



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Estudo Químico E Avaliação Biológica De *Piper klotzschianum*
Kunth (Piperaceae) E *Croton grewoides* Baill (Euphorbiaceae)**

JEFERSON CHAGAS DO NASCIMENTO

**SALVADOR
BAHIA - BRASIL**

JEFERSON CHAGAS DO NASCIMENTO

**Estudo Químico E Avaliação Biológica De *Piper klotzschianum*
Kunth (Piperaceae) E *Croton grewoides* Baill (Euphorbiaceae)**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Química Orgânica.

**Orientador: Prof^o. Jorge Maurício David – UFBA
e co-Orientação da Prof^a. Vanderlucia Fonseca de
Paula – UESB**

**SALVADOR
BAHIA - BRASIL
OUTUBRO – 2011**

DEDICO ESTE TRABALHO

Á Deus, por conceder a graça da vida.

Aos meus pais Pedro e Joaneth, pelo constante Amor.

Ao Irmão Marcio, e irmãs Andréia e Adriani por existirem.

A minha digníssima companheira Fabiane, pelo Amor e carinho.

Em especial pelos meus sobrinhos: João Pedro, Davi, Gabriel e Pietra.

“ Nossa tarefa não é penetrar nas essências das coisas, cujo significado de qualquer forma desconhecemos, mas sim desenvolver conceitos que nos permitam falar de modo produtivo sobre os fenômenos da natureza.”

Niel Bohr.

" A cura das lembranças... significa reexaminá-las com uma nova atitude e aprender com a própria experiência do sofrimento que só o amor constrói ao passo que o ódio só produz destruição e ruína".

(Papa João Paulo II)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade de realizar o curso de doutoramento, especialmente ao Colegiado do Curso de pós-graduação em Química.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela liberação e concessão de bolsa de estudo.

Ao CNPq, FAPESB, PRONEX, e IMSEAR pelos financiamentos de projetos.

Ao Prof^o. Dr. Jorge Maurício David pela orientação, dedicação, ensinamento e respeito constante.

À Prof^a. Dr^a. Vanderlucia Fonseca de Paula pela co-orientação, enorme contribuição e grande amizade.

À Prof^a. Dr^a. Juceni Pereira David pelo apoio, ensinamento, amizade e concessão do seu laboratório para realização dos testes de Atividade Antioxidante.

À Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Conserva pela oportunidade e colaboração na realização dos testes larvicidas realizados no Insetário do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

Ao Prof^o. Dr. Renato Fontana do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, pela contribuição nos testes de Atividade Antimicrobiana.

Aos professores do programa de pós-graduação em Química da UFBA Silvio Cunha e Frederico Guaré pelos valiosos ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Elsie Franklin Guimarães, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela identificação da espécie *Piper Klotschianum*, bem como à Prof^a. Dr^a. Daniela Santos Carneiro Torres, da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela identificação da espécie *Croton grewoides*.

Aos professores doutores Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Antônio Jacinto Demuner da Universidade Federal de Viçosa/MG pela amizade e utilização dos equipamentos de CG-EM e RMN.

À todos professores da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia que me incentivaram, especialmente ao professor Djalma Menezes por me apresentar a “Angélica” *Croton grewoides*.

Aos funcionários do Instituto de Química em especial o secretário da Pós-Graduação Cristovão pela dedicação e auxílio.

Ao técnico do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), da UFV, José Luiz pelo apoio nas obtenções dos espectros de massas.

Ao colega Jesú C. Ferreira da UFAL pela colaboração e realização dos testes de atividade larvicida.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química (LPQ), em especial aos bolsistas de pós-doutorado Manuela Pedra Cardoso e Sandro José de Andrade pela obtenção dos cromatogramas e espectros de massas em EMAR – MicroTOF/ESI da BRUKER e em CG-EM da SHIMADZU, de alta e baixa resolução, respectivamente.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais (GPPN), André, Bel, Bruno, Igor, Clayton, Darlan, Elieser, Hugo, Jordi, José Candido, Larissa, Luciano, Marcelo, Mariluzi, Marcos Paraíba, Marcos Vinicius, Patricia, Raul, Renato, Silvana, e em especial aos alunos de iniciação científica que tive o prazer de Co-orientar Aparecida, Klauber e Roberta pela amizade, convivência harmoniosa e diálogos enriquecedores.

Aos colegas Juraci, Érica, Lourenço, Raimundo, Monique, Isley, Daniel, Miquéias, Sandra, Airan, Michele, Lucileide, Kleber, Tolentino, Geovani e Leandro.

Ao senhor José pela alegria e atenção ao nos receber nas várias coletas da espécie de *Croton*, e por manter o local preservado. Ao meu Pai e ao senhor Argimiro pela coleta e transporte do material coletado (João Barandi). Finalmente, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização e melhoria deste trabalho.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Introdução Geral	1
Objetivos	3
Específicos.....	3
Capítulo I	
Estudo Químico dos Constituintes Fixos das Raízes de <i>Piper klotzschianum</i> Kunth (Piperaceae)	5
I.1 Introdução	6
I.1.1 Família Piperaceae.....	6
I.1.2 Gênero <i>Piper</i> – Distribuição Fitogeográfica x Função Ecológica	6
I.1.3 Aspectos Etnobotânicos do Gênero <i>Piper</i>	7
I.1.4 Aspectos Fitoquímicos do Gênero <i>Piper</i>	8
I.1.5 Atividades Biológicas de Piperamidas Oriundas do Gênero <i>Piper</i>	12
I.2 Parte Experimental.....	14
I.2.1 Materiais e Métodos (Procedimentos Gerais).....	14
I.2.2 Coleta do Material Vegetal e Identificação da Espécie.....	16
I.2.3 Preparo dos Extratos.....	16
I.2.4 Isolamento dos Constituintes Químicos de <i>Piper klotzschianum</i>	17
I.2.4.1 Fracionamento do Extrato Hexânico das Raízes – HJB.....	17
I.2.4.1.1 Purificação da Fração HJB1-6.....	17
I.2.4.1.2 Purificação da Fração HJB1-7.....	18
I.2.4.1.3 Purificação da Fração HJB1-9.....	18
I.2.4.1.4 Purificação da Fração HJB4-2.....	18
I.2.4.2 Fracionamento do Extrato Diclorometânico das Raízes – DJB	19
I.2.4.2.1 Purificação da Fração DJB1-5.....	19
I.2.4.2.2 Purificação da Fração DJB1-7 e DJB1-8.....	19
I.2.4.2.3 Purificação da Fração DJB1-14.....	20

I.2.4.2.4	Purificação da Fração DJB1-17.....	20
I.2.4.3	Fracionamento do Extrato Etanólico das Raízes – EJB.....	21
I.2.4.3.1	Fracionamento do Extrato Etanólico/Clorofórmico das Raízes – ERC.....	21
I.2.4.3.2	Purificação da Fração ERC1-5.....	21
I.2.4.3.3	Purificação da Fração ERC1-7.....	22
I.2.4.3.4	Purificação da Fração ERC1-12.....	22
I.2.5	Análise de Ácidos Graxos e Ésteres de Ácidos Graxos por CG-EM Obtido do Extrato Hexânico.....	22
I.2.5.1	Preparo de Ésteres Metílicos a partir de Misturas de Ésteres de Ácidos Graxos e Ácidos Graxos.....	22
I.2.5.2	Análise em CG-EM dos Ésteres Metílicos.....	23
I.3	Resultados e Discussão.....	26
I.3.1	Substâncias Isoladas de <i>Piper klotzschianum</i>	26
I.3.2	Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas de <i>P. Klotzschianum</i>	28
I.3.2.1	Mistura de β -sitosterol [53] e estigmasterol [54].....	28
I.3.2.2	Mistura de daucosterol (β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicosídeo) [55] e estigmasterol-3- <i>O</i> - β -D-glicosídeo [56].....	29
I.3.2.3	Ácido 4-metoxibenzóico [57].....	30
I.3.2.4	3,4,-Dimetoxi-1-propenilbenzeno (metileugenol) [58].....	30
I.3.2.5	2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno (isoasarona) [59].....	31
I.3.2.6	5-hidroxi-7-metoxicroman-4-ona [60].....	31
I.3.2.7	1-butil-3,4- metilenodioxifenil-benzeno [61].....	32
I.3.2.8	1-(2'-metoxi-4',5'-metilenodioxifenil)-1(1"-ciclopropil) cetona [62].....	33
I.3.2.9	Mistura de isobutilamidas alifáticas [63 - 70].....	33
I.3.2.10	Piperovatina [71].....	34
I.3.2.11	Piperlonguminina [72].....	35
I.3.2.12	Tetrahidropiperlonguminine [73].....	36
I.3.2.13	4,5-dihidropiperlonguminine [74].....	37
I.3.2.14	Mistura das amidas: piperlonguminina [72], isopiperlonguminina [75] e hoffmannseggiamida A [76].....	37
I.3.2.15	Mistura das cromanonas (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [77] e (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [78].....	38
I.3.2.16	Mistura dos ácidos: <i>trans</i> -feruloiloxidocosanoico [79], <i>trans</i> -feruloiloxitetraacosanóico [80] e <i>trans</i> -feruloiloxihexacosanóico [81].....	38
I.3.3	Identificação e Determinação Estrutural.....	39

I.3.3.1 Fração HJB2-5: Mistura de β -sitosterol [53] e estigmasterol [54].....	39
I.3.3.2 Elucidação estrutural da mistura de daucosterol (β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicosídeo) [55] e estigmasterol-3- <i>O</i> - β -D-glicosídeo [56]; e Fração ERC22 daucosterol [55].....	41
I.3.3.3 Elucidação estrutural do ácido 4-metoxibenzóico [57].....	45
I.3.3.4 Elucidação estrutural de 3,4-dimetoxi-1-propenilbenzeno (metileugenol) [58]....	47
I.3.3.5 Elucidação estrutural de 2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno (isoasarona) [59]....	50
I.3.3.6 Elucidação estrutural de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [60].....	52
I.3.3.7 Elucidação estrutural de 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno [61].....	57
I.3.3.8 Determinação estrutural da piperpedrona 1-(2'-metoxi-4',5'-metilenodioxifenil)-1"-ciclopropil-cetona [62].....	60
I.3.3.9 Identificação da composição da fração HJB59-4 - mistura de isobutilamidas alifáticas.....	67
I.3.3.10 Identificação das substâncias piperovatina [71], piperlonguminina [72] e tetrahidropiperlonguminina [73].....	74
I.3.3.11 Elucidação estrutural da mistura das piperamidas: piperovatina [71], piperlonguminina [72], tetrahidropiperlonguminina [73] e 4,5-dihidropiperlonguminina [74].....	85
I.3.3.12 Identificação da HJB55-2-9 composta pela mistura das piperamidas: piperlonguminina [72], isopiperlonguminina [75] e hoffmannseggiamida A [76]....	90
I.3.3.13 Determinação estrutural da mistura das cromanonas (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [77] e (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [78].....	96
I.3.3.14 Elucidação estrutural dos ferulatos ácidos <i>trans</i> -feruloiloxidocosanóico [79], <i>trans</i> -feruloiloxitetracosanóico [80] e <i>trans</i> -feruloiloxihexacosanóico [81].....	101
I.3.4 Identificação por CG-EM dos Ácidos Graxos e Ésteres de Ácidos Graxos.....	107
I.3.4.1 Mistura de ésteres de ácidos graxos e de ácidos graxos da fração HJB15-2...	120

Capítulo II

Estudo Químico dos Voláteis de <i>Piper klotzschianum</i> Kunth (Piperaceae) e <i>Croton Grewioides</i> Baill (Euphobiaceae); e Investigação de Atividades Biológicas.....	110
II.1 Introdução.....	111
II.1.1 Voláteis e Atividades Biológicas no Gênero <i>Croton</i>	111
II.1.2 Descrição botânica de <i>Croton grewoides</i> Baill.....	112
II.1.3 Voláteis e Atividades Biológicas no Gênero <i>Piper</i>	113

II.1.4 Descrição Botânica de <i>Piper klotzschianum</i> Kunth.....	114
II.2 Parte Experimental.....	115
II.2.1 Materiais e Métodos (Procedimentos Gerais).....	115
II.2.2 Coleta do Material Vegetal e Identificação das Espécies.....	116
II.2.3 Extração dos Óleos Essenciais.....	116
II.2.4 Atividades Biológicas das Espécies Estudadas.....	117
II.2.4.1 Teste para Avaliação da Atividade Citotóxica.....	118
II.2.4.2 Teste da Avaliação da Atividade Larvicida.....	118
II.2.4.2.1 Criação e Manutenção dos Mosquitos.....	118
II.2.4.2.2 Ensaio para Avaliação da Atividade Larvicida.....	119
II.2.4.3 Atividade Antimicrobiana.....	121
II.2.4.3.1 Triagem Antimicrobiana.....	121
II.2.4.3.2 Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	121
II.2.4.4 Teste para Avaliação da Atividade Antioxidante.....	122
II.2.4.4.1 Teste de seqüestro do radical 1,1-difenil -2- picrilhidrazil (DPPH).....	122
II.3 Resultados e Discussão.....	123
II.3.1 Teor dos Óleos Essenciais das Espécies Estudadas.....	123
II.3.2 Identificação e Quantificação dos Constituintes Presentes nos Óleos Essenciais..	126
II.3.2.1 <i>Croton grewoides</i> Baill, aroma “erva-doce” - CG1.....	126
II.3.2.2 <i>Croton grewoides</i> Baill, aroma “cravo da Índia” – CG2.....	127
II.3.2.3 <i>Piper klotzschianum</i> Kunth.....	132
II.3.3 Atividades Biológicas das Espécies Estudadas.....	135
II.3.3.1 Avaliação da Atividade Citotóxica.....	135
II.3.3.2 Ensaio da Avaliação da Atividade Larvicida.....	136
II.3.3.3 Ensaio para Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	138
II.3.3.4 Ensaio para Avaliação da Atividade Antioxidante das Espécies.....	142
Considerações Finais.....	144
Referências Bibliográficas.....	146

ÍNDICE DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1 - Foto da espécie <i>Croton grewoides</i> Baill.	4
Figura 2 - Fotos da espécie <i>Piper klotzschianum</i> Kunth.....	4

Capítulo I - Estudo Químico dos Constituintes Fixos das Raízes de *Piper klotzschianum* Kunth (Piperaceae)

Figura I.1 - Distribuição fitogeográfica do gênero <i>Piper</i> . Estimativas do número de espécies para cada um dos centros de diversidade.	7
Figura I.2 - Hipótese biossintética para a formação das ciclobutilamidas.....	10
Figura I.3 - Possibilidade de rota biossintética para a formação das ciclohexanamidas.....	11
Figura I.4 - Rota biossintética para amidas isoladas de espécies de <i>Piper</i>	11
Figura I.5 - Substâncias presentes em <i>Piper corcovadensis</i> Miq.	12
Figura I.6 - Fluxograma das frações obtidas do fracionamento de HJB até a 13ª coluna.	24
Figura I.7 - Fluxograma das frações obtidas do fracionamento de HJB até a 22ª coluna.	25
Figura I.8 - Espectro de RMN de ¹ H (a) e ¹³ C (b) de HJB2-5.....	40
Figura I.9 - Espectro no infravermelho, em pastilha de KBr da fração ERC1-12.	42
Figura I.10 - Espectro de RMN de ¹ H e da fração ERC1-12 e ERC1-12b.....	43
Figura I.11 - Espectro de RMN de ¹³ C (a) e DEPT135 de ERC1-12	44
Figura I.12 - Espectro de RMN de ¹ H (a) e ¹³ C (b) de ERC8-5.....	46
Figura I.13 - Espectro de massas adquirido a 70 eV da fração ERC8-5.....	46
Figura I.14 - Cromatograma adquirido no CG-EM (a) e o espectro de massas com Tr = 32,42 min. (b) da fração HJB38-3.....	48
Figura I.15 - Espectro de RMN de ¹ H (a), ¹³ C (b) e HMBC (c) de HJB38-3.	49
Figura I.16 - Espectro de massa adquirido a 70 eV da fração HJB22-2.	50
Figura I.17 - Espectro de RMN de ¹ H (a), ¹³ C (b) e DEPT 135 (c) de HJB22-2.	51
Figura I.18 - Espectro no infravermelho da fração HJB4-2 em pastilha de KBr.....	53
Figura I.19 - Espectro de RMN de ¹ H (a), ¹³ C (b) e DEPT 135 (c) de HJB4-2.	54
Figura I.20 - Espectro bidimensionais de gHMQC (a), e gHMBC (b) de HJB4-2.....	55
Figura I.21 - Principais correlações observadas no espectro de gHMBC de HJB4-2.	55
Figura I.22 - Cromatograma adquirido no CG-EM (a) e o espectro de massas (b) da fração HJB4-2.	56
Figura I.23 - Proposta da principal fragmentação apresentada no EM-IE para a substância [60].	56

Figura I.24 - Espectro no infravermelho da fração HJB1-3 em filme de NaCl.....	58
Figura I.25 - Espectro de massa a 70 eV da fração HJB1-3.....	58
Figura I.26 - Espectro de RMN de ^1H (a), ^{13}C (b) e DEPT 135 (c) de HJB1-3	59
Figura I.27 - Espectro no infravermelho da fração DJB9-4 em filme de NaCl.....	62
Figura I.28 - Proposta das principais fragmentações apresentadas no EM para a substância [62].....	62
Figura I.29 - Espectro de RMN de ^1H (a), ^{13}C (b) e DEPT 135 (c) de DJB9-4	63
Figura I.30 - Espectro bidimensionais de gCOSY (a), e sua ampliação (b) de DJB9-4	64
Figura I.31 - Espectro bidimensionais de gHMQC (a), e gHMBC (b) de HJB4-2.....	65
Figura I.32 - Principais correlações observadas no espectro de gHMBC de DJB9-4.	65
Figura I.33 - Cromatogramas e espectros de massas da fração DJB9-4: CG/EM adquirido a 70 eV (a) e (b) e CLAE/EM adquiridos no modo APCI positivo (c) e (d).....	66
Figura I.34 - Espectro de RMN de ^1H da: a) (2E,4E)-N-isobutilocta-2,4-dienamida [63] e da fração HJB59-4 (b).	69
Figura I.35 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração HJB59-4, com expansão.	70
Figura I.36 - Cromatograma adquirido em CG-EM da fração HJB59-4.	70
Figura I.37 - Espectros de massas da fração HJB59-4 a 70 eV.	72
Figura I.38 - Principais fragmentações apresentadas no EM para as isobutilamidas.	72
Figura I.39 - Espectro no infravermelho das frações HJB5-5 (a) e HJB10-4 (b) em filme de KBr.....	77
Figura I.40 - Espectro de RMN de ^1H das frações HJB5-5 (a), HJB52-5 (b) e HJB10-4 (c)...	40
Figura I.41 - Espectros de RMN de ^{13}C das frações HJB5-5(a), HJB52-5(b) e HJB10-4(c)..	79
Figura I.42 - Espectro de DEPT 135 das frações HJB5-5 (a) e HJB10-4 (b).	80
Figura I.43 - Cromatogramas adquirido no CG-EM e espectros de massas das frações HJB5-5 (a e a') e HJB52-5 (b e b').....	81
Figura I.44 - Cromatograma adquirido no CG-EM e espectro de massas da fração HJB10-4 (a) e (a').....	82
Figura I.45 - Principais fragmentações apresentadas no EM para a substância [73].	82
Figura I.46 - Principais fragmentações apresentadas no EM para as substâncias [71] e [72].....	83
Figura I.47 - Espectro de RMN de ^1H de DJB31-4... ..	86
Figura I.48 - Principais fragmentações apresentadas no EM para a substância [74].	86
Figura I.49 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração DJB31-4 com as devidas expansões.....	87
Figura I.50 - Cromatograma adquirido no CG-EM da fração DJB31-4.	88
Figura I.51 - Espectros de massas das Substâncias [73], [74], [71] e [72]	88
Figura I.52 - Espectro de RMN de ^1H da fração HJB55-2-9, com expansões	92
Figura I.53 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração HJB55-2-9, com expansão (a) e	

espectro bidimensional gHMQC (b).	93
Figura I.54 - Espectro bidimensional gHMBC da fração HJB55-2-9.	94
Figura I.55 - Cromatograma e espectros da fração HJB55-2-9.	94
Figura I.56 - Espectro de RMN de ^1H da fração HJB55-2-9, com expansões	98
Figura I.57 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração HJB55-2-7, com expansão (a) e espectro bidimensional gHMBC (b).	99
Figura I.58 - Cromatograma e espectros de massas da fração HJB55-2-7.	99
Figura I.59 - Espectro no infravermelho da fração DJB8-2 em pastilha de KBr.	102
Figura I.60 - Espectro de RMN de ^1H de DJB8-2.	103
Figura I.61 - Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135 (b) e HMQC (c) de DJB8-2.	104
Figura I.62 - Espectros bidimensionais de gHMBC: (a) visão geral e (b) com valores numéricos referentes a fração DJB8-2.	105
Figura I.63 - Principais correlações observadas no espectro de gHMBC de DJB8-2.	106
Figura I.64 - Cromatograma adquirido em CLAE (a) e em EMAR-MicroTOF/ ESI(-) (b) da fração DJB8-2.	106
Figura I.65 - Estrutura da substância 1,24-diferulato de tetracosandiol.	106
Figura I.66 - Espectro de RMN de ^1H (a) e ^{13}C (b); e cromatogramas em CG-EM a 70 eV da mistura padrão [C8-C24] (c) e da fração HJB15-2 (d).	109
Capítulo II - Estudo Químico dos Voláteis de <i>Piper klotzschianum</i> Kunth (Piperaceae) e <i>Croton Grewioides</i> Baill (Euphobiaceae); e Investigação de Atividades Biológicas	
Figura II.1 - Aparelhagem do tipo Clevenger, utilizado na extração dos óleos essenciais.	117
Figura II.2 - Larvas de <i>Aedes aegypti</i>	119
Figura II.3 - A) Ciclo do <i>Aedes Aegypti</i> ; B) Ovoposição (entre 5 e 500 ovos); C) Ovos do mosquito; D) Larva quebrando a casca do ovo; E) Larvas (quatro estágios de desenvolvimento); F) Pupas e G) Fêmea adulta.	120
Figura II.4 - Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.	122
Figura II.5 - Constituintes majoritários dos óleos essenciais de <i>C. grewoides</i>	127
Figura II.6 - Espectro de RMN de ^1H (A), ^{13}C (B) e DEPT135 (C) do óleo essencial das folhas de <i>C. grewoides</i> (FCG1).	128
Figura II.7 - Espectro de RMN de ^1H (A), ^{13}C (B) e DEPT135 (C) do óleo essencial do caule de <i>C. grewoides</i> (CCG2).	129
Figura II.8 - Espectro de RMN de ^1H (A) e ^{13}C (B) do óleo essencial das raízes de <i>Piper klotzschianum</i> (OERPCK).	134

Figura II.9 - Halos de inibição das amostras contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	141
Figura II.10 - Placa de Elisa mostrando atividade antimicrobiana das amostras testadas...	141
Figura II.11 - Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos OEFCG2 e OECCG2 e do Ácido gálico.....	143

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I - Estudo Químico dos Constituintes Fixos das Raízes de <i>Piper klotzschianum</i> Kunth (Piperaceae)	
Tabela I.1 - Frações obtidas do fracionamento em CC do extrato DJB.....	23
Tabela I.2 - Constituintes químicos presentes nas raízes de <i>Piper Klotzschianum</i>	26
Tabela I.3 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C [300 MHz (H) e 75 MHz (C), CDCl ₃ , δ C e H (ppm), J (Hz)] de [58].....	48
Tabela I.4 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C [300 MHz (¹ H) e 75 MHz (¹³ C), CDCl ₃ , δ C e H (ppm), J (Hz)] de [63], [64], [65], [66] e [70].	73
Tabela I.5 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C [300 MHz (¹ H) e 75 MHz (¹³ C), CDCl ₃ , δ C e H (ppm), J (Hz)] de [71], [72] e [73].....	84
Tabela I.6 - Dados de RMN de ¹³ C [75 MHz, CDCl ₃ , δ C (ppm)] de [71], [72], [73] e [74].	89
Tabela I.7 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C [300 MHz (¹ H) e 75 MHz (¹³ C), CDCl ₃ , δ C e H (ppm), J (Hz)] de [72], [75] e [76].	95
Tabela I.8 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C [300 MHz (¹ H) e 75 MHz (¹³ C), CDCl ₃ , δ C e H (ppm), J (Hz)] de [60], [77] e [78].....	100
Tabela I.9 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C do grupo ferulato de [79], [80], [81] e [82].....	103
Tabela I.10 - Ésteres metílicos identificados por CG-EM da fração HJB15-2.....	108
Capítulo II - Estudo Químico dos Voláteis de <i>Piper klotzschianum</i> Kunth (Piperaceae) e <i>Croton Grewioides</i> Baill (Euphobiaceae); e Investigação de Atividades Biológicas	
Tabela II.1 - Codificação dos óleos essenciais das espécies estudadas.....	117
Tabela II.2 - Resultado detalhado dos rendimentos encontrados para os óleos essenciais de <i>Croton Grewioides</i> aroma “erva-doce” CG1.....	124
Tabela II.3 - Resultado detalhado dos rendimentos encontrados para os óleos essenciais de <i>Croton Grewioides</i> aroma “cravo da Índia” CG2.....	125
Tabela II.4 – Resultado detalhado dos rendimentos encontrados para os óleos essenciais de <i>P. klotzschianum</i>	125
Tabela II.5 - Constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>Croton Grewioides</i> aroma “erva-doce” CG1.....	130

Tabela II.6 - Constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>Croton Grewioides</i> aroma "cravo da Índia" CG2.....	131
Tabela II.7 - Constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>Piper klotzschianum</i>	133
Tabela II.8 - Atividades citotóxicas dos óleos essenciais sobre <i>Artemia salina</i> expressas em concentrações letais de 50 % (CL50).....	136
Tabela II.9 - Atividades larvicidas dos óleos essenciais e substâncias sobre larvas do quarto instar do <i>Aedes aegypti</i> expressas em concentrações letais de 50% (CL50).....	137
Tabela II.10 - Halo de inibição (mm) apresentado pelas substâncias na triagem antimicrobiana.....	139
Tabela II.11 - Resultado da CIM para as amostras avaliadas contra <i>S. aureus</i> ; <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i>	140
Tabela II.12 - Resultado das Atividades Antioxidante de <i>Croton grewioides</i> e <i>Piper klotzschianum</i> a 200 µg/mL.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
AE	Acetato de etila
AcOEt	Acetato de etila
ALCB	Herbário Alexandre Leal Costa
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG	Cromatografia em fase gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada á espectrometria de massas
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement Polarization Transference</i>
DPPH	Radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila
Dec.	Decomposição
DJB	Extrato diclorometânico do João Barandi
EE	Éter etílico
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
HJB	Extrato hexânico do João Barandi
EJB	Extrato etanólico do João Barandi
EtOH	Etanol
Gli	Glicose
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multi Bond Correlation</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
ν	Estiramento

$\bar{\nu}$	Número de onda
GPPN	Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa carga
Mult	multiplicidade
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
OCP	Ordem crescente de polaridade
p.	Página
R_f	Fator de retenção em CCDC
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Triplete
Tab.	Tabela
PF	Ponto de Fusão
Tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

Resumo

Este trabalho descreve o estudo químico dos constituintes fixos das raízes de *Piper klotzschianum* Kunth, o estudo da composição e atividade biológicas (citotóxicas, larvicidas, antimicrobianas e antioxidantes) dos voláteis de *Piper klotzschianum* e *Croton grewoides*. A partir dos extratos orgânicos das raízes de *Piper klotzschianum* foram isoladas 46 substâncias naturais utilizando técnicas usuais de separação cromatográfica. As estruturas foram elucidadas baseadas em dados de CG-EM, IV, RMN de ^1H e ^{13}C (empregando técnicas uni e bidimensionais). Dentre elas, os compostos (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona e tetra-hidropiperlonguminina estão sendo relatados pela primeira vez como componentes do metabolismo secundário de plantas; as substâncias 1-(2'-metoxi-4',5'-metilenodioxifenil)-ciclopropil-cetona, (2*S*,3*S*)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona e (2*S*,3*R*)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona são inéditas na literatura. Os demais compostos isolados foram identificados como β -sitosterol, estigmasterol, daucosterol, estigmasterol D-glicosilado, ácido 4-metoxibenzóico, metileugenol, isoasarona, 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, piperovatina, piperlonguminina, 4,5-di-hidropiperlonguminina, isopiperlonguminina, hoffmannseggiamida A, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutilocta-2,4-dienamida, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutildeca-2,4-dienamida, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutilundeca-2,4-dienamida, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutildodeca-2,4-dienamida, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutiltrideca-2,4-dienamida, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutiltetradeca-2,4-dienamida, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutilhexadeca-2,4-dienamida, (2*E*)-*N*-isobutilhexadeca-2-enamida; além dos ácidos *trans*-feruloiloxidocosanóico, tetracosanóico e hexacosanóico. Foi também identificado o conteúdo dos ácidos graxos, tendo como componentes majoritários os ácidos palmítico, heptadecanóico, oléico e esteárico. Os principais constituintes voláteis identificados em *Piper klotzschianum* foram determinados como sendo: 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno e 2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno nas raízes, caules e folhas e, 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, limoneno, α -felandreno, *o*-cimeno e α -*trans*-bergamoteno nos óleos das sementes. Já para *Croton grewoides* os componentes majoritários nas folhas e caules foram metilchavicol, eugenol e *trans*-anetol. Nos ensaios contra náuplios de *Artemia salina* todas as amostras testadas apresentaram altamente ativas, com destaque para os valores de $\text{CL}_{50} = 7,06, 7,07$ e $7,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno e óleos dos caules e folhas de *Piper klotzschianum* respectivamente. Atividades larvicidas contra o terceiro instar do *Aedes aegypty* foram constatadas para os óleos essenciais presentes nas raízes e sementes de *Piper klotzschianum*, folhas e caules de *Croton grewoides* e para as substâncias 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, piperovatina, tetra-hidropiperlonguminina e (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona. Destaque para a alta atividade apresentada pelas piperamidas piperovatina ($\text{CL}_{50} = 1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tetra-hidropiperlonguminina ($\text{CL}_{50} = 10,43 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dos óleos de *Piper klotzschianum* foram observadas atividades antimicrobianas para o óleo das raízes contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Cândida albicans* (UMP), e para o óleo das sementes, apenas contra *Cândida albicans*; já para os óleos de *Croton grewoides* foi observada atividade para os três microorganismos testados. Para a substância (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona foi encontrada uma CIM de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Atividades antioxidantes frente ao radical DPPH foram apenas constatadas nos óleos essenciais de *Croton grewoides* aroma "cravo da Índia"; o $\text{EC}_{50} = 64,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ (folhas) e o $\text{EC}_{50} = 57,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ (caules) mostrou resultado similar ao ácido gálico ($\text{EC}_{50} = 16,48 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizado como padrão.

