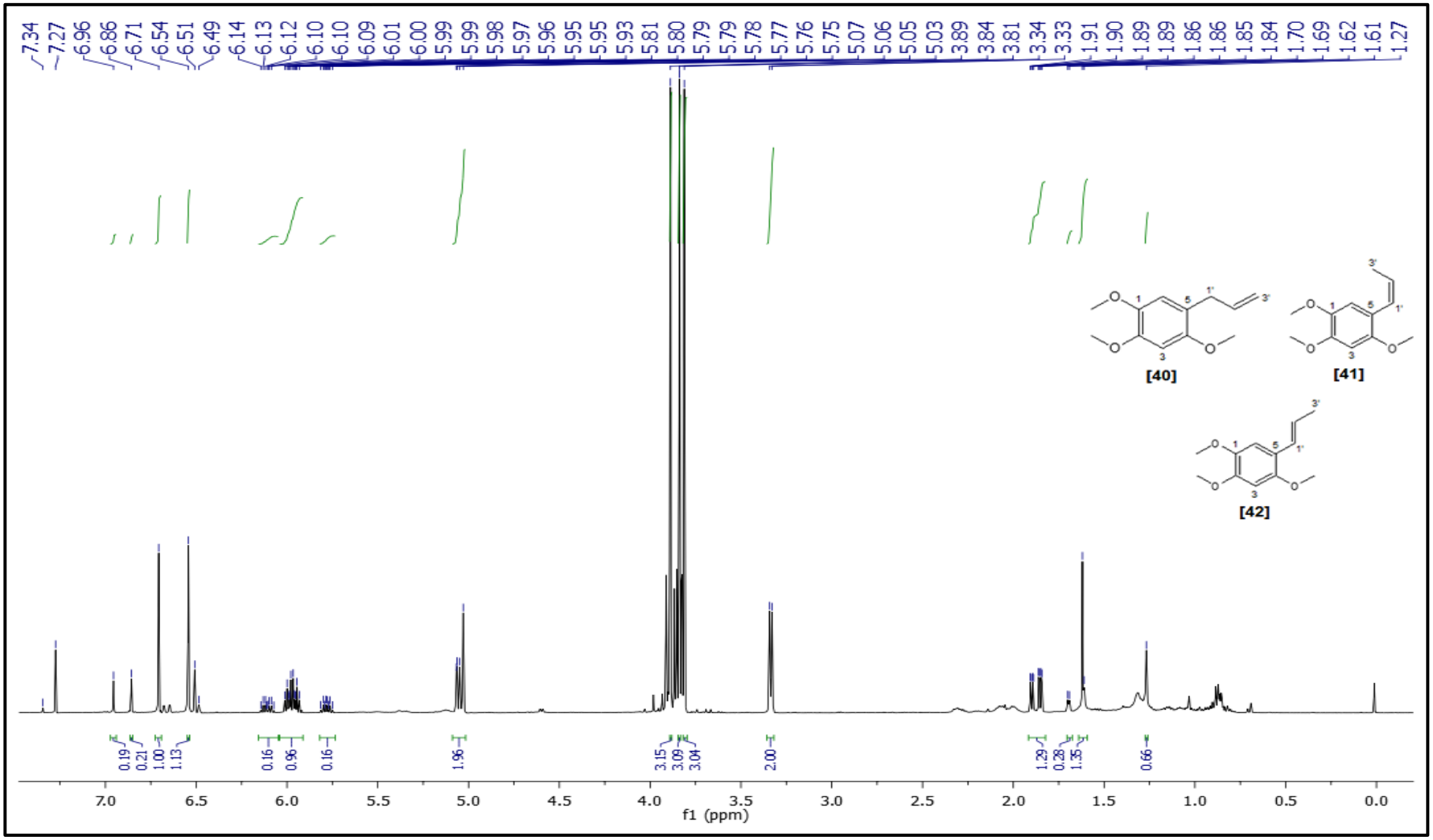



Figura 9: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 500 MHz] da mistura de asaronas **[40]**, **[41]** e **[42]**

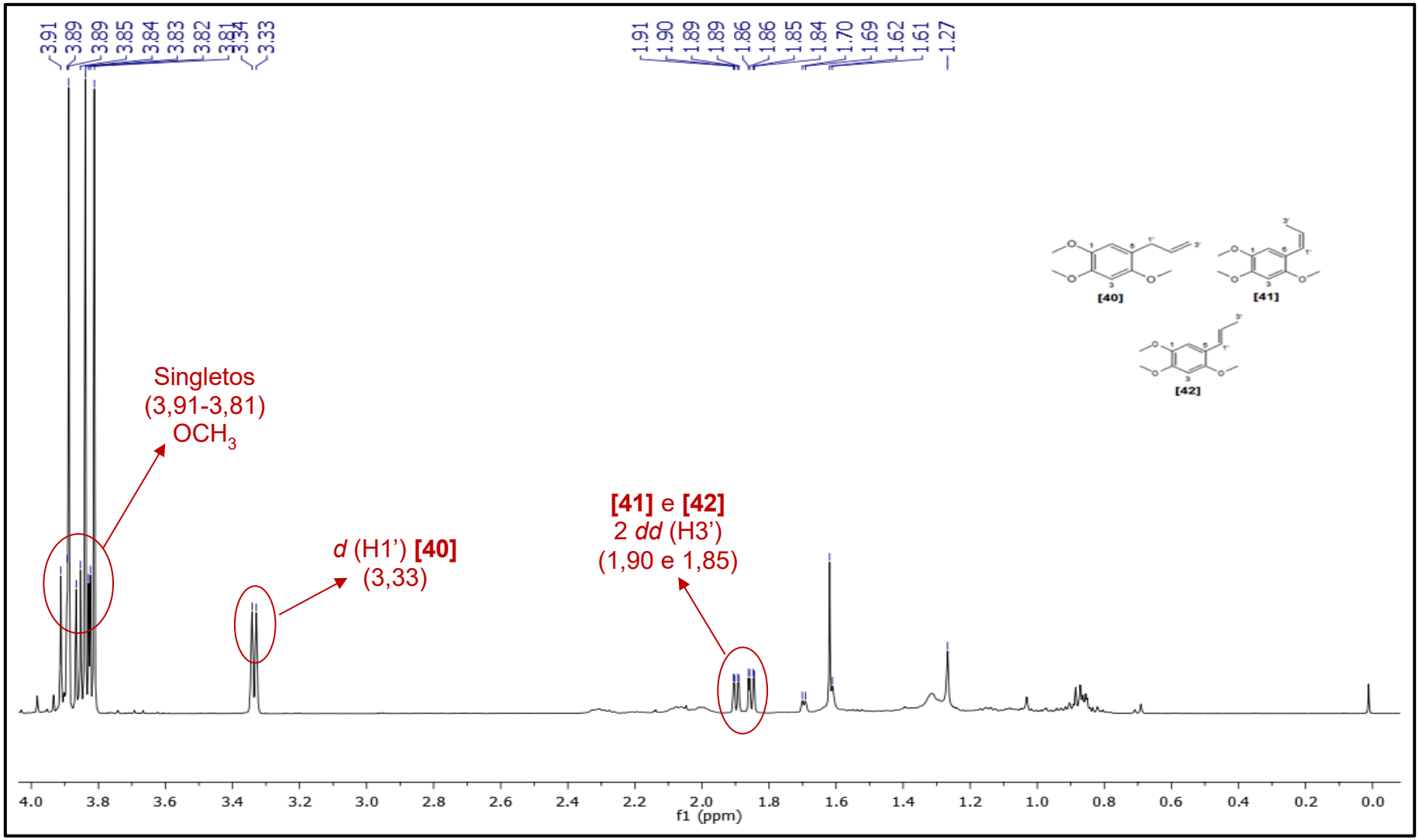



Figura 10: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 500 MHz] ampliado (δ0,1 – 4,0) da mistura de asaronas **[40]**, **[41]** e **[42]**

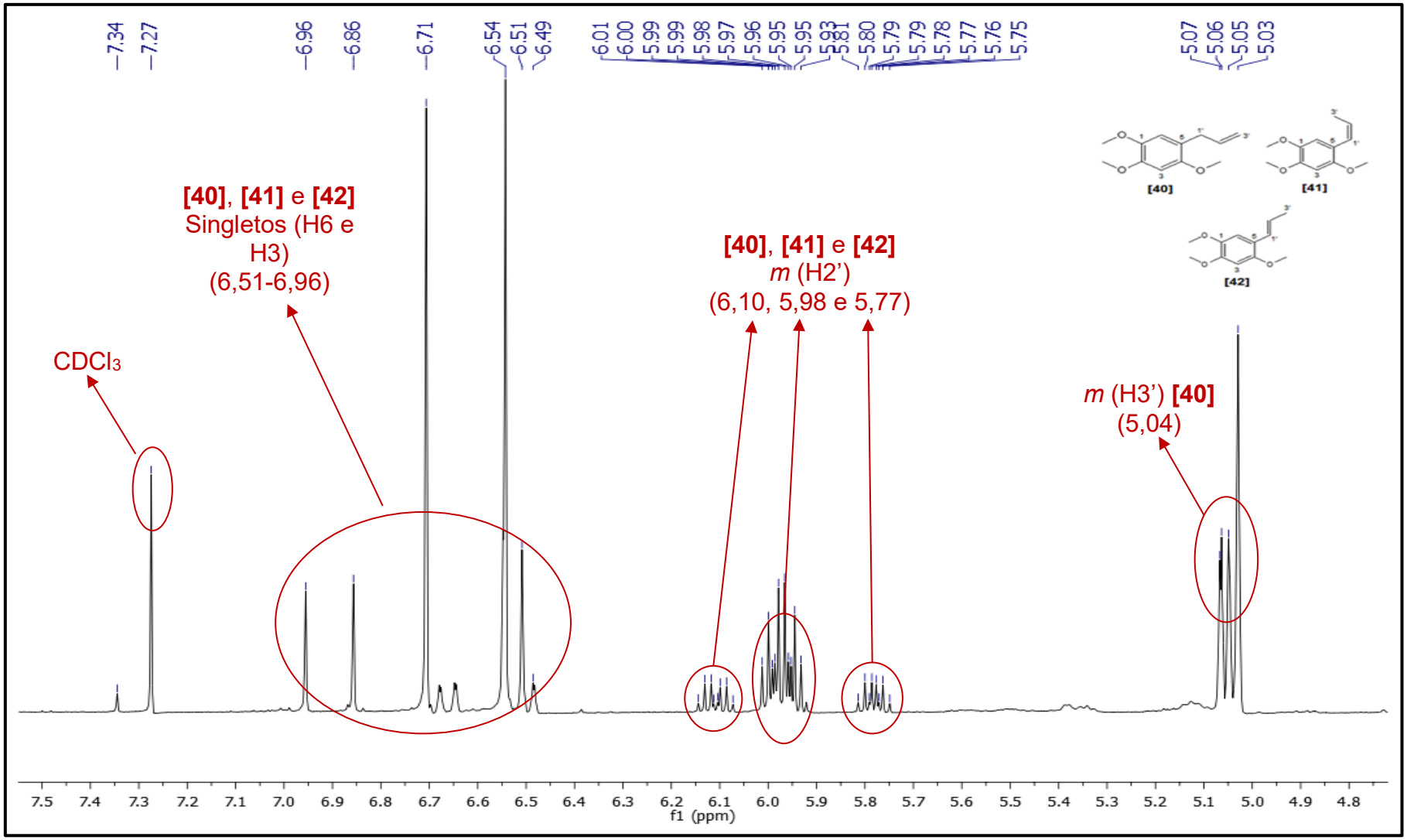



Figura 11: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 500 MHz] ampliado (δ4,8 – 7,5 ) da mistura de asaronas **[40]**, **[41]** e **[42]**

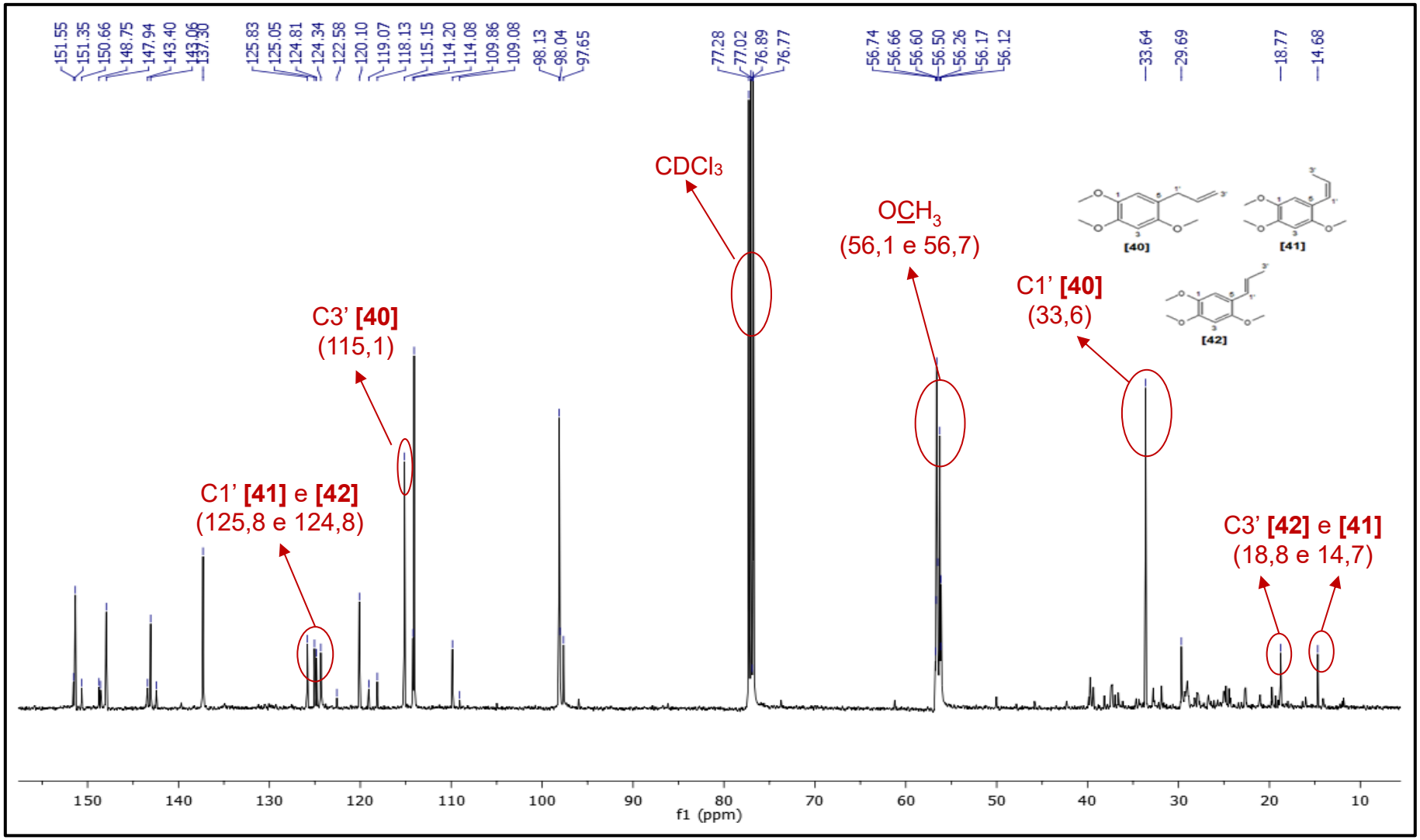


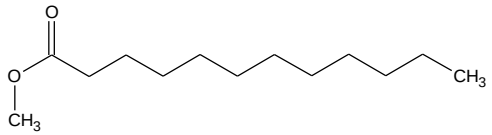

Figura 12: RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 125 MHz] da mistura de asaronas **[40]**, **[41]** e **[42]**

Tabela II - Dados de RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$ [500 MHz ($^{1}H$) e 125 MHz ($^{13}C$), $CDCl_3$] da isoasarona, *cis*-asarona e *trans*-asarona comparados com a literatura

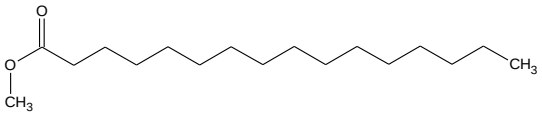
| | **[40]** (ppm) | | Isoasarona* (ppm) | | **[41]** (ppm) | | *cis*-asarona# (ppm) | | **[42]** (ppm) | | *trans*-asarona# (ppm) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $^{13}C$ | $^{1}H$ (mult., J/Hz) | $^{13}C$ | $^{1}H$ (mult., J/Hz) | $^{13}C$ | $^{1}H$ (mult., J/Hz) | $^{13}C$ | $^{1}H$ (mult., J/Hz) | $^{13}C$ | $^{1}H$ (mult., J/Hz) | $^{13}C$ | $^{1}H$ (mult., J/Hz) |
| 1 | 120,1 | - | 120,1 | - | 120,1 | - | 117,6 | - | 120,1 | - | 118,3 | - |
| 2 | 151,4 | - | 151,3 | - | 151,3 | - | 150,9 | - | 151,3 | - | 149,9 | - |
| 3 | 98,1 | 6,54 (s) | 98,2 | 6,54 (s) | 97,6 | 6,51 (s) | 97,2 | 6,47 (s) | 98,0 | 6,51 (s) | 97,3 | 6,45 (s) |
| 4 | 147,9 | - | 147,9 | - | 147,9 | - | 148,0 | - | 147,9 | - | 148,0 | - |
| 5 | 143,1 | - | 143,1 | - | 143,1 | - | 141,8 | - | 143,1 | - | 142,6 | - |
| 6 | 114,2 | 6,70 (s) | 114,1 | 6,70 (s) | 114,1 | 6,86 (s) | 113,7 | 6,79 (s) | 109,9 | 6,96 (s) | 109,2 | 6,91 (s) |
| 1’ | 33,6 | 3,33 (d, 6,5) | 33,6 | 3,33 (d, 6,6) | 125,8 | 6,50 (m) | 125,1 | 6,45 (dq, 7 e 2) | 124,8 | 6.66 (m) | 124,4 | 6,64 (dq, 16 e 1,5) |
| 2’ | 137,3 | 5,98 (m) | 137,2 | 5,98 (m) | 125,0 | 5.77 (dq) | 124,3 | 5,69 (dq, 12 e 7) | 124,3 | 6,10(m) | 123,4 | 6,02 (dq, 16 e 6,2) |
| 3’ | 115,2 | 5,04 (m) | 115,1 | 5,04 (m) | 14,7 | 1,85 (dd, 7 e 1,5) | 14,6 | 1,83 (dd, 7 e 2) | 18,8 | 1,90 (dd, 6,5 e 1,5) | 18,7 | 1,87 (dd, 6,2 e 1,5) |
| 1-$OCH_3$ | 56,7 | 3,81 (s) | 56,6 | 3,80 (s) | 56,2 | 3,82 (s) | 55,8 | 3,74 (s) | 56,1 | 3,83 (s) | 55,1 | 3,77 (s) |
| 2-$OCH_3$ | 56,3 | 3,88 (s) | 56,2 | 3,88 (s) | 56,3 | 3,85 (s) | 56,2 | 3,79 (s) | 56,6 | 3,87 (s) | 55,7 | 3,81 (s) |
| 4-$OCH_3$ | 56,5 | 3,83 (s) | 56,5 | 3,83 (s) | 56,5 | 3,89 (s) | 56,4 | 3,83 (s) | 56,7 | 3,91 (s) | 56,1 | 3,84 (s) |

*Nascimento (2011) [300 MHz ($^{1}H$) e 75 MHz ($^{13}C$), CDCl3]
#Patra & Mitra (1981)

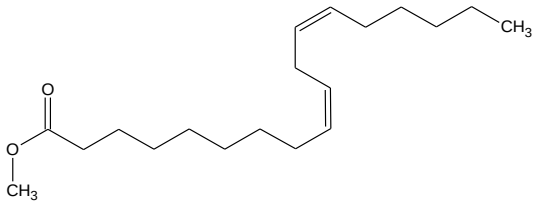
### 4.1.4 Elucidação dos ésteres metílicos: decanoato de metila [35], palmitato de metila [36], linoleato de metila [37], oleato de metila [38] e estearato de metila [39]



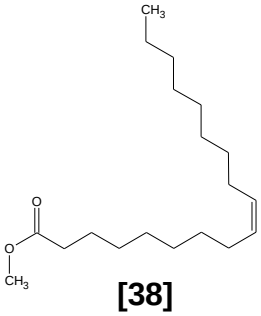
**[35]**



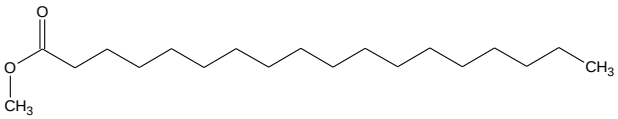
**[36]**



**[37]**



**[38]**



**[39]**

O espectro de IV da fração EHFP4-1 (Figura 13, p.50) apresentou sinais em 2923,2 $cm^{-1}$ e 2853,4 $cm^{-1}$ característicos de deformações axiais de grupos metila ($–CH_3$) e metilênicos ($–CH_2$); em 1462,3 $cm^{-1}$ pode ser verificado bandas de deformação angular da ligação C-H; em 970,5 $cm^{-1}$ referente a ligação =C-H; bandas característicos da função éster, 1737,3 $cm^{-1}$ correspondente a deformações axiais da ligação C=O, 1230,3 $cm^{-1}$ e 1168,6 $cm^{-1}$ da deformação axial da ligação C-O-C. Então, sugeriu que a amostra era composta de triacilglicerídeo, descartando a possibilidade de ser um ácido graxo devido ausência da banda larga (3300-2500 $cm^{-1}$) característica da hidroxila de ácido carboxílico e a carbonila apresentou um valor acima de 1710 $cm^{-1}$. Deste modo, foi realizado uma reação de transesterificação.