Palavras-chave: *Piper klotzschianum*, *Croton grewoides*, piperamidas, óleos essenciais, atividades biológicas.

Abstract

This work describes the chemical constituents fixed from roots of *Piper klotzschianum* Kunth, the study of composition and biological activity (cytotoxic, larvicides, antimicrobial and antioxidant) of volatile of *Piper klotzschianum* and *Croton grewoides*. The organic extracts from the roots of *Piper klotzschianum* 46 natural substances were isolated using the usual techniques of chromatographic separation. The structures were elucidated based on data from GC-MS, IR, ^1H NMR and ^{13}C (using single and two-dimensional techniques). Among them, compounds (2*S*,3*S*)-5-hydroxy-7-methoxy-2,3-dimethylcroman-4-one and tetrahydropiperlonguminine are reported for the first time as components of secondary metabolism of plants, substances 1-(2'-methoxy-4',5'-methylenedioxyphenyl)-1"-cyclopropyl-ketone, (2*S*,3*S*)-5,7-dimethoxy-2,3-dimethylcroman-4-one and (2*S*,3*R*)-6,7-dimethoxy-2,3-dimethylcroman-4-one are new in the literature. The other compounds isolated were identified as β -sitosterol, stigmasterol, daucosterol, stigmasterol β -D-glycosylated, 4-methoxybenzoic acid, methyleugenol, isoasarone, 1-butyl-3,4-methylenedioxy-benzene, piperovatine, piperlonguminine, 4,5-dihydro-piperlonguminine, isopiperlonguminine, hoffmannseggiamide A, (2*E*,4*E*)-*N*-isobuthylocta-2,4-dienamide, (2*E*,4*E*)-*N*-isobutildeca-2,4-dienamide, (2*E*,4*E*)-*N*-2-isobuthylundeca-2,4-dienamide, (2*E*,4*E*)-*N*-isobuthyldodeca-2,4-dienamide, (2*E*,4*E*)-*N*-isobuthyltrideca-2,4-dienamide, (2*E*,4*E*)-*N*-isobuthyltetradeca-2,4-dienamide, (2*E*,4*E*)-*N*-isobuthylhexadeca-2,4-dienamide, (2*E*)-*N*-isobuthylhexadeca-2-enamide; in addition of *trans*-feruloiloxidocosanoic, tetracosanoic and hexacosanoic acids. It also identified the content of fatty acids, with the major components of the palmitic, heptadecanoic, oleic and stearic. The main volatile constituents were identified in *Piper klotzschianum* determined to be: 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene and 2,4,5-trimethoxy-1-propenylbenzene from roots, stems and leaves, and 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, limonene, α -phellandrene, *o*-cymene and α -*trans*-bergamotene in seed oils. As for *Croton grewoides* major components in the leaves and stems were methylchavicol, eugenol and *trans*-anethole. In tests against *Artemia salina* all samples tested were highly active, especially the values of $\text{LC}_{50} = 7,06, 7,07$ and $7,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene and oils from the stems and leaves of *Piper klotzschianum* respectively. Activities against the third instar larva of *Aedes aegypti* were found for the essential oils present in the roots and seeds of *Piper klotzschianum*, leaves and stems of *Croton grewoides* and substances 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, piperovatine, tetrahydropiperlonguminine and (2*S*,3*S*)-5-hydroxy-7-methoxy-2,3-dimethylcroman-4-one. Highlighting the high activity displayed by piperamides piperovatine ($\text{LC}_{50} = 1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and tetra-hidropiperlonguminina ($\text{LC}_{50} = 10,43 \mu\text{g mL}^{-1}$). Oils of *Piper klotzschianum* antimicrobial activities were observed for the oil of the roots against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Candida albicans* (UMP), and oil of seeds, only against *Candida albicans*; longer for the oils of *Croton grewoides* activity was observed for the three microorganisms tested. For the substance (2*S*,3*S*)-5-hydroxy-7-methoxy-2,3-dimethylcroman-4-one was found a MIC of $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Antioxidant activities against the DPPH radical were only found in the essential oils of *Croton grewoides* aroma "stud of India", the $\text{EC}_{50} = 64,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ (leaves) and $\text{EC}_{50} = 57,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ (stems) results showed not far from the $\text{EC}_{50} = 16,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the gallic acid (standard).

Keywords: *Piper klotzschianum*, *Croton grewoides*, piperamidas, essential oils, biological activities.

INTRODUÇÃO GERAL

No mundo globalizado, onde se busca a qualidade total e a maximização da produtividade, a indústria de produtos naturais não é exceção. As investigações científicas vêm sendo realizadas no sentido de se obterem produtos fitoterápicos que atuem diretamente no tratamento e na prevenção de diversas doenças.

A Organização Mundial de Saúde reconhece a eficácia terapêutica e segurança no tratamento de doenças utilizando plantas medicinais usadas por este largo segmento da população mundial e vem incentivando esta prática como forma adequada para cuidados primários à saúde (MATOS, 1998).

As plantas constituem uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas e, portanto, devem ser consideradas como matéria-prima, como ponto de partida para a descoberta de novas moléculas e para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SIMÕES *et al.*, 2001).

O atual valor medicinal de muitas espécies vegetais deve-se em parte à divulgação das vantagens da fitoterapia e, principalmente, à constante elevação de preços dos medicamentos industrializados (AZEVEDO, 2006).

Estudos efetuados na África vêm apontando para a virtual extinção de muitas espécies em função do excesso de coletas decorrentes da demanda urbana atual pela utilização de plantas medicinais, reforçando a necessidade de se apurar os impactos, em longo prazo, da ação das populações que utilizam a flora local (WILLIAMS *et al.* 2000).

A população brasileira sempre fez uso de plantas medicinais, mas com a expansão de seu uso, entre a população urbana, iniciou-se uma pressão extrativista nos locais onde ainda se encontram populações de espécies com valor de mercado. Por seu baixo custo, as plantas medicinais representam, em muitos casos, à única alternativa possível para esta parcela da população (AZEVEDO, 2006).

A medicina popular, proveniente dos tempos da antiguidade, é prática viva e não se restringe à zona rural ou às comunidades de poder aquisitivo menos privilegiado. É amplo o seu uso também nas regiões urbanas e adjacências, logo este campo é amplo para pesquisa e merece estudo científico aprofundado, uma vez que a nossa flora é de uma riqueza invejável. Porém a cobertura vegetal presente no território nacional vem progressivamente cedendo lugar às crescentes formações urbanas, campos agrícolas e áreas devastadas pela exploração irracional destes recursos naturais. Dessa forma, muitas espécies vegetais e animais, podem ser dizimadas, sem ao menos, conhecermos suas constituições químicas, bem como seus potenciais biológicos.

A humanidade, ao longo do tempo selecionou apenas cerca de 300 plantas para a alimentação e, de um pouco mais de uma centena, obteve princípios ativos puros para o tratamento de doenças. Estes números são bem modestos quando se está diante de um universo de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores (PINTO, *et al.*, 2002).

O gênero *Piper* destaca-se pelo grande interesse no isolamento de substâncias com atividade inseticidas (bioinseticidas), como pode ser comprovada pelas publicações de diversos artigos sobre o tema (SU & HORVAT 1981; PARK *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2002; SCOTT *et al.*, 2008; AUTRAN *et al.*, 2009). No entanto, diversas outras atividades são atribuídas às espécies deste gênero: antifúngicas (TERREAUX *et al.*, 1998; NAVICKIENE *et al.*, 2000; MARQUES *et al.*, 2007; TABOPDA *et al.*, 2008), antiinflamatória (SINGH, *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008^a), enzimática (WU *et al.*, 2002; TSUKAMOTO *et al.*, 2002; TABOPDA *et al.*, 2008), agregação antiplaquetária (CHEN *et al.*, 2007), tripanocida (MARTINS *et al.*, 2003), piscicida (MCFERREN & RODRIGUEZ, 1998), anticancerígena (ZHAO *et al.*, 1992; LIN *et al.*, 2006; EFDI *et al.*, 2007), antioxidante (YAMAGUCHI *et al.*, 2006; TABOPDA *et al.*, 2008), alelopática (CUNICO *et al.*, 2006), herbicida (HUANG *et al.*, 2010), antiofídica (NUNEZ *et al.*, 2005), antimicrobiana (NAIR & BURKE, 1990; CUNICO *et al.*, 2006; GUERRINI *et al.*, 2006), antiplasmodial (SINGH *et al.*, 1976), leishmanicida (HERMOSO *et al.*, 2003; BODIWALA *et al.*, 2007), ansiolítica/antidepressivo (FELIPE *et al.*, 2007), antituberculose (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2004), antidiabética (ARAMBEWELA *et al.*, 2005), antinociceptiva (ZAKARIA *et al.*, 2010), adipogênica (ZHANG *et al.*, 2008) e hepatoprotetora (MATSUDA *et al.*, 2008 e 2009).

Por outro lado, a atividade antioxidante dos óleos voláteis tem sido bastante estudada, e os óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro constituem fontes potenciais de antioxidantes naturais. A região de Jequié, no sudoeste da Bahia, situa-se na zona limítrofe entre a caatinga e a zona da mata. Nesta região ocorre uma grande diversidade de espécies do gênero *Croton*, e com pouco ou nenhum relato de estudos fitoquímicos na literatura.

No levantamento bibliográfico realizado se verificou que para as espécies de *Croton* que ocorrem na Região de Jequié-BA; a espécie *Croton grewoides* Baill (Fig. 1, p.4), existem pouquíssimas informações na literatura relacionadas aos estudos químicos e biológicos. Já para a espécie *Piper klotzschianum* (Fig. 2, p.4) coletada no município de Aracruz-ES; não foram encontradas pesquisas relacionadas ao estudo químico e biológico; o que nos despertou interesse em realizar estas investigações, uma vez que poderemos contribuir com a pesquisa na busca de novas substâncias naturais com atividade antimicrobiana, antioxidante e larvicidas, as quais poderão servir como modelo experimental para o desenvolvimento de novas drogas.

Esta tese está dividida em dois capítulos: o primeiro trata do estudo químico dos constituintes fixos das raízes de *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE) e o segundo do estudo químico das substâncias voláteis de *Piper klotzschianum* kunth (Piperaceae) e *Croton grewoides* baill (Euphobiaceae); e investigação de atividades biológicas.



Figura 1 – Foto da espécie *Croton grewoides* Baill.



Figura 2 – Fotos da espécie *Piper klotzschianum* Kunth.

OBJETIVOS

- Realizar o estudo dos componentes fixos presentes nas raízes de *Piper klotzschianum*;
- Realizar o estudo dos componentes voláteis presentes nos caules, folhas, sementes e raízes de *Piper klotzschianum*; bem como nos caules e folhas de *Croton grewioides*;
- Colaborar com a pesquisa em busca de novos compostos naturais com bioatividade que possam servir de modelos para o desenvolvimento de novas drogas.

Específicos

- Isolar, através de métodos cromatográficos, substâncias provenientes do metabolismo secundário presentes nos extratos hexânico, diclorometânico e etanólico das raízes de *Piper klotzschianum*.
- Elucidar as estruturas das substâncias isoladas usando métodos espectrométricos como EM, RMN de ^1H e de ^{13}C (1D e 2D), além de métodos espectroscópicos como IV e UV; e comparação com dados da literatura;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Croton grewioides* e *Piper klotzschianum*; bem com das substâncias isoladas, contra:
 - um coco Gram-positivo aeróbio, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923);
 - um bacilo Gram-negativo fermentador aeróbio, *Escherichia coli* (ATCC 25922), um bacilo Gram-negativo não fermentador aeróbio *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC28853);
 - uma levedura *Candida albicans* (UMP);
- Avaliar a atividade citotóxica frente à *Artemia salina* e *Aedes aegypty* dos óleos essenciais das duas espécies estudadas; bem como dos extratos brutos de *Piper klotzschianum*.
- Avaliar a atividade antioxidante, dos óleos essenciais das duas espécies estudadas, frente ao DPPH.

CAPÍTULO I

ESTUDO QUÍMICO DOS CONSTITUINTES FIXOS DAS RAÍZES DE *Piper klotzschianum* Kunth (PIPERACEAE)

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1 Família Piperaceae

Piperaceae, pertencente à ordem Piperales, é uma das maiores famílias dentre as Angiospermas basais, somando aproximadamente 3.000 espécies (BORNSTEIN, 1989) de distribuição pantropical e com centro de diversidade nas Américas Central e do Sul, e na Malásia (YUNCKER, 1958). No Novo Mundo esta família apresenta espécies distribuídas do México ao sudeste da Argentina. No Brasil são encontradas aproximadamente 500 espécies (YUNCKER 1972, 1973, 1974). Está amplamente distribuída no território nacional, sendo expressiva sua importância econômica e medicinal. Algumas espécies já fazem parte do mercado mundial e outras são usadas de modo empírico, não raro, empregadas pelas populações para combater diferentes doenças.

A classificação em relação aos gêneros desta família está em constantes mudanças: as primeiras classificações de Piperaceae enfatizando *Piper* reconheciam entre sete e 15 gêneros (KUNTH, 1839; MIQUEL, 1843-1844, citado por JARAMILLO & MANOS 2001). Segundo TEBBS 1993, citado por JARAMILLO & MANOS 2001, cinco destes táxons eram aceitos: *Piper*, *Pothomorphe*, *Macropiper*, *Ottonia* e *Zippelia*.

Entretanto, atualmente a família Piperaceae está dividida em cinco gêneros: *Macropiper*, *Zippelia*, *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* (JARAMILLO *et al.*, 2004), sendo composta por uma grande variedade de espécies e comumente encontrada em diversas localidades do planeta. Dos cinco gêneros hoje considerados para a família, os três últimos ocorrem no Brasil principalmente nas florestas Atlântica e Amazônica e são também encontrados no Parna do Itatiaia (MONTEIRO & GUIMARÃES, 2008).

I.1.2 Gênero *Piper* – Distribuição Fitogeográfica x Função Ecológica

O gênero *Piper* é o maior representante desta família incluindo mais de 1000 espécies, fazendo deste o maior gênero das angiospermas basais. As espécies de *Piper* são de distribuição pantropical, sendo a maior diversidade encontrada no tropico Americano (700), seguida pelo Sul da Ásia (300) (Fig. I.1, p.7), onde é importante economicamente (JARAMILLO & MANOS, 2001).

Grande parte das espécies do gênero *Piper* são plantas pioneiras e estão envolvidas em processos de regeneração e manutenção da diversidade de matas; algumas espécies de *Piper* também crescem em áreas fechadas (THIES & KALKO, 2004) e tendem a apresentar maior abundância em áreas de borda de mata e no interior de clareiras naturais ou causadas por humanos (GREIG, 1993). À associação de espécies *Piper* com morcegos

frugívoros são de grande importância ecológica e têm sido consideradas espécies “chaves” nos processos citados acima (BIZERRIL & RAW, 1998).

I.1.3 – Aspectos Etnobotânicos do Gênero *Piper*

Algumas espécies do gênero *Piper* têm seu emprego na medicina popular, por exemplo: *Piper corcovadensis* é comumente encontrada no norte e nordeste do Brasil, popularmente conhecida como João Brandinho; no Acre, é conhecida como uma das principais espécies vegetais da medicina popular. As folhas são usadas para tratamento de reumatismo na forma de compressa e como chá para gripe e tosse. Já no sudeste suas raízes e ramos são mastigados para aliviar dor de dente, devido à ação anestésica sobre a membrana mucosa da boca (BERG, 1982 citado por FACUNDO *et al.*, 2004^a).

Na China, prescrições recomendam o uso das folhas de *Piper futokasura* no tratamento de arritmias cardíacas e da asma. Na Jamaica dores estomacais são tratadas com uma infusão das folhas de *P. aduncum* e *P. hispidum*. No México e no Brasil usam-se folhas de *P. amalago* para aliviar dores estomacais e no combate a diversas infecções (FACUNDO *et al.*, 2008). Folhas e talos de *P. marginatum* e *P. tuberculatum* são utilizadas, na Paraíba, contra picada de cobra e como sedativos (CHAVES *et al.*, 2006; ARAÚJO-JUNIOR *et al.*, 1999).

Outro exemplo é a utilização de *P. sarmentosum*; suas raízes são utilizadas na Tailândia como carminativo e digestivo. Já na Malásia e Indonésia folhas e raízes desta planta são utilizadas para o tratamento de dor de dente, dermatite nos pés, causado por fungos, tosse e asma (TUNTIWACHWUTTIKUL *et al.*, 2006).

A espécie investigada neste trabalho, *Piper klotzschianum* Kunth, é utilizada por muitas pessoas na cidade de Aracruz, norte do Espírito 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.

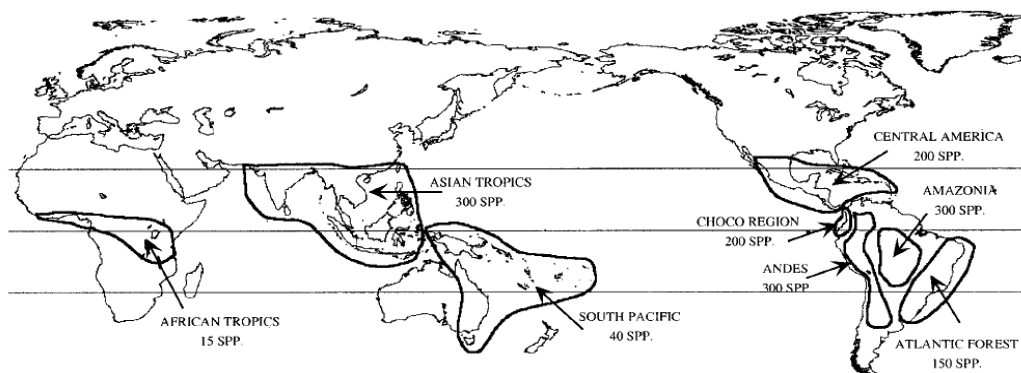


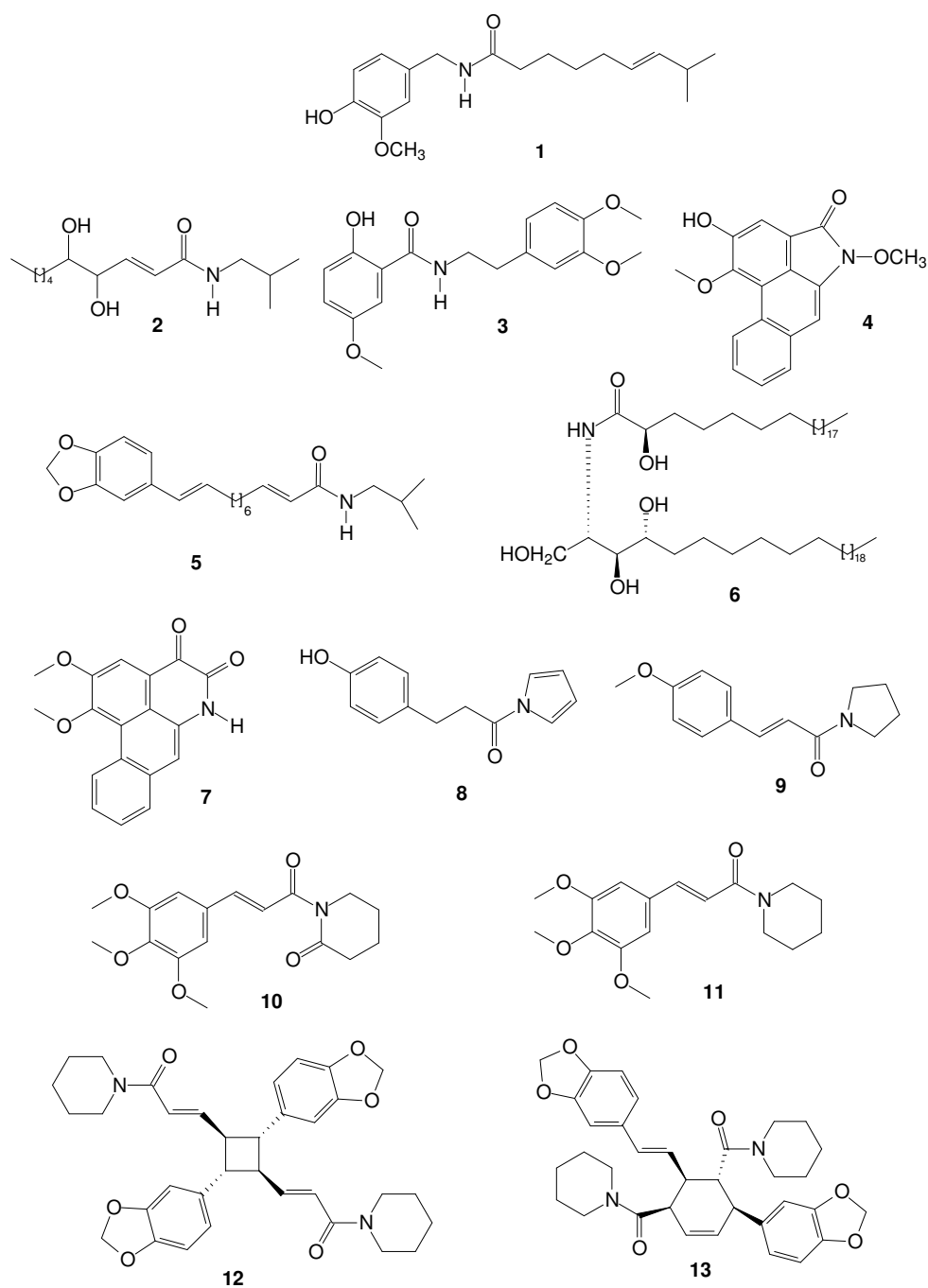
Figura I.1 - Distribuição fitogeográfica do gênero *Piper*. Estimativas do número de espécies para cada um dos centros de diversidade (JARAMILLO & MANOS, 2001).

I.1.4 – Aspectos Fitoquímicos do Gênero *Piper*

A diversidade da constituição química apresentada pelo gênero *Piper* é bastante expressiva, e seus metabólitos secundários elucidados até o momento pertencem às mais variadas classes: neolignananas (BENEVIDES *et al.*, 1999; MAXWELL *et al.*, 1999; KOROISHI *et al.*, 2008), lignanas (ZHAO *et al.*, 1992; PRASAD *et al.*, 1995; RAMOS *et al.*, 2008), lactonas (XUAN *et al.*, 2006), terpenos (PARMAR *et al.*, 1997; MOREIRA *et al.*, 1998^a; SCOTT *et al.*, 2008), fenilalcanóides/benzenóides (PINDER *et al.*, 1967; SANTOS *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2002; LAGO *et al.*, 2009), hidroquinonas (DANELUTTE *et al.*, 2003; YAMAGUCHI *et al.*, 2006) amidas/alcalóides (PARMAR *et al.*, 1997; DEMBITSKY *et al.*, 2008), esteróides (AHMAD *et al.*, 1995; PARMAR *et al.*, 1998; FACUNDO & MORAIS 2003), chalconas/diidrochalconas (HERMOSO *et al.*, 2003; PORTET *et al.*, 2007 e 2008), cromonas (MOREIRA *et al.*, 1998^b; MBAH *et al.*, 2002; SALAZAR *et al.*, 2005; KITAMURA *et al.*, 2006), ácidos graxos (KIJJOA *et al.*, 1989), ceramidas (HUANG *et al.*, 2010) e flavonóides (FACUNDO & FILHO 2004^b; REIGADA *et al.*, 2007; PORTET *et al.*, 2008). Do estudo dos óleos essenciais no gênero *Piper* destacam-se principalmente as classes: fenilpropanóides (ex: *trans*-anetol, elemicina, chavicol), hidrocarbonetos monoterpênicos (ex: α -pineno, mirceno, limoneno), hidrocarbonetos sesquiterpênicos, (ex: α -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno), monoterpemos oxigenados (ex: 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol) e sesquiterpenos oxigenados (espatulenol, *E*-nerolidol, óxido de cariofileno) (EVANS *et al.*, 1984; MUNDINA *et al.*, 2001; VILA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2001; PÉRES *et al.*, 2009).

Diversas espécies de *Piper* apresentam como constituintes principais amidas/alcalóides. A definição de alcalóides vem sofrendo modificações com o passar dos anos. O nome alcalóide foi atribuído pelo farmacêutico alemão Carl Friedrich Wilhelm Meissner em 1819 para se referir a produtos naturais de plantas que demonstrassem propriedades similares às dos álcalis inorgânicos (FRIEDRICH & DOMARUS 1998). No início do século 20 uma importante tentativa de definir alcalóides em termos estruturais foi feita por WINTERSTEIN & TRIER (1910, citado por FATTORUSSO & SCAFATI 2008); em 1963 foi proposta por HEGNAUER uma definição baseada em grupos biogênicos; em 1983 uma adequada definição moderna de alcalóides foi proposta por PELLETIER – alcalóide é um composto contendo átomo de nitrogênio em nível de oxidação negativo (-3 para aminas, amidas, e sais de amônio, e -1 para óxidos de amina) caracterizado por sua limitada distribuição na natureza. Em seu livro publicado em 2008 FATTORUSSO & SCAFATI consideram a capsaicina [1] (p.9) como um alcalóide; Portanto, neste trabalho vamos também considerar todas as piperamidas como alcalóides, uma vez que estão de acordo com a definição moderna apresentada por PELLETIER. Desta forma, definiremos piperamidas como uma classe de metabólitos especiais isoladas de qualquer espécie de

Piper. Além disso, as piperamidas serão divididas em: amidas/alcalóides de cadeia aberta - exemplo: silvanamida [2], alcanidas – taiwanamida A [3], aristolactamas – piperlactama S [4], amidas com grupo metilendioxi – piperchabamida D [5], ceramidas - (2*S*,3*S*,4*R*)-2-*N*-[(2'*R*)-2'-hidroxipentacosanoilamino]-nonacosano-1,3,4-triol [6], 4,5-dioxoporfirinas – norcefadariona B [7], amidas com grupos pirrol – piperlotina E [8], pirrolidina – piperlotina A [9], piperidona - piplatina [10] e piperidina - puberulumina [11], ciclobutanamidas – dipiperamida A [12] e ciclohexanamidas – nigramida B [13].



As piperamidas são normalmente biossintetizadas a partir de derivados do ácido cinâmico e alguns aminoácidos (KATO & FURLAN, 2007) (Fig. I.2, p.10). Em relação à biossíntese das ciclobutanamidas, provavelmente devem ser formadas por reações de cicloadição do tipo Paterno-Buchi [2+2], exemplo: formação do dímero A da pipilatina [14] formado por duas unidades de pipilatina [10] (Fig. I.3, p.11); e no caso das ciclohexanamidas a hipótese biossintética é que elas sejam formadas por reações intermoleculares do tipo Diels-Alder [4+2] (Fig. I.4, p.11) (WEI *et al.*, 2005; RAO *et al.*, 2011).

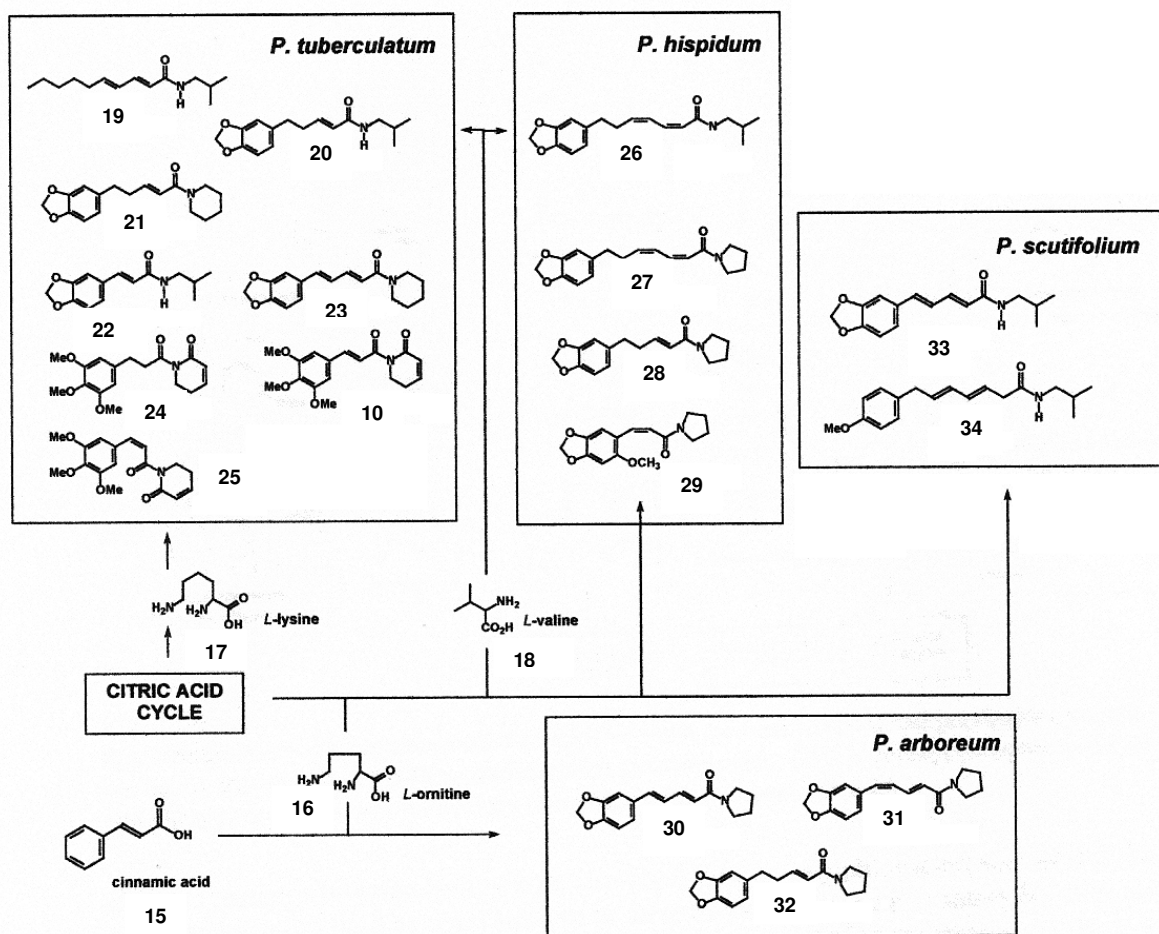


Figura I.2 – Rota biossintética para amidas isoladas de quatro espécies de *Piper* (KATO & FURLAN, 2007).