Após a reação de transesterificação, foi efetuada a análise do CG-EM da amostra (Figura 14a, p.50) e pode observar, através da comparação das bibliotecas NIST14, WILEY7 e com os tempos de retenção de uma mistura de

ésteres metílicos (Figura 14b, p.50), a presença de cinco ésteres metílicos: dodecanoato de metila (pico 1); palmitato de metila (pico 4); linoleato de metila (pico 6); oleato de metila (pico 7) e estearato de metila (pico 9), levando sempre em consideração um percentual acima de 95% de similaridade.

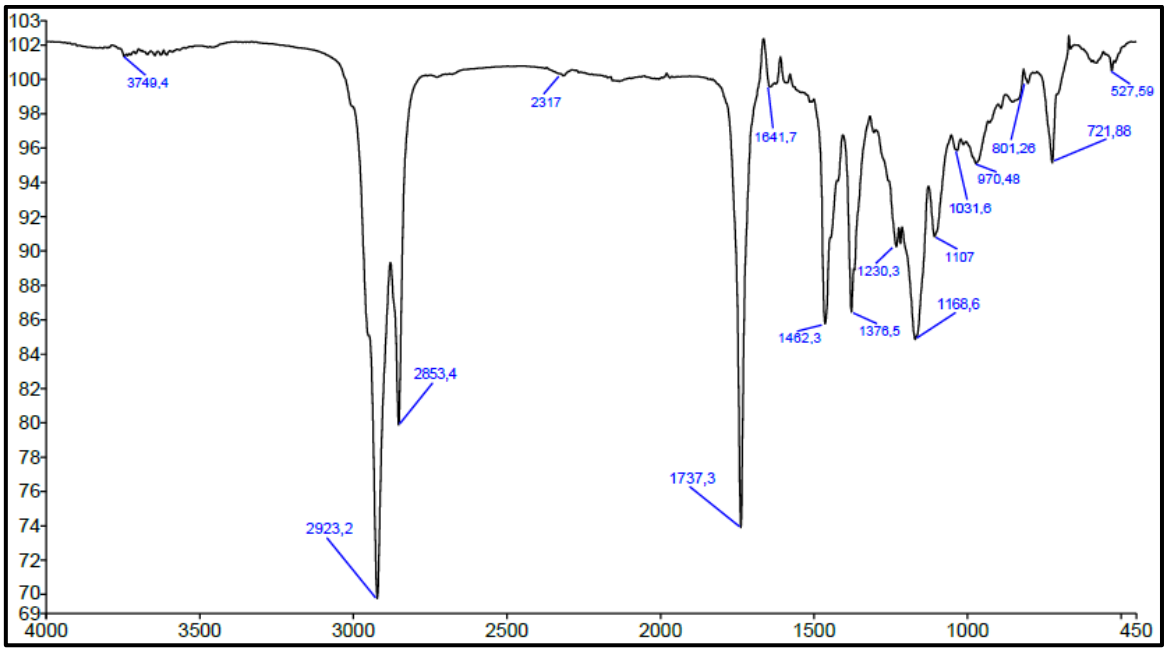



Figura 13: Espectro de IV da amostra EHFP4-1

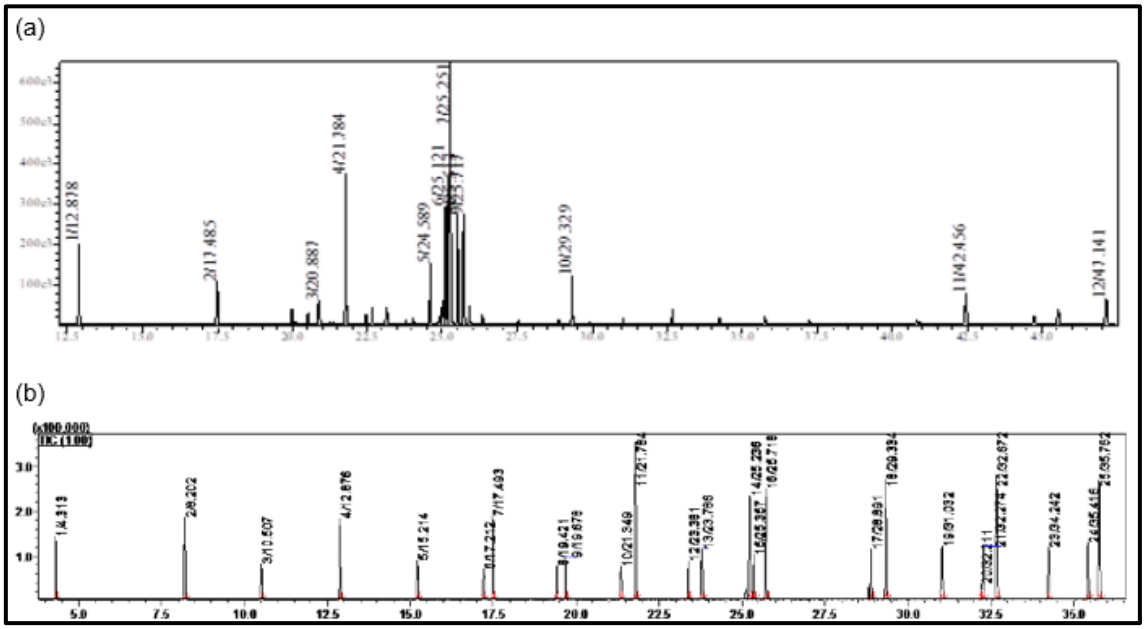
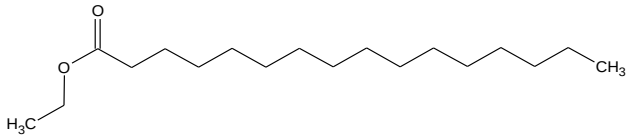
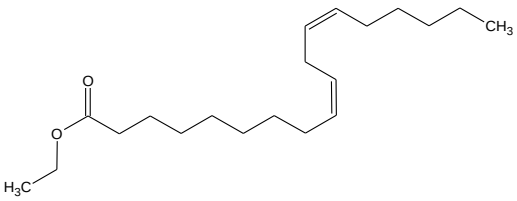


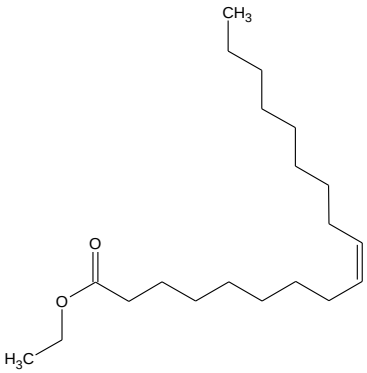

Figura 14: (a) Cromatograma em CG-EM da mistura de ésteres metílicos **[35-39]**; e (b) Cromatograma da mistura de padrão de ésteres metílicos

### 4.1.5 Elucidação dos ésteres etílicos: pentadecanoato de etila [44], (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de etila [45], (Z)-octadec-9-enoato de etila [46] e octadecanoato de etila [47]

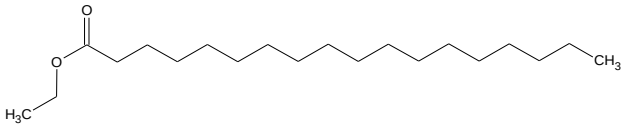



**[44]**




**[45]** **[46]**




**[47]**

O CG-EM da subfração EHFP5-2 (Figura 15, p.53) permitiu analisar e identificar, por comparação dos espectros de massas presentes na amostra com o da biblioteca WILEY7, quatro ésteres etílicos: pentadecanoato de etila ($C_{17}H_{34}O_2$) (Pico 1), (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de etila ($C_{20}H_{36}O_2$); (Z)-octadec-9-enoato de etila ($C_{20}H_{38}O_2$) e o octadecanoato de etila ($C_{20}H_{40}O_2$), nestas identificações foi levado em consideração percentuais acima de 95% de similaridades.

O espectro de massas do éster etílico **[44]** apresenta dois principais fragmentos: primeiramente acontece a ionização da carbonila e, nesta etapa, ocorre um rearranjo do tipo McLafferty onde o hidrogênio *γ* migra para a carbonila e em subsequência a clivagem da ligação α-β, formando o íon *m/z* 88 como íon base; numa segunda etapa, ao migrar o hidrogênio γ, ocorre um rearranjo de hidrogênio do tipo 1,2 e clivagem homolítica da ligação adjacente, o que explicaria a formação do íon *m/z* 101 (SANTOS FILHO, 2010). O éster etílico

**[47]** apresenta as mesmas principais fragmentações que o éster **[44]**. Essas principais fragmentações são mostradas na Figura 16 (p.53).

Através dos dados de RMN de $^{1}H$ (Figura 17, p.54) apresentaram sinais bem nítidos, um quarteto mais desprotegido em δ4,12 atribuído ao grupo metilênico ($–CH_2$) do grupo etoxila e um tripleto em δ2,28 referente ao grupo metilênico *α*-carbonílico. Além de sinais na região entre δ0,85 e δ2,00 que são referentes aos grupos metila ($–CH_3$) e metilênicos ($–CH_2$) da cadeia longa de hidrocarboneto.

O espectro de RMN de $^{13}C$ (Figura 18, p.55) apresentou sinal em δ173,9 característico do grupo carbonila de ésteres, em δ60,1 atribuído ao carbono ligado ao oxigênio e sinais entre δ14,1 e δ37,4 referentes aos carbonos dos grupos metila ($–CH_3$) e metilênicos ($–CH_2$) da cadeia longa de hidrocarbonetos.

Os ésteres etílicos não são muito comuns em plantas, no genêro *Piper* não foram encontrados relatos de isolamentos desses ésteres. Em geral, os ésteres etílicos são obtidos a partir de reações de transesterificação de óleos vegetais ou animais. Há relato de ésteres etílicos isolados de fungos endofíticos através do isolamento dos mesmos a partir de suas plantas hospedeiras (SANTOS FILHO, 2010). Desta forma, o isolamento dessas substâncias a partir das folhas de *Piper klotzschianum* é uma contribuição enriquecedora para a espécie no sentido da descoberta de novas substâncias naturais promissora, uma vez que sua toxicidade foi testada frente a *Artemia salina* e se mostrou moderadamente ativa.

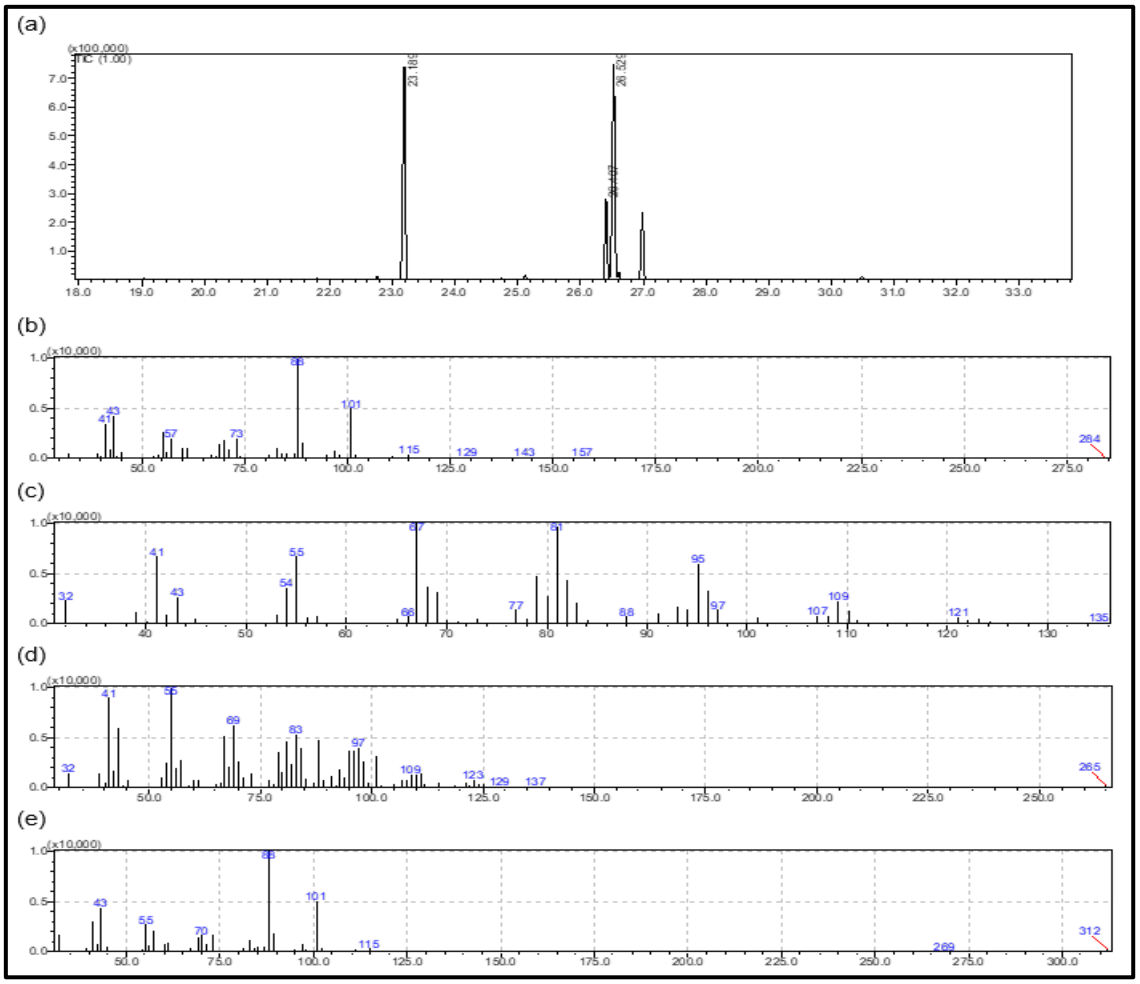



Figura 15: (a) Cromatograma em CG-EM da amostra EHFP5-2; (b) EM do pico 1; (c) EM do pico 2; (d) EM do pico 3; e (e) EM do pico 4

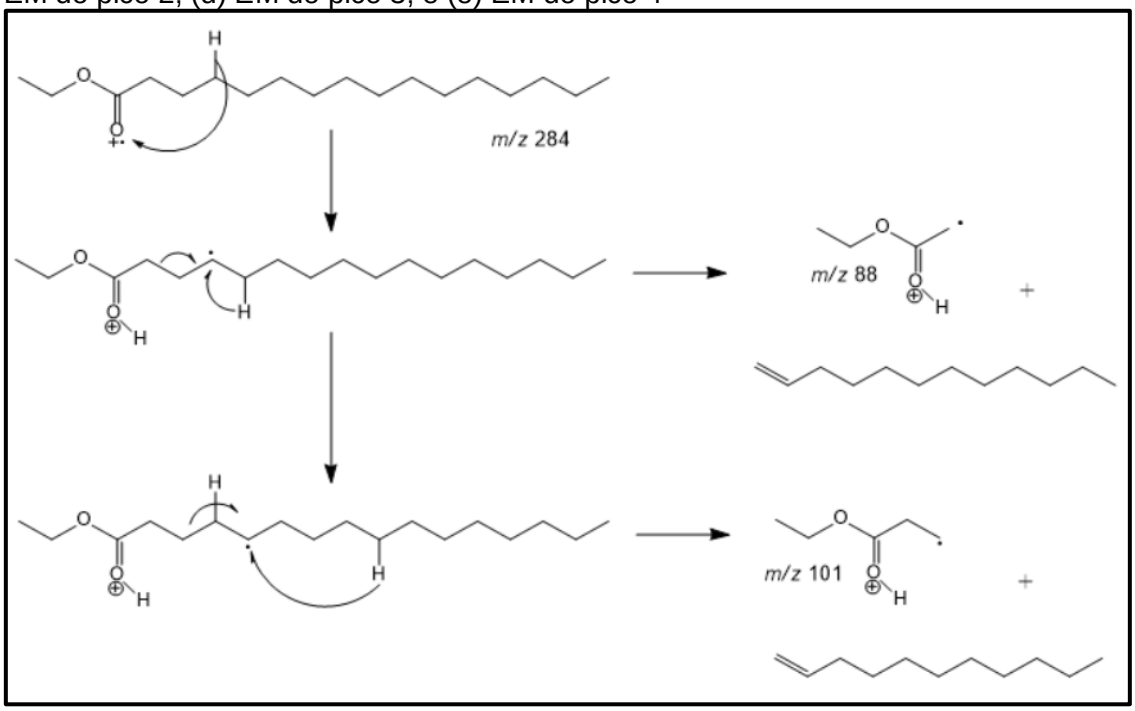



Figura 16: Principais fragmentações apresentadas no EM do éster etílico **[44]**

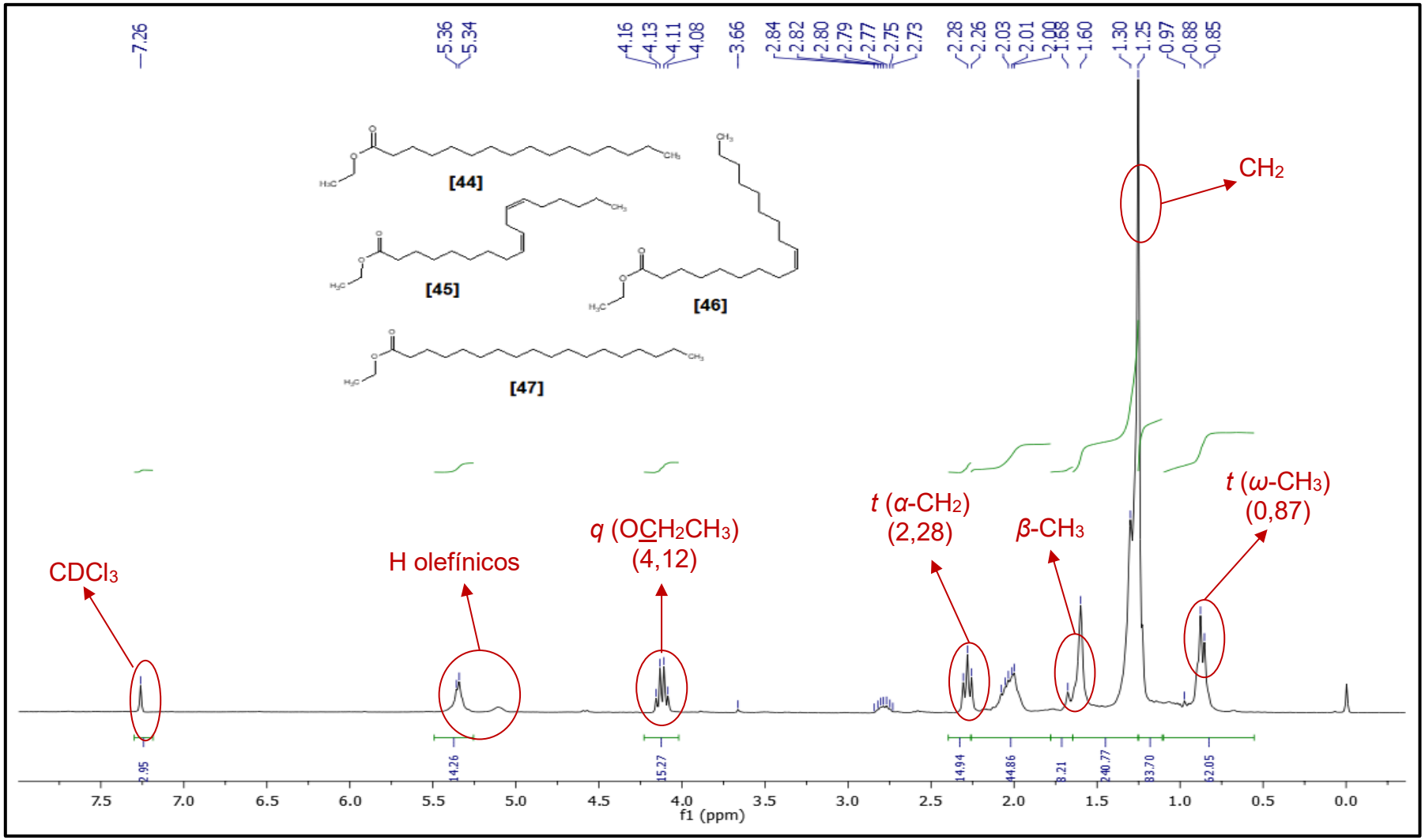



Figura 17: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] da mistura de ésteres etílicos **[44]**, **[45]**, **[46]** e **[47]**

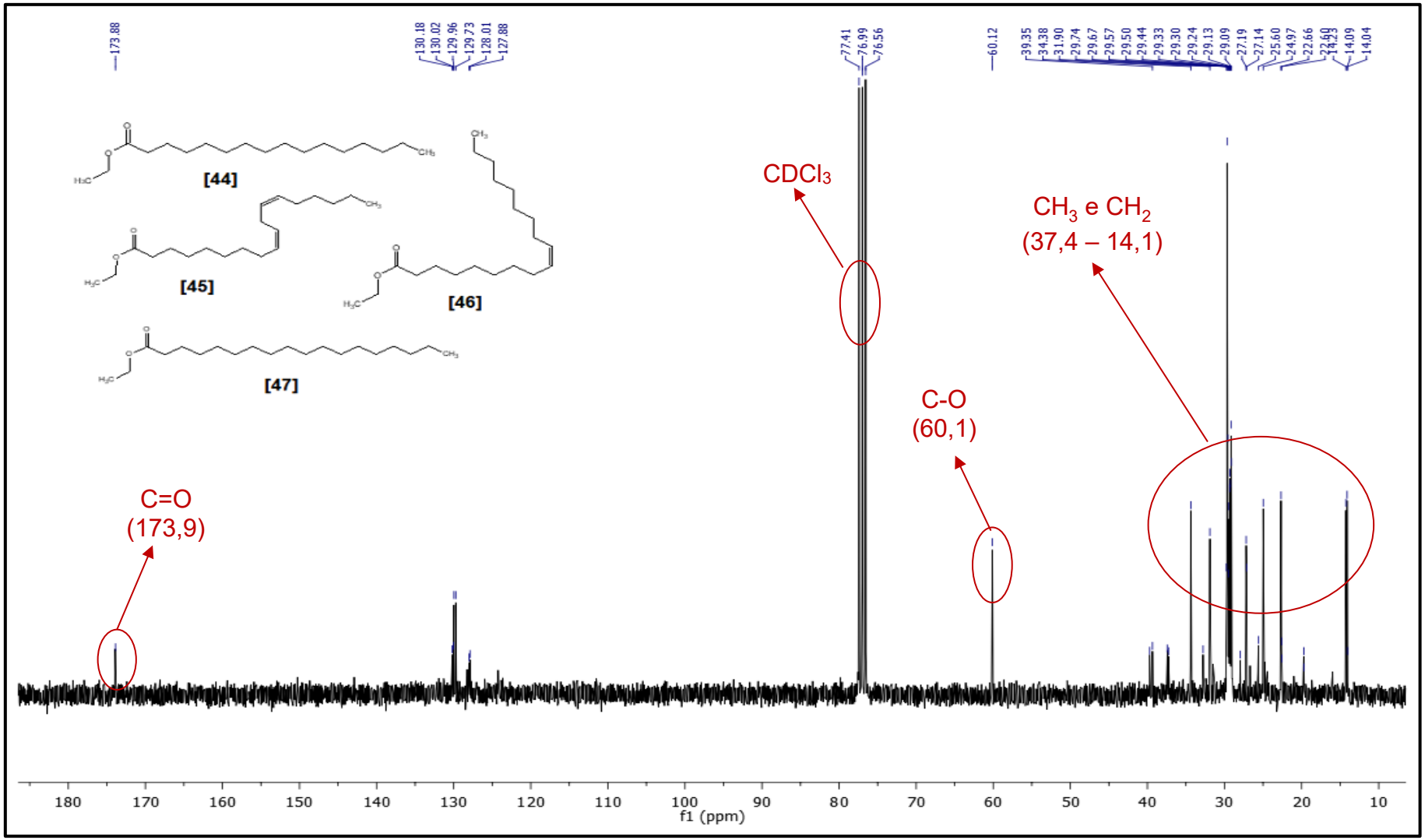
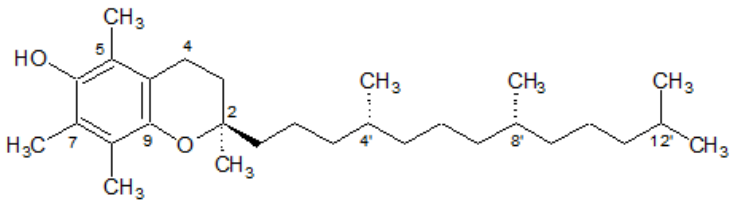



Figura 18: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 75 MHz] da mistura de ésteres etílicos **[44]**, **[45]**, **[46]** e **[47]**

### 4.1.6 Elucidação do *α*-tocoferol (vitamina E) [43]




**[43]**

A partir da análise do CG-EM da amostra EHFP5-5 (Figura 19, p.57), foi possível identificar a substância majoritária (TR= 42.597) por comparação do espectro de massas presente na amostra com o da biblioteca NIST14, sendo confirmada a substância como sendo o *α*-tocoferol (vitamina E - $C_{29}H_{50}O_2$), com 95% de similaridade.

O espectro de massas apresenta dois picos intensos: o íon molecular de *m/z* 430 e o pico base em *m/z* 165. O íon molecular (*m/z* 430) sofre uma fragmentação através de um rearranjo de hidrogênio (rH) uma reação de retro Diels-Alder (RDA) no anel pirânico do tocoferol, para dar origem ao íon *m/z* 165 (SIQUEIRA *et al*, 2003), conforme Figura 20 (p.57).

Os dados de RMN de $^{1}H$ (Figuras 21-23, p.58-60) mostram vários sinais característicos da vitamina E: um tripleto em δ2,60 (H-4) e um singleto em δ4,19 referente a hidroxila, além dos sinais em δ2,11, integrado para 6H, e em δ2,16, integrado para 3H, atribuídos as metilas ligadas ao anel aromático. Não foi possível identificar claramente todos os sinais apresentados no espectro de RMN de $^{1}H$ devido a impureza da amostra como é possível observar no cromatograma (Figura 19a, p.55).

O espectro de RMN de $^{13}C$ (Figuras 24 e 25, p.61,62) apresentaram sinais em: δ74,5 (C-2), δ118,5 (C-5), δ39,8 (C-1'), δ21,0 (C-2'), δ28,0 (C-12'), δ22,7 (C-13'). Além dos sinais em δ23,8; δ11,2; δ12,2; δ11,7; δ19,6; δ19,7 e δ22,6, atribuídos as metilas ligadas aos carbonos C-2, C-5, C-7, C-8, C-4', C-8' e C-12', respectivamente. O espectro de RMN de $^{13}C$ apresentou alguns ruídos que podem estar relacionados ao tempo de aquisição do espectro, o que dificultou a identificação de alguns carbonos do anel aromático. Esses sinais, bem como os

dados de RMN de $^{1}H$, foram comparados com a literatura (Ayres *et al.*, 2009) e contribuindo para a confirmação da estrutura da vitamina E.

Como é sabido o possui atividade antioxidante. O *α*-tocoferol já foi identificada por Lima (2014) no extrato das folhas de *P. klotzschianum* utilizando extração com fluido supercrítico.

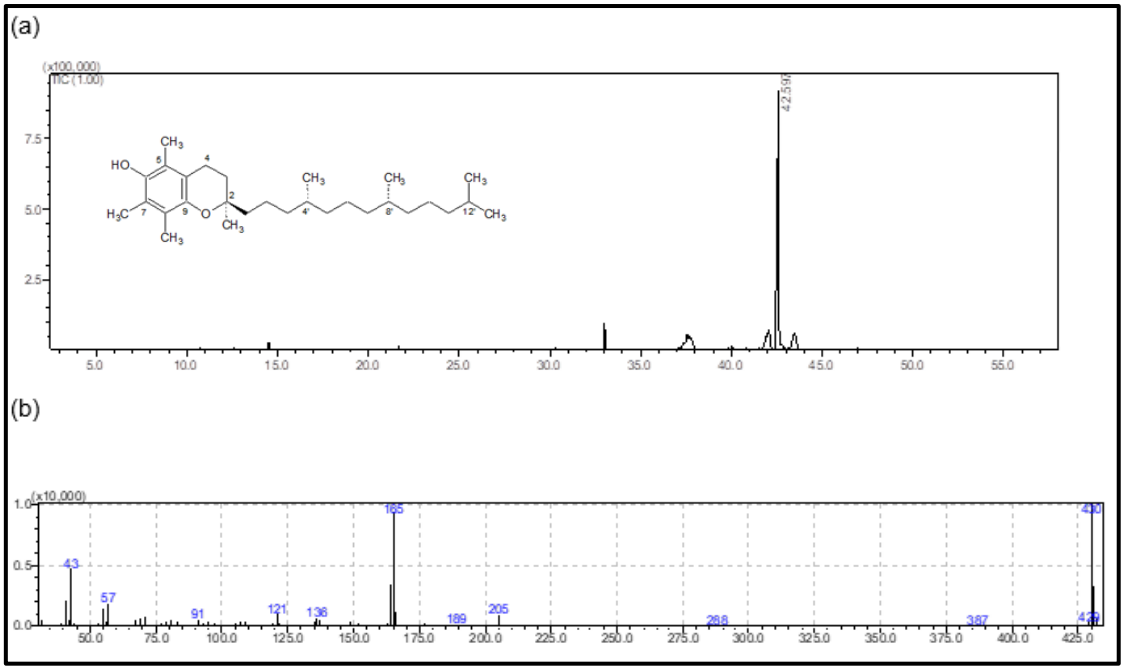



Figura 19: (a) Cromatograma em CG-EM da amostra EHFP5-5 com pico majoritário em RT=42.597 min (b) Espectro de massa do pico majoritário (*α*-tocoferol)

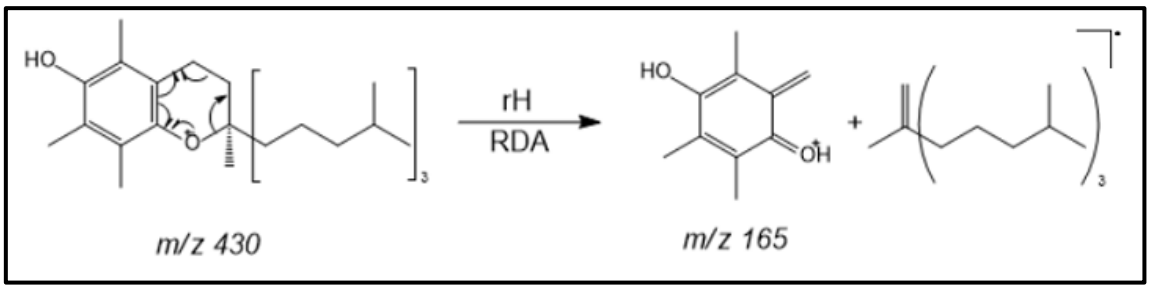



Figura 20: Principal fragmentação apresentada no EM do *α*-tocoferol

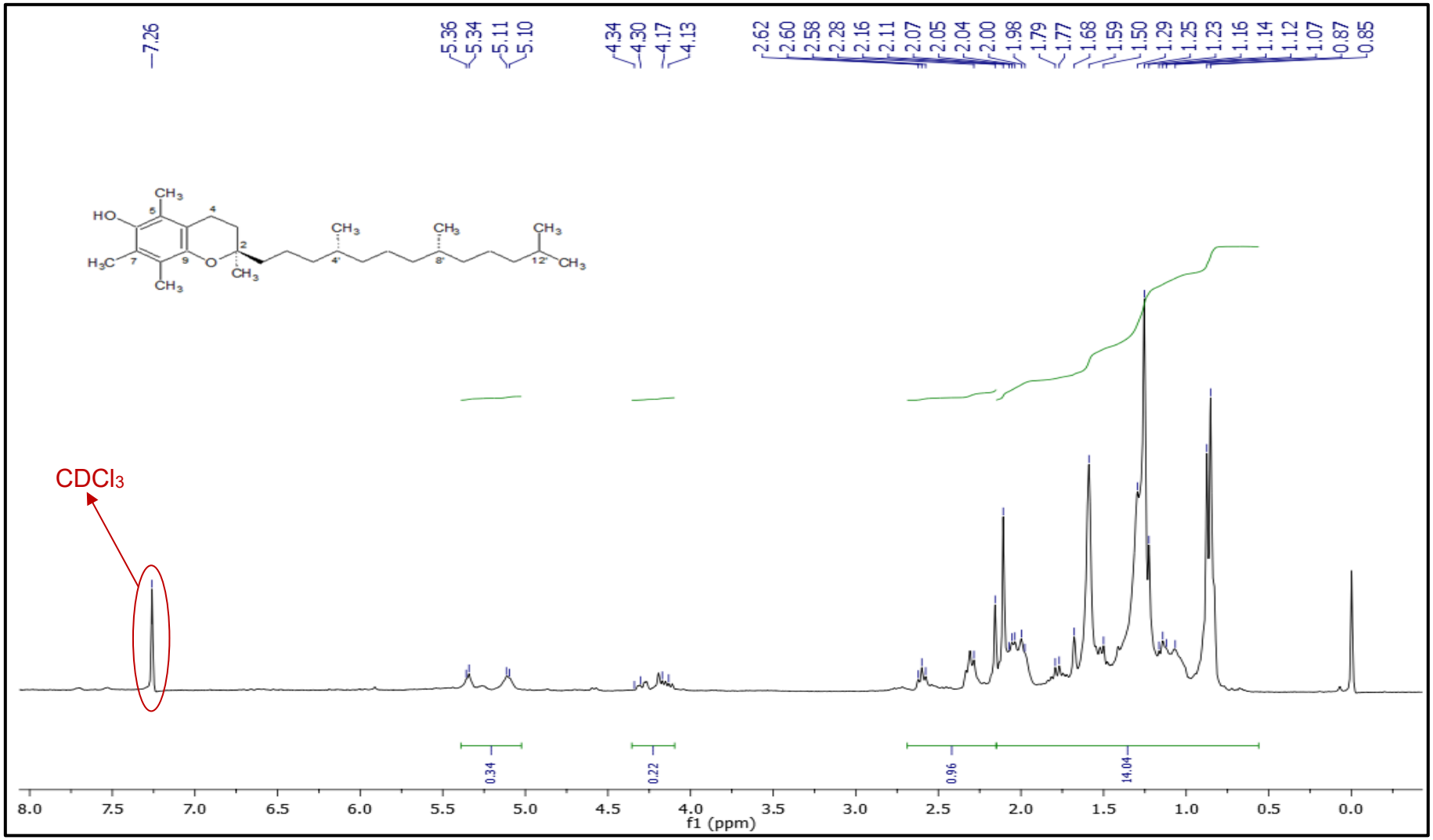



Figura 21: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] do *α*-tocoferol

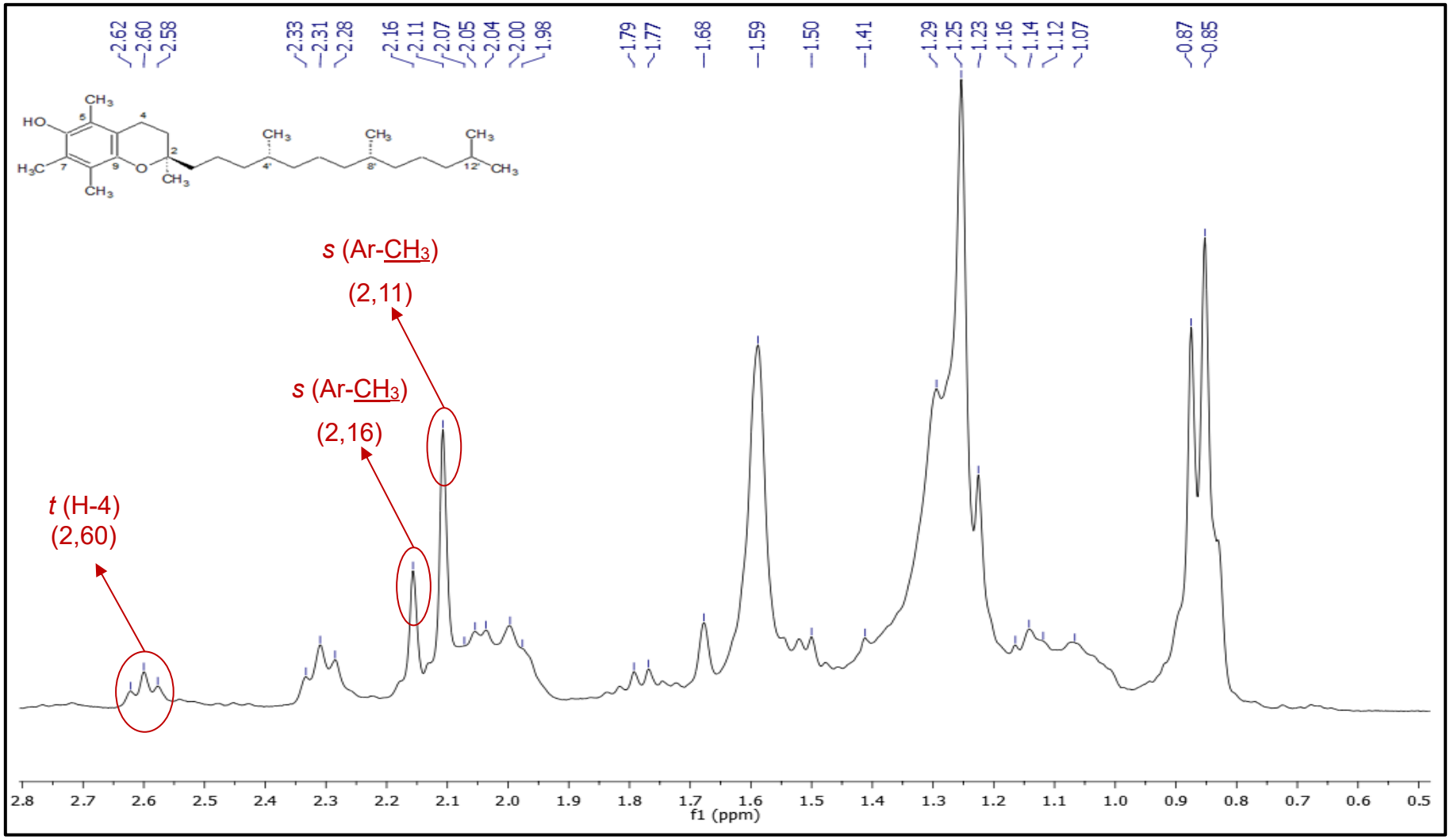



Figura 22: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] ampliado (δ0,5 – 2,8) do *α*-tocoferol