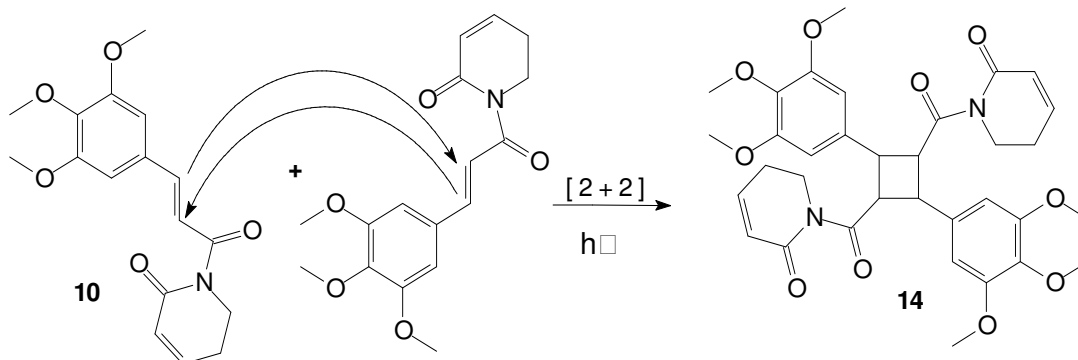


Figura I.3 – Hipótese biossintética para a formação das ciclobutilamidas.

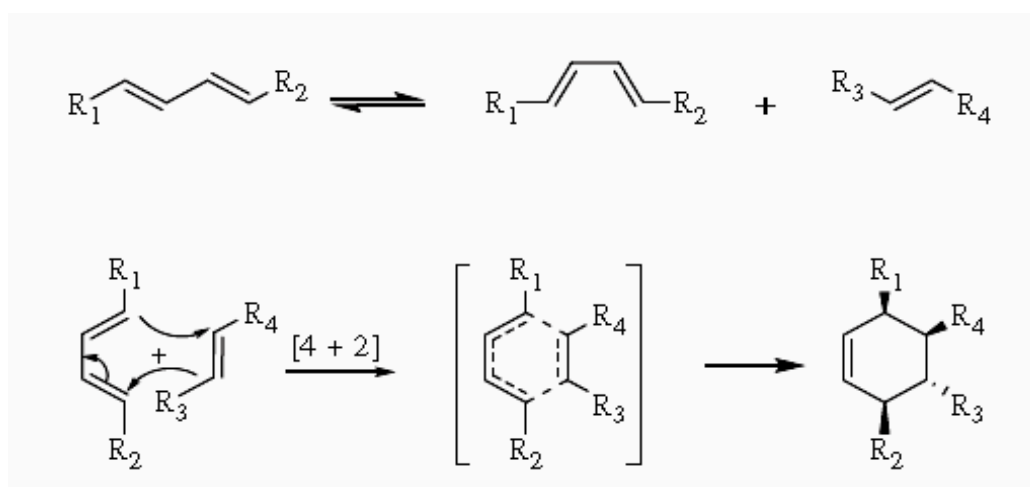


Figura I.4 – Possibilidade de rota biossintética para a formação das ciclohexanamidas.

Para ilustrar a diversidade de metabólitos especiais no gênero *Piper*, o estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Piper corcovadensis* é um bom exemplo; após a extração do óleo essencial por arraste de vapor, levou ao isolamento e identificação de 3',4',5,5',7-pentametoxiflavona [35], 3',4',5,7-tetrametoxiflavona [36] e 5-dihidroxi-3',4',5',7-tetrametoxiflavona [37], bem como o ácido cafeico [38]. Do extrato etanólico das raízes foram isoladas as amidas piperovatina [39] e chingchengenamida [40] (FACUNDO *et al.*, 2004^a). No entanto, a partir da investigação fitoquímica do extrato éter de petróleo das raízes de um espécime coletado na montanha do Corcovado, Rio de Janeiro, Brasil, registrou a presença de cinco amidas, piperovatina [39], piperlonguminina [33], corcovadina [41], isopiperlonguminina [42] e isocorcovadina [43] (Fig. I.5, p.12). A atividade anestésica da planta foi atribuída à presença de piperovatina [39] (COSTA & MORS, 1981).

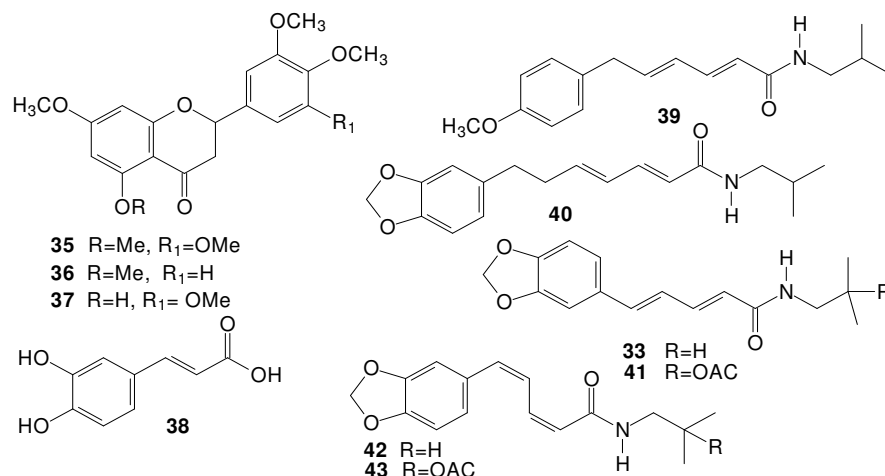


Figura I.5 – Substâncias presentes em *Piper corcovadensis* Miq.

I.1.5 – Atividade Biológica de Piperamidas Oriundas do Gênero *Piper*

O grande número de espécies presentes no gênero *Piper* mostra a importância do mesmo para realização de investigações científicas. Atualmente estas investigações são direcionadas na identificação de princípios ativos, além da descoberta de novas fórmulas estruturais. A descoberta de novas substâncias bioativas pode contribuir para o descobrimento ou desenvolvimento de futuros fármacos com as mais variadas atividades biológicas.

Atualmente no Brasil, a população de vários estados da federação vem sofrendo com o aumento da incidência da Dengue, doença causada pela picada do mosquito *Aedes aegypti*. O controle deste inseto, muitas vezes, se dá através da aplicação contínua de inseticidas sintéticos em locais de água parada; o que pode levar à seleção de espécies resistentes, como já observado no controle de outras espécies de insetos (CHANDRE *et al.*, 1998; CASIDA *et al.*, 2000 e LEE *et al.*, 2001).

Este problema tem realçado a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para o controle seletivo da forma larval do mosquito, e as plantas podem ser uma fonte alternativa de agentes inseticidas, porque elas constituem uma rica fonte de substâncias bioativas; neste sentido, em 2002 foi realizada uma investigação científica por YANG *et al.*, com os frutos de *P. longum*, onde foi isolada a substância piperonalina [44] (p.14) que apresentou atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, comparável ao pirimifosmetilo, um inseticida comumente utilizado. Segundo os autores a piperonalina pode ser útil como um composto bioativo para o desenvolvimento de novos tipos de larvicidas, sendo desta forma uma alternativa para os inseticidas utilizados atualmente.

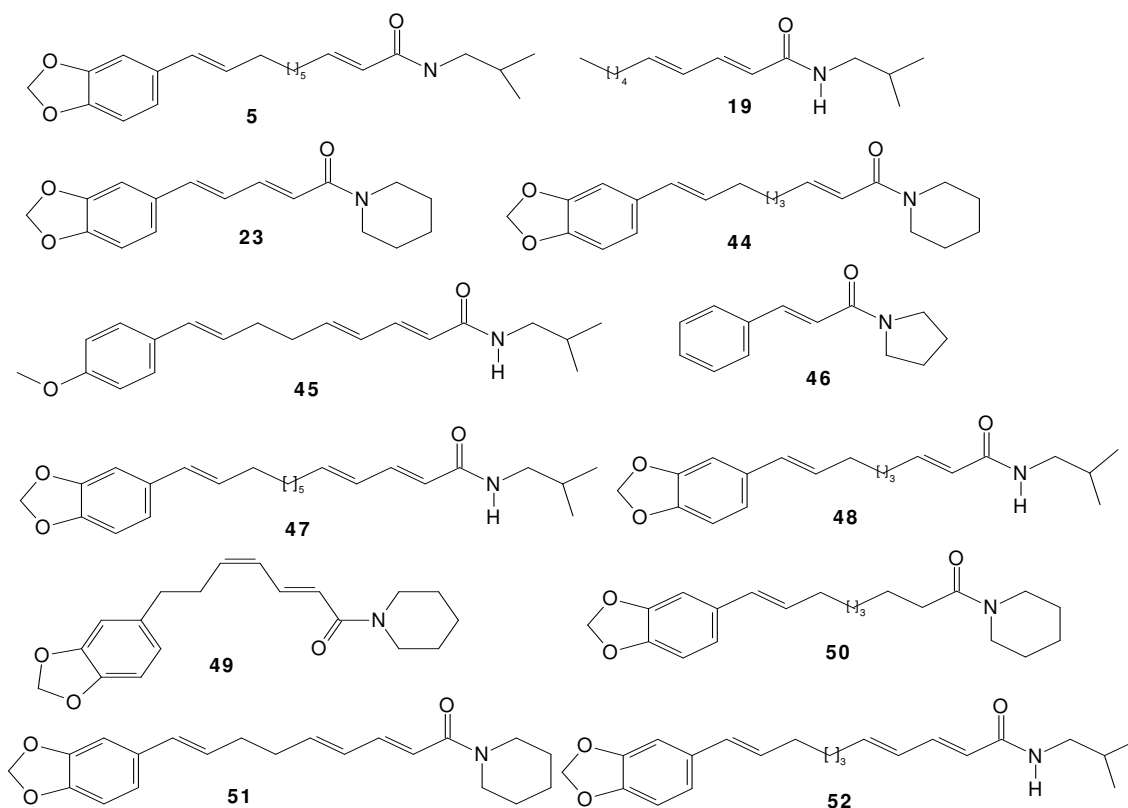
Outra questão de saúde pública mundial é a obesidade a qual vem aumentando de maneira exponencial. Estima-se que, no ano de 2015, 700 milhões de pessoas serão obesas no mundo. Esta patologia aparece como uma das causas principais de diversas doenças crônicas não transmissíveis, favorecendo o aparecimento de algumas potencialmente letais como doenças cardiovasculares e diabetes (FREITAS & NAVARRO 2007). Em 2008, ZHANG *et al.*, testaram a atividade adipogênica de piperamidas isoladas de *P. chaba* e dentre elas, a retrofractamida A [45] apresentou resultado satisfatório; sendo assim, um grande promissor no desenvolvimento de agentes anti-diabéticos.

Outro bom exemplo relacionado à busca de substâncias naturais com atividade biológica foi investigado em *Piper lolot* (LI *et al.*, 2007); neste trabalho, além de relatar piperamidas inéditas, relata a inibição da agregação plaquetária *in vitro*. A agregação plaquetária desempenha um papel central na trombose (formação de coágulo). A presença de um trombo em uma artéria impede o fornecimento de sangue para o coração, sendo assim a causa mais comum de doença coronariana, tais como infarto do miocárdio e angina. Inibidores da agregação plaquetária podem fornecer proteção contra estas doenças e de mortalidade em acidente vascular cerebral. Agentes naturais antitrombóticos que influenciam a função plaquetária são de potencial interesse para a prevenção primária das doenças cardiovasculares (DAVIES & THOMAS 1984, citado por LI *et al.*, em 2007). Entre os compostos testados o *N*-[*trans*-cinamoil]piperolidina [46] foi o mais ativo inibidor da agregação plaquetária com IC₅₀ de 7,3 mg/mL, comparável à da aspirina (IC₅₀ 5,5 mg/mL), um agente anti-agregante utilizado clinicamente.

Outro fato muito interessante observado é a relação estrutura-atividade - SAR (*structure-activity relationship*), apresentada por algumas piperamidas, por exemplo: no estudo realizado por LEE *et al.*, (2008), foi avaliado o potencial de inibição da adesão celular para as amidas guinesina [47], retrofractamida C [48], [(2*E*,4*Z*,8*E*)-*N*-[9-(3',4'-metilenodioxifenil)-2,4,8-nonatrienoil]piperidina [49], piperonalina [44], piperoleina B [50], piperchabamida D [5], pelitorina [19] e diidropiperonalina [51]. As substâncias [19], [47], [49] e [51] possuem grupos dienamidas conjugados, [5], [44] e [48], possuem grupos monoenamidas conjugados e a substância [50] não possui um sistema de amida conjugada. Os resultados desta investigação mostraram que as substâncias [5], [47] e [48] contendo o grupo isobutilamida, apresentaram baixo potencial de inibição da adesão celular; já as substâncias [44], [49], [50], e [51] contendo o grupo piperidina, mostraram potente atividade inibitória, logo esta atividade nas piperamidas testadas foi mais positivamente influenciada pela presença do grupo piperidina que isobutil como substituinte; a substância [19] apresentou moderada atividade. A substância [51] foi que apresentou o melhor potencial de inibição de adesão celular, seguida de [44], [49] e [50] respectivamente. Estes resultados demonstram que a atividade inibitória pode ser afetada pelo sistema dienamida conjugado;

além disso, a configuração *trans* da ligação dupla exerce alguma influencia na atividade, pois ao compararmos à configuração *cis* no composto [49] observamos que ocorre uma diminuição no potencial de inibição.

Park *et al.*, (2002) investigando a atividade larvicida para três espécies de mosquitos (*Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, e *A. togoi*), empregando as substâncias [19], [45], [47], [52] (retrofractamida B) e [23] (piperina). Com exceção da piperina, todas as demais exibiram atividade larvicida contra larvas do terceiro instar. Estes autores sugerem que a relação estrutura atividade do grupo *N*-isobutilamina pode desempenhar um papel crucial na atividade larvicida, mas o grupo metilendioxifenil não parece ser essencial para a toxicidade.



I.2. PARTE EXPERIMENTAL

I.2.1 Materiais e Métodos (Procedimentos Gerais)

1 - Os solventes utilizados no preparo dos extratos, na solubilização das amostras, nas eluições em CCDG, CCDP e CC foram: acetato de etila, hexano, clorofórmio, diclorometano e metanol (grau analítico procedência Quimex e Quemis).

2 - Nos processos de separação por cromatografia em coluna os adsorventes utilizados como fase estacionária foram sílica-gel 60 (0,063-0,200 mm e 0,040-0,063 mm - “sílica Flash”) da Across Co e Sephadex LH-20 da Pharmacia, para procedimentos de permeação em gel.

3 - Nos procedimentos de cromatografia em camada delgada comparativa foram utilizadas placas da Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ (0,25 mm de sílica-gel com indicador de fluorescência UV₂₅₄).

4 - Nas separações por cromatografia em camada delgada preparativa foram utilizadas placas da Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ (1 mm de sílica-gel com indicador de fluorescente UV₂₅₄).

5 - Os métodos de revelação utilizados nas cromatografias em camada delgada consistiram na exposição das placas à radiação, empregando-se, em gabinete apropriado, lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 256 e 366 nm (Spectroline – Model CM-10, *Fluorescence Analysis Cabinet*), vapores de iodo ou reagente de Liebermann-Burchard. Para o preparo deste reagente foram previamente misturados 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético e, posteriormente, essa mistura foi cuidadosamente adicionada à 50 mL de etanol resfriado em banho de gelo.

6 - Os evaporadores rotatórios utilizados para evaporação de solventes sob pressão reduzida foram das marcas BUCHI 461 e IKA LABORTECHNIK HB4 basic, com temperatura em geral entre 35 e 60 °C.

7 - As temperaturas de fusão foram determinadas em um aparelho Microquímica MQAPF-301.

8 - Os espectros no IV foram obtidos em um Espectrofotômetro de IV por Transformada de Fourier, modelo IRAffinity-1, da Shimadzu. Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr, e quando oleosas, como filmes em placa de NaCl.

9 – As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas em dois equipamentos distintos, no Laboratório de Análise e Sínteses de Agroquímicos da UFV/MG e no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química da UFBA/BA. Os equipamentos e condições de análises são descritos a seguir:

9.1. Na UFV-MG: Os cromatogramas das amostras foram obtidos em um equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução (CG-EM) da Shimadzu, com detector seletivo de massas, modelo QP 5050A. A Coluna cromatográfica e condições de análises foram: coluna Elite-5 (5% de fenil, 95% dimetilpolissiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 µm. Fluxo de gás de arraste (He) foi de 1,8 mL.min⁻¹; a temperatura do injetor foi 220 °C; a temperatura da interface foi 240 °C; e a temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, aumentando 3 °C.min⁻¹, até atingir 240 °C, permanecendo constante nesta temperatura por 35 minutos. A razão de *split* 1/5; volume injetado 1 µL de

cada amostra dissolvida em diclorometano, na concentração de 10.000 µg.mL⁻¹. As condições do espectrômetro de massas foram: energia de impacto 70 eV; velocidade de varredura 1000; intervalo de varredura de 0,5 e registro da razão *m/z* de 30,00 a 500,00.

9.2. Na UFBA-BA: Os cromatogramas das amostras foram obtidos em um equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução (CG-EM) da Shimadzu, com detector seletivo de massas, modelo QP 2010. A Coluna cromatográfica e as condições de análises foram: coluna DB-5MS (5%-fenil-95% metilpolisiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 µm. Fluxo de gás de arraste (He) foi de 1,8 mL.min⁻¹; a temperatura do injetor foi 290 °C; a temperatura da interface foi 290 °C; e a temperatura inicial da coluna foi de 100 °C, aumentando 6 °C. min⁻¹, até atingir 285 °C, permanecendo constante nesta temperatura por 28 minutos. A razão de *split* 1/27; volume injetado 1 µL de cada amostra dissolvida em hexano, na concentração de 10.000 µg.mL⁻¹. As condições do espectrômetro de massas foram, energia de impacto 70 eV; velocidade de varredura 1000; intervalo de varredura de 0,5 e registro da razão *m/z* de 30,00 a 600,00.

10 - Os cromatogramas obtidos por inserção direta foram registrados em um cromatógrafo em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução (CG-EM) da Shimadzu CG-2010, com detector seletivo de massas, modelo QP 2010.

11 - Uma mistura com padrões de ésteres metílicos foi adquirido (FAME mix C8-C24 da Supelco Analytical – USA).

12 - Os espectros de massas de baixa e alta resolução foram adquiridos em equipamento Shimadzu LCMS-2010 e Brucker LC-MS-microTOF, respectivamente.

13 - Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Varian GEMINI 2000 e Varian Inova 500.

I.2.2 Coleta do Material Vegetal e Identificação da Espécie

Partes da planta em estudo, *Piper klotzschianum*, tais como folhas, caules, raízes e sementes, foram coletados para o preparo de exsiccatas. A coleta foi realizada em Janeiro de 2007, em Vila do Riacho-Aracruz, ES, sendo suas exsiccatas identificadas pela Profa. Dra. Elzie Flanklim Guimarães e depositadas no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com registro nº 480408, 480409 e 480410.

I.2.3 Preparo dos Extratos

Raízes (1,56 kg) de *Piper klotzschianum* foram cortadas em pequenos pedaços e secas à temperatura ambiente e subsequentemente em estufa com circulação de ar a 40 °C.

Em seguida, triturados em liquidificador industrial até obtenção de um pó finamente granulado. O pó obtido foi submetido à extração a frio, com Hex, DCM e EtOH, respectivamente. Após as extrações, os solventes foram removidos em evaporador rotatório sob pressão reduzida para obtenção dos extratos hexânicos, diclorometânicos e etanólicos. Os extratos das raízes foram denominados: **HJB** (11,7 g), **DJB** (9,1 g) e **EJB** (14,3 g) - extrato hexânico, diclorometânico e etanólico das raízes do João Barandi, respectivamente.

I.2.4 Isolamento dos Constituintes Químicos de *Piper klotzschianum*

I.2.4.1 Fracionamento do Extrato Hexânico das Raízes - HJB

O extrato hexânico (11,7 g) foi incorporado em sílica-gel 60 e submetido à purificação por CC utilizando como fase móvel os solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade (1:0, 9:1, 8:2, 6:4, 1:1; 3:7, 1:9, 0:1). Após comparação por CCDC foram obtidas 11 frações, as quais foram submetidas a sucessivos fracionamentos em CC (Fig. I.6 e I.7, p.24 e 25). Em todas as colunas cromatográficas, a fase móvel iniciou-se com um determinado sistema de eluente, e conforme o seu comportamento cromatográfico mudava-se a fase móvel, aumentando sua polaridade até o término do fracionamento químico. As frações em azul mostradas nos fluxogramas (Fig. I.6 e I.7, p.24 e 25) correspondem às substâncias isoladas e identificadas, ou identificadas em mistura. Para a primeira coluna cromatográfica foram coletados aproximadamente 100 mL de eluente e para as demais 40 mL.

I.2.4.1.1 Purificação da Fração HJB1-6

O material da fração HJB1-6 (0,40 g - Fig. I.6, p.25) foi incorporado em sílica-gel 60 e submetido à purificação por CC sobre sílica-gel 60, utilizando como fase móvel os solventes Hex:AcOEt (6:1) em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 20 subfrações de aproximadamente 40 mL cada, que foram reunidas em 8 subfrações após análise em CCDC. A subfração HJB48-5 (116 mg), eluída com Hex:AcOEt (4:1), foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20, com o sistema eluente CH₂Cl₂:MeOH (1:1) obtendo-se a subfração HJB59-4 (10 mg). Análise de RMN de ¹H, de ¹³C, CG-EM e comparação com dados da literatura permitiram identificar a subfração **HJB59-4** como sendo uma mistura de isobutilamidas alifáticas [63 a 70].

I.2.4.1.2 Purificação da Fração HJB1-7

A fração HJB1-7 (0,32 g) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20, com o sistema eluente CH₂Cl₂:MeOH (1:1); aproximadamente 15 mL foram coletados para cada fração e após análises em CCDC resultaram-se 6 subfrações. A Análise de RMN de ¹H e de ¹³C da subfração HJB52-5 (10 mg) e comparação com dados da literatura permitiram identificar a subfração **HJB52-5** como sendo a piperlonguminina [72]. Já a subfração HJB52-4 (45 mg) foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa utilizando uma placa 20 x 20 cm em sistema eluente DCM:MeOH (99:1), eluída 3x consecutivamente; deste processo resultou 5 novas subfrações: HJB55-1; HJB55-2; HJB55-3; HJB55-4 e HJB55-5. A subfração HJB55-2 (16 mg) apresentou-se como um sólido, sendo recristalizado em DCM:MeOH (98:2). Após recristalização foi obtida duas subfrações (HJB55-2-7 e HJB55-2-9); estas foram analisadas por métodos espectrométricos permitindo verificar a presença na subfração **HJB55-2-9** (9 mg) das piperamidas isopiperlonguminina [75] e hoffmannseggiamida A [76]; e das cromanonas (2*S*,3*S*)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [77] e (2*S*,3*R*)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [78] na subfração **HJB55-2-7** (7 mg).

I.2.4.1.3 Purificação da Fração HJB1-9

Esta fração (282 mg) foi submetida a CC sobre sílica-gel 60 e fase móvel Hex:éter etílico (3:1) em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 9 frações de aproximadamente 30 mL cada, que foram reunidas em 6 subfrações após análise em CCDC; sendo as frações **HJB29-4** (39 mg) eluída com Hex:éter etílico (1:1) e **HJB29-5** (148 mg), eluída com Hex:éter etílico (1:2) identificadas através do espectro de RMN de ¹H como sendo respectivamente as piperamidas piperovatina [71] e tetrahidropiperlonguminina [73].

I.2.4.1.4 Purificação da Fração HJB4-2

A fração HJB4-2 (410 mg - Fig. I.6, p.25) por apresentar-se como um sólido branco de aparência amorfa foi recristalizado em Hex:éter etílico (4/1) resultando 98 mg de um sólido branco que após aquisição de dados espectroscópicos e espectrométricos foi caracterizado sendo [60]. A parte sobrenadante foi concentrada e em seguida submetida à cromatografia em coluna, utilizando-se como fase estacionária sílica "Flash", com o sistema eluente Hex:AcOEt (1:0) em gradiente crescente de polaridade; foram coletados aproximadamente 30 mL para cada fração que após análises em CCDC resultaram-se 4 subfrações: HJB36-1; HJB36-2; HJB36-3 e HJB36-4. A subfração HJB36-1 (250 mg), eluída com Hex:AcOEt (9:1)

foi submetida à CC em fase estacionária Sephadex LH-20, com o sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1), sendo coletadas frações de 10 mL que, após análises em CCDC, foram reagrupadas em 6 subfrações: HJB37-1; HJB37-2; HJB37-3; HJB37-4; HJB37-5 e HJB37-6. A subfração **HJB 37-5** (70 mg) foi identificado após RMN de ^1H como sendo a cromanona [60]. A subfração HJB37-4 (101 mg) foi novamente submetida ao processo cromatográfico em coluna, utilizando como fase estacionária sílica “Flash”, com o sistema eluente Hex:AcOEt (15:1). Deste procedimento foi obtido a subfração **HJB38-2** (54 mg) identificada como sendo a substância [60] e a subfração **HJB38-3** eluída com Hex:AcOEt (12:1) como sendo o metileugenol [58].

1.2.4.2 Fracionamento do Extrato Diclorometânico das Raízes - DJB

A fração DJB (9,1 g) foi incorporado em sílica-gel 60 e submetido à purificação por CC empregando-se como fase estacionária sílica-gel 60, utilizando como fase móvel os solventes Hex:AcOEt:MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 52 frações de aproximadamente 60 mL cada, que foram reunidas em 26 subfrações após análise em CCDC (Tab. I.1, p.23). A fração **DJB1-15** (198 mg) por apresentar cristais foi identificada após análise de RMN de ^1H , de ^{13}C e comparação com dados da fração HJB5-5 como sendo a substância [71].

1.2.4.2.1 Purificação da Fração DJB1-5

A fração DJB1-5 (220 mg) foi submetida a CC sobre sílica “Flash” e como sistema eluente Hex:AcOEt (9:1) em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 11 frações de aproximadamente 30 mL cada, que foram reunidas em 7 subfrações após análise em CCDC. Pela análise de RMN de ^1H da subfração **DJB9-2** (56 mg) eluída em Hex:AcOEt (8:1) foi possível constatar como sendo a isoasarona [59]. Já a subfração **DJB9-4** (18 mg) eluída em Hex:AcOEt (8:2) após se submetida a experimentos uni e bidimensionais de RMN, análises em CG-EM e EMAR foi possível propor a existência da substância ciclopropil (4,5-metilenodioxo-2-metoxifenil)cetona [62], inédita na literatura.

1.2.4.2.2 Purificação das Frações DJB1-7 e DJB1-8

O material da fração DJB1-7 (100 mg) foi submetida à CC em fase estacionária Sephadex LH-20, com o sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1), sendo coletadas frações de 10 mL que, após análises em CCDC, foram reagrupadas em 5 subfrações. Após análises de

RMN de ^1H das subfrações **DJB13-3** (21 mg) e **DJB13-4** (26 mg), estas foram identificadas como sendo mistura respectivamente das substâncias [53] + [54] e [62].

Já a fração DJB1-8 (312 mg) foi incorporada em sílica-gel 60 e submetido à CC sobre sílica-gel 60 e fase móvel Hex:AcOEt (9:1) em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 12 frações de aproximadamente 40 mL cada, que foram reunidas em 7 subfrações após análise em CCDC. A subfração **DJB3-3** (40 mg) eluída no sistema Hex:AcOEt (8:2) foi identificada após análise de RMN de ^1H como sendo a substância [62].

1.2.4.2.3 Purificação da Fração DJB1-14

A fração DJB1-14 (99 mg) foi submetida à CC com fase estacionária “sílica Flash”, e como fase móvel Hex:AcOEt (2:1) em gradiente crescente de polaridade; aproximadamente 40 mL de eluente foram coletados para cada fração. Após análise da fração **DJB8-4** (55 mg) eluída em Hex:AcOEt (1:1) por RMN de ^1H , pode-se constatar ser uma mistura das substâncias [71] e [73]. A fração **DJB8-2** (12 mg), eluída em Hex:AcOEt (2:1), foi identificada através de dados espectroscópicos e espectrométricos como sendo uma mistura dos ácidos *trans*-feruloiloxidocosanóico [79], tetracosanóico [80] e hexacosanóico [81].

1.2.4.2.2 Purificação da Fração DJB1-17

A fração DJB1-17 (0,831 g) foi incorporado em sílica-gel 60 e submetido à CC empregando-se como fase estacionária sílica-gel 60, e fase móvel o sistema CHCl_3 :MeOH (99:1) em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 11 subfrações com aproximadamente 40 mL cada, que após comparação por CCDC foram reagrupadas em 6 subfrações. A subfração DJB4-3 (432 mg) eluída em CHCl_3 :MeOH (9:1) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20, com o sistema eluente CH_2Cl_2 :MeOH (1:1); sendo coletada frações de 10 mL que, após análises em CCDC, foram reagrupadas em 5 subfrações: DJB5-1, DJB5-2, DJB5-3; DJB5-4 e DJB5-5. A subfração DJB5-3 (175 mg) foi submetida ao mesmo procedimento utilizado anteriormente, resultando a subfração **DJB15-4** (96 mg) que após análise de RMN de ^1H foi identificada como uma mistura de [71] e [73].

A subfração DJB5-5 (238 mg) foi submetida à fracionamento em Sephadex LH-20, utilizando metanol como sistema eluente; a subfração DJB31-4 (45 mg) após análise de RMN de ^1H , de ^{13}C , CG-EM e comparação com dados da literatura permitiram identificar a subfração **DJB31-4** (45 mg) como sendo uma mistura das piperamidas piperovatina [71], piperlonguminina [72], tetrahidropiperlonguminina [73] e 4,5- dihidropiperlonguminina [74].

A subfração DJB4-5 (92 mg) eluída em CHCl_3 :MeOH (8:2) foi fracionada em sephadex LH-20 no sistema CH_2Cl_2 :MeOH (1:1). Deste fracionamento a subfração **DJB10-3** (59 mg) identificada por comparação com o espectro de RMN de ^1H como sendo a mistura dos ácidos *trans*-feruloiloxidocosanóico [79], tetracosanóico [80] e hexacosanóico [81].

Todas as demais substâncias identificadas na tabela I.1, p.23 foram feitas com base na comparação de espectros de RMN de ^1H .