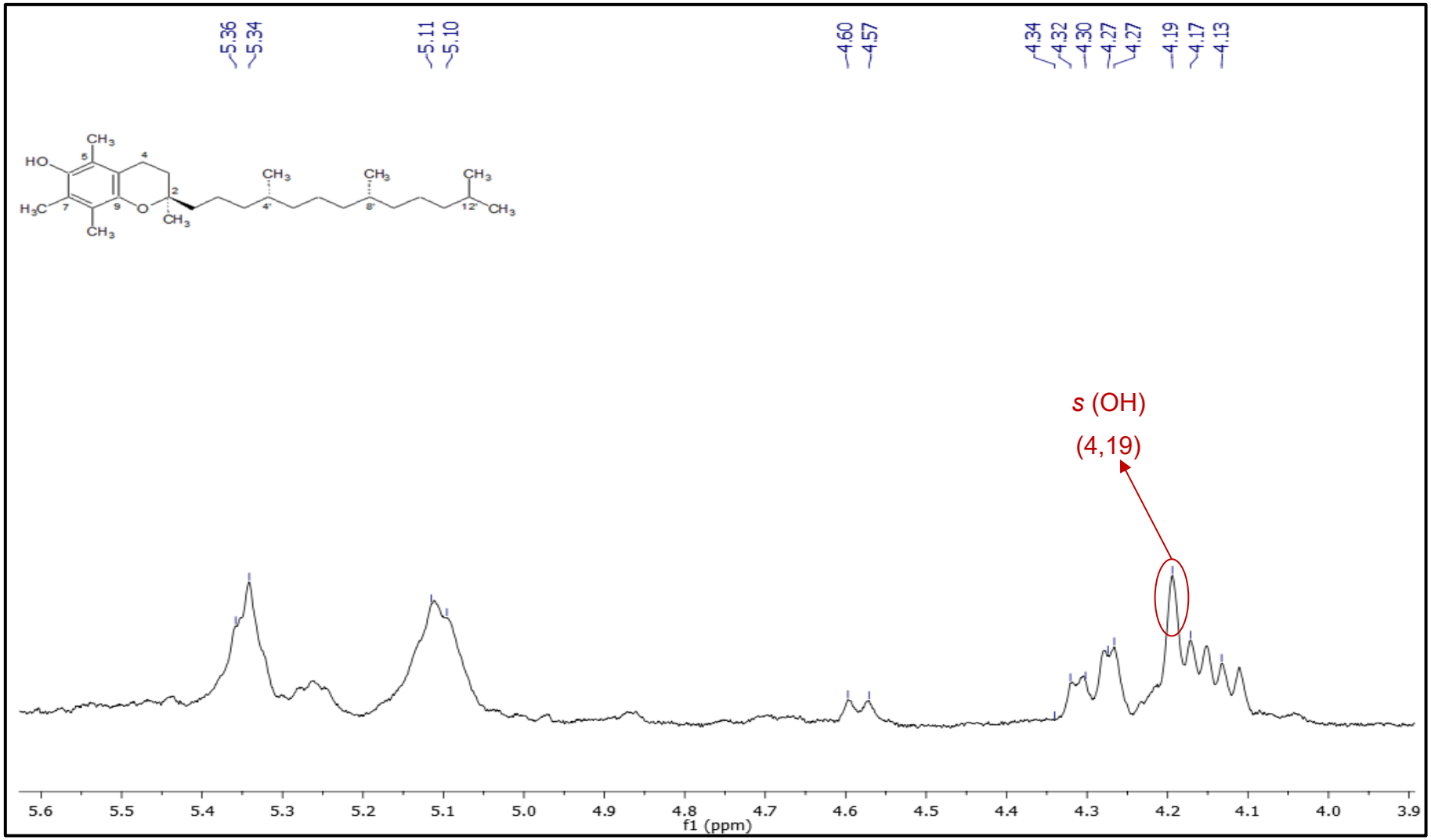



Figura 23: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] ampliado (δ3,9 – 5,6) do *α*-tocoferol

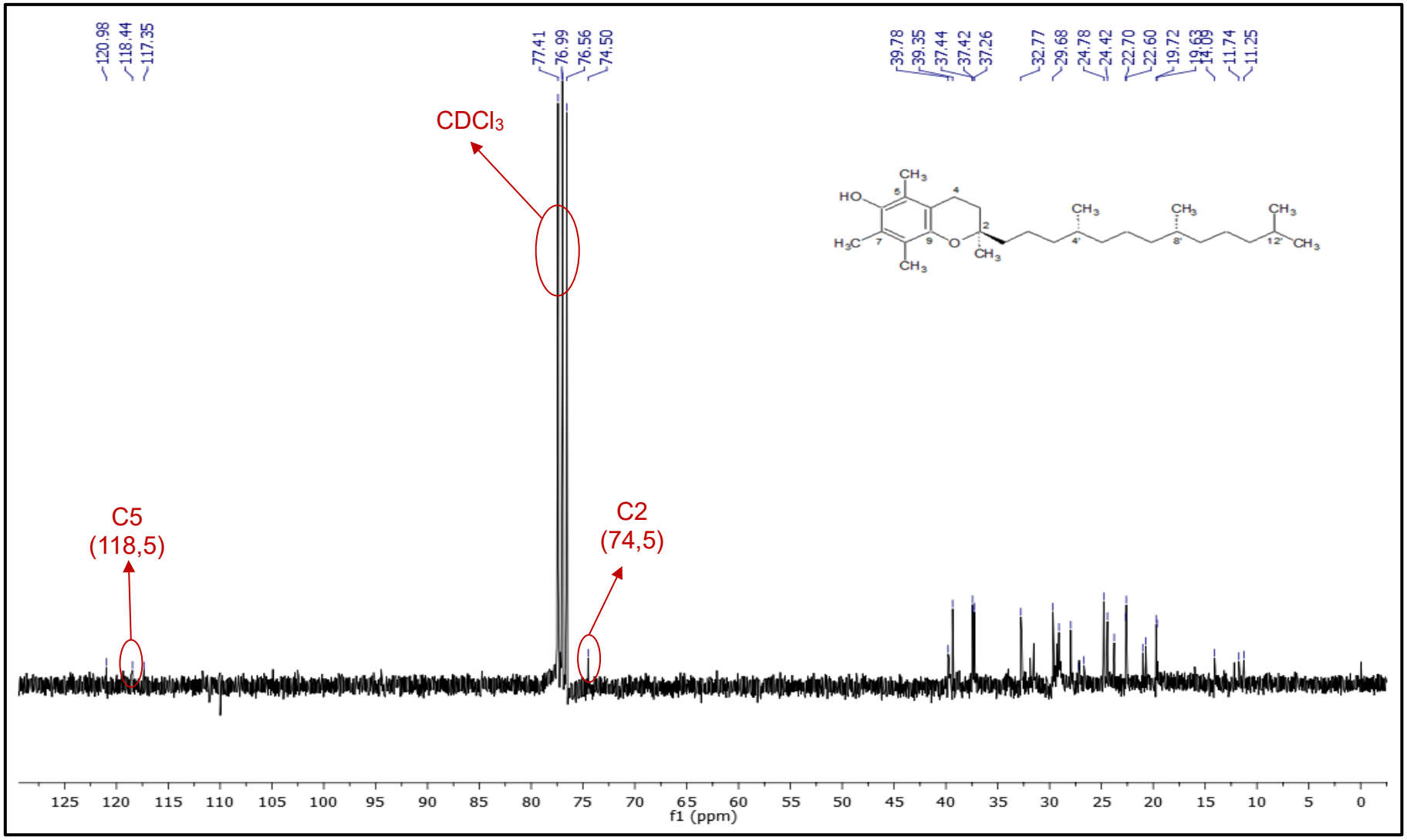



Figura 24: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 75 MHz] do *α*-tocoferol

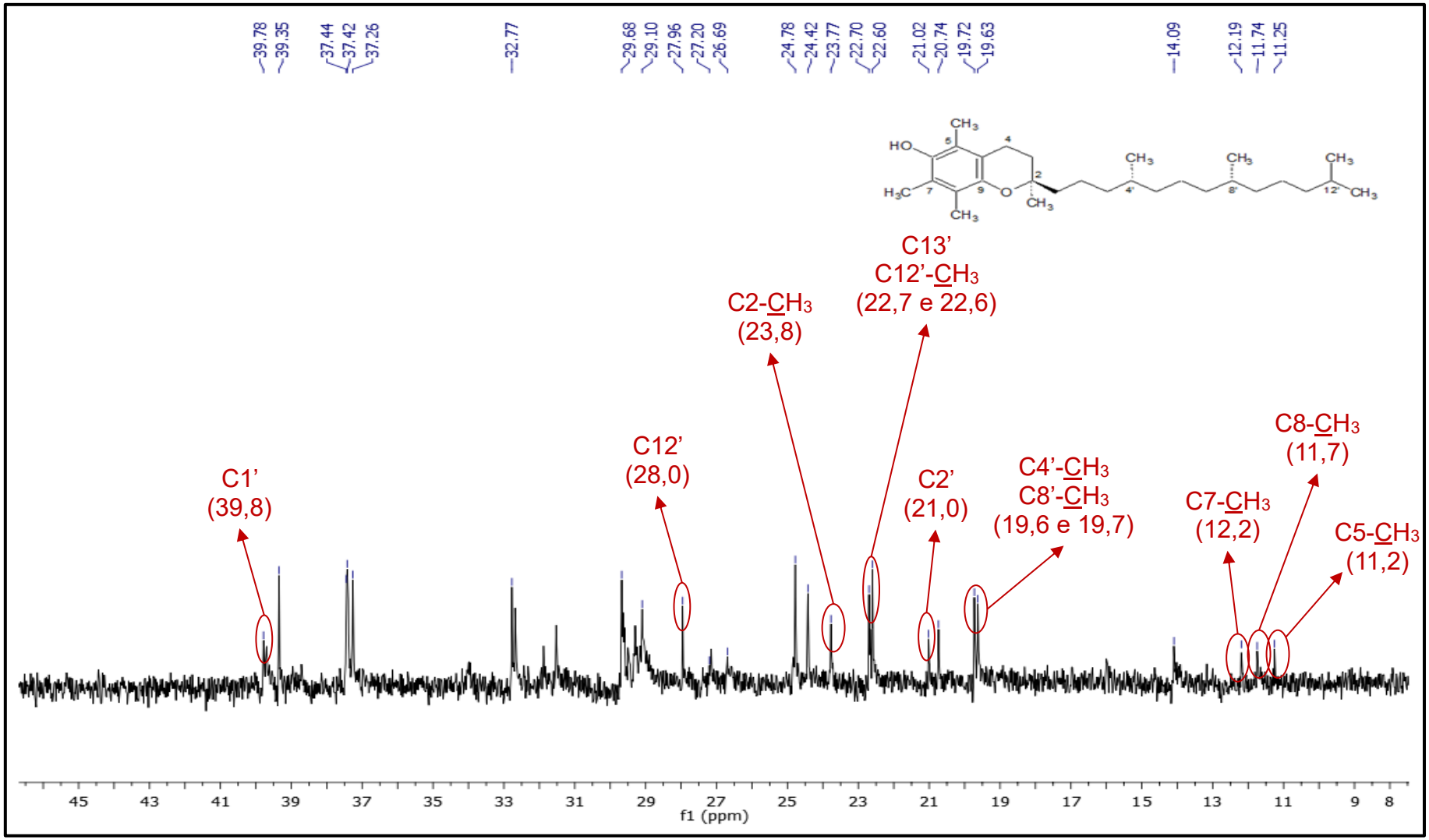
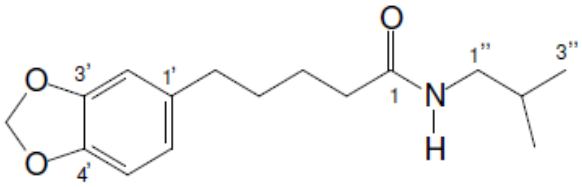



Figura 25: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 75 MHz] ampliado (δ8 – 45) do *α*-tocoferol

### 4.1.7 Elucidação da tetrahidropiperlonguminina [15]




**[15]**

A substância foi identificada através de dados de CG-EM (Figura 26, p.63), observando um bom grau de pureza, tempo de retenção (RT) de 29.536 minutos e o ponto de fusão encontrado foi de 56–57ºC, além da comparação com dados relatados na literatura de temperatura de fusão de 55 – 56ºC e tempo de retenção de 25.654 minutos (Nascimento, 2011). A diferença do RT pode estar relacionada com as condições em que foram realizados os cromatogramas.

O espectro de massas mostrou o íon molecular *m/z* 277 sofre fragmentação dando origem a quatro principais picos: *m/z* 204, 135, 115 e 60, tendo como pico base o íon *m/z* 135 (NASCIMENTO, 2011), além do pico em *m/z* 148. As principais fragmentações são mostradas na Figura 27 (p.64).

A tetrahidropiperlonguminina já foi isolada das raízes de *P. klotzschianum* e sua atividade larvicida frente larvas do *Aedes aegypti* foi comprovada por NASCIMENTO (2011).

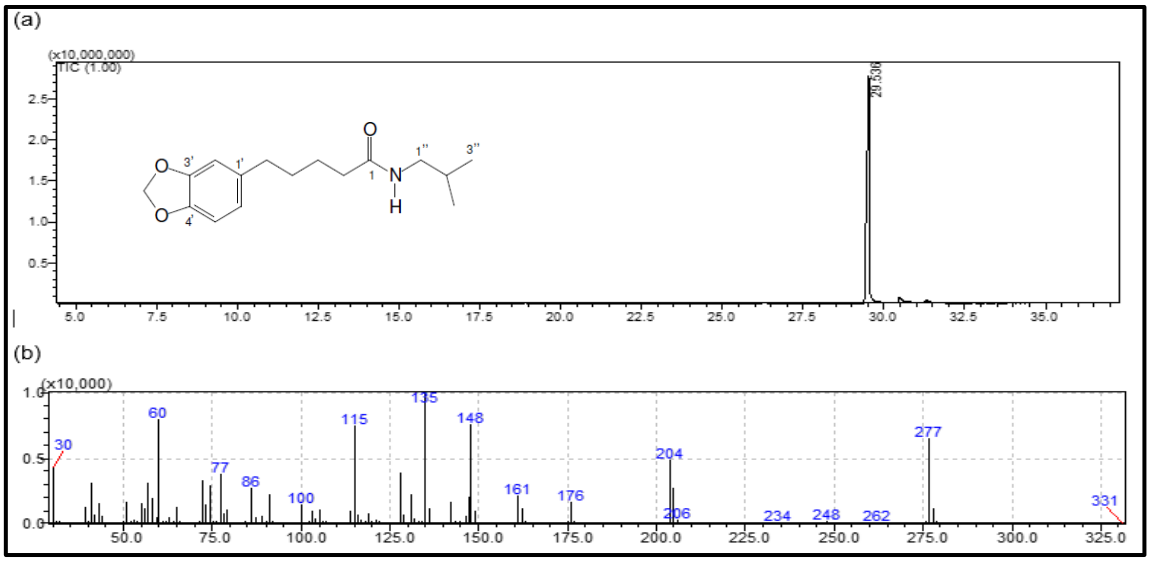



Figura 26: (a) Cromatograma em CG-EM da tetrahidropiperlonguminina (b) Espectro de massa da tetrahidropiperlonguminina

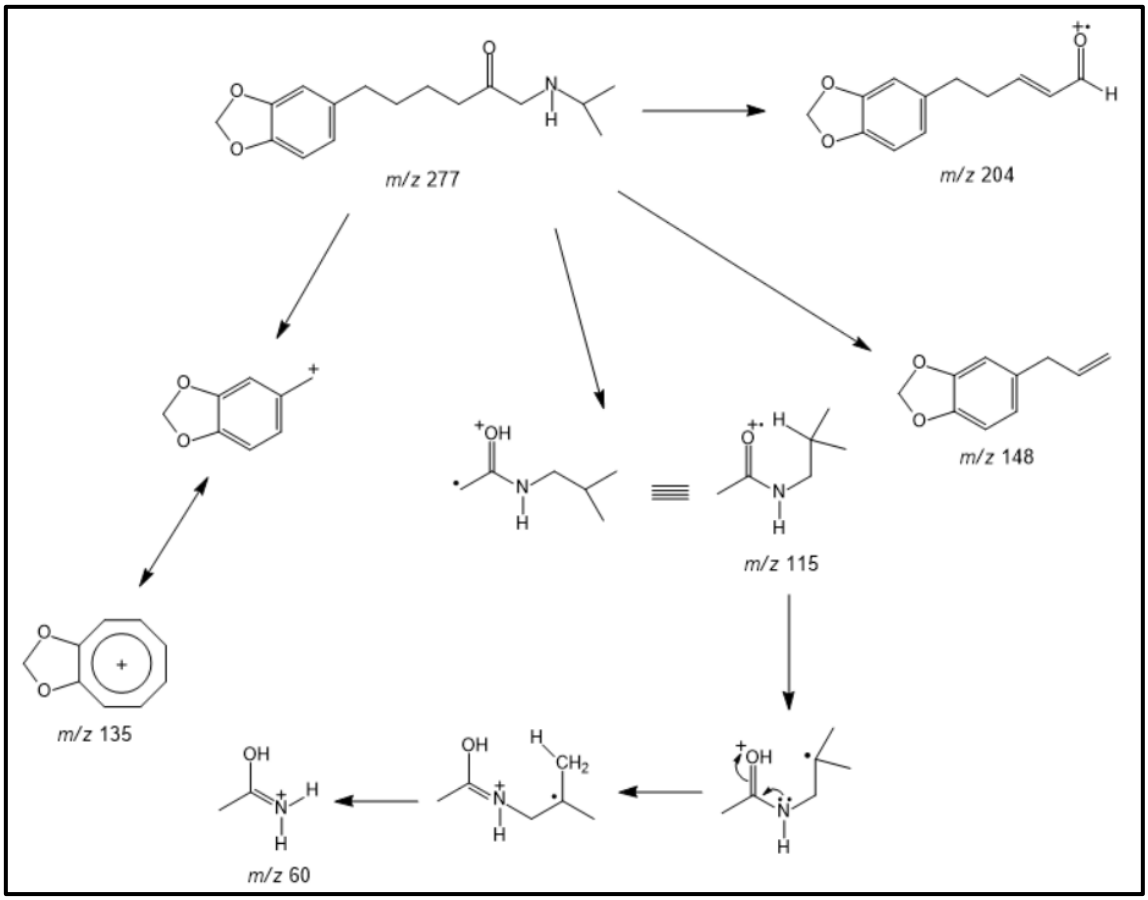
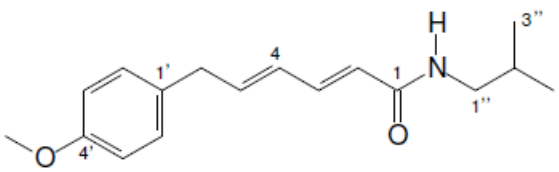
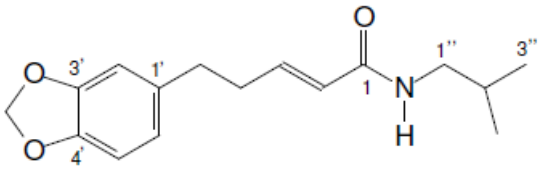



Figura 27: Principais fragmentações apresentadas no EM para tetrahidropiperlonguminina

### 4.1.8 Elucidação da mistura de piperovatina [13] e 4,5-dihidropiperlonguminina [16]



**[13]**



**[16]**

A análise do cromatograma feito em CG-EM (Figura 28, p.67) da amostra EHFP10-2 foi possível identificar uma mistura. Dentre as substâncias foi possível identificar a piperovatina (pico 4) e a 4,5-dihidropiperlonguminina (pico 1) através da comparação dos EM's como a literatura (NASCIMENTO, 2011). As amidas identificadas são os componentes majoritários dessa mistura, é possível que as outras substâncias presentes na mistura possam ser também amidas. Essas

estruturas foram confirmadas através dos dados de IV, RMN de $^{1}H$ e de $^{13}C$, que também foram comparados com a literatura.

O espectro de IV (Figura 29, p.67) apresentou sinais característicos de amida secundária. Foi observado banda em 3298,8 $cm^{-1}$ característico de estiramento da ligação N-H em amidas na forma *trans*, conformação que geralmente é majoritária. Devido ao fato de ser uma mistura de amidas, apresentou mais de um sinal para carbonila; as bandas em 1666,2 $cm^{-1}$ e 1625,2 $cm^{-1}$ são características de estiramento da ligação C=O, conhecida como banda de amida I. O valor da banda em 1625,2 $cm^{-1}$ se dá devido a insaturações conjugadas com a carbonila, que tem como efeito o enfraquecimento da ligação C=O reduzindo o número de onda de absorção de aproximadamente 15 $cm^{-1}$. Como ambas as amidas possuem insaturação conjugada a carbonila e é a banda mais intensa correspondente a carbonila, a banda de 1625,2 $cm^{-1}$ foi atribuído as amidas **[13]** e **[16]**.

Ainda no espectro de IV, outras três bandas características de amidas secundárias na conformação *trans* foram apresentadas: a banda em 1546,2 $cm^{-1}$ é correspondente a deformação angular da ligação N-H, conhecido como banda de amida II; a banda em 672,96 $cm^{-1}$ é característica da deformação angular fora do plano da ligação N-H; e a banda em 1217,5 $cm^{-1}$ referente ao estiramento da ligação C-N.

O espectro de massas da piperovatina sofre fragmentação e apresenta, além do íon molecular *m/z* 273, os picos: *m/z* 173 e 152 (NASCIMENTOS, 2011). É possível verificar também a presença dos picos em *m/*z 139 e 121. Já a 4,5-dihidropiperlonguminina apresentam dois picos: o íon molecular *m/z* 275 e o pico base em *m/z* 135. As principais fragmentações para as amidas **[13]** e **[16]** são mostradas na Figura 30 (p. 68).

Os dados de RMN de $^{1}H$ (Figuras 31-33, p.69-71) da mistura das amidas **[13]** e **[16]**, apresentaram dupletos em δ7.13 e em δ6.76, integrados para dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios do anel aromático, um dupleto em δ0.91 integrado para 12 hidrogênios referentes aos grupos isopropilas presentes em ambas as moléculas; singleto em δ3.79, referente ao grupo metoxílico e um dupleto em δ3.42 (H-6), existente na substância **[13]** e um sinal em δ5.90 atribuído ao grupo metilenodióxido presente na substância **[16]**.

Os dados de RMN de $^{13}C$ (Figura 34, p.72) apresentaram sinal das carbonilas em δ166.2 e em δ165.9, sinais em δ20.1 e δ20.0 referentes aos carbonos isopropílicos (C3” e C4”). Apresentaram também os sinais em δ55.3, referente a metoxila, e em δ100.7, do grupo metilenodióxido, além dos sinais referentes aos carbonos do anel aromático. Os dados de RMN de $^{13}C$ foram comparados com a literatura (Tabela III, p.73).

É válido ressaltar que dessas duas piperamidas a piperovatina foi isolada em vária espécies do gênero *Piper* tais como: *P. ottonoides* (Wolff *et al.*, 2014), *P. piscatorum* (Pimentel, 2007), *P. ovatum* (Silva, 2015), *P. alatabaccum* (Santos, 2013), *P. scutifolium*, *P. corcovadensis* (Marques, 2009), dentre outras. Já a dihidropiperlonguminina foi isolada das espécies: *Piper guineense* (DWUMA-BADU et al. 1976), *P. tuberculatum* (NAVICKIENE et al., 2000), *P. longum* (TABUNENG et al., 1983) e *P. chaba* (MATSUDA et al., 2008).

A espécie *P. klotzschianum* é utilizada por muitas pessoas na cidade de Aracruz, norte do Espirito Santo, para alívio de dores reumáticas através da infusão de suas raízes e caules em garrafas de alcoóis comerciais. Após 24 horas a solução resultante é aplicada diretamente no local da dor. O efeito analgésico da planta se deve a piperovatina, principal constituinte das raízes de espécie. Essa substância ativa é responsável pela ação anestésica e dormência (MAKAPUGAY et al., 1983).

A piperovatina teve sua atividade larvicida frente *Aedes aegypti* comprovada por NASCIMENTO (2011) e também foram comprovados seus potenciais antimicrobiano e alelopático (CUNICO *et al*, 2006).

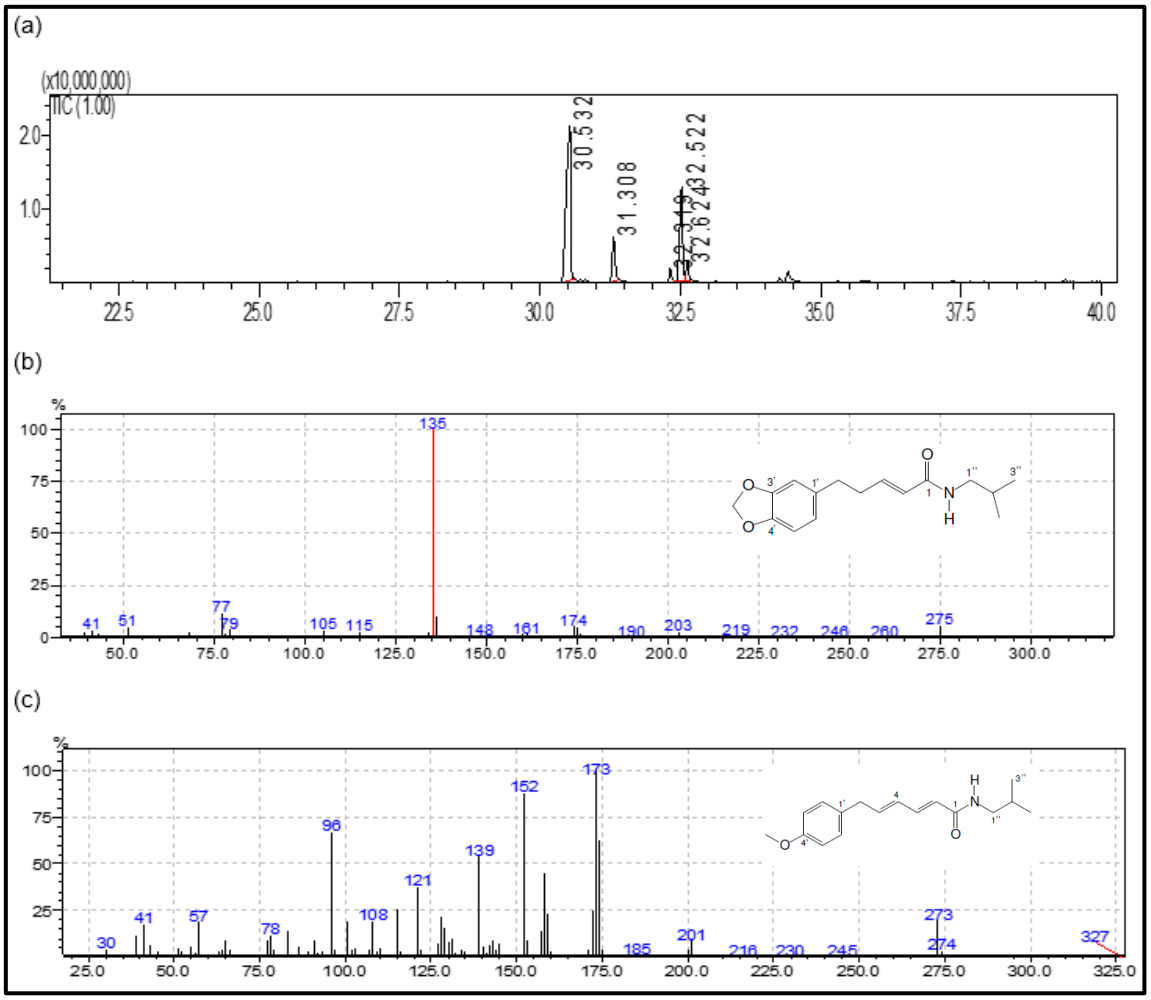



Figura 28: (a) Cromatograma em CG-EM da mistura de amidas **[13]** e **[16]** (b) EM da 4,5-dihidropiperlonguminina (RT =30.532) (c) EM da piperovatina (RT= 32,522)

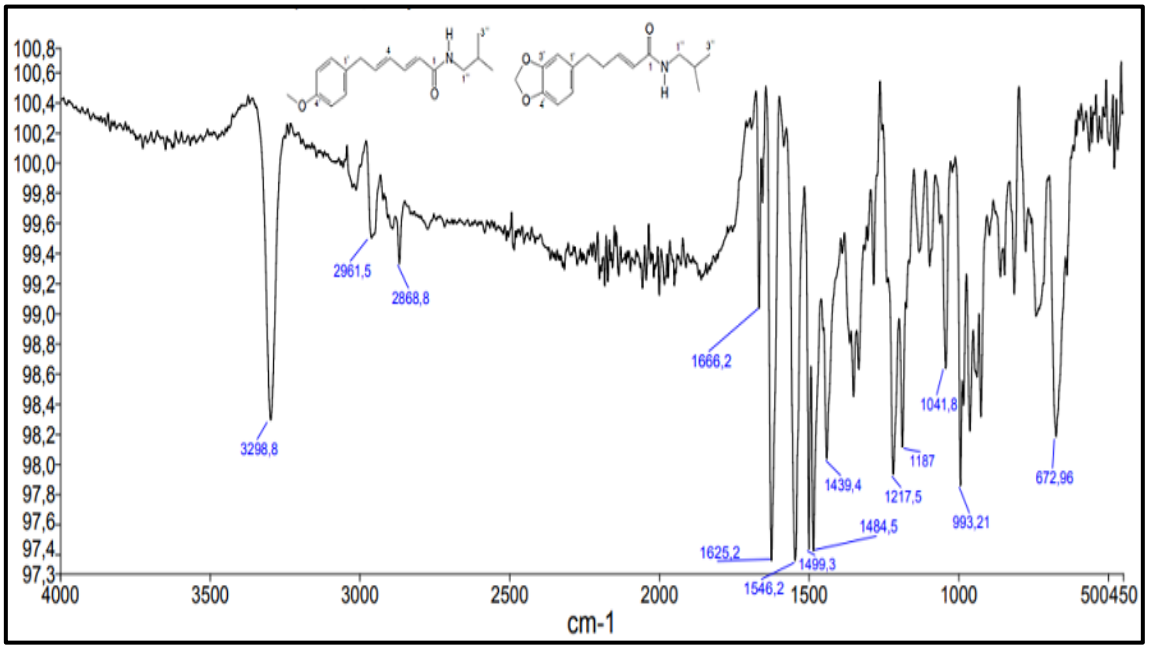



Figura 29: Espectro de IV da mistura das amidas **[13]** e **[16]**

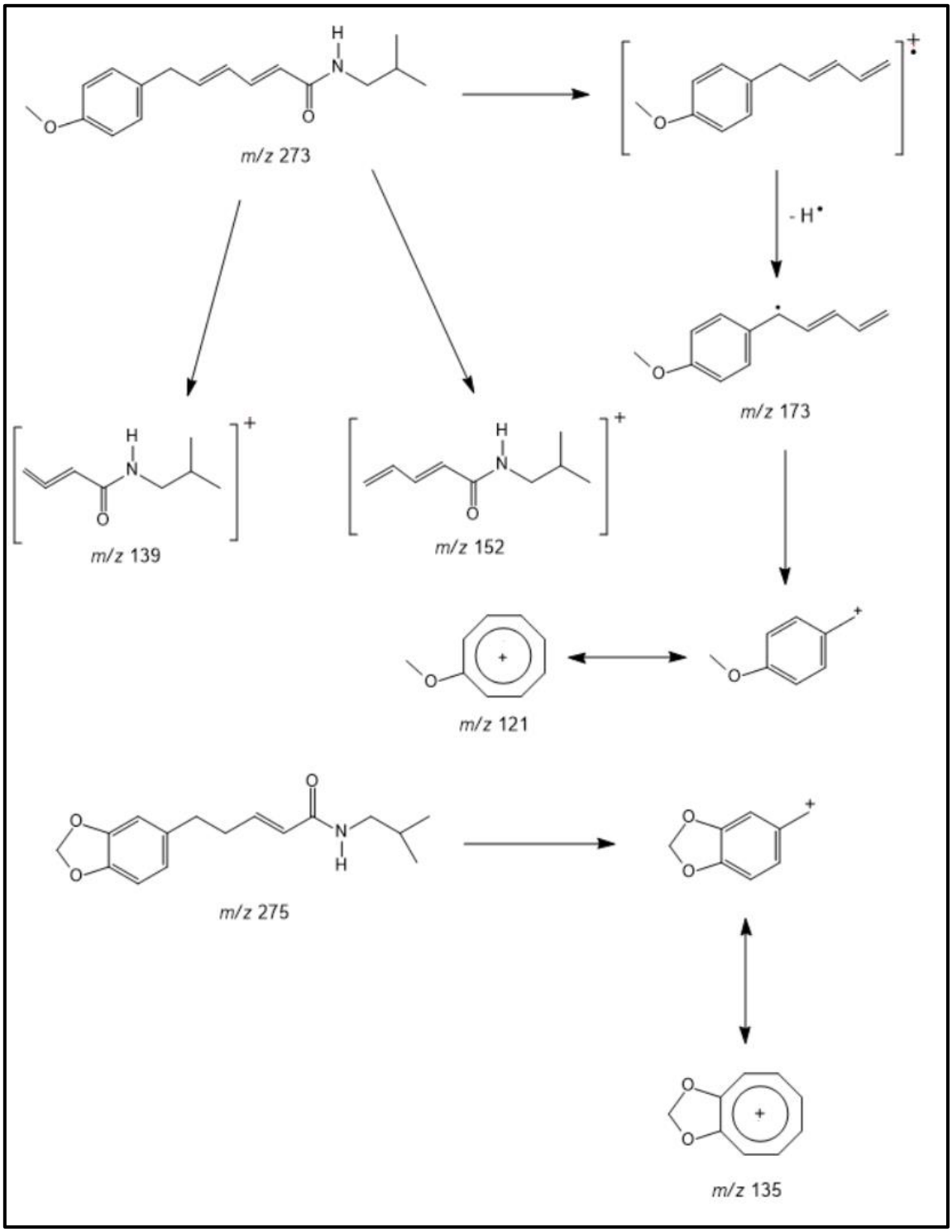



Figura 30: Principais fragmentações apresentadas no EM da mistura de amidas **[13]** e **[16]**

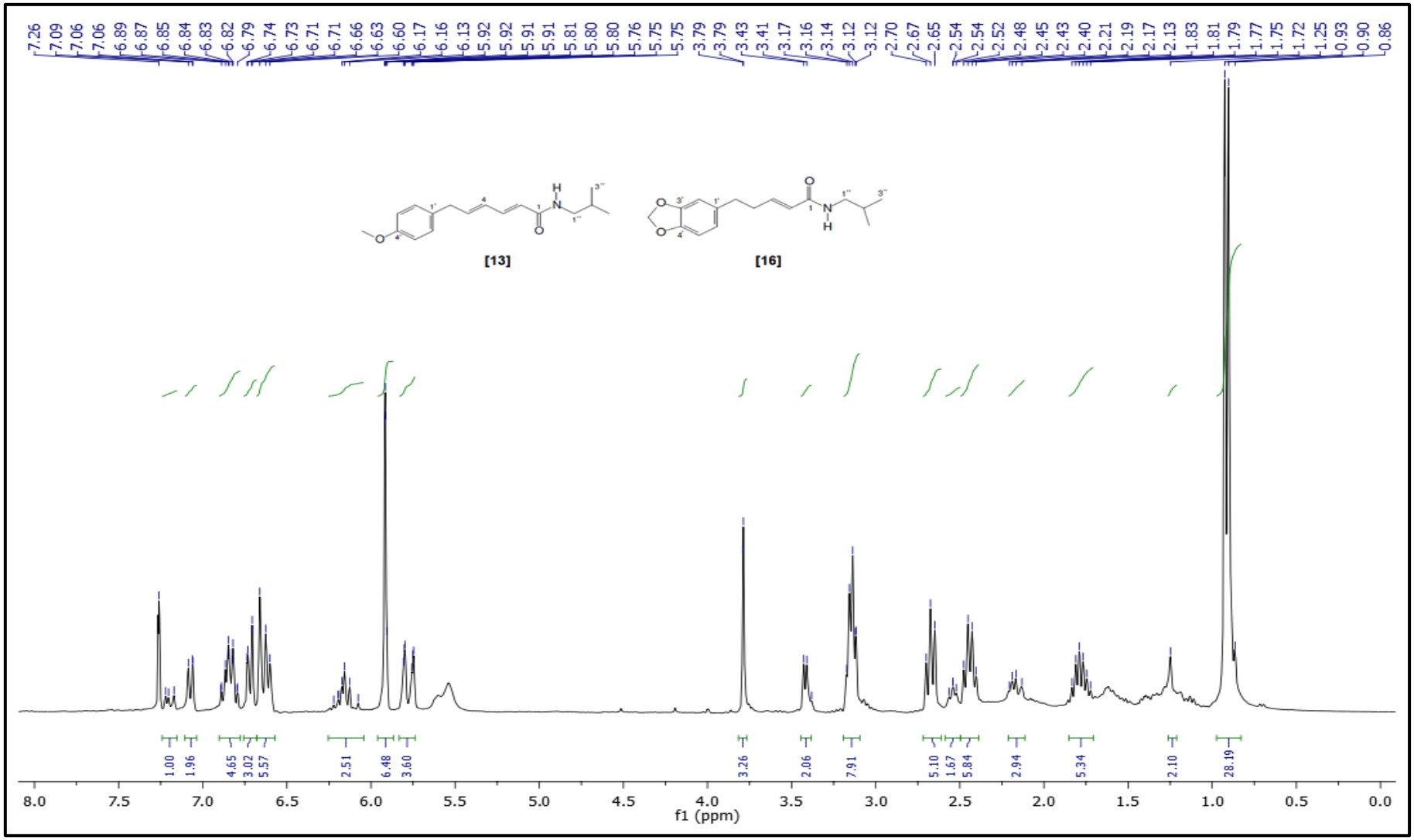



Figura 31: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] da mistura das amidas **[13]** e **[16]**