I.2.4.3 Fracionamento do Extrato Etanólico das Raízes - EJB

O extrato EJB (14,3 g) foi suspenso em Metanol:Água (9:1) e particionado em CHCl_3 (3 x) e em seguida com AcOEt (3 x). Após concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida obteve-se três novos extratos denominados da seguinte forma: **ERC** (5,43 g), **ERAE** (0,61 g) e **ERAQ** (2,3 g) - extrato etanólico/clorofórmico, etanólico/acetato de etila e etanólico/aquoso das raízes do João Barandi, respectivamente. Desses extratos apenas o **ERC** teve seu estudo iniciado.

I.2.4.3.1 Fracionamento do Extrato Etanólico/clorofórmico das Raízes - ERC

Este extrato ERC (5,43 g) foi inicialmente incorporado em sílica-gel 60 e fracionado em CC sobre sílica-gel 60 e fase móvel CHCl_3 :MeOH (1:0) em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 38 frações de aproximadamente 60 mL cada, que após análise em CCDC foram reagrupadas em 15 frações. Dessas foram estudadas as frações ERC1-5 (764 mg), ERC1-7 (120 mg) e ERC1-12 (140 mg).

I.2.4.2.1 Purificação da Fração ERC1-5

A fração ERC1-5 (760 mg) eluída em CHCl_3 :MeOH (8:2) foi submetida à CC empregando-se como fase estacionária “sílica Flash” e como fase móvel o sistema CHCl_3 :MeOH (98:2) em gradiente crescente de polaridade; aproximadamente 40 mL de eluente foram coletados para cada subfração. Este fracionamento resultou após análise em CCDC em 10 subfrações. A subfração ERC2-5 (140 mg) eluída em CHCl_3 :MeOH (9:1) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20, com o sistema eluente CH_2Cl_2 :MeOH (1:1); após análises em CCDC obteve-se 5 subfrações. A subfração **ERC4-1** (15 mg) foi identificada através de seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C como sendo a mistura dos ácidos [79], [80] e [81]. Já a subfração **ERC4-4** (68 mg), após análise de RMN de ^1H e de ^{13}C foi possível identificar a presença das amidas piperovatina [71], piperlonguminina [72], dihidropiperlonguminina [74] e tetrahidropiperlonguminina [73].

I.2.4.2.1 Purificação da Fração ERC1-7

A fração ERC1-7 (120 mg) eluída em CHCl_3 :MeOH (6:4) foi submetida à CC utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20, com o sistema CH_2Cl_2 :MeOH (1:1); foram coletados aproximadamente 10 mL de cada subfração que após análises em CCDC obteve-se 5 subfrações: ERC3-1; ERC3-2; ERC3-3; ERC3-4; e ERC3-5. A subfração ERC3-4 (44 mg) foi refracionada no mesmo sistema anterior, resultando desta forma a subfração **ERC8-4** (12 mg). Análise de RMN de ^1H , de ^{13}C , de CG-EM, do ponto de fusão e comparação com dados da literatura permitiram identificar a subfração **ERC8-4** como sendo o ácido 4-metoxibenzóico [57].

I.2.4.2.1 Purificação da Fração ERC1-12

Esta fração (140 mg) eluída em CHCl_3 :MeOH (1:2) por apresentar aspecto de um sólido pastoso branco foi recristalizada em CHCl_3 :MeOH (2:1), após filtração, resultou uma massa de 90 mg de um sólido branco. Este sólido foi submetido a análises de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT135 e do ponto de fusão. Através da comparação com dados da literatura foi possível identificar a subfração **ERC1-12** como sendo uma mistura dos fitoesteróides: daucosterol (β -sitosterol-3-*O*- β -D-glicosídeo) [55] e estigmasterol-3-*O*- β -D-glicosídeo [56]. O sobrenatante também foi submetido à análise de RMN de ^1H , revelando se tratar da mesma mistura, porém em uma maior proporção do componente [55]; esta subfração foi denominada de **ERC1-12b**.

I.2.5 Análise de Ácidos Graxos e Ésteres de Ácidos Graxos por CG-EM Obtido do Extrato Hexânico

I.2.5.1 Preparo de Ésteres Metílicos a partir de Misturas de Ésteres de Ácidos Graxos e Ácidos Graxos

A fração **HJB15-2** (91 mg) foi caracterizada por seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Fig. I.66a e I.66b, p.109), como uma mistura de ácidos graxos livres e possivelmente uma quantidade muito pequena de ésteres de ácido graxos. Para a obtenção dos ésteres metílicos promoveu-se uma hidrólise alcalina seguida de esterificação, de acordo com o procedimento descrito a seguir: 10 mg da fração foi dissolvida em 1 mL de solução de KOH/MeOH 0,5 M, em um tubo de ensaio. Aqueceu-se o tubo a 100 °C durante cinco minutos; em seguida, adicionam-se 0,4 mL de uma solução de HCl 36% : MeOH (4:1 v/v) e

aqueceu-se por mais cinco minutos mantendo a temperatura utilizada anteriormente. Em seguida, adicionou-se 2 mL de água destilada (JHAM *et al.*, 1982).

Os ésteres metílicos obtidos foram extraídos com hexano (3 x 5 mL), sendo a fase orgânica submetida a secagem com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e em seguida filtrada. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, sendo os ésteres metílicos obtidos redissolvidos em 1 mL de hexano para posterior análise por CG-EM. As condições de análises são descritas no item 9.2, página 16.

I.2.5.2 ANÁLISE em CG-EM dos Ésteres Metílicos

Uma mistura com padrões de ésteres metílicos foi adquirido (FAME mix C8-C24 da Supelco Analytical – USA) e utilizada para identificação dos ésteres presentes na fração **HJB15-2** através da análise em CG-EM. As condições de análises são descritas no item 9.2, página 16.

Tabela I.1 - Frações obtidas do fracionamento em CC do extrato DJB

Código	Frações reunidas	Sistema eluente Hex:AcOEt:MeOH	Massa (g)	Substâncias identificadas
DJB1-1	1 - 2	12:1:0	0,683	[60] e [61]
DJB1-2	3 - 4	10:1:0	0,974	[61]
DJB1-3	5 - 7	9:1:0	0,386	[53], [54] e [62]
DJB1-4	8 - 9	8:2:0	0,120	Não trabalhada
DJB1-5	10 - 12	7:3:0	0,220	[59] e [62]
DJB1-6	14	7:3:0	0,100	Trabalhada
DJB1-7	15 - 17	6:4:0	0,100	[53], [54] e [62]
DJB1-8	18 - 20	6:4:0	0,312	[62]
DJB1-9	21 - 22	1:1:0	0,130	Trabalhada
DJB1-10	23	1:3:0	0,099	Trabalhada
DJB1-11	24 - 25	1:3:0	0,209	Não trabalhada
DJB1-12	26	1:5:0	0,169	Trabalhada
DJB1-13	27 - 28	1:5:0	0,075	Não trabalhada
DJB1-14	29	0:1:0	0,099	[71], [73], [79], [80] e [81]
DJB1-15	30	0:1:0	0,198	[71]
DJB1-16	31 - 32	0:9:1	0,328	Não trabalhada
DJB1-17	33 - 34	0:9:1	0,831	[71], [72], [73], [74], [79], [80] e [81]
DJB1-18	35 - 36	0:9:1	0,227	Não trabalhada
DJB1-19	37	0:7:3	0,133	[73], [79], [80] e [81]
DJB1-20	38 - 39	0:7:3	0,151	Trabalhada
DJB1-21	40 - 41	0:6:4	0,290	[79], [80] e [81]
DJB1-22	42 - 44	0:6:4	0,450	Trabalhada
DJB1-23	45 - 46	0:1:1	0,295	Não trabalhada
DJB1-24	47 - 48	0:1:1	0,353	Trabalhada
DJB1-25	49 - 50	0:0:1	0,068	Trabalhada
DJB1-26	51 - 52	0:0:1	0,568	Não trabalhada

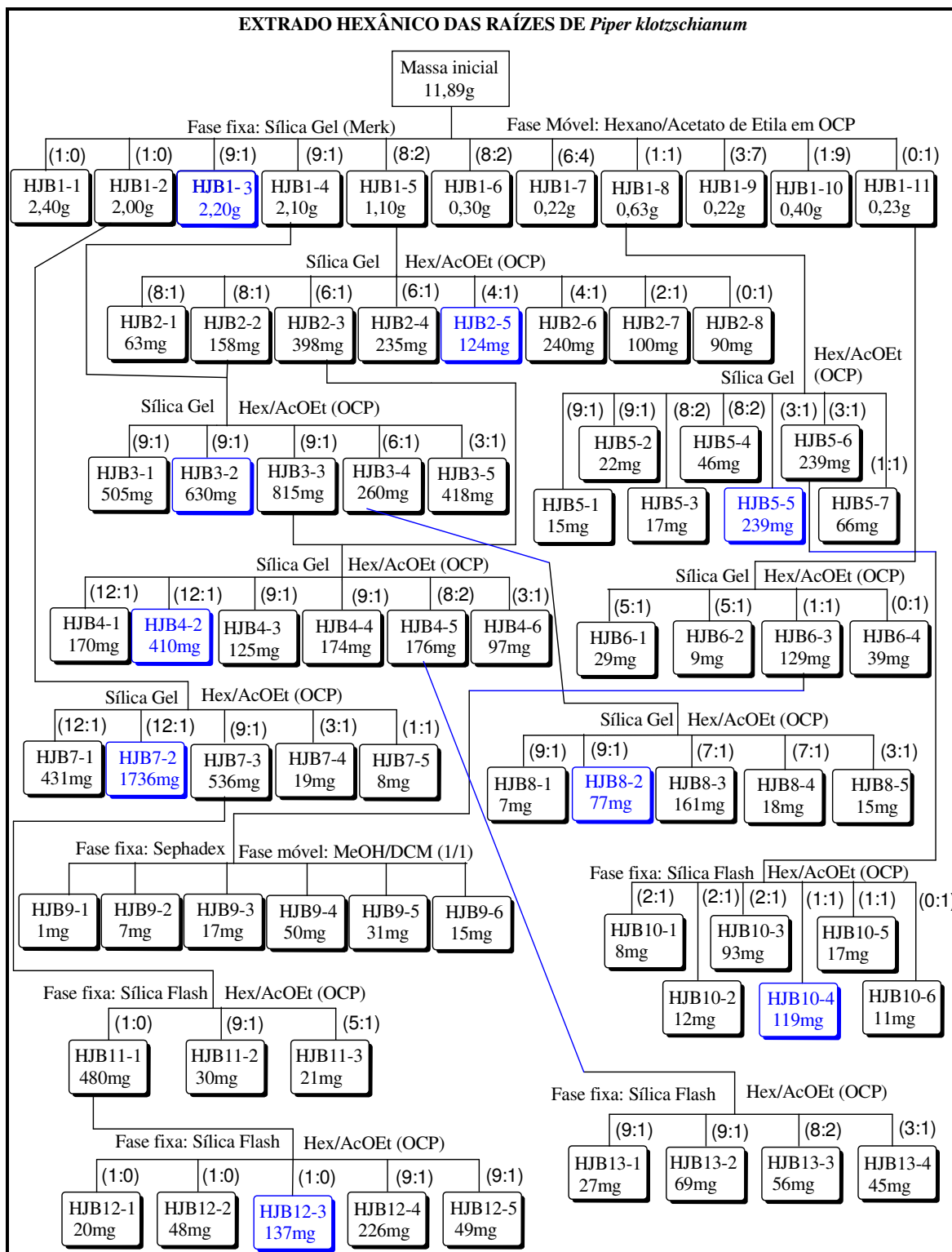


Figura I.6 – Fluxograma simplificado das frações obtidas do fracionamento de **HJB** até a 13ª coluna.

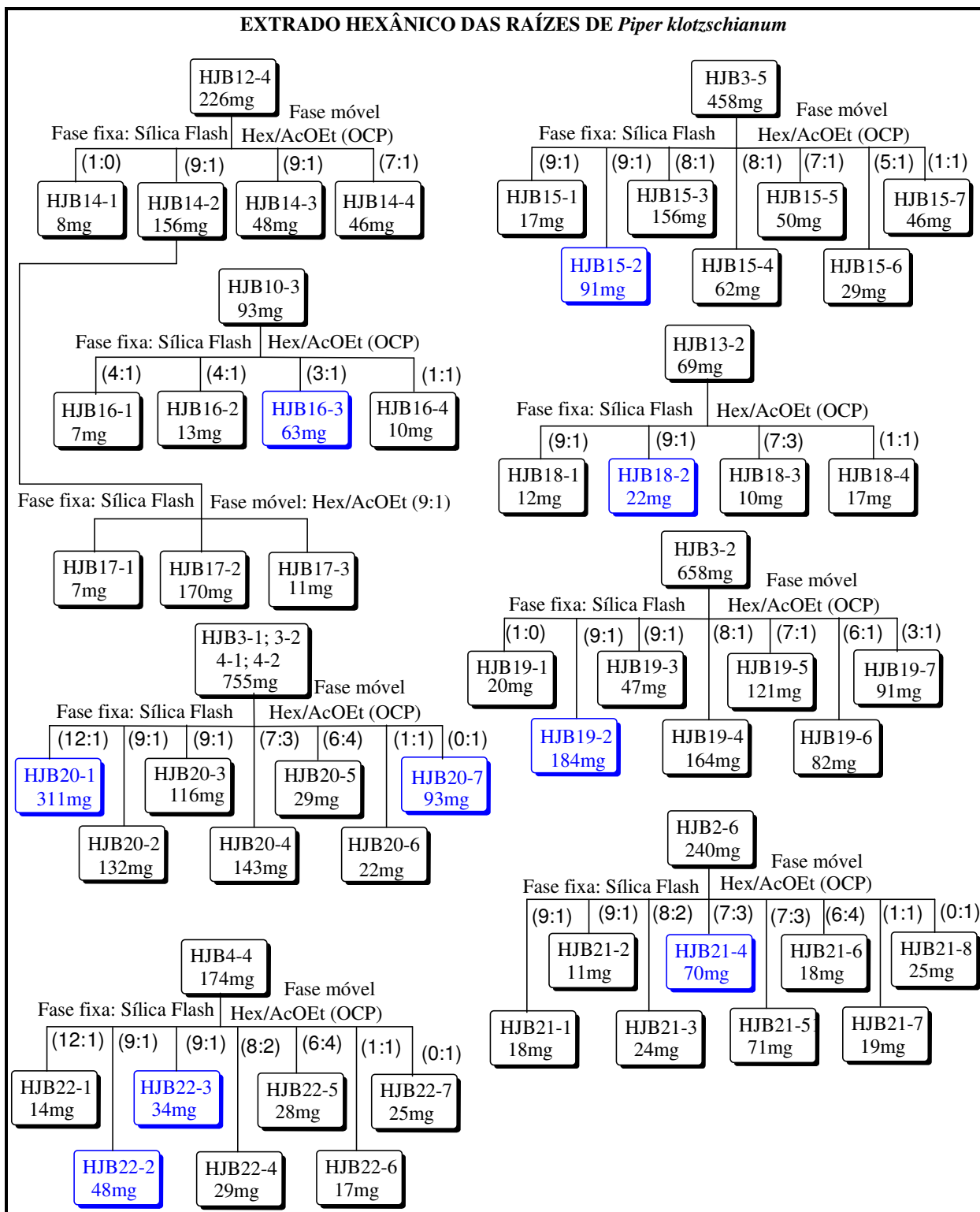


Figura I.7 – Fluxograma simplificado das frações obtidas do fracionamento de HJB até a 22ª coluna.

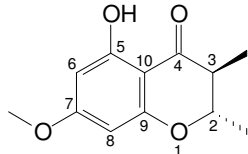
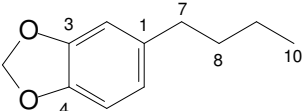
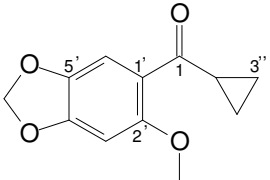
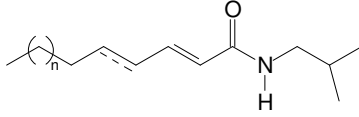
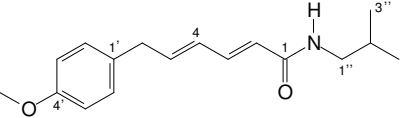
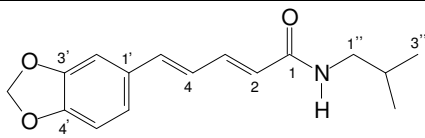
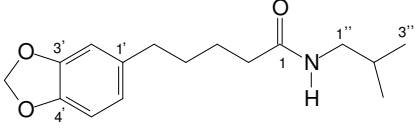
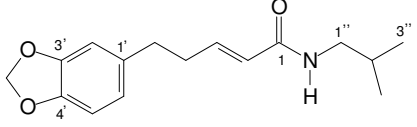
I.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

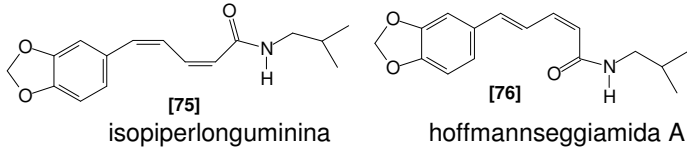
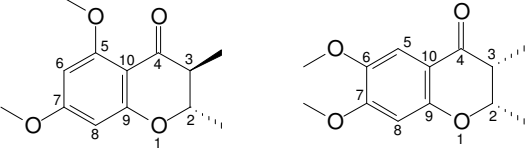
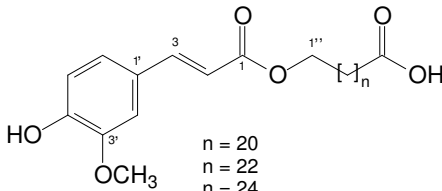
I.3.1 Substâncias Isoladas de *Piper klotzschianum*

Na tabela I.2 estão apresentados os constituintes químicos isolados dos extratos hexânico, diclorometânico e etanólico das raízes de *P. klotzschianum*, bem como os experimentos realizados para a identificação dos mesmos.

Tabela I.2 Constituintes químicos identificados nas raízes de *Piper Klotzschianum*

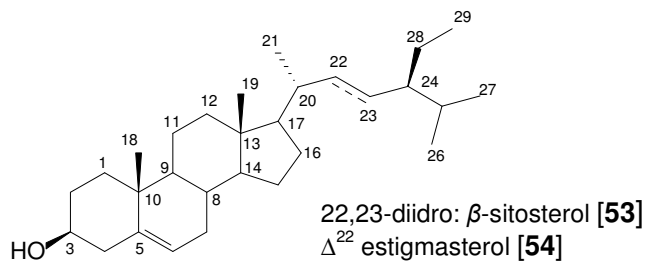
Código	Estrutura Química	Experimentos realizados
HJB2-5; HJB8-2; HJB21-4; DJB13-3	<p>22,23-dihidro:β-sitosterol [53] Δ²² estigmasterol [54]</p>	PF, RMN ¹ H e ¹³ C
ERC1-12; ERC1-12b	<p>22,23-dihidro:β-sitosterol D-glicosilado (daucosterol) [55] Δ²² -estigmasterol D-glicosilado [56]</p>	PF, RMN ¹ H, ¹³ C, DEPT135 e IV
ERC8-4	<p>ácido 4-metoxibenzóico [57]</p>	PF, RMN ¹ H, ¹³ C e CG-EM
HJB38-3	<p>metileugenol [58]</p>	RMN ¹ H, ¹³ C, HMBC e CG-EM
HJB18-2; HJB20-7 HJB22-2; DJB9-2	<p>isoasarona [59]</p>	RMN ¹ H, ¹³ C, DEPT135 e CG-EM

HJB4-2; HJB37-5; HJB38-2	 <p>(2S,3S)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [60]</p>	PF, RMN ¹ H, ¹³ C, HMBC, HMQC, DEPT135, CG-EM, EMAR; [α] _D ²⁰ e IV
HJB1-3; HJB7-2; HJB19-2; HJB12-3; HJB20-1; DJB1-2	 <p>1-butil-3,4- metilendioxibenzeno [61]</p>	RMN ¹ H, ¹³ C, DEPT135 e EM
DJB3-3; DJB9-4; DJB13-4	 <p>1,1-(2'-metoxi-4',5'-metilendioxifenil)-ciclopropilcetona [62]</p>	RMN ¹ H, ¹³ C, HMBC, HMQC, DEPT135, gCOSY, CG-EM, EMAR e IV
HJB59-4	 <p>n = 1 [63] - (2E,4E)-N-isobutilocta-2,4-dienamida n = 3 [64] - (2E,4E)-N-isobutildeca-2,4-dienamida n = 4 [65] - (2E,4E)-N-isobutylundeca-2,4-dienamida n = 5 [66] - (2E,4E)-N-isobutildodeca-2,4-dienamida n = 6 [67] - (2E,4E)-N-isobutiltrideca-2,4-dienamida n = 7 [68] - (2E,4E)-N-isobutiltetradeca-2,4-dienamida n = 9 [69] - (2E,4E)-N-isobutylhexadeca-2,4-dienamida n = 9 [70] - (2E)-N-isobutylhexadeca-2-enamida</p>	RMN ¹ H, ¹³ C e CG- EM
HJB5-5; HJB29-4; DJB1-15	 <p>piperovatina [71]</p>	PF, RMN ¹ H, ¹³ C, HMBC, HMQC, DEPT135, CG-EM, EMAR e IV
HJB52-5	 <p>piperlonguminina [72]</p>	RMN ¹ H, ¹³ C e EM
HJB10-4; HJB16-3; HJB29-5	 <p>tetrahidropiperlonguminina [73]</p>	PF, RMN ¹ H, ¹³ C, DEPT135, CG-EM, EMAR e IV
DJB31-4	 <p>4,5-dihidropiperlonguminina [74]</p>	RMN ¹ H, ¹³ C e EM

HJB55-2-9	 <p>[75] isopiperlonguminina</p> <p>[76] hoffmannseggiamida A</p>	RMN ¹ H, ¹³ C e EM
HJB55-2-7	 <p>(2<i>S</i>,3<i>S</i>)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [77] (2<i>S</i>,3<i>R</i>)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [78]</p>	RMN ¹ H, ¹³ C e EM
DJB8-2; DJB10-4; ERC4-1	 <p>n = 20 n = 22 n = 24</p> <p>ácidos <i>trans</i>-feruloiloxidocosanóico [79], tetracosanóico [80] e hexacosanóico [81]</p>	PF, RMN ¹ H, ¹³ C, HMBC, HMQC, DEPT135, CG-EM, EMAR, e IV

I.3.2 Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas de *P. Klotschianum*

I.3.2.1 Mistura de β -sitosterol [53] e estigmasterol [54]



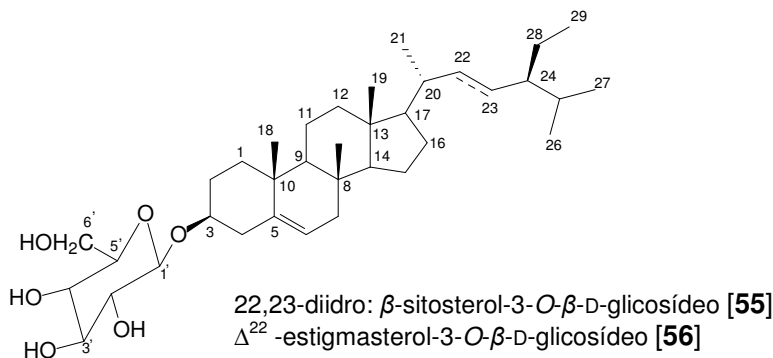
PF = 145,5-148,5 °C

RMN DE ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_H /ppm (mult., J/Hz): 5,16 (dd, 8,4 e 15,0, H₂₂, **54**); 5,02 (dd, 8,4 e 15,0, H₂₃, **54**); 5,35 (d, 5,1, H₆); 3,52 (m, H₃).

RMN DE ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 140,7 (C₅); 138,3 (C₂₂, **54**); 129,3 (C₂₃, **54**); 121,7 (C₆); 71,8 (C₃); 56,9 (C₁₄, **54**); 56,8 (C₁₄, **53**); 56,1 (C₁₇, **53**); 56,0 (C₁₇, **54**); 51,2 (C₂₄, **54**); 50,1 (C₉); 45,8 (C₂₄, **53**); 42,3 (C₁₃); 42,2 (C₄); 40,5 (C₂₀, **54**); 39,8 (C₁₂, **53**); 39,7 (C₁₂, **54**); 37,3 (C₁); 36,5 (C₁₀); 36,1 (C₂₀, **53**); 34,0 (C₂₂, **53**); 31,9 (C₂₅, **54**); 31,9 (C₇ e C₈); 31,6 (C₂); 29,2 (C₂₅, **53**); 28,8 (C₁₆, **54**); 28,2 (C₁₆, **53**); 26,1 (C₂₃, **53**); 25,4 (C₂₈,

54); 24,4 (C15, **54**); 24,3 (C15, **53**); 23,1 (C28, **53**); 21,2 (C21, **54**); 21,1 (C11); 19,8 (C26 e 27, **54**); 19,4 (C19); 19,1 (C21, **53**); 19,0 (C26 e C27, **53**); 18,8 (C21, **53**); 12,2 (C29, **54**); 12,0 (C29, **53**); 11,9 (C18).

I.3.2.2 Mistura de daucosterol (β -sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo) [55] e estigmasterol-3-O- β -D-glicosídeo [56]



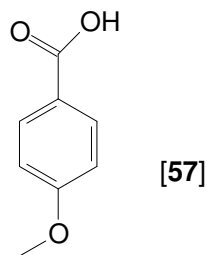
PF = 256 °C (dec.)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3600-3100, 2959, 2933, 2898, 2850, 1655, 1631, 1612, 1540, 1463, 1368, 1074 e 1023.

RMN DE ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 5,33 (d, 4,9, H6); 5,16 - 5,03 (sobreposição do sinal da água sobre os sinais H22 e H23, [56]); 4,55 (d, 2,4, HO-2'); 4,53 (d, 2,4, HO-3'); 4,39 (dd, 5,3, HO-6'); 4,27 (m, HO-4', H5'); 4,05 (d, 8,2, H1', [56]); 4,03 (d, 8,2 H1', [55]); 3,98-3,91 (m, H6'a, H6'b, H3).

RMN DE ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ_{C} (ppm): 140,8 (C5); 138,7 (C22, [56]); 129,4 (C23, [56]); 121,8 (C6); 102,5 (C1'); 78,4 (C5'); 78,1 (C3'); 78,5 (C3); 75,3 (C2'); 71,6 (C4'); 62,8 (C6'); 56,9 (C14, [56]); 56,8 (C14, [55]); 56,2 (C17, [55]); 56,0 (C17, [56]); 51,3 (C9, [56]); 50,3 (C9, [55]); 46,0 (C24); 42,4 (C13, [55]); 42,3 (C13, [56]); 40,7 (C4, [56]); 39,9 (C12, [55]); 39,8 (C12, [56]); 39,3 (C4, [55]); 37,4 (C1); 36,9 (C20); 36,3 (C10, [55]); 34,2 (C22); 32,1 (C8); 32,0 (C7); 30,2 (C2); 29,4 (C25, [55]); 29,2 (C25, [56]); 28,5 (C16); 26,4 (C23, [55]); 25,6 (C23, [56]); 24,4 (C15); 23,3 (C28); 21,4 (C11, [56]); 21,2 (C11, [55]); 19,9 (27, [56]); 19,4 (C26, [55] e C19, [56]); 19,2 (C19 e C27, [55]); 19,1 (C26, [55]); 19,0 (C21, [55]); 18,8 (C21, [56]); 12,5 (C29, [56]); 12,1 (C29, [55]); 11,9 (C18).

I.3.2.3 Ácido 4-metoxibenzóico [57]



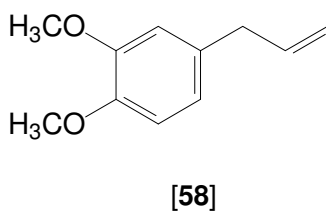
PF = 180-182 °C

RMN DE ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm (mult., J/Hz): 8,07 (d, 9,0, H2 e H6); 6,95 (d, 9,0, H3 e H5); 3,89 (s, OCH₃).

RMN DE ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 171,2 (-COOH); 164,0 (C4); 132,3 (C2 e C6); 122,0 (C1); 113,7 (C3 e C5) e 55,5 (O-CH₃).

EM (CG-EM, IE), m/z (% int. rel.): 152 (73) [M⁺], 135 (100), 107 (25), 92 (23), 77 (40).

I.3.2.4 3,4,-Dimetoxi-1-propenilbenzeno (metileugenol) [58]



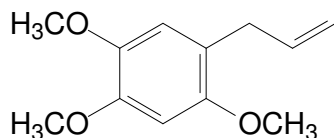
Óleo incolor de aroma agradável

RMN DE ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm (mult., J/Hz): 6,82 (d, 8,4, H5); 6,75 (dd, 8,4 e 1,8, H6); 6,74 (d, 1,8, H2); 5,95 (m, H2'); 5,08 (m, H3'); 3,88 (s, 4-OCH₃); 3,87 (3-OCH₃); 3,34 (d, 6,6, H').

RMN DE ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 148,6 (C4); 147,1 (C3); 137,7 (C2'); 132,7 (C6); 120,4 (C1); 115,6 (C3'); 111,9 (C2); 111,3 (C5); 55,9 (3-OCH₃); 55,8 (4-OCH₃); 39,8 (C1').

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 179 (11) [M^{+1}], 178 (100) [M^{+*}], 163 (30), 147 (33), 91 (28), 77 (16), 41 (12).

I.3.2.5 2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno (isoasarona) [59]



[59]

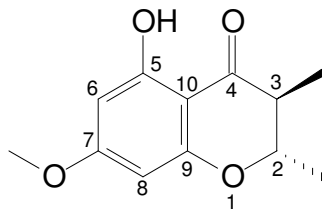
Óleo incolor amarelado de aroma forte

RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 6,70 (s, H6); 6,54 (s, H3); 5,98 (m, H2'); 5,04 (m, H3'); 3,88 (s, 4-OCH₃); 3,83 (5-OCH₃); 3,80 (2-OCH₃); 3,33 (d, 6,6, H1').

RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 151,3 (C2); 147,9 (C4); 143,1 (C5); 137,2 (C2'); 120,1 (C1); 115,1 (C3'); 114,1 (C6); 98,2 (C3); 56,6 (2-OCH₃); 56,5 (5-OCH₃); 56,2 (4-OCH₃); 33,6 (C1').

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 209 (14) [M^{+1}], 208 (100) [M^{+*}], 193 (49), 177 (16), 165 (15), 77 (14).