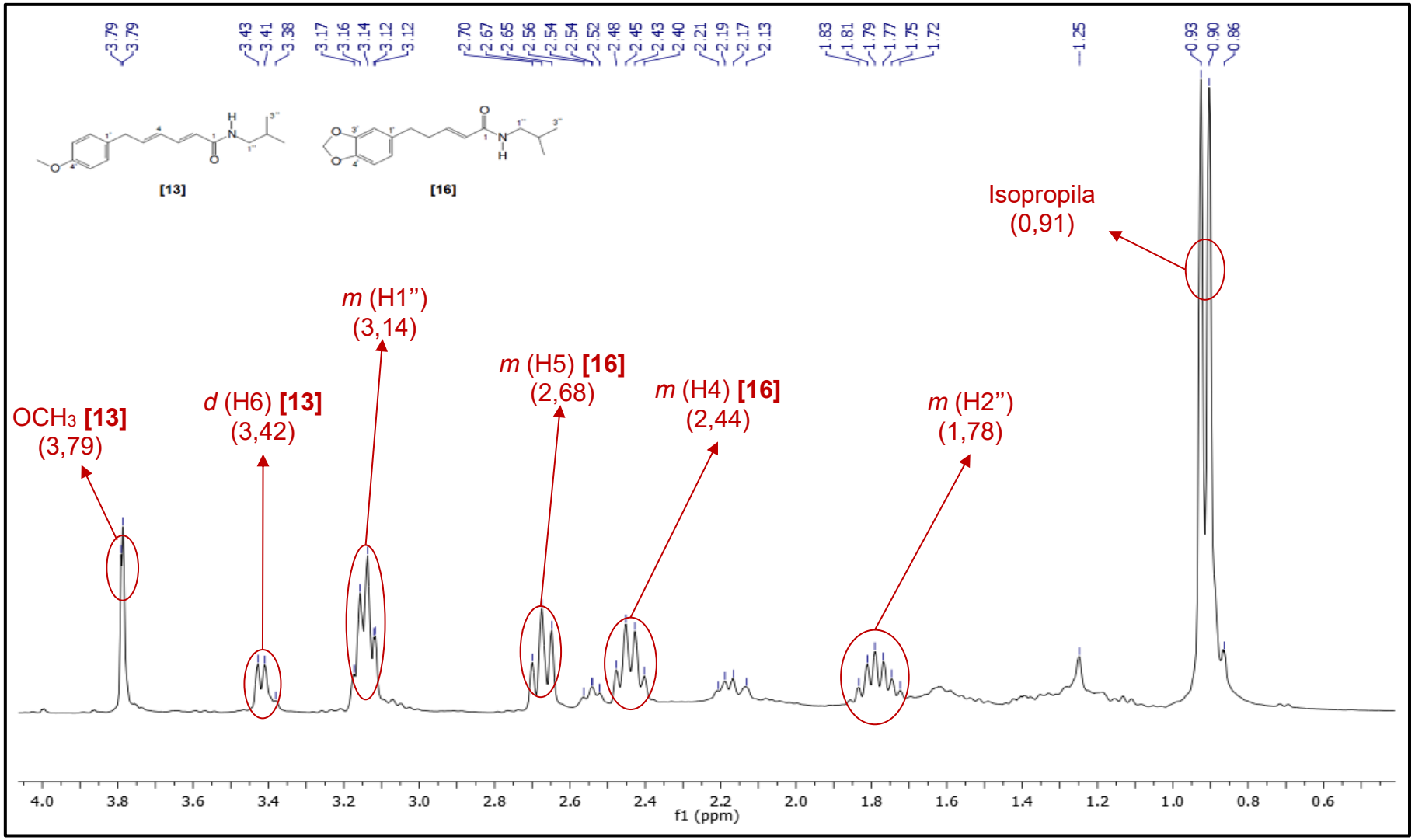



Figura 32: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] ampliado (δ0,6 – 4,0) da mistura das amidas **[13]** e **[16]**

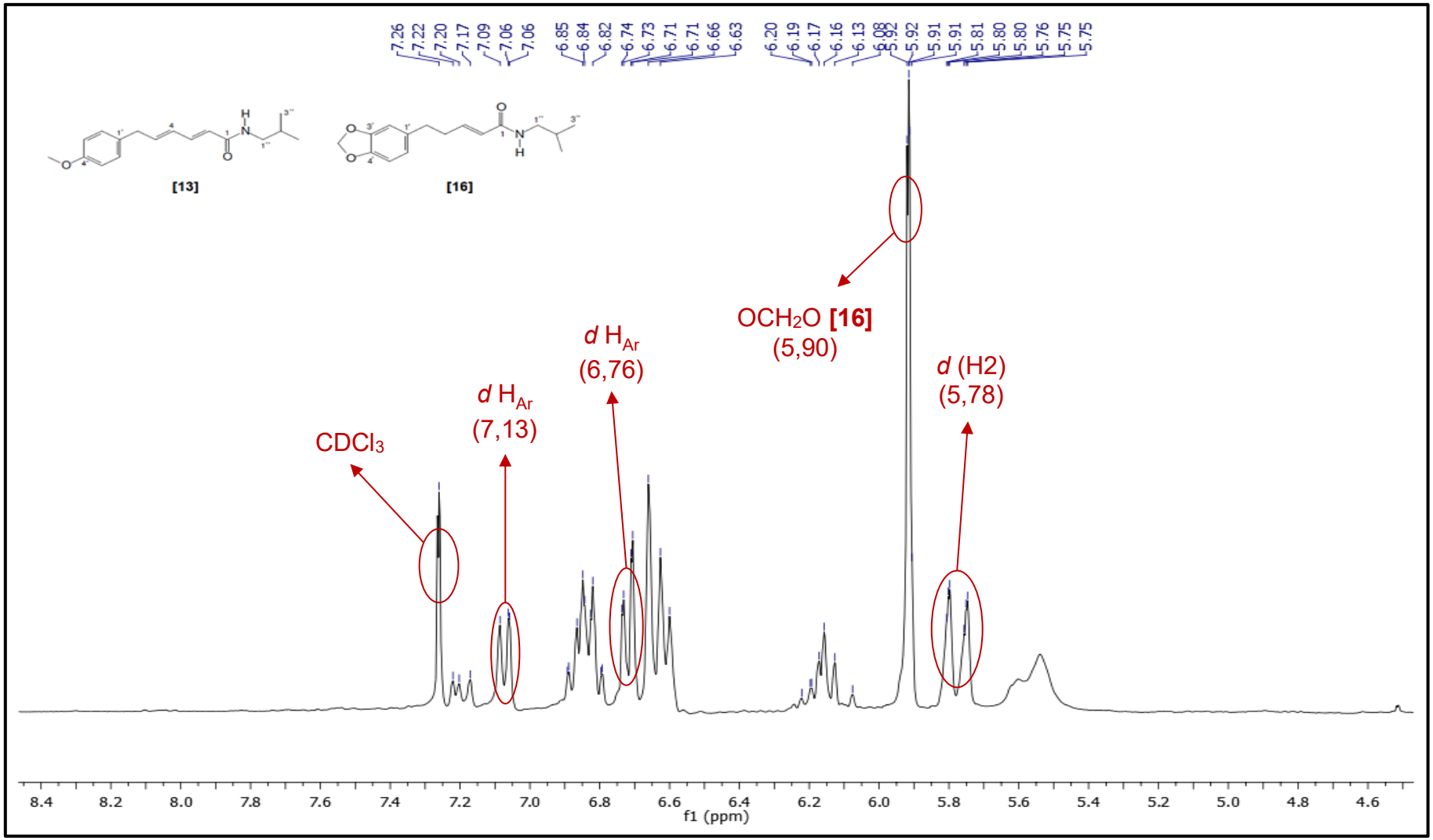



Figura 33: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 300 MHz] ampliado (δ4,6 – 8,4) da mistura das amidas **[13]** e **[16]**

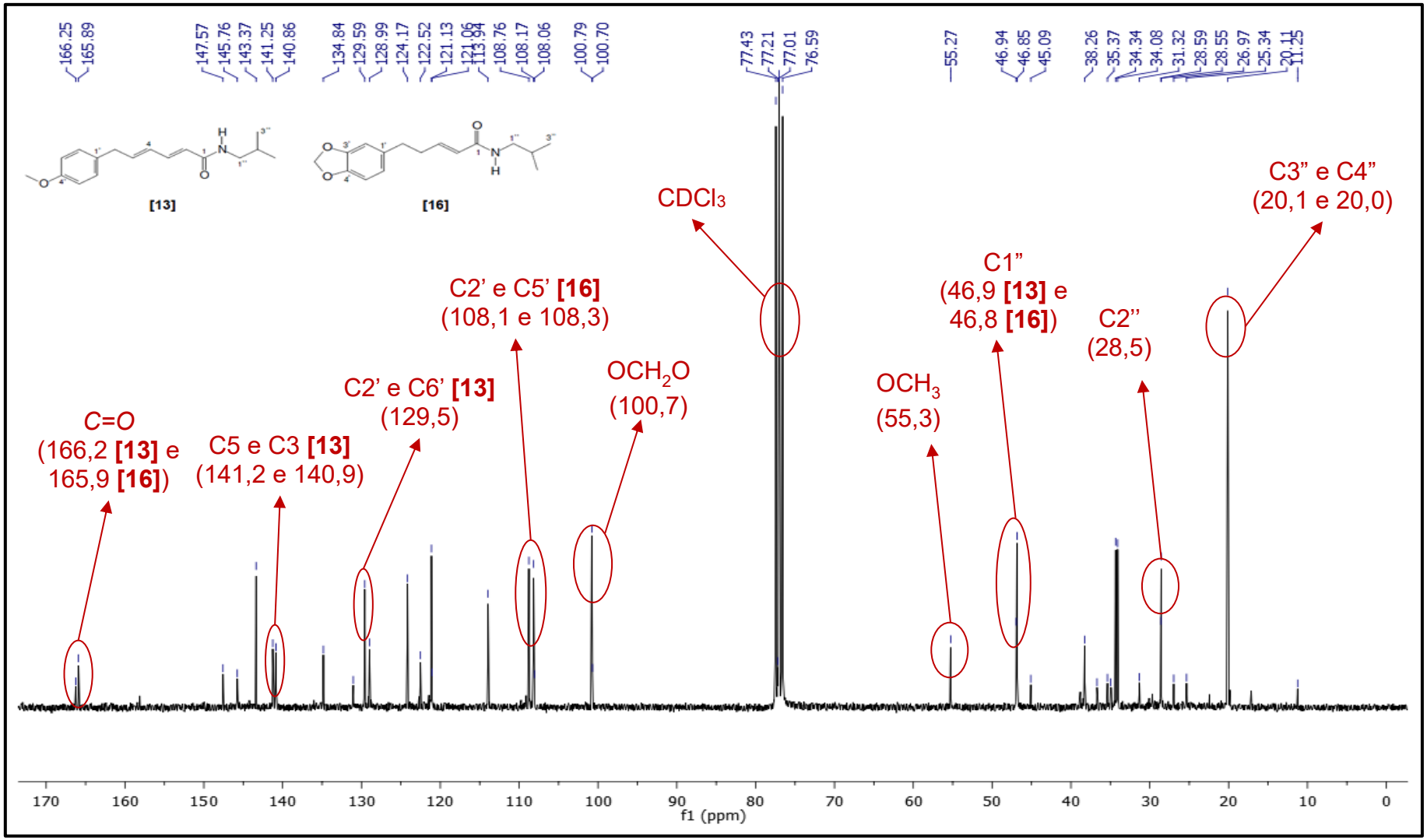


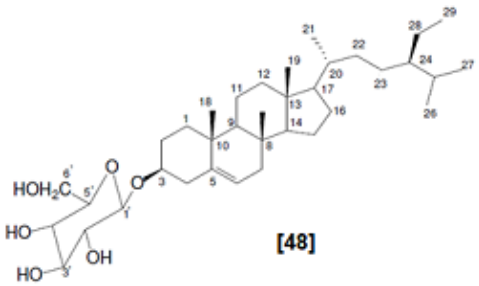

Figura 34: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$CDCl_3$, δ(ppm) – 75 MHz] da mistura das amidas **[13]** e **[16]**

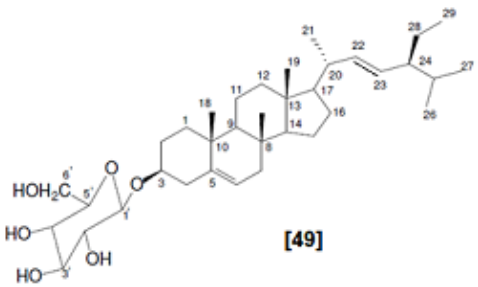
Tabela III - Dados de RMN de $^{13}C$ [125 MHz, $CDCl_3$] da piperovatina e dihidropiperlonguminina comparados com a literatura

| Posição | [13] | Piperovatina* | [16] | Dihidropiperlonguminina* |
|---|---|---|---|---|
| | $^{13}C$ | $^{13}C$ | $^{13}C$ | $^{13}C$ |
| 1 | 166,2 | 166,2 | 165,9 | 165,9 |
| 2 | 122,5 | 122,7 | 121,1 | 120,9 |
| 3 | 140,9 | 140,6 | 143,4 | 143,0 |
| 4 | 128,9 | 129,0 | 34,1 | 34,0 |
| 5 | 141,2 | 141,0 | 34,3 | 34,3 |
| 6 | 38,3 | 38,2 | - | - |
| 1’ | 131,0 | 131,0 | 134,8 | 134,8 |
| 2’ | 129,5 | 129,5 | 108,1 | 108,1 |
| 3’ | 113,9 | 113,9 | 145,8 | 145,7 |
| 4’ | 158,1 | 158,0 | 147,6 | 147,5 |
| 5’ | 113,9 | 113,9 | 108,3 | 108,4 |
| 6’ | 129,5 | 129,5 | 124,2 | 124,3 |
| 1” | 46,9 | 46,9 | 46,8 | 46,8 |
| 2” | 28,5 | 28,5 | 28,5 | 28,4 |
| 3” e 4” | 20,1 | 20,1 | 19,9 | 20,0 |
| $OCH_2O$ | - | - | 100,7 | 100,6 |
| $OCH_3$ | 55,3 | 55,2 | - | - |

*Nascimento, 2011 [75 MHz, $CDCl_3$]

### 4.1.9 Elucidação da mistura de esteroides glicosilados: daucosterol (β-sitosterol-3-O-β-Dglicosídeo) [48] e estigmasterol-3-O-β-D-glicosídeo [49]




Os dados de RMN de $^{1}H$ (Figuras 35-37, p.75-77) permitiu observar a presença de dois sinais referentes a hidrogênios olefínicos do estigmasterol, em δ5,21 (H-22, 1H) e em δ5,06 (H23, 1H) e o sinal do hidrogênio ligado ao carbono anomérico C-3 em δ5,05 tendo sua intensidade relacionada ao alinhamento por todo sistema de spin. Outros sinais característicos destes dois esteróides são na região entre δ0,65 e δ0,99 que são correspondentes a grupos metílicos típicos

de fitoesteroides e o sinal em δ5,35 (H-6). Além disso, também foram observados os sinais entre δ3,90 e δ4,45 característicos do glicosídeo.

O espectro de RMN de $^{13}C$ (Figuras 38-40, p.78-80) mostrou o sinal em δ78,4 atribuído a C-3, pois este valor é compatível com o deslocamento químico de esteroides glicosilados. Alguns valores característicos puderam ser observados em δ121,7 (C-6, **48** e **49**), δ26,2 (C-23, **48**), δ129,2 (C-23, **49**), δ34,0 (C-22, **48**), δ138,6 (C-22, **49**), δ140,7 (C5, **48** e **49**). Foi possível identificar também a presença de sinal de carbono metínico anomérico em δ102,4, além de cinco sinais de carbonos oximetínicos (δ78,3; δ77,9; δ75,1; δ71,6 e δ62,6) característicos de uma unidade de glicose. Estes dados, bem como os de RMN de $^{1}H$, foram comparados com os valores encontrados na literatura (NASCIMENTO, 2011) e se mostraram semelhantes. Desta forma podemos afirmar que a fração EMFP2-8S é uma mistura dos esteroides β-sitosterol-3-O-β-Dglicosídeo [**48**] e estigmasterol-3-O-β-D-glicosídeo [**49**].

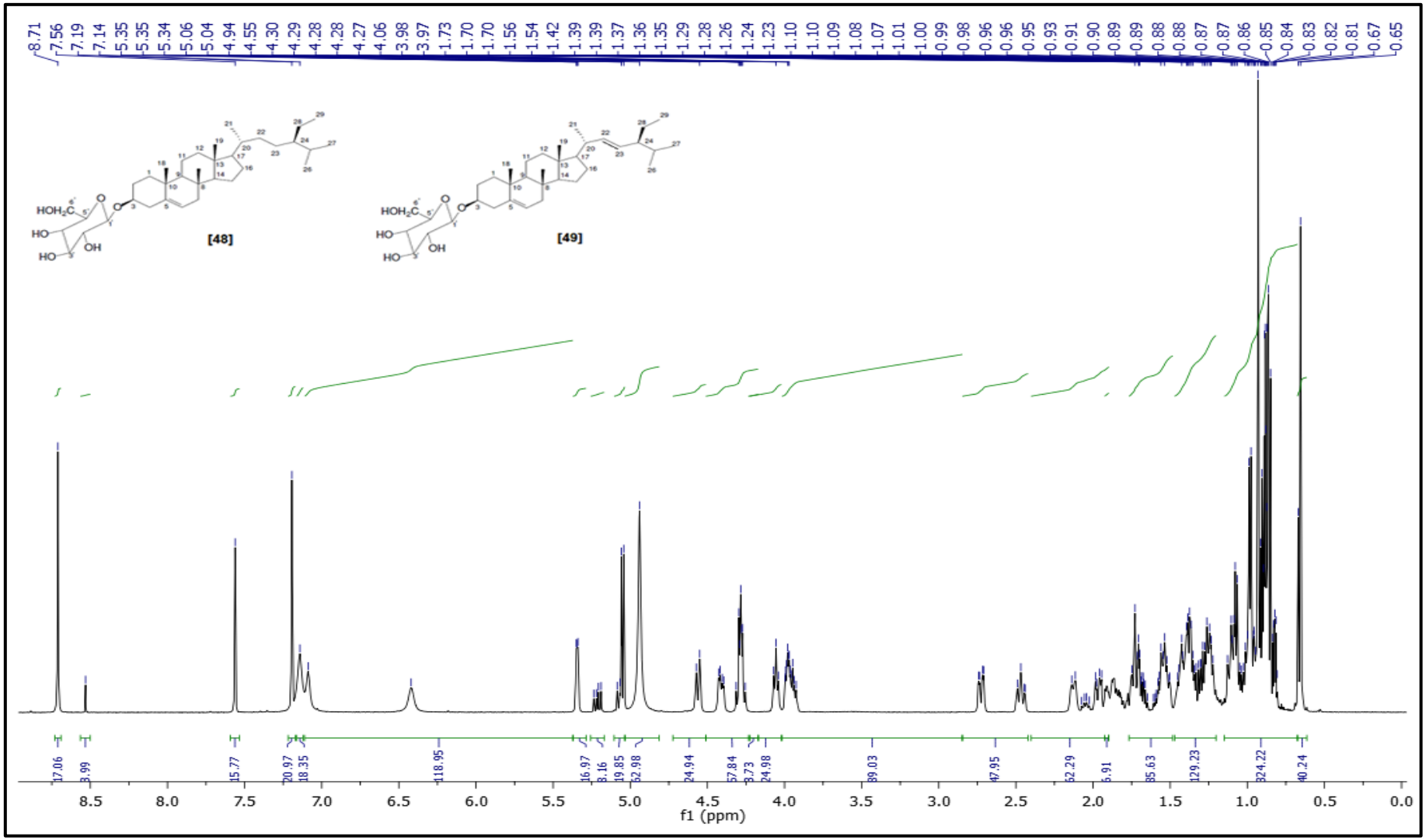



Figura 35: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 500 MHz] da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**