I.3.2.6 (2S,3S)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [60]



[60]

PF = 106 - 107 °C

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3018, 2986, 2974, 2936, 2912, 1620, 1573, 1508, 1453, 1156, 1130 e 829.

RMN DE ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm (mult., J/Hz): 12,14 (s, -OH); 6,03 (d, 2,1, H6); 5,95 (d, 2,1, H8); 4,18 (dq, 11,1 e 6,3, H2); 3,79 (s, 7-OCH₃); 2,56 (dq, 11,1 e 6,9, H3); 1,49 (d, 6,3, 2-CH₃); 1,21 (d, 6,9, 3-CH₃).

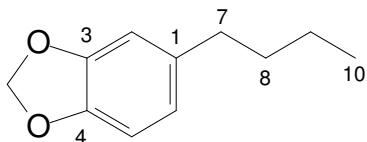
RMN DE ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 198,6 (C4); 167,6 (C7); 164,1 (C5); 162,5 (C9); 102,3 (C10); 94,8 (C6); 93,6 (C8); 78,9 (C2); 55,6 (OCH₃); 45,7 (C3); 19,6 (2-CH₃); 10,2 (3-CH₃).

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 222 (60) [M⁺], 167 (21), 166 (100), 138 (41), 110 (13), 95 (18), 69 (15) e 41 (8).

EMAR-MicroTOF/ESI(-) = 221,0799

Rotação Específica: [α]_D²⁰ = + 142° (c 1,00, CH₃OH).

I.3.2.7 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno [61]



[61]

Óleo incolor de aroma suave

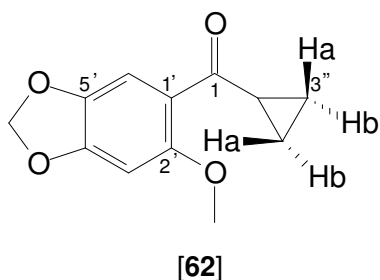
IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}$ /cm⁻¹): 3072, 2956, 2925, 2871, 2855, 1504, 1490, 1465, 1345 e 1042.

RMN DE ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm (mult., J/Hz): 6,73 (d, 8,1, H5); 6,67 (d, 1,8, H2); 6,63 (dd, 8,1 e 1,8, H6); 5,92 (s, OCH₂O); 2,54 (dd, 7,8 e 7,5, H7); 1,57 (m, H8); 1,35 (sext, 8,1 e 7,2, H9); 0,93 (t, 7,2, H10).

RMN DE ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 147,4 (C3); 145,3 (C4); 136,7 (C1); 121,0 (C6); 108,8 (C2); 107,9 (C5); 100,6 (OCH₂O); 35,3 (C7); 33,9 (C8); 22,2 (C9); 13,9 (C10).

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 178 (46) [M⁺], 136 (39), 135 (100), 79 (11), 77 (40), 51 (21), 39 (12).

I.3.2.8 1,1-(2'-metoxi-4',5'-metilenodioxifenil)-ciclopropilcetona [62]



Sólido amarelado pastoso de aroma agradável

UV (MeOH) λ_{max} : 333 nm

IV (KBr, $\bar{\nu}$ cm^{-1}): 3006, 2955, 2917, 2851, 1718, 1654, 1618, 1507, 1260 e 1038.
[62]

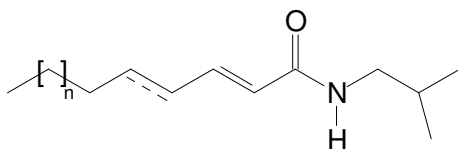
RMN DE ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 7,19 (s, H6'); 6,58 (s, H3'); 5,99 (s, OCH_2O); 3,88 (s, OCH_3); 2,81 (m, H1''); 1,20 (m, Hb2''/3''); 0,93 (m, Ha2''/3'').

RMN DE ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 200,9 (C1); 156,3 (C2'); 151,7 (C4'); 141,6 (C5'); 122,1 (C1''); 109,2 (C6'); 101,8 (OCH_2O); 94,8 (C3'); 56,7 (OCH_3); 21,1 (C2''); 11,8 (C3''/4'').

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 220 (41) [M^+], 179 (100), 192 (9), 164 (15), 69 (16), 41 (26).

EMAR-MicroTOF/ESI(+) = 221,0857

I.3.2.9 Mistura de isobutilamidas alifáticas [63 - 70]



- n = 1 [63] - (2E,4E)-N-isobutilocta-2,4-dienamida
- n = 3 [64] - (2E,4E)-N-isobutildeca-2,4-dienamida
- n = 4 [65] - (2E,4E)-N-isobutilundeca-2,4-dienamida
- n = 5 [66] - (2E,4E)-N-isobuildodeca-2,4-dienamida
- n = 6 [67] - (2E,4E)-N-isobutiltrideca-2,4-dienamida
- n = 7 [68] - (2E,4E)-N-isobuiltetradeca-2,4-dienamida
- n = 9 [69] - (2E,4E)-N-isobuilhexadeca-2,4-dienamida
- n = 9 [70] - (2E)-N-isobuilhexadeca-2-enamida

RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 7,19 (dd, 15,0; 10,0, H3); 6,07 - 6,13 (m - H4/H5); 5,75 (d, 15,0, H2); 5,51 (sl, -NH); 3,17 (dd, 6,8 e 6,2, H1'); 2,14 (m, H6); 1,80 (m, H'); 1,10 - 1,50 (m, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16); 0,93 (d, 6,6, H3'/4'); 0,89 (m, CH_3 terminal).

RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): Ver Tabela I.4 na página 73.

[63] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 195 (100) [$\text{M}^{+\bullet}$], 196 (11) [$\text{M} + 1$], 166 (100), 180 (7), 152 (4), 41 (3).

[64] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 223 (45) [$\text{M}^{+\bullet}$], 208 (3), 195 (11), 151 (91), 96 (63), 81 (100), 43 (65), 41 (94).

[65] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 237 (30) [$\text{M}^{+\bullet}$], 165 (98), 152 (65), 96 (80), 81 (100), 41 (57).

[66] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 251 (29) [$\text{M}^{+\bullet}$], 236 (13), 179 (97), 152 (42), 96 (81), 81 (100), 41 (67).

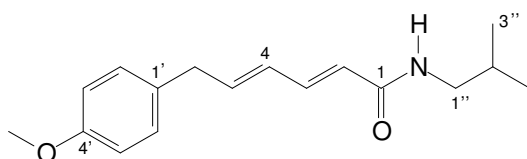
[67] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 265 (32) [$\text{M}^{+\bullet}$], 250 (15), 209(63), 193 (95), 152 (57), 96 (73), 81 (100), 41 (89).

[68] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 279 (33) [$\text{M}^{+\bullet}$], 264 (16), 207 (99), 152 (53), 96 (76), 81 (100), 41 (70).

[69] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 307 (30) [$\text{M}^{+\bullet}$], 292 (18), 235 (84), 152 (64), 96 (64), 81(100), 43 (50), 41 (72).

[70] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 309 (20) [$\text{M}^{+\bullet}$], 294 (21), 254 (39), 237 (100), 126 (54), 81 (27), 55 (70), 41 (53).

I.3.2.10 Piperovatina [71]



[71]

PF = 120,3 - 121 °C

UV (MeOH) λ_{\max} : 266 nm

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3299, 3077, 2959, 2927, 2898, 2875, 1655, 1627, 1612, 1547, 1510, 1466, 1251, 1032 e 993.

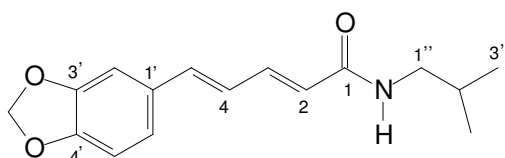
RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 7,14 (dd, 15,0 e 9,8, H3); 7,02 (d, 8,7, H2' e H6'); 6,80 (d, 8,7, H3' e H5'); 6,09 (dd, 15,0 e 9,8, H4); 6,04-6,21 (m, H5); 5,78 (d, 15,0, H2); 3,90 (s, OCH_3); 3,38 (d, 5,7, H6); 3,08 (d, 6,9, H1''); 1,75 (noneto, 6,0, H2''); 0,87 (d, 6,6, H3'' e H4'').

RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 166,2 (C1); 158,0 (C4'); 141,0 (C3); 140,6 (C5); 131,0 (C1'); 129,5 (C2' e C6'); 129,0 (C4); 122,7 (C2); 113,9 (C3' e C5'); 55,2 (OCH_3); 46,9 (C1''); 38,2 (C6); 28,5 (C2''); 20,1 (C3'' e C4'').

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 273 (29) [M^+], 174 (78), 173 (100), 158 (42), 152 (96), 139 (67), 121 (38), 115 (24), 96 (61) e 57 (26).

EMAR-MicroTOF/ESI(-) = 272,1633

I.3.2.11 Piperlonguminina [72]



[72]

PF = 166 - 167 °C

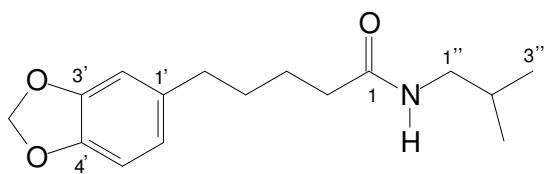
UV (MeOH) λ_{\max} : 337 nm

RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 7,36 (dd, 10,8 e 10,5, H3); 6,98 (d, 1,8, H2'); 6,89 (dd, 7,8 e 1,8, H6'); 6,79 (d, 15,6, H5); 6,78 (d, 7,8, H5'); 6,66 (dd, 15,6 e 10,6, H4); 5,98 (s, OCH_2O); 5,96 (d, 15,0, H2); 5,45 (sl, NH); 3,20 (dd, 6,9, e 6,0, H1''); 1,80 (m, H2''); 0,89 (d, 6,6, H3'' e H4'').

RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 166,1 (C1); 148,2 (C3' e C4'); 141,0 (C3); 138,8 (C5); 130,9 (C1'); 124,6 (C4); 123,1 (C2); 122,6 (C6'); 108,5 (C5'); 105,7 (C2') 101,3 (OCH₂O); 47,0 (C1''); 28,6 (C2''); 20,1 (C3" e C4").

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 273 (57) [M^+], 216 (20), 201 (90), 173 (82), 143 (40), 115 (100), 96 (31), 57 (26).

1.3.2.12 Tetra-hidropiperlonguminine [73]



[73]

T_f = 55,0-56,0 °C (sólido cristalino branco)

UV (MeOH) λ_{max} : 284 nm

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}$ /cm⁻¹): 3298, 3079, 2956, 2927, 2868, 2775, 1642, 1551, 1489, 1441, 1246 e 1039.

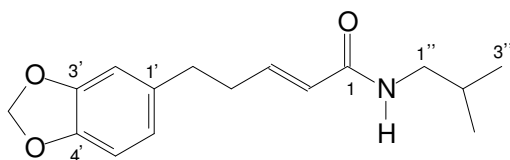
RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 6,71 (d, 7,8, H5'); 6,66 (d, 0,9, H2'); 6,61 (dd, 7,8 e 0,9, H6'); 5,89 (s, OCH₂O); 5,43 (sl, NH); 3,08 (t, 6,3, H1''); 2,56 (t, 7,5, H5); 2,19 (t, 7,2, H2); 1,75 (m, H2''); 1,65 (m, H3 e H4); 0,89 (d, 6,6, H3" e H4").

RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 172,8 (C1); 147,4 (C3'); 145,4 (C4'); 136,0 (C1'); 121,0 (C6'); 108,7 (C2'); 108,0 (C5'); 100,8 (OCH₂O); 46,7 (C1''); 36,6 (C5); 35,3 (C4); 31,3 (C2); 28,4 (C2''); 25,3 (C3); 20,0 (C3" e C4").

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 277 (76) [M^+], 205 (31), 204 (60), 148 (64), 135 (100), 128 (43), 115 (91), 77 (36), 60 (77) e 30 (63).

EMAR-MicroTOF/ESI(-) = 276,1573

I.3.2.13 4,5-Di-hidropiperlonguminina [74]



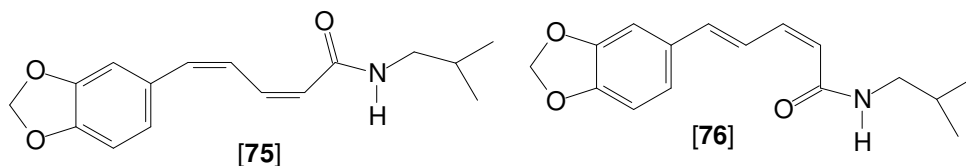
[74]

RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 6,95 – 6,55 (m, H3, H2', H5' e H6'); 5,90 (s, OCH_2O); 5,81 (d, 15,0, H2); 5,78 (sl, NH); 3,14 (m, H1''); 2,66 (dd, 8,1 e 6,9, H5); 2,43 (m, H4); 1,75 (m, H2''); 0,90 (d, 6,6, H3'' e H4'').

RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 165,9 (C1); 147,5 (C4'); 145,7 (C3'); 143,0 (C3); 134,8 (C1'); 124,3 (C6'); 120,9 (C2); 108,4 (C5'); 108,1 (C2'); 100,6 (OCH_2O); 34,0 (C4); 34,3 (C5); 46,8 (C1''); 28,4 (C2''); 20,0 (C3'' e C4'').

EM (CG-EM, IE), m/z (%): 275 (4) [M^+], 203 (2), 175 (5), 174 (5), 135 (100), 105 (3), 77 (13), 57 (2) e 43 (2).

I.3.2.14 Mistura das piperamidas: piperlonguminina [72], isopiperlonguminina [75] e hoffmannseggiamida A [76]

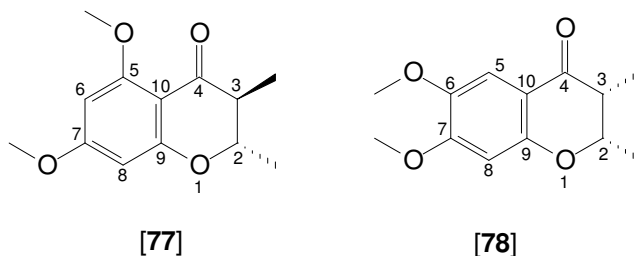


RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz) e **RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ_{C} (ppm): ver Tabela I.7 na página 95

[75] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 273 (59) [M^+], 216 (21), 201 (85), 173 (77), 143 (42), 115 (100), 96 (30), 57 (29).

[76] - EM (CG-EM, IE), m/z (%): 273 (52) [M^+], 216 (20), 201 (91), 173 (90), 143 (42), 115 (100), 96 (32), 57 (25).

I.3.2.15 Mistura das cromanonas (2S,3S)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [77] e (2S,3R)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [78]

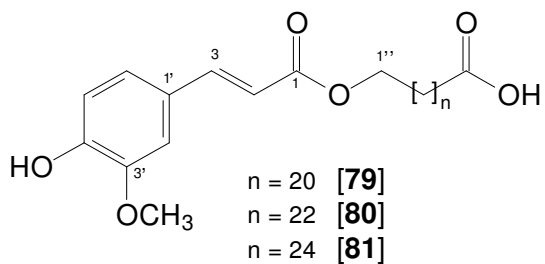


Sólido branco

RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz) e RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): ver Tabela I.8 na página 100

[77] e [78]- EM (CG-EM, IE), m/z (%): 236 (30) [M^{+}], 180 (100), 152 (31), 137 (23), 41 (10).

I.3.2.16 Mistura dos ferulatos ácidos *trans*-feruloiloxidocosanóico [79], *trans*-feruloiloxitetracosanóico [80] e *trans*-feruloiloxihexacosanóico [81]



$T_f = 70 - 73$ °C (sólido amorfo de aparência amarela)

UV (MeOH) λ_{max} : 325 nm

RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (mult., J/Hz): 7,62 (d, 16,0, H3); 7,07 (dd, 8,1, e 1,8, H6'); 7,04 (d, 1,8, H2'); 6,92 (d, 8,1, H5'); 6,30 (d, 16,0, H2); 4,19 (t, 6,6, H1''); 3,93 (s, OCH_3); 2,35 (t, 7,5, H21'' [79], H23'' [80] e H25'' [81]); 1,72 – 1,58 (m, H2'', H20'' [79], H22'' [80] e H24'' [81]); 1,26 (s, H3'' – H19'' [79], H3'' – H21'' [80] e H3'' – H23'' [81]).

RMN DE ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 178,0 (C22" [79], C24" [80] e C26" [81]); 167,4 (C1); 147,9 (C3'); 146,7 (C4'); 144,6 (C3); 127,0 (C1'); 123,0 (C6'); 115,7 (C2); 114,7 (C5'); 109,3 (C2'); 64,6 (C1"); 55,9 (OCH_3); 33,7 (C21" [79], C23" [80] e C25" [81]); 28,76 (C2"), 29,7 – 26,0 (C3" – C19" [79], C3" – C21" [80] e C3" – C23" [81]); e 24,7 (C20" [79], C22" [80] e C24" [81]).

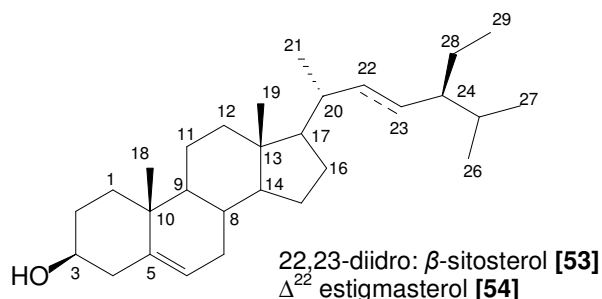
EMAR – MicroTOF/ESI(-) = 531,3694

EMAR – MicroTOF/ESI(-) = 559,4020

EMAR – MicroTOF/ESI(-) = 587,4332

I.3.3 Identificação e Determinação Estrutural

I.3.3.1 Fração HJB2-5: Mistura de β -sitosterol [53] e estigmasterol [54]



A análise do espectro de RMN de hidrogênio dessa fração (Fig I.8a, p.40) permitiu observar a presença de sinais referentes a hidrogênios olefínicos do estigmasterol, H-22 (1H, δ 5,16, dd, $J = 8,4/15,0$ Hz) e H-23 (1H, δ 5,02, dd, $J = 8,4/15,0$ Hz), que associada à integração dos sinais, indicou tratar-se de uma mistura. Outros sinais característicos destes dois esteróides é o H-6 (1H, δ 5,35, d, $J = 5,10$ Hz) e H-3 (1H, δ 3,52, m).

Além dos dados de RMN de ^1H , determinou-se também o ponto de fusão do sólido cristalino branco. O valor encontrado foi de 145,5-148,0 $^{\circ}\text{C}$, valor que está em acordo com o encontrado na literatura (BARCELOS, 1997). Os dados de deslocamentos químicos para RMN de ^{13}C (Fig I.8b, p.40) foram comparados com valores da literatura (PAULA, 1995) e mostraram-se idênticos; destaque para os valores característicos δ 71,8 (C-3, **53 + 54**), 121,7 (C-6, **53 + 54**), 26,1 (C-23, **53**), 129,3 (C-23, **54**), 34,0 (C-22, **53**), 138,3 (C-22, **54**) e 140,7 (C-5, **53 + 54**). Logo, pela autenticidade da amostra foi possível confirmar a presença de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

Por meio da análise do espectro de RMN de ^1H foi possível estimar o teor de cada constituinte na mistura. O cálculo foi baseado na integração dos sinais correspondentes a H-6 (intensidade relativa: 1,88, **53** + **54**) e H-22 e H-23 (intensidade relativa: 2,12, **54**). A metade de 2,12 (1,06), corresponde a 1 próton na molécula do estigmasterol (**54**). Subtraindo este valor de 1,88, temos 0,82 que representa a intensidade relativa de um próton na molécula do β -sitosterol (**53**). As intensidades relativas 1,06 (1H de **54**) e 0,82 (1H de **53**) permitiram deduzir que a mistura [1,88 (**53** e **54**)] contém 43,6 % de **53** e 56,4 % de **54**.

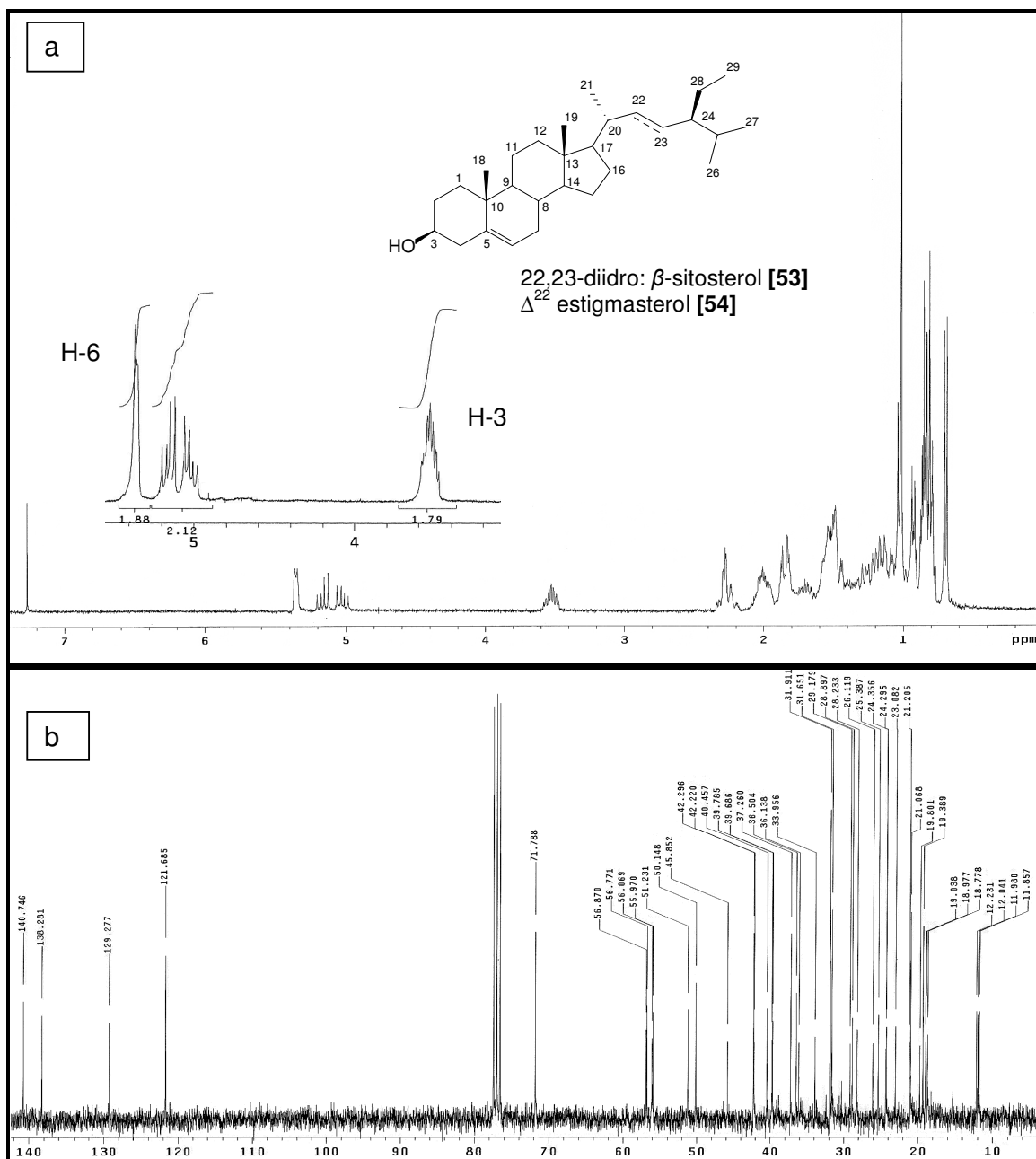
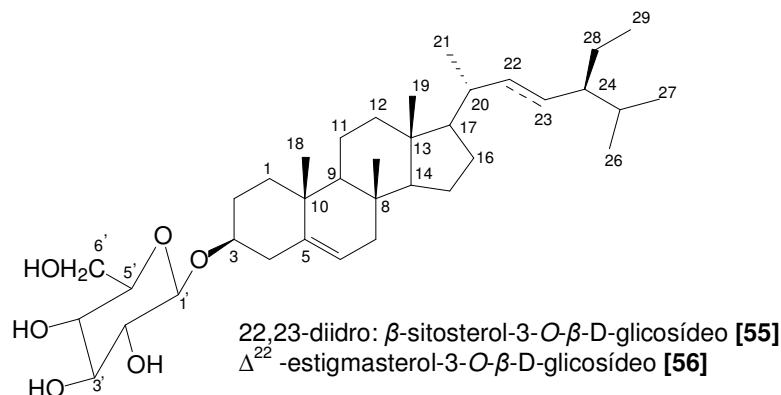


Figura I.8 – Espectro de RMN de ^1H (a) e ^{13}C (b) de HJB2-5 [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm)].

I.3.3.2 Elucidação estrutural da Mistura de daucosterol (β -sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo) [55] e estigmasterol-3-O- β -D-glicosídeo [56]; e Fração ERC22 daucosterol [55]



O espectro no IV da fração **ERC1-12** (Fig. I.9, p.42) apresentou uma banda forte de absorção entre 3600 a 3100 cm^{-1} (ν O-H) e absorções em 2960, 2933 e 2850 cm^{-1} (ν C-H), bem como em 1632 cm^{-1} (ν C=C). Duas fortes absorções em 1074 e 1023 cm^{-1} (ν C-O) foram também observadas.

O espectro de RMN de ^1H (Fig. I.10a, p.43) de **ERC1-12** indicou sinais na região entre δ 0,64 e 0,97 correspondendo a grupos metílicos típicos de fitoesteróides. O padrão de multiplicidade e deslocamentos químicos apresentaram grande similaridade ao da mistura de β -sitosterol e estigmasterol discutido anteriormente. Além disso, foram observados sinais entre δ 3,90 e 4,56 característicos da presença de glicosídeo.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C (Fig. I.11a, p.44) permitiu identificar a presença de sinal de carbono metínico anomérico em 102,5 ppm, além da presença de cinco sinais de carbonos oximetínicos (δ 78,4, 78,1, 75,3, 71,6 e 62,8) característicos de uma unidade de glicose. O sinal em δ 78,5 encontra-se mais desblindado quando comparado com o C-3 da mistura de β -sitosterol e estigmasterol devido à ligação com a unidade osídica. Este valor é compatível com o deslocamento químico do C-3 de esteróide glicosilado. A configuração β da glicose foi estabelecida devido à constante de acoplamento entre H1' e H2' ($J_{1,2} = 8,1$ Hz). Se o valor desta constante estiver na faixa de 6 a 8 Hz trata-se da β glicose, porém se for de 1-4 Hz é referente a α glicose (AGRAWAL 1992).

Através do experimento de DEPT 135 (Fig. I.11b, p.44) foi possível confirmar a presença do carbono metilênico em δ 62,8 (CH_2), dos carbonos oximetínicos, confirmando a presença de uma unidade de glicose, e da natureza olefínica da amostra. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C quando comparados com valores descritos na literatura (IRIBARREN &

POMILIO 1983; PAULA, 1999) permitiram a identificação inequívoca de **ERC1-12** e **ERC1-12b** como sendo a mistura de daucosterol (β -sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo) [55] e estigmasterol-3-O- β -D-glicosídeo [56].

Com objetivo de calcularmos a proporção entre os componentes da mistura foi adquirido espectro de RMN de ^1H da fração ERC1-12b (Fig. I.10b, p.43) em DMSO deuterado. O β -sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo [55] foi encontrado nesta fração na proporção de 83 % e o estigmasterol-3-O- β -D-glicosídeo [56] a 17 %. Para a fração ERC1-12 não foi possível a execução dos cálculos uma vez que o sinal da água está sobrepondo os sinais dos Hidrogênios H22 e H23 do composto [56].

Os fitoesteróides e seus derivados são extensamente aplicados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos devido à suas atividades biológicas especiais e suas propriedades físicas e químicas (LIN *et al.* 2005).

Além disso, vale à pena citar, que o β -sitosterol ajuda na redução do colesterol existente no plasma dos seres humanos (CARERI & ELVIRI, 2001), sendo algumas vezes usado no tratamento da hipercolesterolemia (PRAGER *et al.* 2002). Este fato já está sendo explorado economicamente por empresas do setor alimentício; exemplo é a adição de fitosteróis no leite integral pela Nestlé, o que agrega valor ao produto. Desta forma, torna-se importante o relato de potenciais fontes destes compostos e seus derivados.

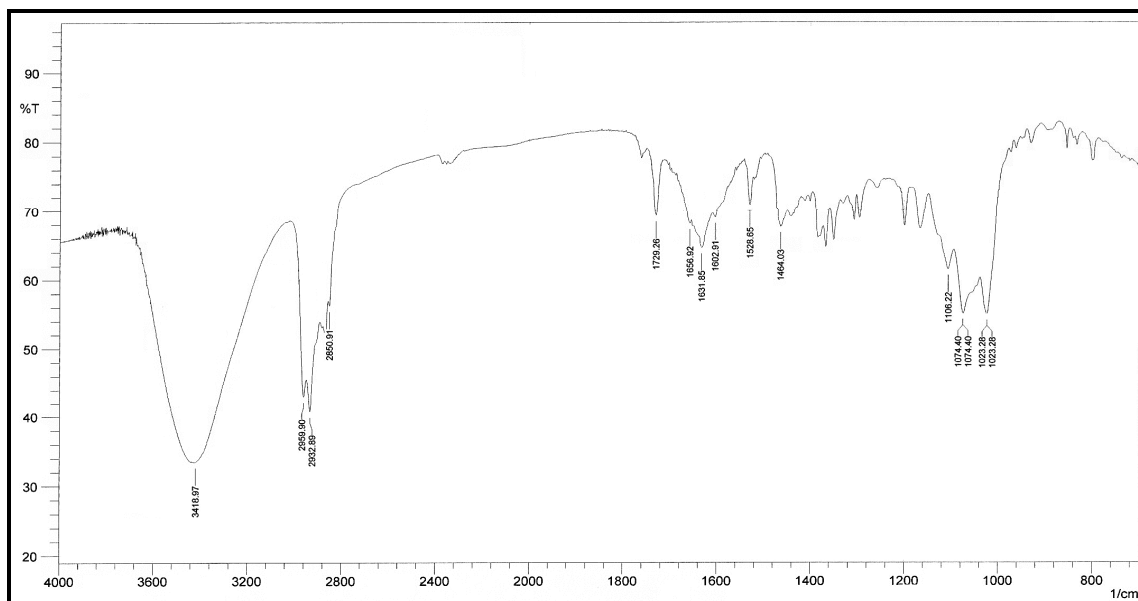


Figura I.9 – Espectro no IV, em pastilha de KBr da fração **ERC1-12**.

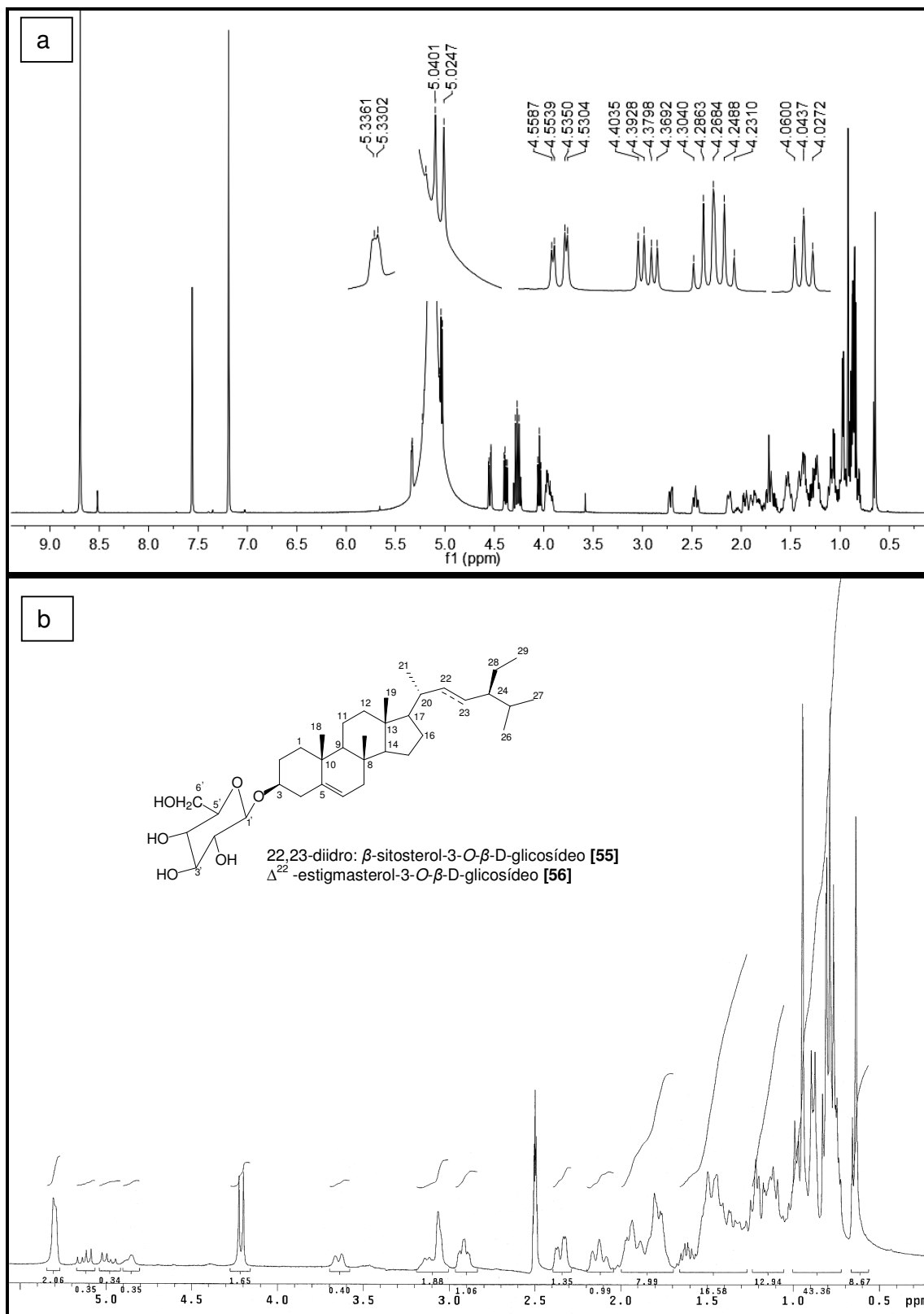


Figura I.10 – Espectro de RMN de ^1H da fração **ERC1-12** [$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ (ppm) – 500 MHz] (a); e RMN de ^1H de **ERC1-12b** [DMSO, δ (ppm) – 300 MHz] (b).

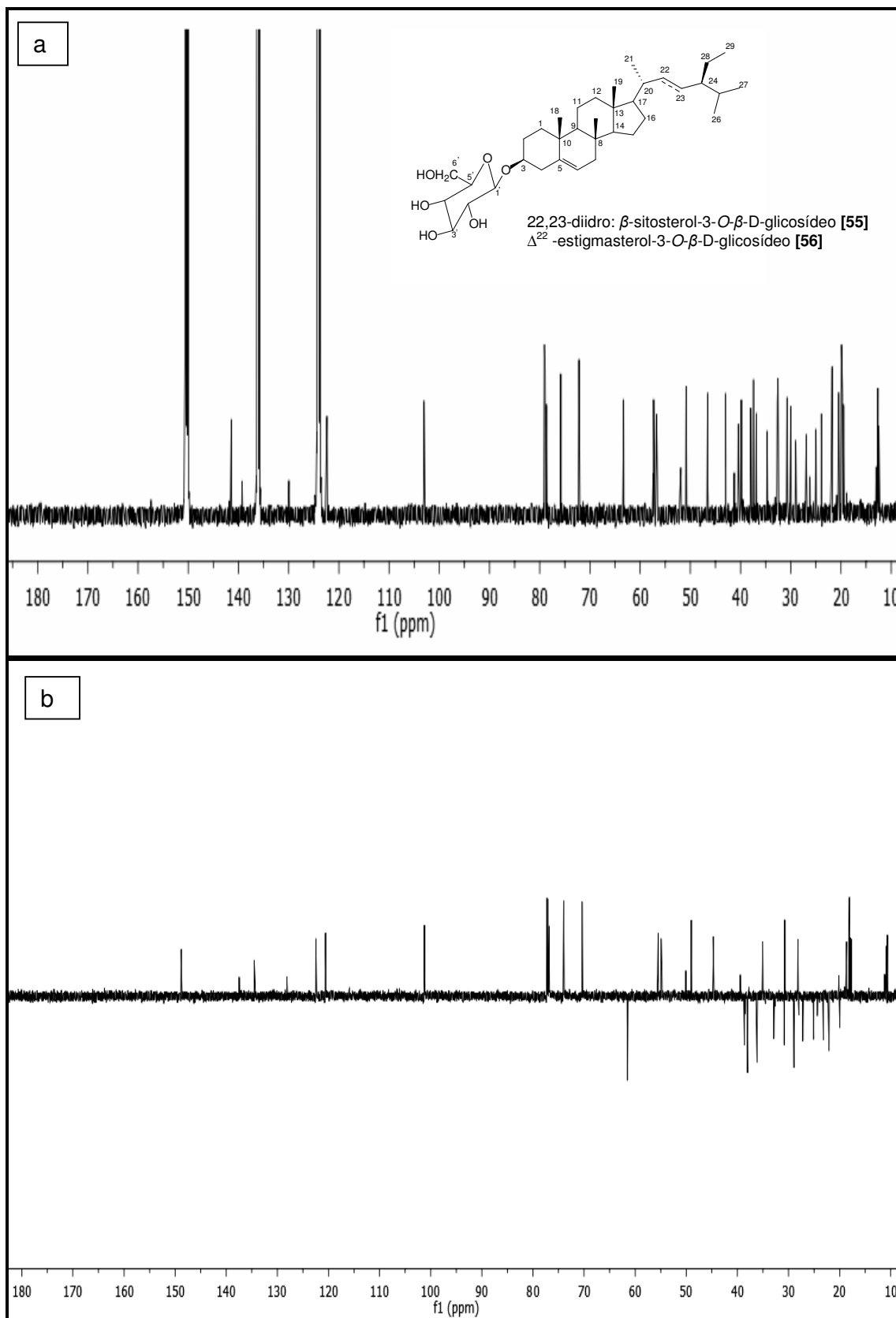
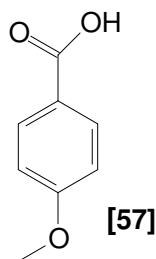


Figura I.11 – Espectro de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) de **ERC1-12** [$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ (ppm) – 125 MHz].

I.3.3.3 Elucidação estrutural do ácido 4-metoxibenzóico [57]



Esta substância (12 mg) mostrou-se como um sólido cristalino incolor e, o espectro de RMN ^1H (Figura I.12a, p.46) registrou dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ 8,07 (d, J = 9,0 Hz) e em 6,95 (d, J = 9,0 Hz); além da presença de uma metoxila em δ 3,89. Pela integração dos sinais fica evidente que os hidrogênios aromáticos pertencem a um sistema AA'BB', sugerindo tratar-se de um anel *para*-disubstituído. No espectro de massas utilizando impacto de elétrons (Figura I.13, p.46) foi possível observar a presença do íon molecular em m/z 152, corroborando com a fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$. Comparado este espectro de massas com os existentes no banco de dados da biblioteca Wiley 7, pode constatar 91 % de similaridade com indicativo da existência do ácido 4-metoxibenzóico.

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura I.12b, p.46) e comparação com dados existentes na literatura (KOYAMA *et al.*, 2000) foi possível comprovar a estrutura de [57] e fazer suas atribuições dos dados de RMN (item I.3.2.3, p.30).

O ácido 4-metoxibenzóico está presente como componente do metabolismo de plantas e relatado numa grande variedade de famílias tal como Leguminosae (MARQUES *et al.*, 1998). No gênero *Piper* foi relatado em *P. philippinum* (CHEN *et al.*, 2007), *P. methysticum* (ACHENBACH & KARL 1971) e agora em *P. klotzschianum*. É também encontrado em alguns chás, como no chá de camomila comum – *Chamomilla recutita* (<http://www.plantasquecuram.com.br/ervas/camomila-comun.html>). Apresenta propriedades anti-sépticas e também é utilizado como repelente e ovicida de insetos. É largamente utilizado em reações químicas como intermediários na fabricação de tinturas, perfumes e produtos agroquímicos (<http://chemicalland21.com/specialtychem/finechem/p-anisic%20acid.htm>).

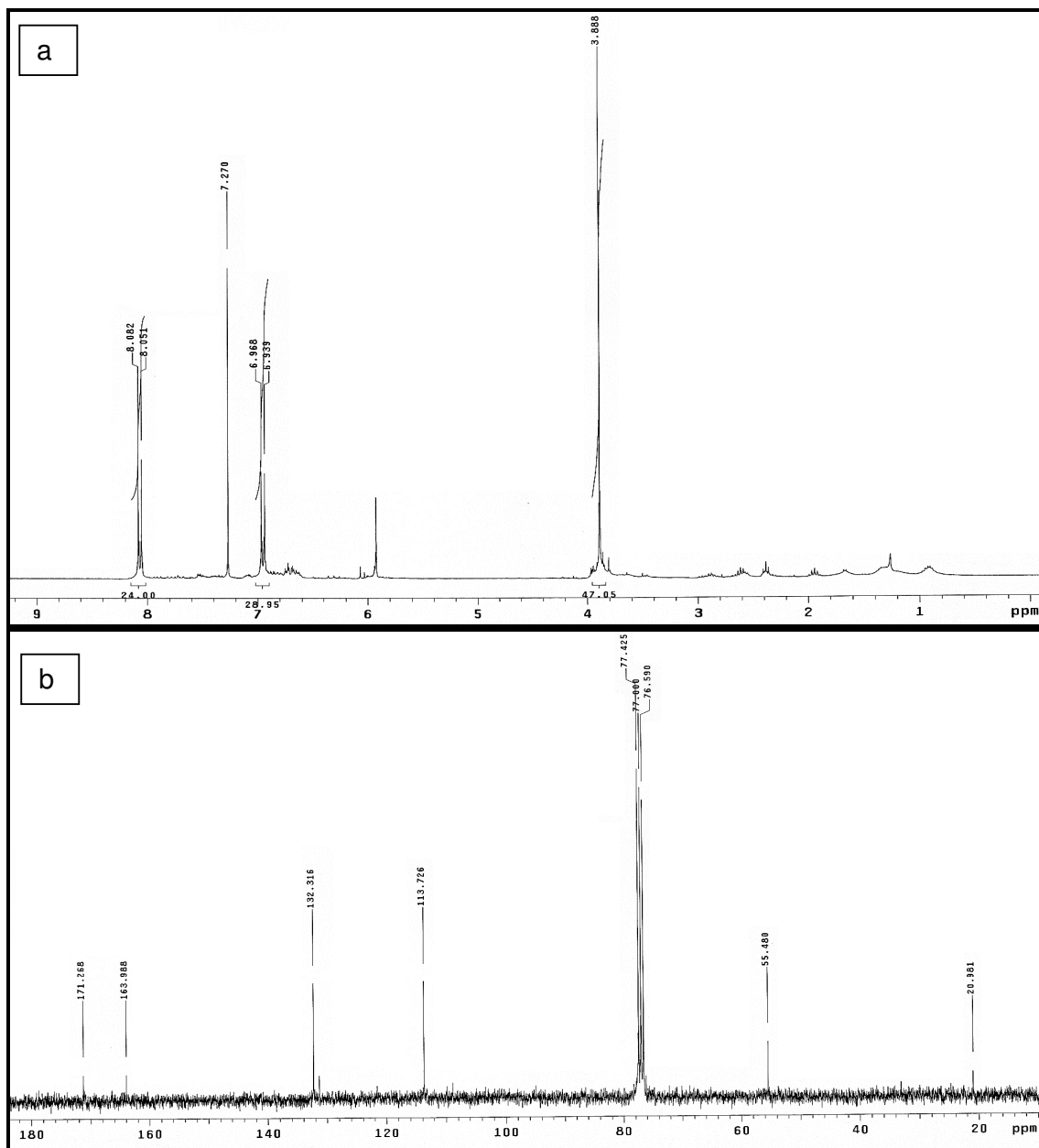


Figura I.12 – Espectro de RMN de ^1H (a) e ^{13}C (b) do composto [57] [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm)].

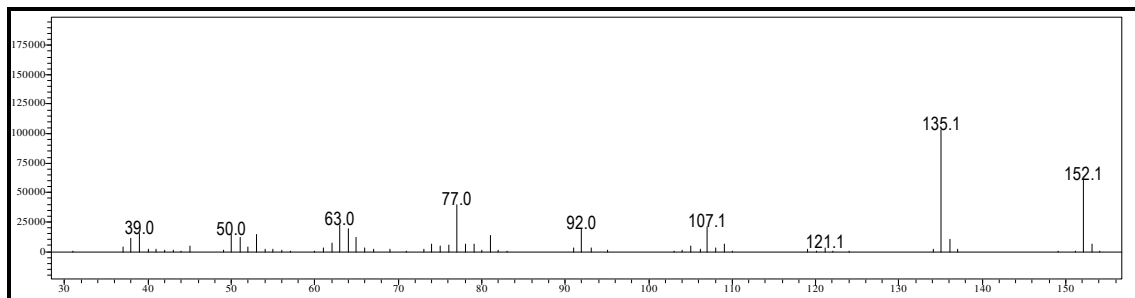
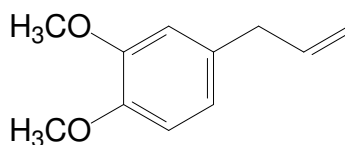


Figura I.13 – Espectro de massas adquirido a 70 eV do composto [57].

I.3.3.4 Elucidação estrutural de 3,4-dimetoxi-1-propenilbenzeno (metileugenol) [58]



[58]

A fração HJB38-3 (12 mg) apresentou-se como um óleo de coloração amarela e com aroma bastante agradável. Esta fração foi analisada por CG-EM do qual resultou o cromatograma e o espectro de massas visualizados na Figura I.14, p.48; a análise do pico espectro de massas com tempo de retenção 32,42 min. apresentou 96 % de similaridade com o espectro de massas do metileugenol quando comparado com os dados da biblioteca Wiley 7. Resolveu-se então adquirir espectros de RMN para confirmação desta proposta.

O espectro de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (Fig. I.15, p.49) corroborou com o indicativo dos dados de EM e, embora a amostra apresentasse contaminação, foi possível sua elucidação estrutural. A presença do metileugenol foi confirmada através da comparação com dados existentes na literatura (Tab. I.3, p.48).

O metileugenol é um componente natural presente em óleos essenciais, amplamente encontrado em plantas e utilizado como agente aromatizante na indústria de alimentos; possui diversas atividades biológicas tais como: analgésica, anestésica, anticonvulsivante, hipotermizante e miorelaxante (BARBOSA *et al.*, 1988; DALLMEIER & CARLINI 1981). Além dessas atividades ele possui papel ecológico importante, pois segundo WEE *et al.*, 2007 o metileugenol serve como feromônio de atração para machos de *Bactrocera carambolae* (mosca-da-carambola) que ataca frutos de carambola, que pode ocasionar enormes prejuízos econômicos para países exportadores desses frutos. Na família piperaceae este componente foi relatado nas espécies: *Piper nigrum* (VINCENZI *et al.* 2000), *P. sanctum* (MATA *et al.*, 2004) e *P. sarmentosum* (QIN *et al.*, 2010).

Tabela I.3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [300 MHz (H) e 75 MHz (C), CDCl_3 , δC e H (ppm), J (Hz)] de [58]

Posição	δ_{H}	δ_{H}^*	δ_{C}	δ_{C}^*
1	-	-	120,4	120,2
2	6,74 (d, 1.8)	6,71 (d, 2.0)	111,9	111,8
3	-	-	147,1	147,3
4	-	-	148,6	148,8
5	6,82 (d, 8.4)	6.81 (d, 8.0)	111,3	111,2
6	6,75 (dd, 8.4; 1,8)	6.74 (dd, 8,0; 2.0)	132,7	132,6
1'	3,34 (d, 6.6)	3,34 (ddd, 6,8; 1,7; 1,4)	39,8	39,8
2'	5,95 (m)	5.96 (ddt, 17,0; 10,4;6,8)	137,7	137,7
3'	5,08 (m)	5,06 (ddd, 10,4; 1,4; 1,2) e 5,08 (ddd, 17,0; 1,7; 1,2)	115,6	115,6
3-OCH ₃	3,87	3.86 (s)	55,9	55,9
4-OCH ₃	3,88	3.87 (s)	55,8	55,7

* MIYAZAWA & KOHNO 2005, em equipamento de 500 MHz.

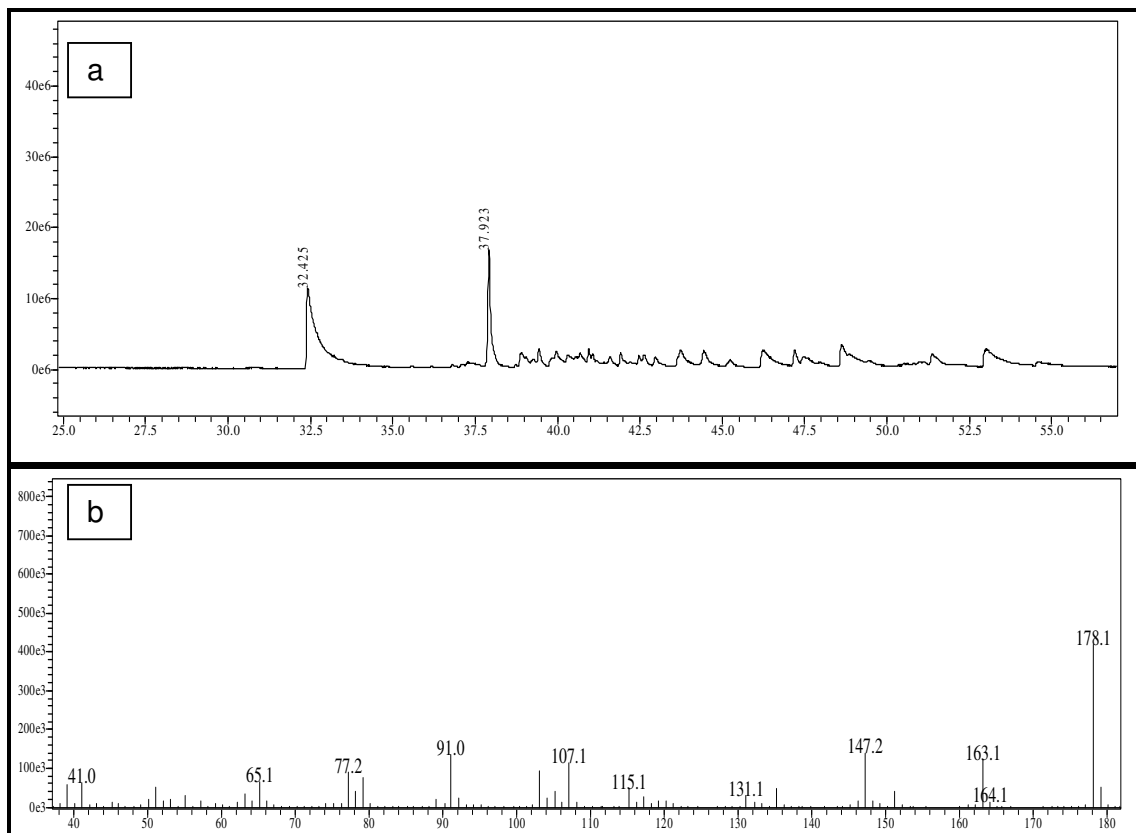


Figura I.14 – Cromatograma adquirido no CG-EM-IE (a) e o espectro de massas com $T_r = 32,42$ min. (b) do composto [58].

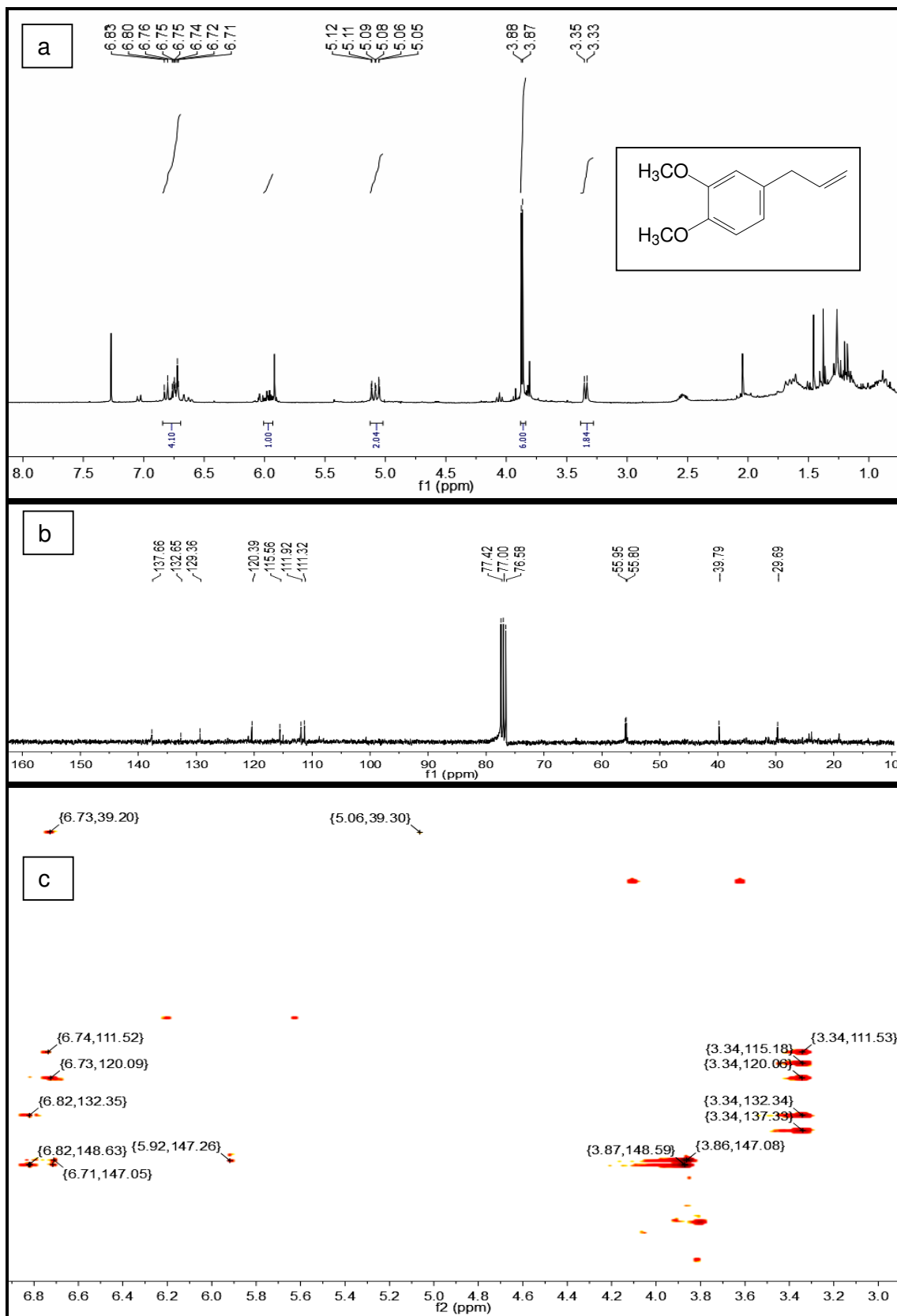
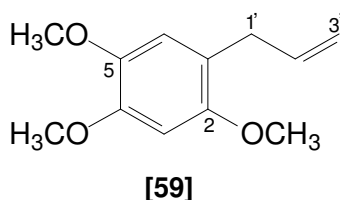


Figura I.15 – Espectro de RMN de ^1H (a), ^{13}C (b) e HMBC (c) de **HJB38-3** [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm)].

I.3.3.5 Elucidação estrutural de 2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno (isoasarona) [59]



A isoasarona apresentou-se como um óleo incolor de aroma agradável. Os dados de RMN de ^1H (Fig. I.17a, p.51) aliado a integração dos sinais permitiram identificar o padrão de substituição do anel aromático, sendo o mesmo tetrasubstituído; além do registro de sinais correspondente a presença de três grupos metoxilicos. Pela observação do espectro de RMN de ^{13}C e da análise do DEPT135 (Fig. I.17b e I.17c, p.51) foi possível constatar a presença de 3 carbonos metínicos, 2 carbonos metilênicos sendo um saturado (δ 33,6 - C1') e o outro insaturado (δ 115,1 - C3'), 4 carbonos não hidrogenados e 3 metoxilas (item I.3.2.5, p.31).

Os singletos em δ 6,70 e 6,54 integrados para 1H foram atribuídos a H6 e H3 respectivamente; outros dados registrados (item I.3.2.5, p.31) permitiram propor a estrutura de [59] como sendo 1-alil-2,4,5-trimetoxibenzeno. As três metoxilas foram atribuídas da seguinte forma: δ 3,88 (s, 4-OCH₃); 3,83 (5-OCH₃) e 3,80 (2-OCH₃), em acordo com a atribuição feita por SANTOS *et al.*, 1998.

O espectro de massas para esta substância (Fig. I.16, p.50) mostrou o íon molecular em m/z 208, o que corroborou com fórmula molecular C₁₂H₁₆O₃. Através do conjunto de informações relatadas foi possível confirmar que [59] era a isoasarona. Os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e EM estão em conformidade com os da literatura para esta substância (SANTOS *et al.*, 1998; MIYAZAWA & KOHNO 2005).

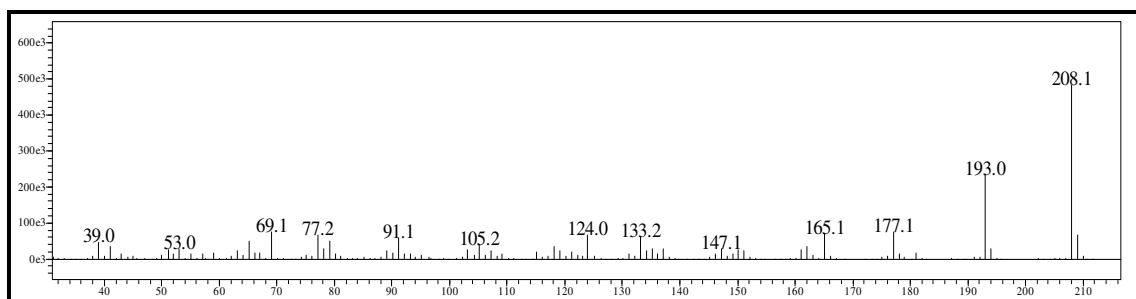


Figura I.16 – Espectro de massa adquirido a 70 eV da substância [59].

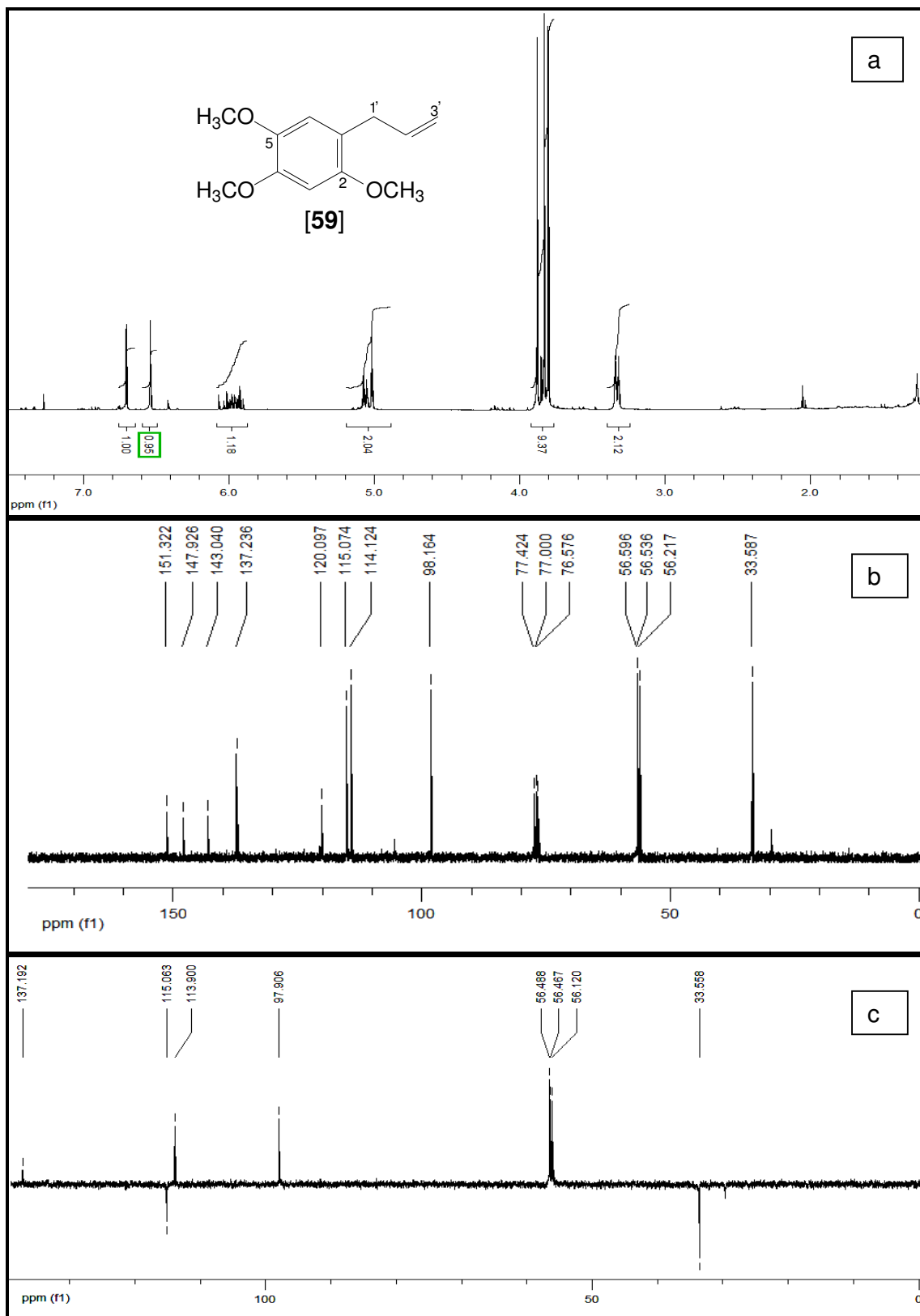
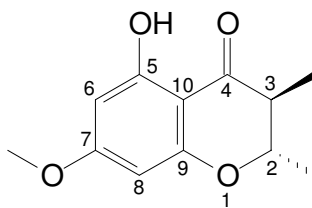


Figura I.17 – Espectro de RMN de ^1H (a), ^{13}C (b) e DEPT 135 (c) da substância [59] [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm)].