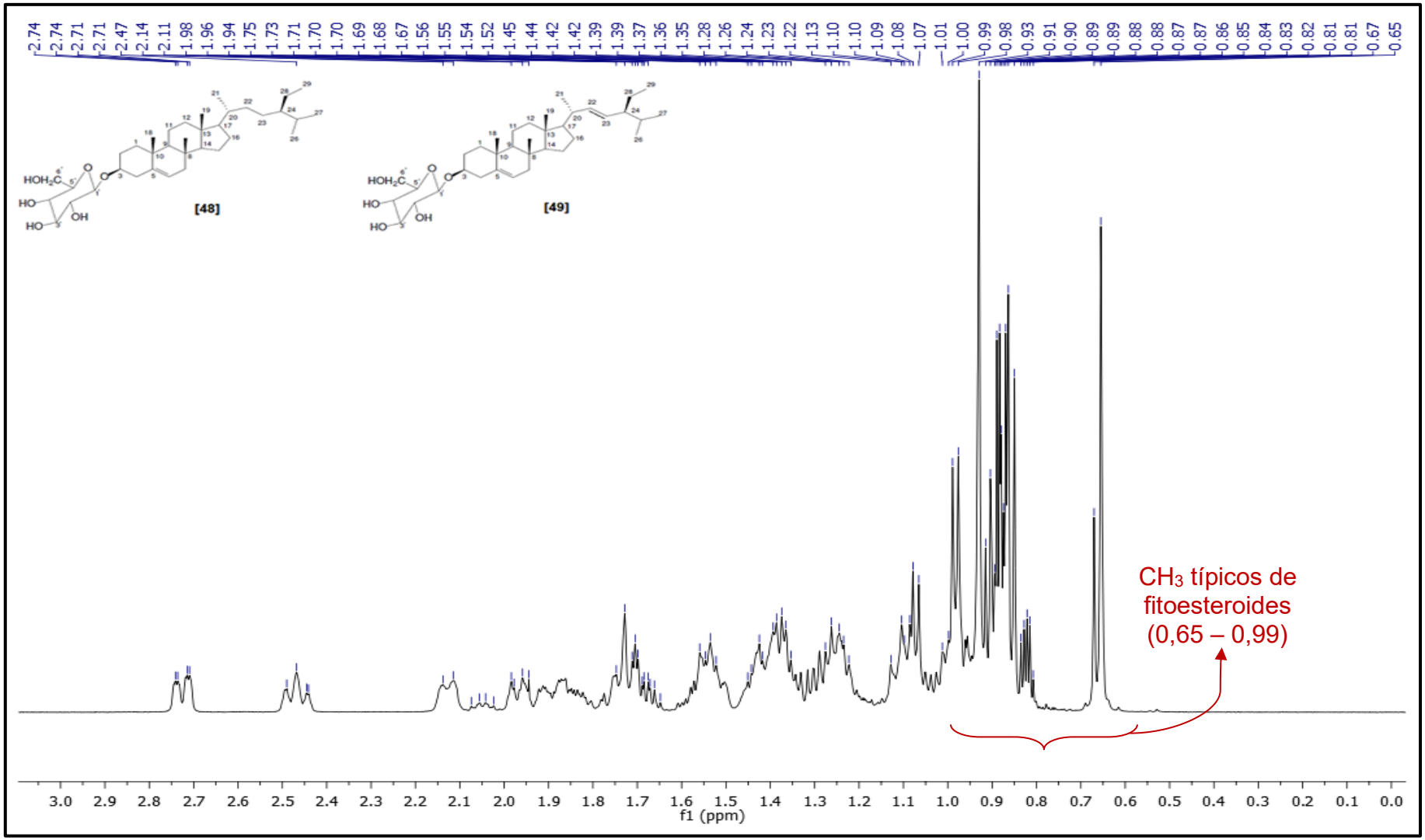



Figura 36: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$C_5D_5N$, δ (ppm) – 500 MHz] ampliado (δ0,0 – 3,0) da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**

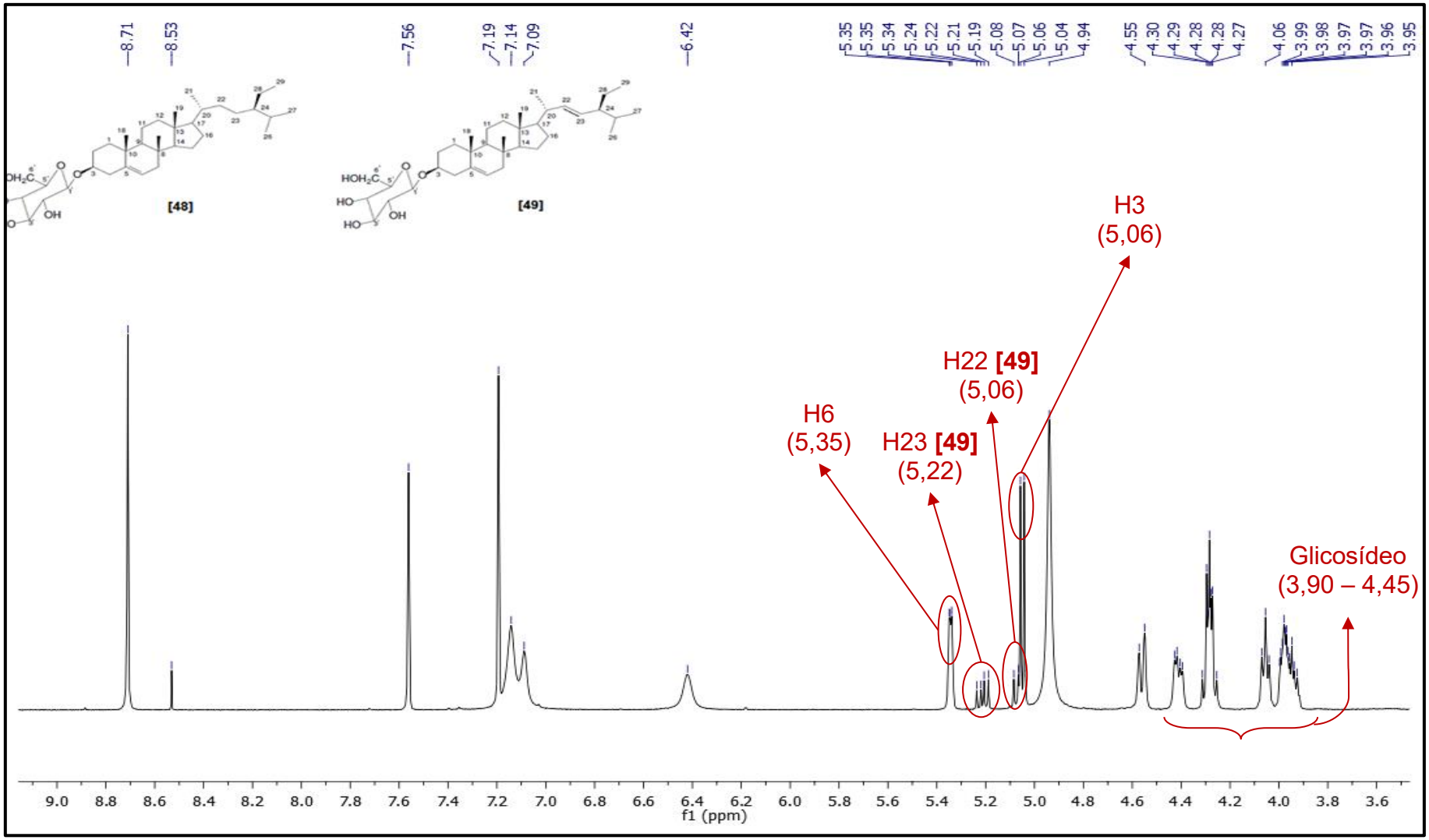



Figura 37: Espectro de RMN de $^{1}H$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 500 MHz] ampliado (δ3,6 – 9,0) da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**

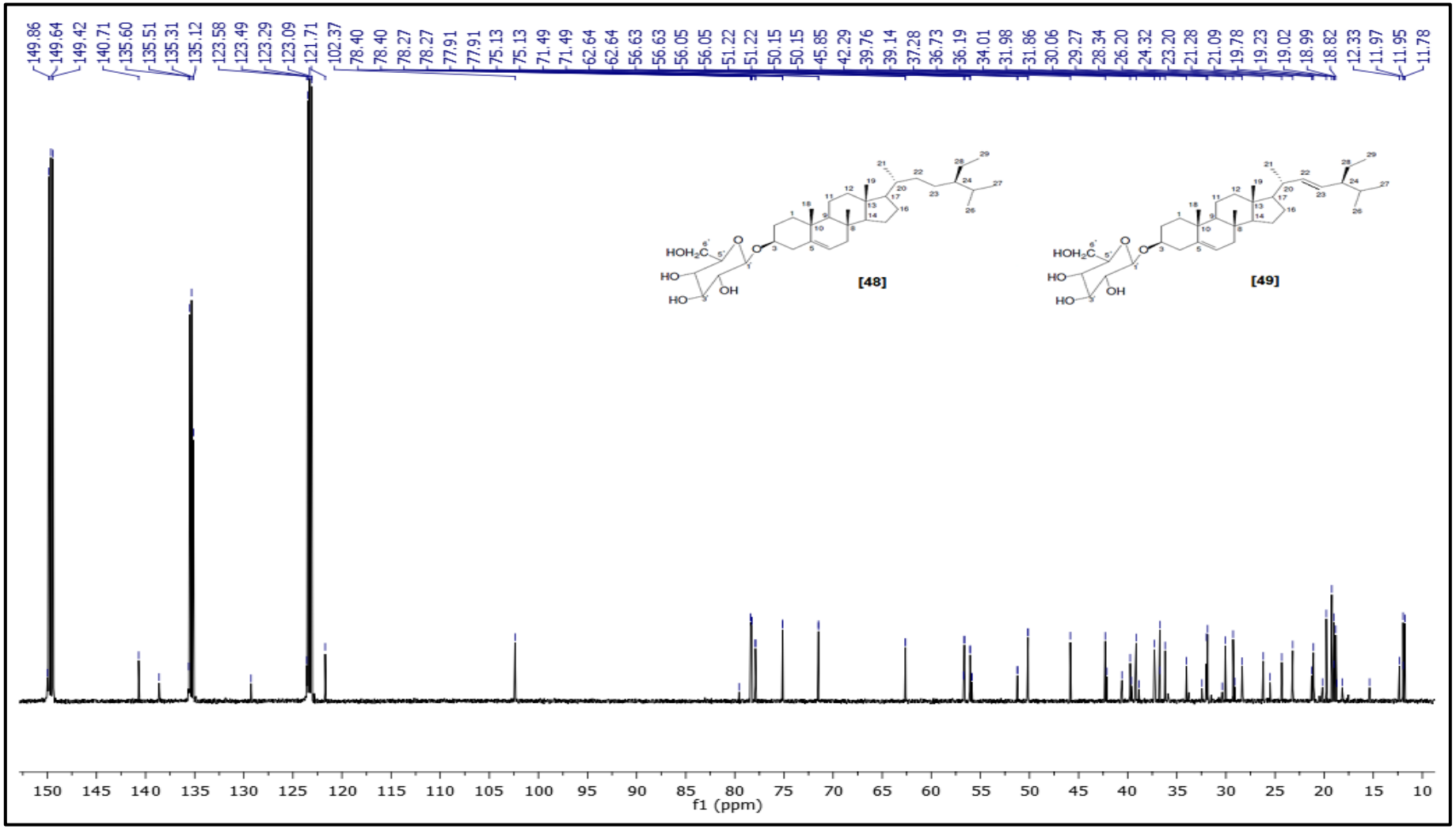



Figura 38: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 125 MHz] da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**

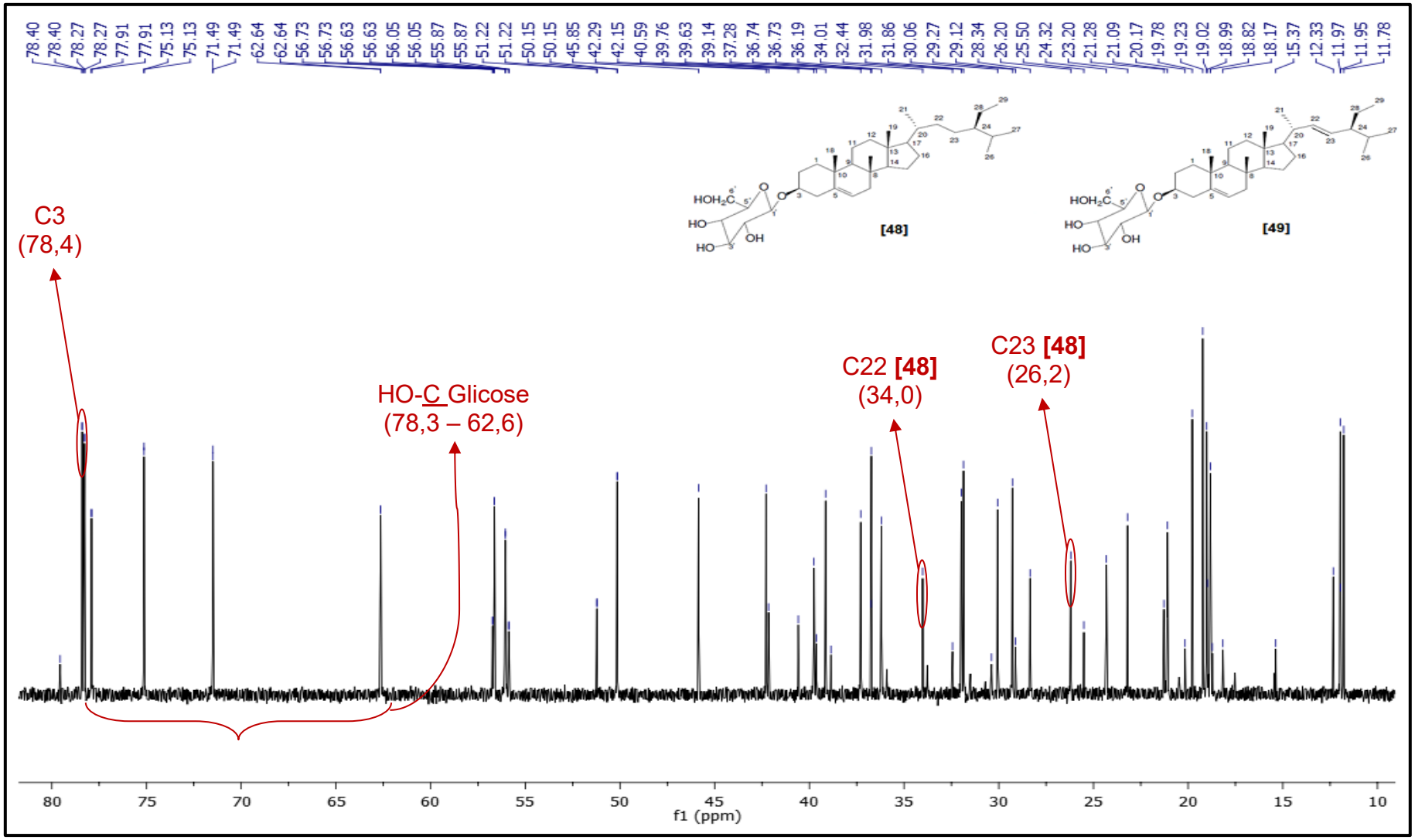



Figura 39: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 125 MHz] ampliado (δ10 – 80) da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**

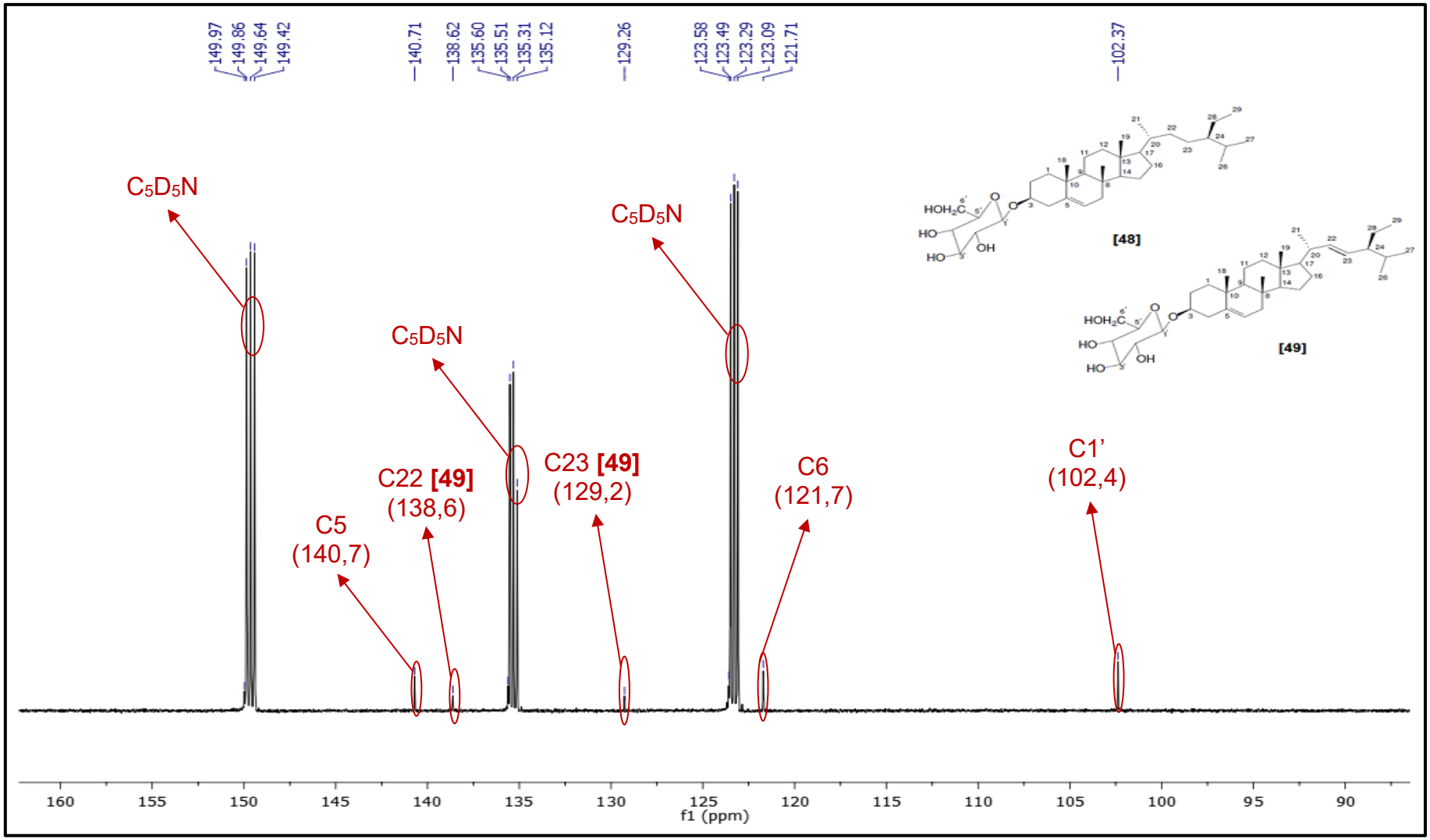



Figura 40: Espectro de RMN de $^{13}C$ [$C_5D_5N$, δ(ppm) – 125 MHz] ampliado (δ90 – 160) da mistura dos esteroides **[48]** e **[49]**

## 4.2 Ensaios biológicos

### 4.2.1 Avaliação do efeito tóxico frente à *Artemia salina*

A toxicidade à *Artemia salina* foi determinada através da concentração letal de 50% ($CL_{50}$) para os microcrustáceos. As amostras foram ensaiadas em 6 concentrações diferentes em tubos de ensaio contendo água do mar e 10 náuplios. As larvas vivas e mortas foram contadas após 24 e 48 h, exceto para a amostra EHFP5-2 que foi contada após 24 h. Os ensaios foram realizados em triplicata, assim como o ensaio de controle. Além das amostras contendo as substâncias isoladas, o extrato etanólico bruto (EEFPK) da folha também foi testado.