I.3.3.6 Elucidação estrutural de (2S,3S)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [60]



[60]

A fração **HJB4-2** apresentou-se como um sólido branco cujo ponto de fusão encontrado foi de 106 – 107 °C, equivalente àquele descrito na literatura (POLONSKY & BASKEVITCH, 1958). O espectro no IV da substância **[60]** (Fig. I.18, p.53) apresentou banda em 3018 cm⁻¹ característica de estiramento =C-H em anéis aromáticos; bandas em 2986, 2974, 2936 e 2912 cm⁻¹ (ν C-H de CH₃ e CH); bandas em 1573, 1508 e 1453 cm⁻¹ (ν C=C); uma forte banda em 1620 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento C=O devido a formação de ligação de hidrogênio intramolecular; absorções em 1156 e 1130 cm⁻¹ (ν C-O) e uma forte absorção em 830 cm⁻¹ referente à deformação angular fora do plano de ligações =C-H em compostos aromáticos tetrasubstituídos foram observadas.

Os dados de RMN de ¹H (Fig. I.19a, p.54) aliados a integração dos sinais desta fração permitiram identificar o padrão de substituição do anel aromático tetrasubstituído. Os sinais em δ 6.03 e 5.95 como dubletos com J = 2,1 Hz é indicativo que ambos os hidrogênios encontram-se em relação meta um ao outro. Deste modo estes dados permitiram propor que o anel aromático possuía padrão de substituição 1,2,3,5-tetrasubstituído. O singlete em δ 12,14 indicativo da presença de uma hidroxila em ligação de hidrogênio com um grupo carbonílico. Outros sinais puderam ser identificados no espectro tais como presença de um grupo metoxílico e duas metilas (item **I.3.2.6** p.32). Através da análise do espectro de RMN de ¹³C, incluindo DEPT135 (Fig. I.19b e I.19c, p.54), foi possível verificar a presença de 5 carbonos não hidrogenados, 4 carbonos metínicos, uma metoxila e 2 carbonos metílicos (item **I.3.2.6** p.32).

A análise das correlações observadas no espectro de HMQC (Fig. I.20a, p.55) permitiu atribuir os hidrogênios com os respectivos carbonos. O cromatograma (Fig. I.22a, p.56) de íons totais confirma o grau de pureza da substância e o espectro de massas (Fig. I.22b, p.56) apresenta o íon molecular em m/z 222, o que levou a propor a fórmula molecular C₁₂H₁₄O₄, coerente com a massa de alta resolução encontrada em modo ESI negativo, 221,0799 com erro experimental de 1,5 ppm. Uma proposta para formação do principal

fragmento de massa gerado utilizando impacto de elétron a 70 eV é mostrado na figura I.23, página 56. Através da determinação da rotação específica foi possível identificar a natureza dextrorrotatória da molécula, $[\alpha]_D^{20} = + 142^\circ$ (c 1,00, CH₃OH) indicando também que a substância é um produto natural e não um artefato.

Através do conjunto de informações relatadas e pela análise do espectro de HMBC (Fig. I.20b, p.55) em especial a correlação entre a metila (δ 1,21, d, 6,9 Hz, 3-CH₃) e a carbonila (δ 198,6 – C4), foi possível propor a estrutura [60] como sendo a substância (2S,3S)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona; além disso, pelos valores das constantes de acoplamento, atribuídos aos hidrogênios ligados a C₂ e C₃, pode-se constatar que ambos estão em posição axial, e a alta blindagem dessa metila (δ 10,2) pode ser explicada por ela está dentro do cone de proteção da carbonila. Esta substância está sendo relatada pela primeira vez como componente do metabolismo de plantas; sua origem biossintética deve ser através do ácido cinâmico. Cabe ressaltar que esta substância foi relatada pela primeira vez como produto de síntese em 1958 (POLONSKY & BASKEVITCH, 1958).

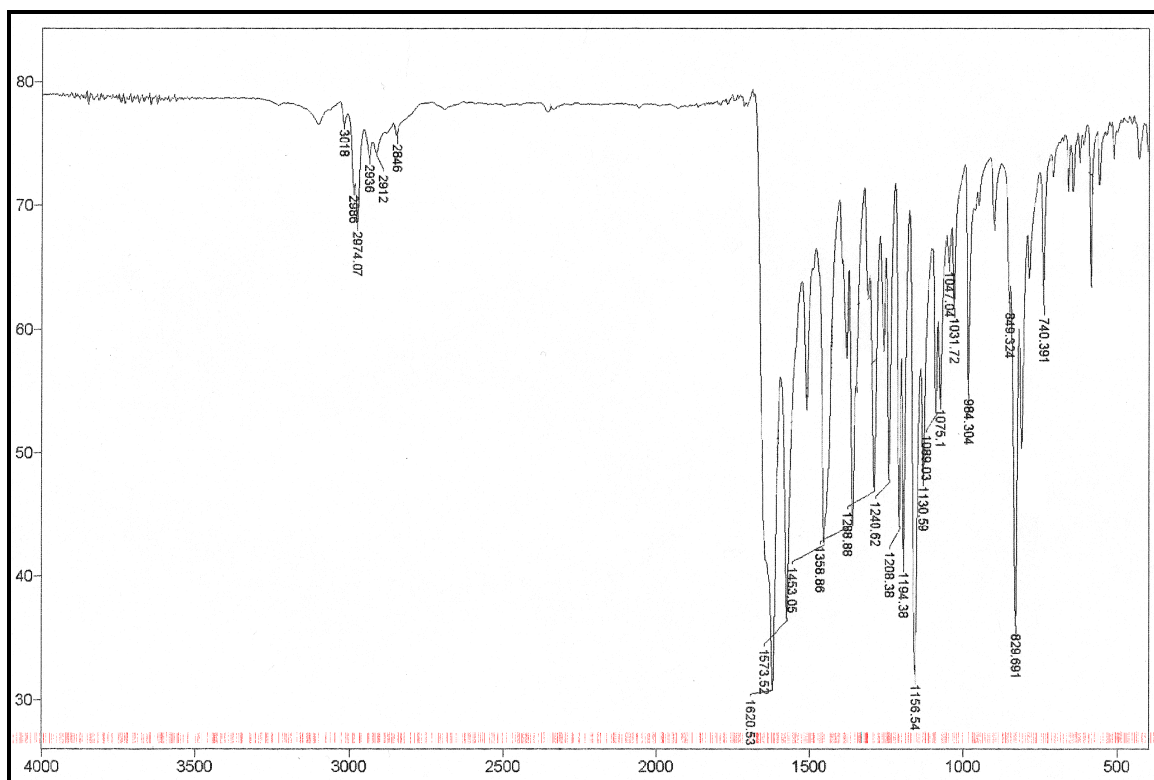


Figura I.18 – Espectro no IV da substância [60] em pastilha de KBr.

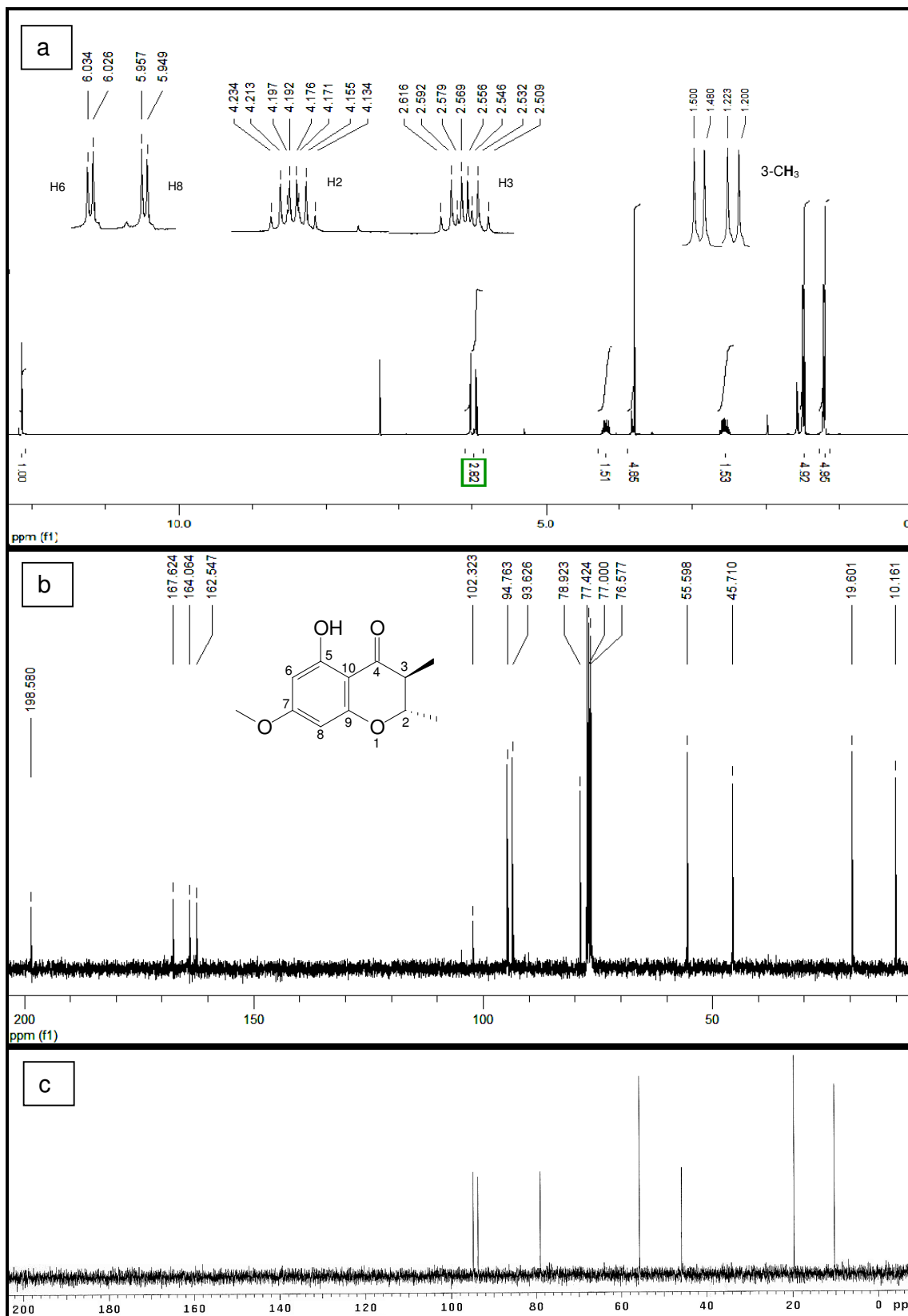


Figura I.19 – Espectro de RMN de ^1H (a), ^{13}C (b) e DEPT 135 (c) da substância **60** [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm)].

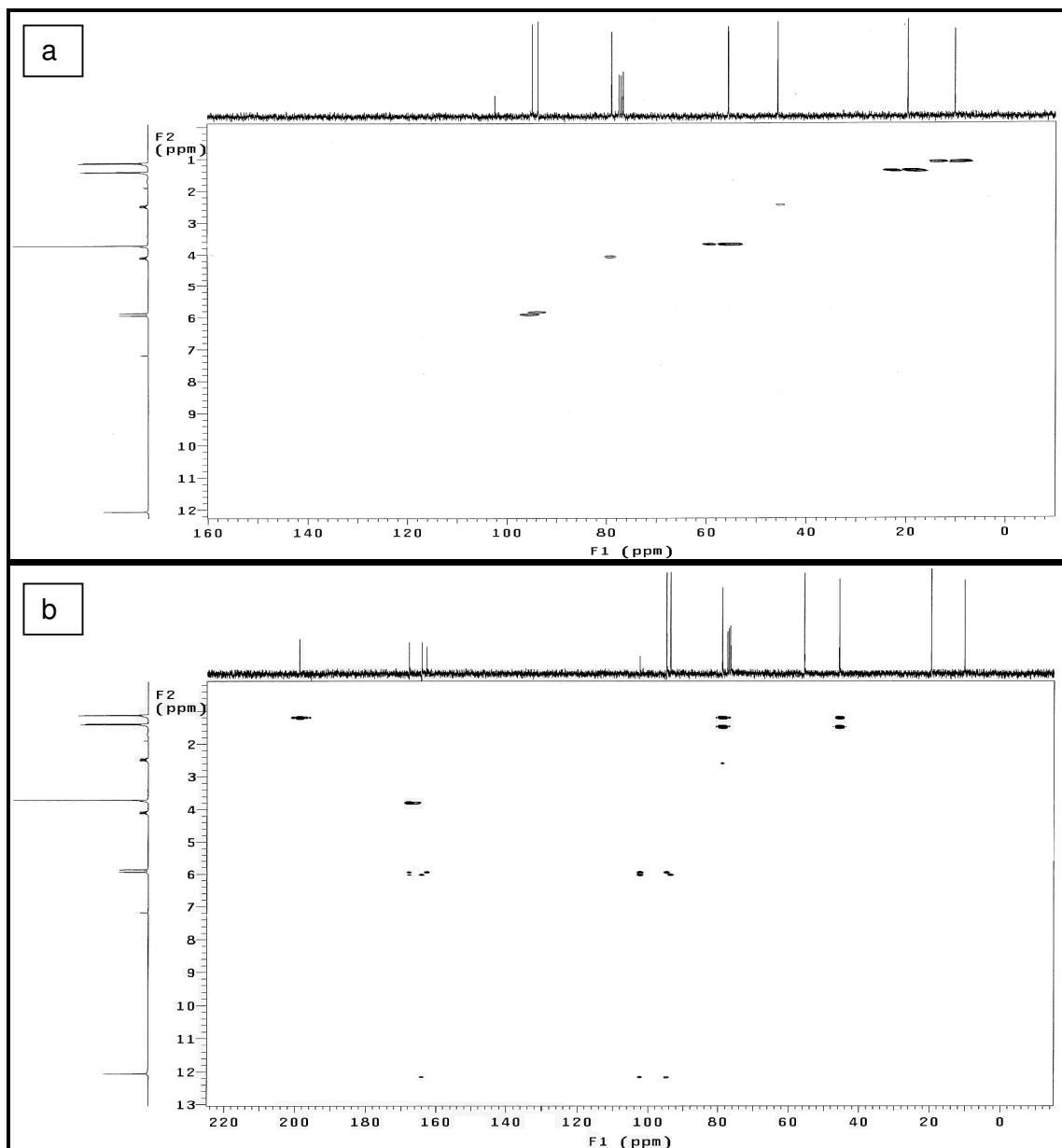


Figura I.20 – Espectro bidimensionais de gHMBC (a), e gHMBC (b) da substância [60] [CDCl₃, δ (ppm) – 300 MHz].

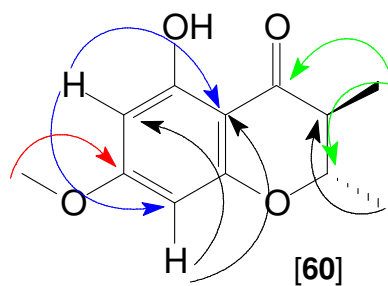


Figura I.21 – Principais correlações observadas no espectro de gHMBC da substância [60].

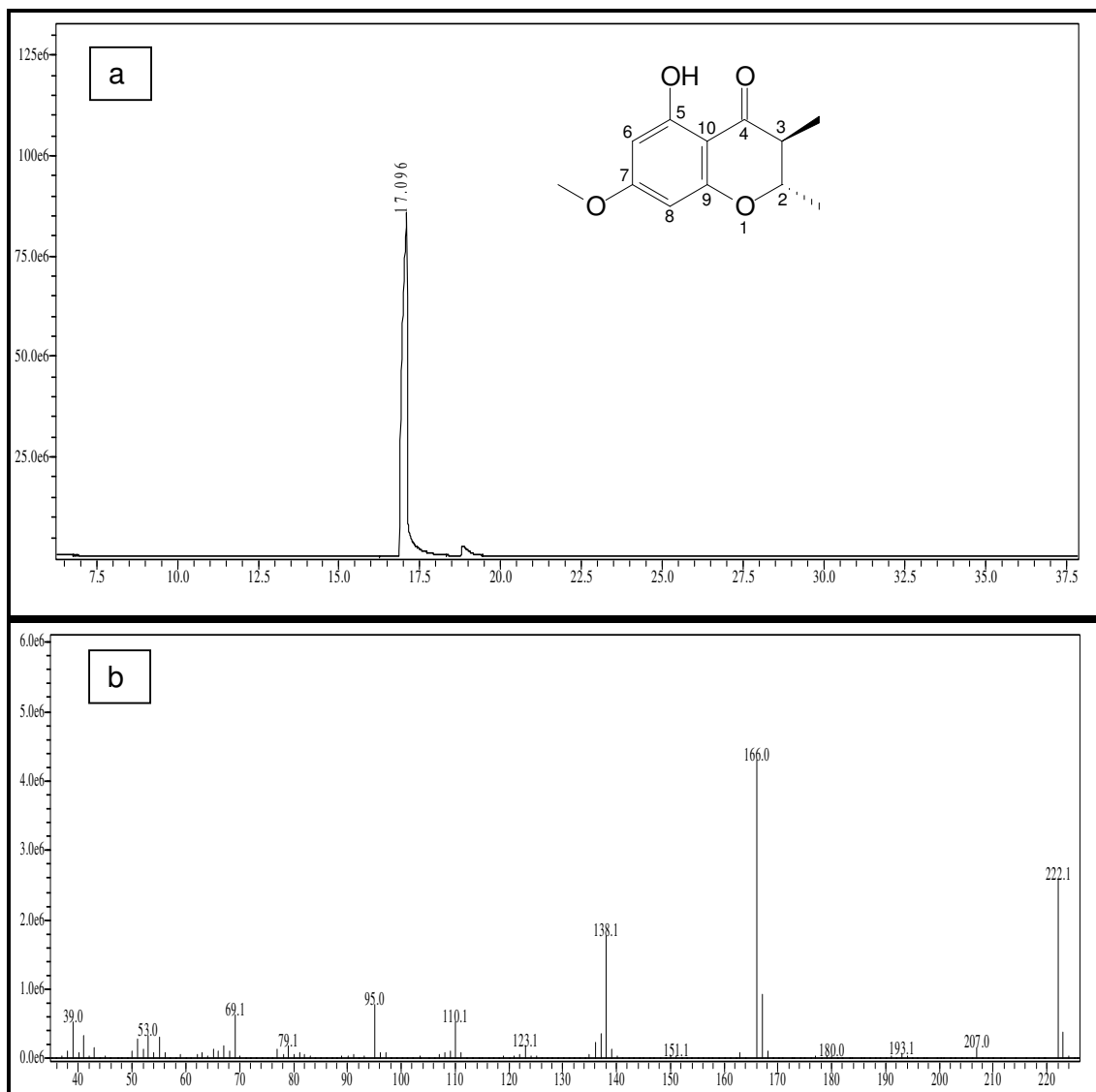


Figura I.22 – Cromatograma adquirido no CG-EM da fração **HJB4-2** (a) e o espectro de massas (b) da substância **[60]**.

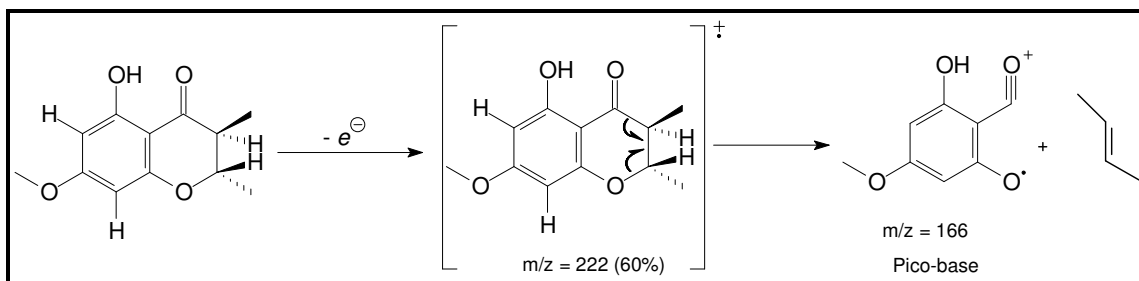
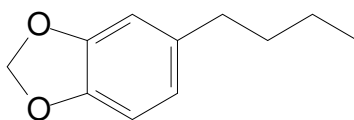


Figura I.23 – Proposta da principal fragmentação apresentada no EM-IE para a substância **[60]**.

I.3.3.7 Elucidação estrutural da 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno [61]



[61]

A fração **HJB1-3** apresentou-se como um óleo incolor de aroma suave. O espectro no IV (Fig. I.24, p.58) mostrou uma banda de baixa intensidade característica de estiramento =C-H em anéis aromáticos acima de 3000 cm^{-1} ; bandas em 2956 , 2925 , 2871 e 2855 cm^{-1} (ν C-H de CH_3 e CH_2); bandas em 1504 , 1490 e 1465 cm^{-1} (ν C=C) e absorções em 1245 e 1042 cm^{-1} foram atribuídos respectivamente aos estiramentos das ligações =C-O-C e C-O.

Os dados de RMN de ^1H (Fig. I.26a, p.59) aliados a integração e multiplicidade dos sinais permitiram identificar o padrão de substituição do anel aromático como sendo um sistema AMX, além da presença de um grupo metilenodióxido em δ 5,92. Pela observação do espectro de RMN de ^{13}C e da análise do DEPT135 (Fig. I.26b e I.26c, p.59) foi possível constatar a presença de 3 carbonos não hidrogenados, 3 carbonos metínicos, 4 carbonos metilênicos e 1 carbono metílico (item **I.3.2.7**, p.32). Os demais deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H estão descritos no item **I.3.2.7**, página 32.

O espectro de massas desta substância (Fig. I.25, p.58) mostrou o íon molecular em m/z 178, com provável fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$. Através do conjunto de informações relatadas foi possível confirmar **HJB1-3** como sendo o fenilpropanóide 1-Butil-3,4-metilenodioxi-benzeno [61]. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C são similares aos descritos anteriormente (MARQUES *et al.*, 2008). Esta substância foi primeiramente isolada de *Piper ovatum* (PINDER & PRICE 1967) e posteriormente de *Piper anisum* (MOREIRA *et al.*, 1997; MARQUES *et al.*, 2008).

Neste trabalho no capítulo 2, descrevemos esta substância como majoritária nos óleos essenciais das raízes, caules, folhas e sementes de *Piper klotzschianum* Kunth extraídos pelo processo de hidrodestilação.

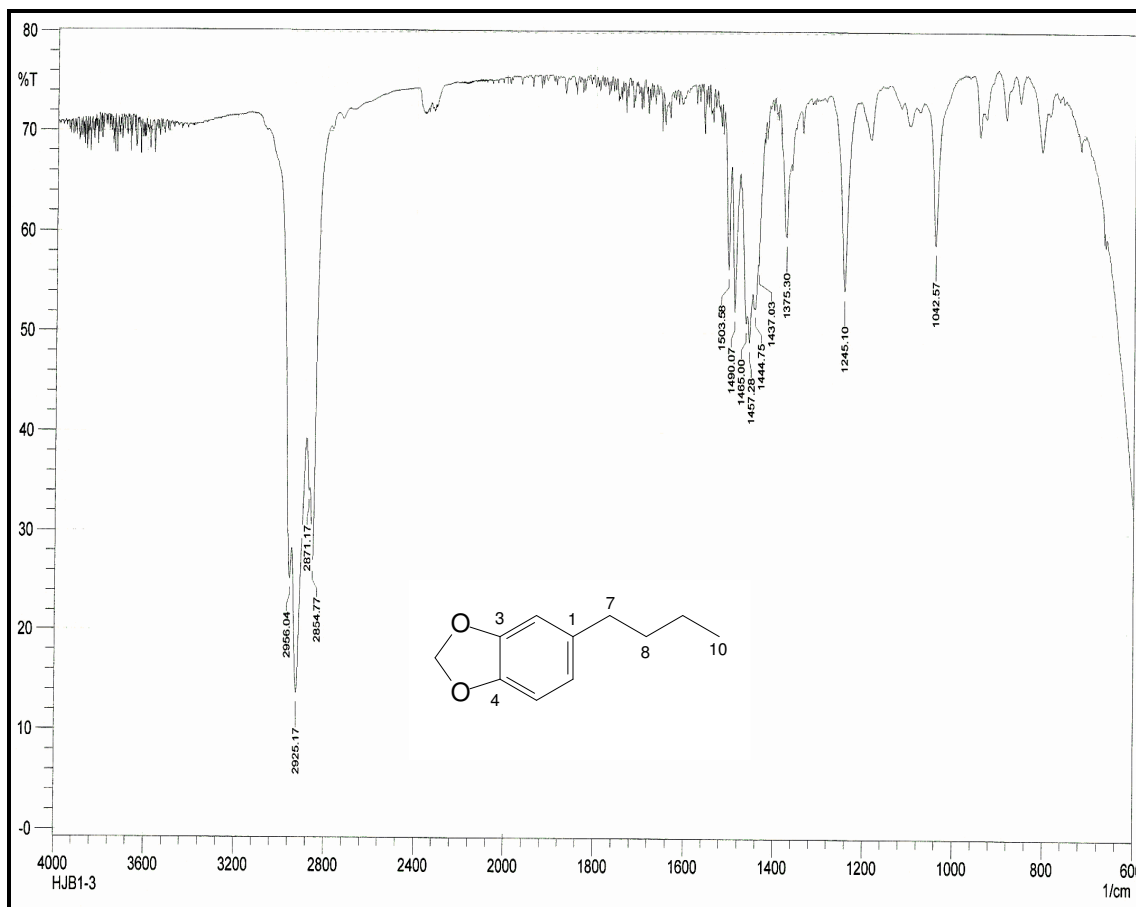


Figura I.24 – Espectro no IV da fração **HJB1-3** em filme de NaCl.

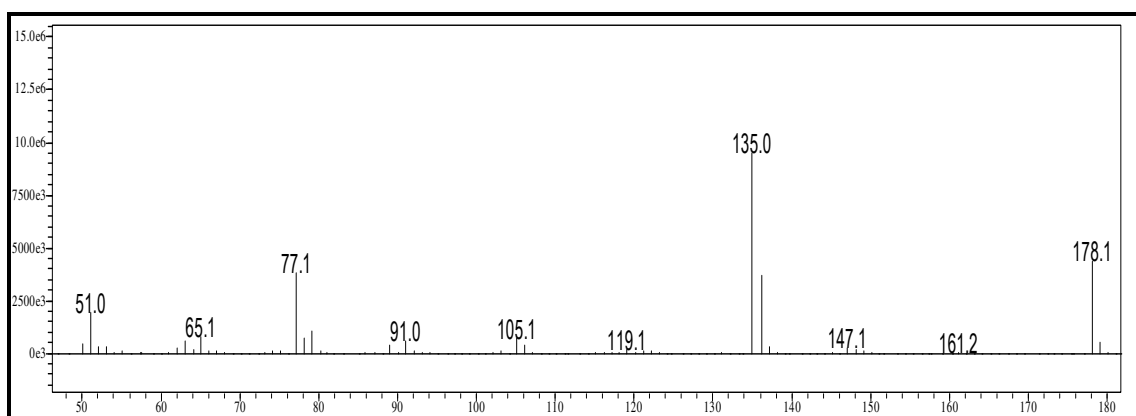


Figura I.25 – Espectro de massa a 70 eV da substância **[61]**.