Os gráficos foram feitos no programa Microsoft Office Excel 2016 e obtido as equações de regressão linear a partir da correlação entre porcentagem de indivíduos mortos e a concentração dos compostos testados. Os cálculos da $CL_{50}$, através da equação y = ax + b, substituindo y por 50% e obtendo os valores da $CL_{50}$, indicados na Tabela IV (p. 81).

Tabela IV - Valores de $CL_{50}$ obtidos na avaliação do efeito tóxico frente à *Artemia salina* para compostos isolados de *Piper klotzschianum*.

| Amostra | $CL_{50}$ ($\mu g.mL^{-1}$) | |
|---|---|---|
| | 24h | 48h |
| EEFPK | 217,86 | 148,96 |
| EHFP3-3 | 89,06 | 66,82 |
| EHFP5-2 | 192,86 | - |

A substância que apresentar $CL_{50} \leq 100$ $\mu g.mL^{-1}$ é comparável com a camptotecina e sulfato de vincristina, duas substâncias consideradas muito ativas e, aquela que apresentar $CL_{50} \geq 100$ $\mu g.mL^{-1}$, no intervalo entre 100 a 900 $\mu g.mL^{-1}$, comparável ao ácido hipúrico é considerada medianamente ativa. Enquanto que é considerada inativa a substância que apresentar $CL_{50} > 1000$ $\mu g.mL^{-1}$ (DAVID *et* al, 2011 *apud* ANDERSON *et al*, 1991).

A mistura de isoasaronas apresentou alta atividade tóxica com $CL_{50}$ de 89,06 $\mu g.mL^{-1}$ após 24h e $CL_{50}$ de 66,82 $\mu g.mL^{-1}$ após 48h. A mistura de ésteres etílicos apresentou uma atividade tóxica mediana, assim como o extrato

hexânico bruto (EEFPK). Esses resultados são indicativos positivos para serem posteriormente realizados testes para verificar uma possível atividade fungicida, larvicida, antitumoral, inseticida e qualquer outra atividade que vise a mortalidade de algum tipo de micro-organismo.

### 4.2.2 Atividade Antimicrobiana

A importância da descoberta de novas substâncias com ação antimicrobiana é necessária para o combate aos micro-organismos que apresentam resistência aos fármacos existentes com ação antimicrobiana já comprovada.

Aligianis *et al*. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição - CIM até 500 $\mu g.mL^{-1}$; inibição moderada - CIM entre 600 e 1500 $\mu g.mL^{-1}$ e como fraca inibição - CIM acima de 1600 $\mu g.mL^{-1}$.

Os resultados obtidos para avaliação da atividade antimicrobiana são mostrados na Tabela V para as amostras e na Tabela VI para os extratos brutos. O extrato bruto ECFPK apresentou atividade antimicrobiana para os três micro-organismos Gram-positivos utilizados. Frente a *S. aureus* CBAM 324 apresentou CIM de 500 $\mu g.mL^{-1}$, sendo considerada uma forte inibição; frente a *S. aureus* AC e *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou CIM de 1000 $\mu g.mL^{-1}$, sendo considerada uma inibição moderada. Esses resultados são de bastante interesse investigativo, uma vez se tratar de um extrato.

Os resultados das tabelas V e VI (p. 82 e 83) demonstram que os micro-organismos foram resistentes contra as demais substâncias identificadas e utilizados.

Tabela V - CIM das substâncias isoladas sobre os micro-organismos utilizados.

| Microorganimos | CIM ($\mu g.mL^{-1}$) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | EHFP2-2 | EHPF2-4 | EHFP3-3 | EHFP5-5 |
| *S. aureus CBAM 324* | R | R | R | R |
| *S. aureus AC* | R | R | R | R |
| *S. epidermidis ATCC 35984* | R | R | R | R |
| *E. coli CBAM 002* | R | R | R | R |
| *E. coli EPEC* | R | R | R | R |
| *P. mirabilis ATCC 15920* | R | R | R | R |
| *P. aeruginosa ATCC 25003* | R | R | R | R |
| *C. krusei ATCC 6258* | R | R | R | R |

R: resistente

Tabela VI - CIM dos extratos brutos das folhas sobre os micro-organismos utilizados.

| Micro-organismos | CIM ($\mu g.mL^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|
| | ECFPK | EHFPK | EMFPK |
| *S. aureus CBAM 324* | 500 | R | R |
| *S. aureus AC* | 1000 | R | R |
| *S. epidermidis ATCC 35984* | 1000 | R | R |
| *E. coli CBAM 002* | R | R | R |
| *E. coli EPEC* | R | R | R |
| *P. mirabilis ATCC 15920* | R | R | R |
| *P. aeruginosa ATCC 25003* | R | R | R |
| *C. krusei ATCC 6258* | R | R | R |

R: resistente.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta investigação trouxe uma contribuição para o conhecimento fitoquímico ao examinar os constituintes fixos presentes nas folhas da *Piper klotzschianum* Kunth, além de realizar avaliações das atividades biológicas (citotóxica e antimicrobiana) dos extratos, das substâncias isoladas das folhas da *P. klotzschianum*.

Sendo assim, através do estudo do extrato etanólico das folhas de *Piper klotzschianum* e com a utilização das técnicas de cromatografia clássica e transesterificação foi possível identificar 20 substâncias através das técnicas de CG-EM, IV e RMN 1D (de $^{1}H$ e de $^{13}C$), sendo isolado três amidas (tetrahidropiperlonguminina, piperovatina e 4,5-dihidropiperlonguminina), uma mistura com três isômeros de asaronas (isoasarona, *cis*-asarona e *trans*-asarona), uma mistura de quatro éteres etílicos (pentadecanoato de etila, (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de etila, (Z)-octadec-9-enoato de etila e octadecanoato de etila), além de mais 4 substâncias (esqualeno, 1-butil-3,4-metilenodioxidobenzeno, vitamina E e daucosterol). A partir da reação de transesterificação foi possível obter cinco ésteres metílicos (dodecanoato de metila, palmitato de metila, linoleato de metila, oleato de metila e estearato de metila).

Nos ensaios de toxicidade frente *Artemia salina* todas as amostras e o extrato testado apresentaram ativas com destaque para a mistura de asaronas que obteve uma $CL_{50}$=66,82 $\mu g.mL^{-1}$ após um período de 48h de observação. Esses resultados são indicativos positivos para serem posteriormente realizados testes para verificar uma possível atividade fungicida, larvicida, antitumoral,

inseticida e qualquer outra atividade que vise a mortalidade de algum tipo de micro-organismo.

Na avaliação de atividade antimicrobiana os micro-organismos se mostraram resistentes a todas as amostras e extratos, com exceção do extrato ECFPK que apresentou atividade para três micro-organismos Gram-positivos (*S. aureus* CBAM 324, *S. aureus* AC e *S. epidermidis* ATCC 35984). Esse resultado é investigativo por se tratar de um extrato, uma vez que muitas bactérias tem apresentado resistência as substâncias que apresentam atividade antimicrobiana já comprovada. O estudo desse extrato e posteriormente testes antimicrobianos podem revelar novas substâncias ativas.

O estudo das folhas de *Piper klotzschianum* foi relevante no ponto de vista que foi possível obter ésteres etílicos, os quais não foram encontrados nas raízes, que apresentaram uma moderada atividade tóxica. Além da idenfiticação dos três isômeros de asaronas, sendo a *trans* e a *cis* encontradas nas folhas e ausente nas raízes. Outro fato relevante foi a identificação da amida 4,5-dihidropiperlonguminina em maior quantidade do que a encontrada nas raízes.

## REFERÊNCIAS

AIRES, I. C. S.; LIMA, R. A. Potencial fungicida do extrato etanólico dos talos de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Candida albicans* in vitro. **Revista Eletrônica de Biologia**, 2014, 7, 270-280.

ALIGIANIS N., KALPOUTZAKIS E., MITAKU S., CHINOU I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum species*, **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; JÚNIOR, G. M. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, v. 32, No. 6, 1509-1512, 2009.

BADKE, M. R., BUDÓ, M. L. D., SILVA, F. M., RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular**. Escola Anna Nery** (impr.), 2011, p. 132-139.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 1a ed., **Ed. Artmed**: Porto Alegre, 2001.

BATISTA, I.; MARTINS, G.; PADILHA, M.; PAULO, M. C; BANDARRA, N. M. Produção de esqualeno e ácidos gordos polinsaturados por microrganismos do grupo dos *Thraustochytrids*. **Boletim de Biotecnologia**, série 2, n. 5, p 44-46, 2014.

BERNARD, C. B.; KRISHNAMURTHY, H. G.; CHANRET, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B. J. R.; SANCHEZ-VINDAS, P.; HASBUN, C.; POVEDA, L.; SAN ROMAN, L.; ARNASON, J. T. **Journal of Chemical Ecology**, 1995, 21, 801-814.

BORNSTEIN, A.J. Taxonomic studies in the Piperaceae. I. The pedicellate pipers of Mexico and Central America. **Journal of the Arnold Arboretum**, v.70, n.1, p.1-55, 1989.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p.229-239, 2010.

CECHINEL FILHO, V. Medicamentos de origem vegetal: atualidades, desafios, perspectivas.1 ed. Itajaí, SC: **Univali**, 2015.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. (Org). Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacologia. 5. ed., rev. e ampl. – Itajaí, SC: Univali, 2016.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolities). In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; R, Jones. (Eds) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 1 ª ed. **American Society of Plant Physiologists**, Capítulo 24, 2000, p. 1250-1317.

CUNICO, M. M.; DIAS, J. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; AUER, C. G.; CÔCCO, L. C.; LOPES, A. R.; YAMAMOTO, C. I.; MONACHE, F. D. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 746-749, 2006.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blancchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

DWUMA-BADU, D.; AYIM, J. S. K.; DABRA, T. T.; ELSOHLY, H. N.; ELSOHLY, M. A.; KNAPP, J. E.; SLATKIN, D. J.; SCHIFF, P. L. Jr. Dihydropiperlonguminine, a new amide from *Piper Guineense*, **Phytochemistry**, v.15, p.822-823, 1976.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M. Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.111-113, 2003.

FACUNDO, V. A.; POLLLI, 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 Amazônica**, 2008, 38, 733-742.

FIGUEREDO, F. G.; TINTINO, S. R.; DE BRITO, D. I. V.; BRAGA, M. F. B. M.; LEITE, N. F.; LUCENA, B. F. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; GOMEZ, M. C. V.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e

antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações **Revista Ciência Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2014, 35, 149-154.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira De Farmacognosia.** V.15, n.2, p.178-182, 2005.

FURLAN, M.; BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; MAQUES, M. O. M. Flavonas, Lignanas e Terpeno de *Piper umbellata* (PIPERACEAE). **Química Nova**, 2009, 32, 1107-1109.

GONÇALVES, A. P. S.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper tuberculatum* JACQ. **Journal of Basic Edication, Tachnical and Technological**, 2016, 3, 100-109.

GUSMÃO, A. S. Plantas medicinais comercializadas na cidade de Vitória da Conquista: Levantamento Etnobotânico, Composição Química e Atividades Farmacológicas. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Instituto Federal de Ciência Tecnologia e Educação da Bahia (IFBA), Vitória da Conquista, BA, 2015.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n.7, p. 294-300, 2000.

HUANG, X. Z.; YIN, Y.; DAI, J. H.; LIANG, H.; DAI, Y.; BAI, L. Two new ceramides from the stems of *Piper betle* L. **Chinese Chemical Letters**. v.21, n.4, p.433-436, 2010.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.88, n.4, p.706-716, 2001.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationships of the perianth-less Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**, v.165, n.3, p.403-416, 2004.

KIJJOA, A.; PINTO, M. M. M.; TANTISEWIE, B.; HERZ, W. A New Linalool Derivative and Other Constituents from *Piper ribesoides*. **Planta Medica**, v.55, n.2, p.193-194, 1989.

KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. **Phytochemistry**, v.67, n.21 p.2398-2402, 2006.

KOYAMA, J.; MORITA, I.; TAGAHARA, K.; HIRAI, K. I. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v.53, n.8, p.869-872, 2000.

LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; REIGADA, J. B.; SOARES, M. G.; ROESLER, B. P.; KATO, M. J. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). **Química Nova**, v.30, n.5, p.1222-1224, 2007.

LIMA, R. N. Caracterização química dos óleos essenciais e extratos supercríticos de três espécies de piper de Sergipe. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2014.

MA, C. Y.; LIU, W. K.; CHE, C.T. Lignanamides and nonalkaloidal components of *Hyoscyamus niger* seeds. **Journal of Natural Products**, v.65, p.206-209, 2002.

MAKAPUGAY, H. et al. Piperovatine, the tongue-numbing principle of Ottonia frutencens. **Journal Ethnopharmacology**, Shannon-Ireland, v.7, p.235-238, 1983.

MARQUES, J. V. Atividade biológica de amidas e análogos de espécies de *Piper* e estudos biossintéticos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; MORIKAWA, T.; YASUDA, D.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIKAWA, M. Protective effects of amide constituents from the fruit of Piper chaba on D-galactosamine/TNF-a-induced cell death in mouse hepatocytes **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.2038–2042, 2008.

MAZZEU, B. F. Estudo de aspectos químicos, biológicos e biossintéticos em *Piper fuligineum* Kunth (Piperaceae) **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brasil, 2014.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, vol.45, n.1, p.31-34, 1982.

MIYAZAWA, M.; KOHNO, G. Suppression of chemical mutagen-induced sos response by allylbenzen from *Asiasarum heterotropoides* in the *Salmonella typhimurium* TA1535/PSK1002 *umu* test. Natural Product Research, v.19, n. 1, p. 29-36, 2005.

NAKAMURA, Y., TONOGAI, Y., TSUMURA, Y., SHIBATA, T., UCHIYAMA, M. Effect of dietary squalene on the fecal steroid excretions and lipid levels of serum and liver in the rat. **Nutrition Research**, v. 17, n. 2, p. 243-257, 1997.

NASCIMENTO, J. C. Estudo Químico E Avaliação Biológica De *Piper klotzschianum* Kunth (Piperaceae) E *Croton grewioides* Baill (Euphorbiaceae). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, 2011.

NASCIMENTO, J. C.; DE PAULA, V. F.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Occurrence, biological activities and $^{13}C$ NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). **Química Nova**, v.35, n. 11, p. 2288-2311, 2012.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum, Piper arboreum and Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n.3, p.467-470, 2006.

PATRA, A; MITRA, A. K. Constituents of Acorus calamus: structure of acoramone. Carbon-13 NMR spectra of cis- and trans-asarone. **Journal of Natural Products**, v. 198, n. 44, p. 668-669, 1981.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drugs discovery. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 50-62, 2005.

PELLETIER S. W. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, **Wiley**, New York, 1983.

PEREIRA, D. M. N. ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES: *Piper klotzschianum* (PIPERACEAE) E *Achyrocline satureioides* (ASTERACEAE). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié, BA, 2015.

PIMENTEL, F. A. Avaliação fungitóxica e caracterização química dos óleos essenciais e extratos obtidos após diferentes processos de extração de Cipó vick (*Tanaecium nocturnum*) e João-Brandim (*Piper piscatorum*). **Tese Doutorado**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

PISSURNO, A. P. R.; LAURENTIZ, R. S. Cubebina: Uma Pequena Molécula com Grande Potencial. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, *no prelo*, 2017.

PORTET, B.; FABRE, N.; ROUMY, V.; GORNITZKA, H.; BOURDY, G.; CHEVALLEY, S.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; MOULIS, C. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from Piper hostmannianum var. berbicense. **Phytochemistry**, v.68, n.9, p.1312–1320, 2007.

PORTET, B.; FABRE, N.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J. L. H.; MOULIS, C.; LECLERCQ, J. Q. Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. berbicense using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1210, p.45–54, 2008.

REBELO, R. A.; SANTOS, T. G.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; DE GASPER, A. L.; CRUZ, A. B.; SCHMIT, A. P.; CRUZ, R. C. B.; STEINDEL, M.; NUNES, R. K. Compisição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Química Nova**, 2012, 35, 477-481.

SANTOS FILHO, F. C. Análise dos constituintes fixos e voláteis de fungos endofiticos dos gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e suas plantas hospedeiras. **Teses de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

SANTOS, B. V. O.; CUNHA, E. V. L.; CHAVES, M. C. O.; GRAY, A. I. Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. **Phytochemistry**, v.49, n. 5, p.1381-1384, 1998.

SANTOS, M. S.; POSER, G.; BORDIGNON, S.; RIBEIRO, V. L. S.; FERRAZ, A. B. F. Analise química e avaliação da atividade acaricida das folhas de *Piper amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, 2009/2010.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; SILVA, A.G.; TEIXEIRA, C.A.D.; ALPIREZ, I.P.V.; FACUNDO, V.A. Composição química e atividade inseticida do extrato acetônico de *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae) sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v.15, n.3, p.332-336, 2013.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H. R.; PHILOGENE, B. J. R.; ARNASON, J. T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 65, n. 7, 2008.

SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLLAR, A. Biological activity of traditional medicines from spain and guatemala. Artemia salina bioassay: a revision. **Phytotherapy Research**, v.10, p.118-120, 1996.

SILVA, D.R.; BRENZAN, M.A.; ALBIERO, A.L.M., CORTEZ, L.E.R., CORTEZ, D.A.G. Contribuição ao estudo farmacognóstico da *Piper ovatum* Vahl. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v.17, n.2, p.324-330, 2015.

SILVA, J. A.; OLIVEIRA, F.F.; GUEDES, E. S.; BITTENCOURT, M. A. L.; OLIVEIRA, R. A. Atividade antioxidante de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper divaricatum* **Revista Brasileira de Plantas Medecinais**, v. 16, p. 700-706, 2014.

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

SIQUEIRA, D.S.; PEREIRA, A.S.; NETO, F.R.A.; CABRAL, J.A.; FERREIRA, C.A.C.; SIMONEIT, B.R.T.; ELIAS, V.O. Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia. **Quimíca Nova**, v. 26, n. 5, p. 633-640, 2003.

TABUNENG, W.; BANDO, H.; AMIYA, T. Studies on the Constituents of the Crude Drug "Piperis Longi Fructus." On the Alkaloids of Fruits of Piper longum L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.10, p.3562-3565, 1983.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n. 2, p.326-337, 2006.

WOLFF, T.; SANTOS, P. F. P.; PEREIRA, R. C. A.; GUIMARÃES, E. F.; TINOCO, L. W.; VALENTE, L. M. M. Identificação em mistura de piperamidas em folhas, caule e raízes de *Piper ottonoides* por CG-EM e RMN 1D e 2D. 37ª **Reunião anual da Sociedade Brasileira De Química**, Rio Grande do Norte – RN, 2014.

YAMAGUCHI, L. F.; LAGO, J. H. G.; TANIZAKI, T. M.; MASCIO, P. D.; KATO, M. J. **Phytochemistry**, v.67, n.16, p.1838-1843, 2006.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil II: Piper - Group V; Ottonia; Pothomorphe;Sarcorliachis. **Hoehnea**, v.3, p.29-284, 1973.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae – A family profile. **Brittonia**, v.10, p.1-7, 1958.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. I. Piper-Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, v.2, p.19-366, 1972.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. III: Peperomia; Taxa of uncertain status. **Hoehnea**, v.4, p.71-413, 1974.

ZIMATH, P. L.; RIBEIRO, T. C.; DALMAGRO, A. P.; SANTOS, M. E.; GASPARETTO, A.; CRUZ, A. B.; MALHEIROS, A.; SOUZA, M. M. Avaliação psicofarmacológica do óleo essencial de *Piper amplum*. **Revista Fitos**, v. 11, p. 119-249, 2017.