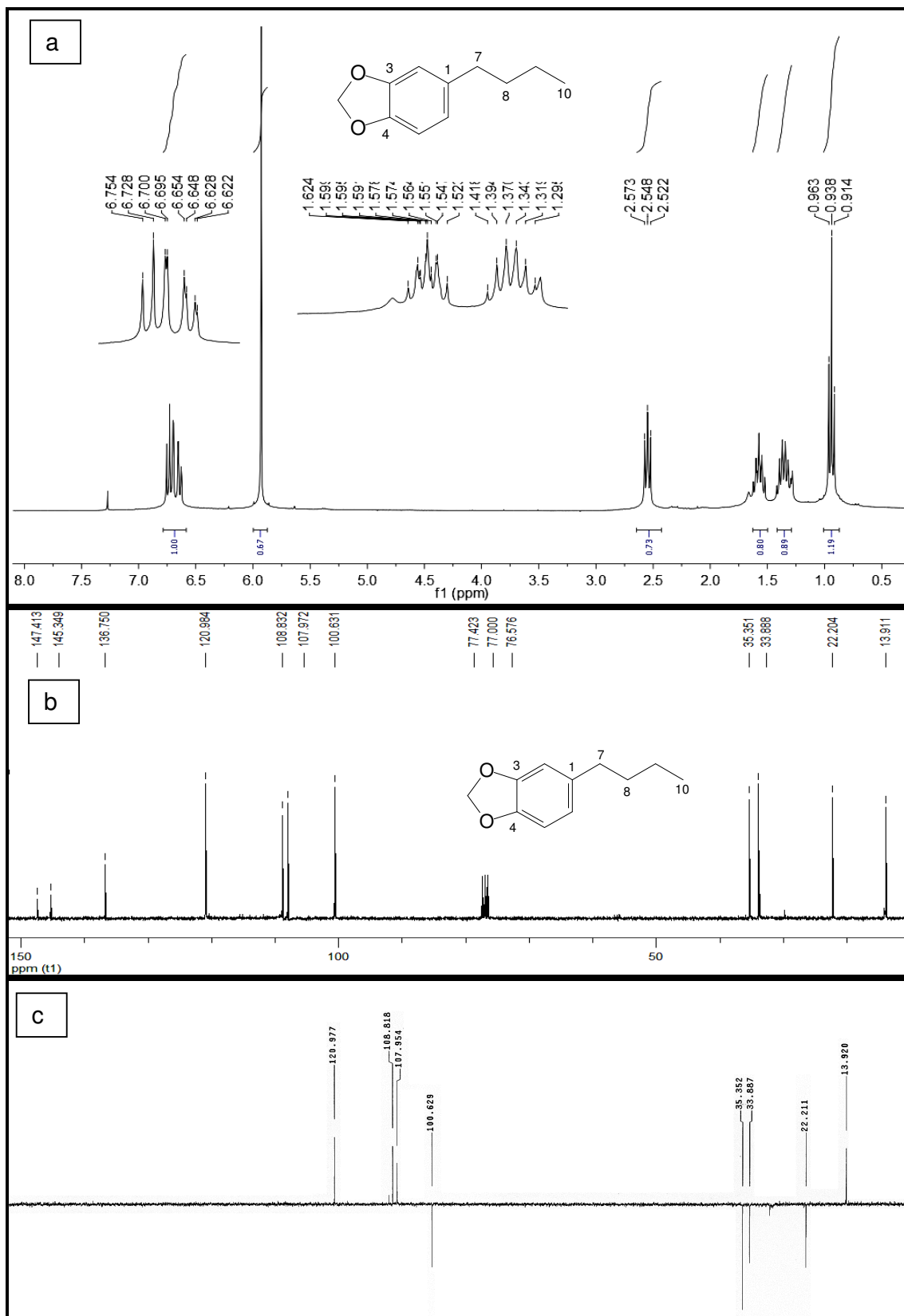
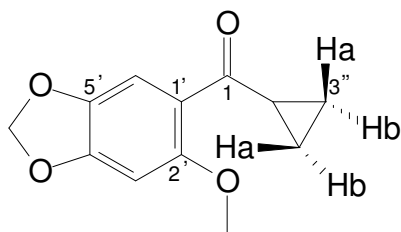


Figura I.26 – Espectro de RMN de ^1H (a), ^{13}C (b) e DEPT 135 (c) da substância **[61]** [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm)].

I.3.3.8 Determinação estrutural da piperpedrona (1,1-(2'-metoxi-4',5'-metilenodioxifenil)-ciclopropilcetona) [62]



[62]

A substância [62] apresentou-se como um sólido amorfo amarelado de aroma agradável. O espectro no IV (Fig. I.27, p.62) apresentou banda em 3006 cm^{-1} característica de estiramento =C-H em anéis aromáticos; além de bandas em 2955 , 2917 e 2851 cm^{-1} (ν C-H de CH_3 e CH_2); em 1654 , 1618 e 1507 cm^{-1} (ν C=C); uma banda em 1718 cm^{-1} característica de estiramento C=O de cetona; absorções entre 1260 e 1038 cm^{-1} foram atribuídos aos estiramentos das ligações =C-O-C e C-O, respectivamente.

Os dados de RMN de ^1H (Fig. I.29a, p.63) aliados a integração dos sinais desta fração permitiram identificar o padrão de substituição do anel aromático 1,2,4,5 tetrasubstituído devido a presença de dois singletos, (δ 7,19 e 6,58) integrados para um átomo de hidrogênio cada. Além disso, constatou-se um singleto em δ 5,99 integrado para dois átomos de hidrogênios indicativo da presença de um grupo metilenodioxílico, a presença de grupo metoxílico (δ 3,88) e a presença de outros três sinais na região de δ 2,81 a 0,93 (item I.3.2.8, p.33); Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. I.29b, p.63), incluindo DEPT135 (Fig. I.29c, p.63) foi possível verificar a presença de 5 carbonos não hidrogenados, 3 carbonos metínicos, 3 carbonos metilênicos e uma metoxila (item I.3.2.8, p.33).

A análise do espectro de HMQC (Fig. I.31a, p.65) permitiu constatar que os hidrogênios em δ 1,20 e 0,93 encontravam-se correlacionados ao mesmo carbono (δ 11,8). Além disso, pelo DEPT 135 este carbono se trata de um carbono metilênico, estando o mesmo em um ambiente bem protegido. Estes dados sugerem assim a presença de um anel ciclopropânico. Outra informação importante na elucidação estrutural foi obtida pela análise do gCOSY (Fig. I.30a e I.30b, p.64) onde pode ser constatado que o hidrogênio metínico (H-1'') encontrava-se acoplado com os hidrogênios do carbono metilênico (H-2'' e H-3''). Pode-se também observar pelo espectro de RMN de ^1H que H2''/H3'' são permutáveis espacialmente devido à livre rotação da ligação entre C1 e C1''.

Através da análise em CG-EM-IE, (figura I.33a, p.66) verificou a presença de três picos majoritários, sendo um da estrutura proposta (Tr = 50,10 min.) e outros dois pertencentes, conforme sugerido pela biblioteca Wiley 7 como sendo os ácidos palmítico (Tr = 53,14 min. 96 % de similaridade e $m/z = 256$) e oléico (Tr = 58,78 min 95 % de similaridade e $m/z = 282$); cabe ressaltar que o ácido palmítico foi o componente majoritário identificado na análise de ácidos graxos (item **I.3.4.1**, p.107). O espectro de massas da substância [62] (Fig. I.33b, p.66) apresentou o íon molecular em m/z 220, que juntamente com outros dados espectroscópicos permitiram propor a fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_4$. Esta amostra também foi analisada em CLAE-EM (Fig. I.33c e I.33d, p.66) em coluna C18 em modo APCI positivo, gerando um pico em 221. Com isso foi possível adquirir a massa em equipamento de alta resolução cujo valor foi de 221,0857, valor este com um erro experimental de 4,3 ppm confirmando assim a FM proposta anteriormente.

De posse destes dados foi proposta a estrutura [62], que está coerente com as correlações observadas pelo espectro de HMBC (Fig. I.31b e I.32 p.65) em especial as correlações entre: os dois grupos CH_2 (δ 1,20 e 0,93) com a carbonila (δ 200,9 – C1), entre H6 (δ 7,19) e o grupo carbonílico; hidrogênios do grupo metoxila (δ 3,88) com o C2 (δ 156,3). A figura I.32 (p.65) resume as correlações observadas no mapa de contornos do HMBC.

Outros dados que reforçam a estrutura sugerida são os fragmentos gerados pelo espectro de massas cuja proposta para as principais fragmentações são mostradas na figura I.28, página 62. Esta substância está sendo relatada pela primeira vez na literatura, sendo seu nome **1,1-(2'-metoxi-4',5'-metilenedioxifenil)-ciclopropilcetona [62]** (cujo nome de fantasia propomos como piperpedrona em homenagem a um dos coletores). Os dados de RMN de 1H e ^{13}C estão em conformidade com os do modelo estrutural utilizado (2-methoxy-4,5-methylenedioxypropioiphenone FACUNDO & MORAES 2003).

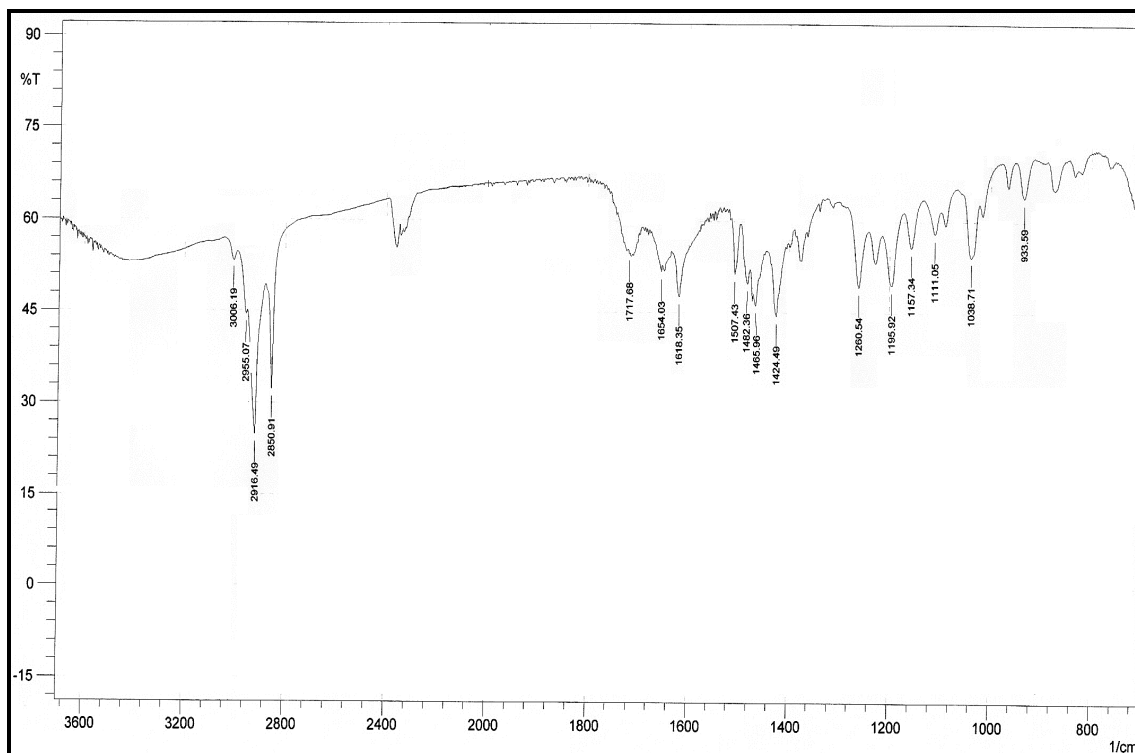


Figura I.27 – Espectro no IV da fração **DJB9-4** em filme de NaCl.

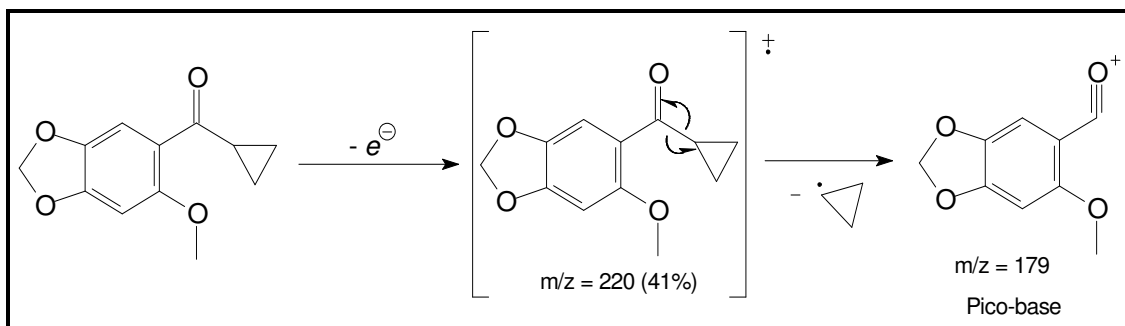


Figura I.28 – Proposta das principais fragmentações apresentadas no EM para a substância [62].

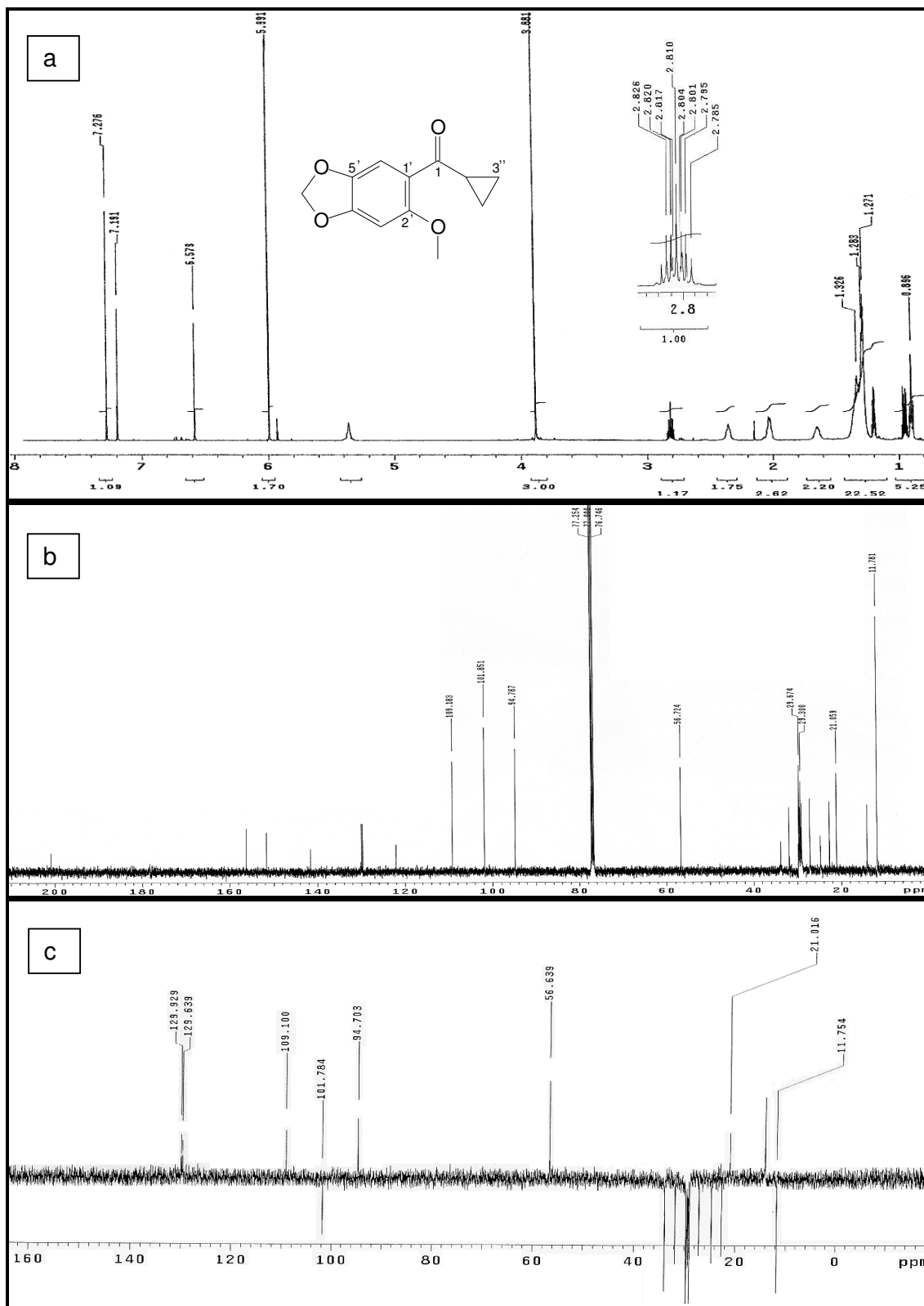


Figura I.29 – Espectro de RMN de ^1H (a), ^{13}C (b) e DEPT 135 (c) de **DJB9-4** [500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm)].

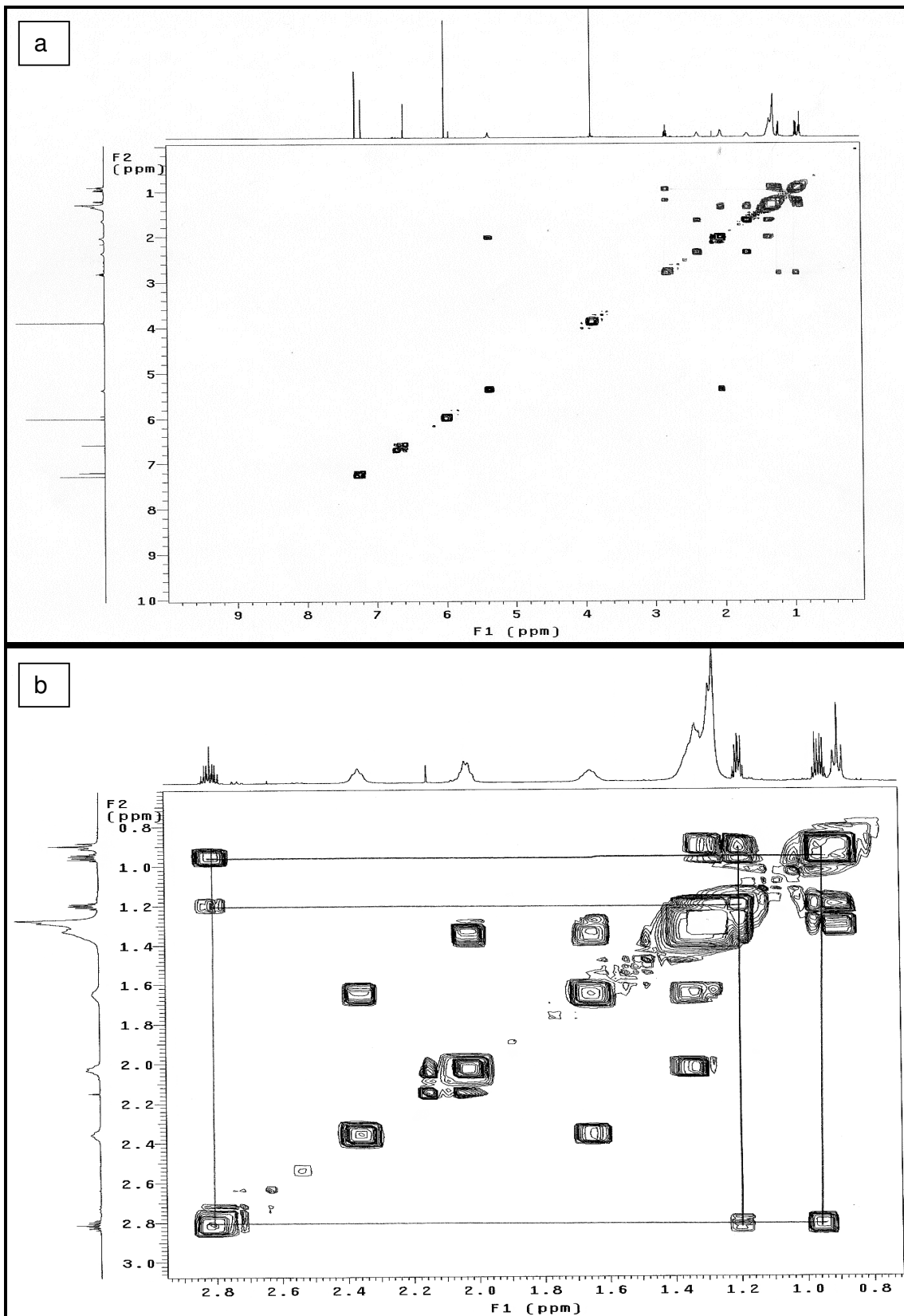


Figura 1.30 – Espectro bidimensionalis de gCOSY (a), e sua ampliação (b) de DJB9-4 [CDCl₃, δ (ppm)].

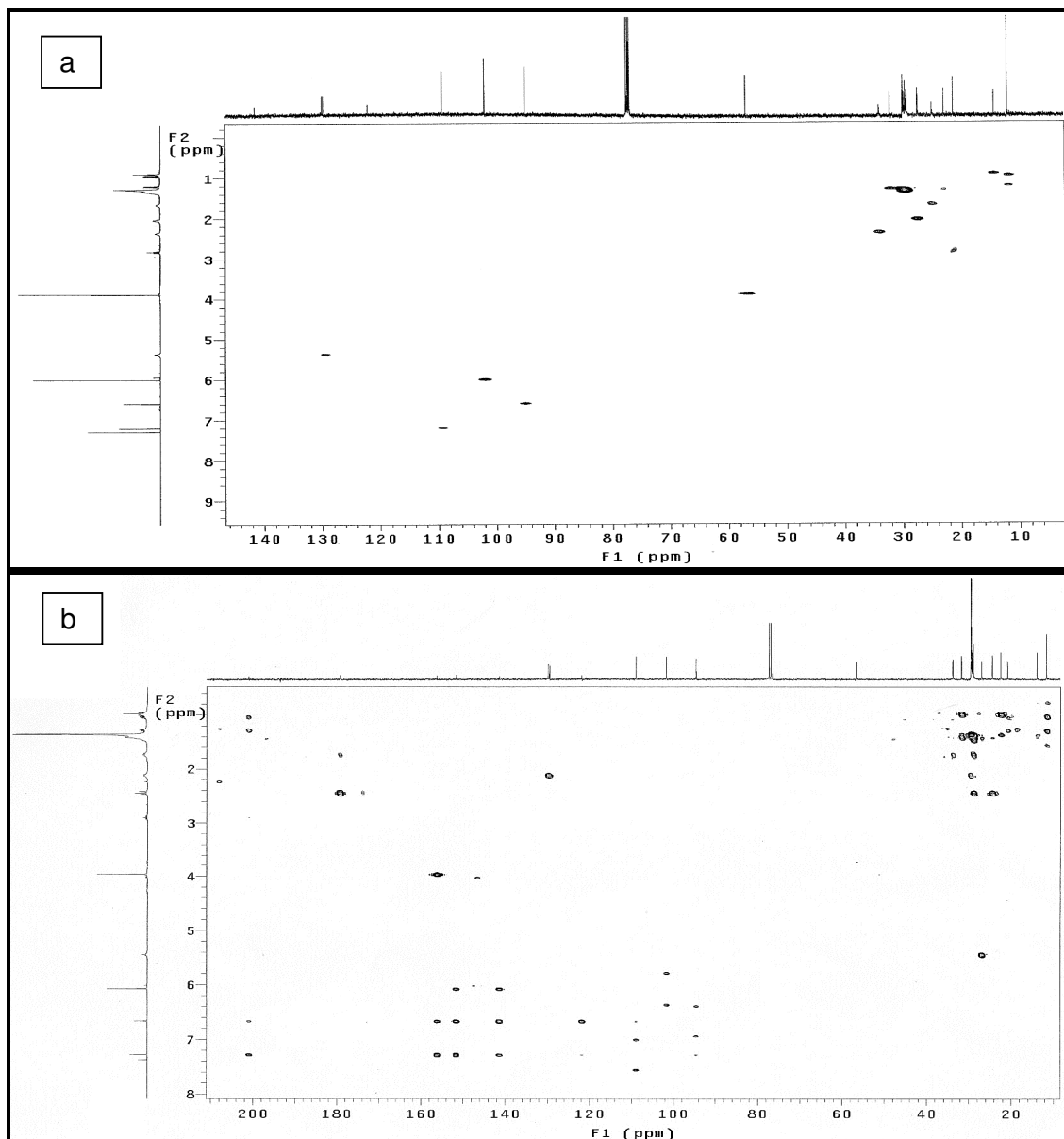


Figura I.31 – Espectro bidimensionais de gHMBC (a), e gHMBC (b) de **DJB9-4** [CDCl_3 , δ (ppm)].

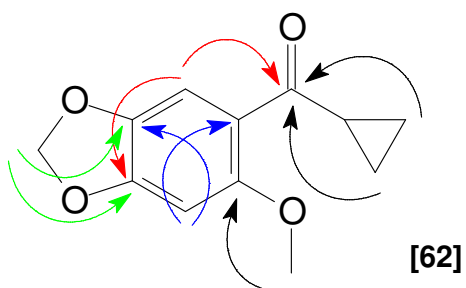


Figura I.32 – Principais correlações observadas no espectro de gHMBC da substância [62].

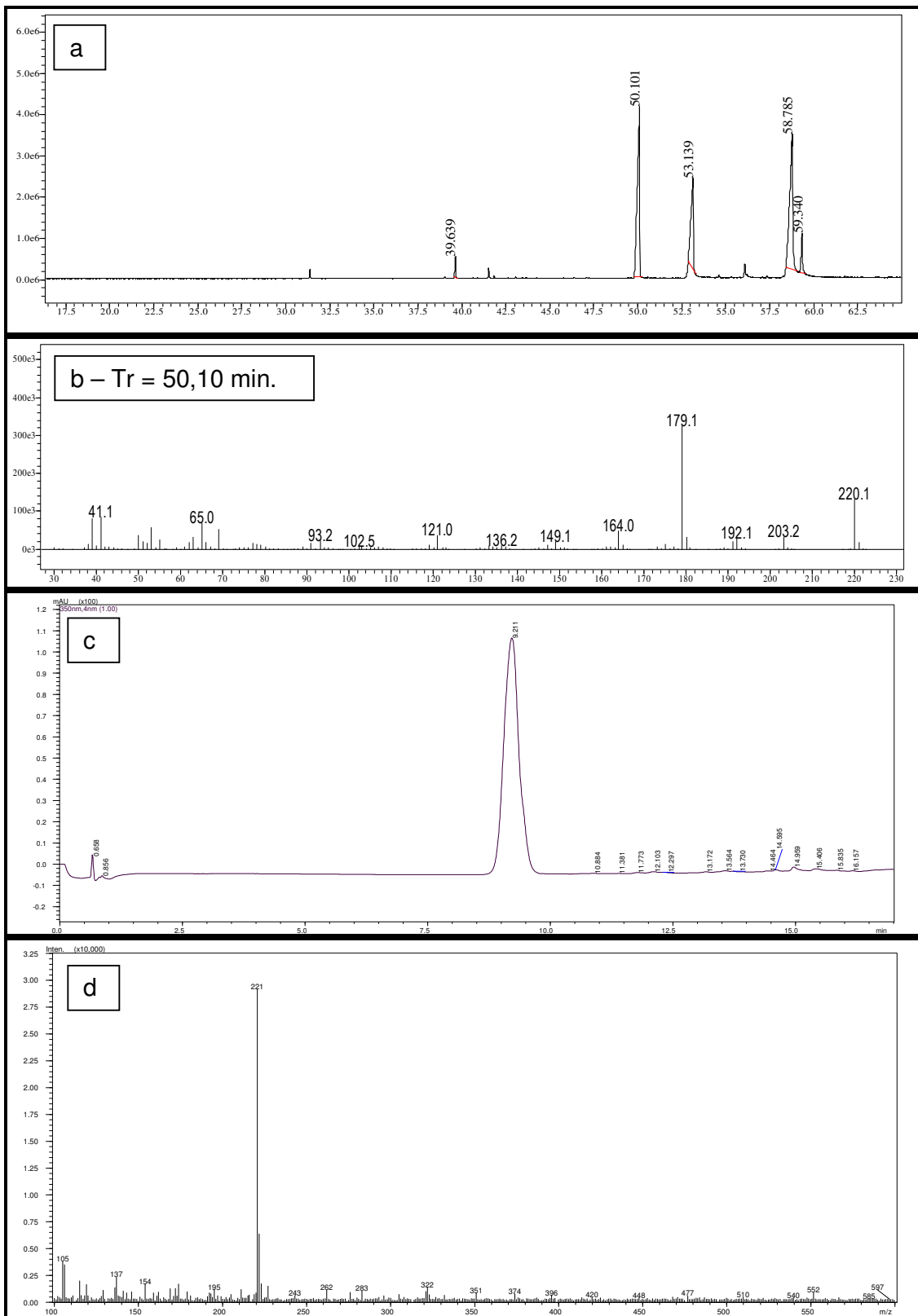
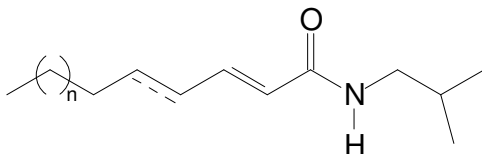


Figura I.33 – Cromatogramas e espectros de massas da fração **DJB9-4**: CG-EM adquirido a 70 eV (a) e (b) e CLAE-EM adquiridos no modo APCI positivo (c) e (d).

I.3.3.9 Identificação da composição da Fração HJB59-4 - mistura de isobutilamidas alifáticas



- n = 1 [63] - (2E,4E)-N-isobutilocta-2,4-dienamida
- n = 3 [64] - (2E,4E)-N-isobutildeca-2,4-dienamida
- n = 4 [65] - (2E,4E)-N-isobutilundeca-2,4-dienamida
- n = 5 [66] - (2E,4E)-N-isobutildodeca-2,4-dienamida
- n = 6 [67] - (2E,4E)-N-isobutiltrideca-2,4-dienamida
- n = 7 [68] - (2E,4E)-N-isobuiltetradeca-2,4-dienamida
- n = 9 [69] - (2E,4E)-N-isobutilhexadeca-2,4-dienamida
- n = 9 [70] - (2E)-N-isobutilhexadeca-2-enamida

O aspecto físico desta fração era de um semi-sólido de coloração amarela; seu espectro de RMN de ^1H foi similar ao encontrado para a (2E,4E)-N-isobutilocta-2,4-dienamida [63] (Fig. I.34a e I.34b, p.69) previamente isolada da espécie *Fagara macrophylla* pertencente à família Rataceae (KUBO *et al.*, 1984). Os valores de RMN de ^{13}C (Fig. I.35, p.70) foram semelhantes aos encontrados para esta substância (Tab. I.4, p.73). Esta fração foi analisada em CG-EM-IE, e revelou-se como uma mistura (Fig. I.36, p.70). Pela análise dos espectros de massas (Fig. I.37, p.71-72) fica evidente o padrão de fragmentação das moléculas componentes desta mistura; os principais fragmentos gerados estão apresentados na figura I.38, p.72.

Análise do espectro de RMN de ^1H foi possível observar claramente os sinais referentes às principais características estruturais das substâncias presentes na mistura. A multiplicidade dos sinais bem como as constantes de acoplamento permitiu propor a estereoquímica da alcamida $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada (Tab. I.4, p.73). Na região entre δ 6,07 e 6,13 os sinais parecem estar sobrepostos, pois devido a uma mistura, vários sinais absorvem em uma mesma região do espectro, logo, não foi possível uma atribuição inequívoca para os átomos de hidrogênios nesta região. O mesmo é observado para a região compreendida entre δ 1,1 e 1,5, além do alargamento dos sinais.

Os dados espectroscópicos juntamente com os dados espectrométricos permitiram constatar a presença de sete isobutilamidas alifáticas em sistema $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ - insaturados próximos à carbonila [63] a [69]; além disso, quando se compara a integração dos sinais de H2 e H5 no espectro de RMN de ^1H percebe-se um maior valor para H2, logo se acredita ser um indicativo para a presença de compostos com cadeia monoinsaturada na mistura. Daí a

proposta para a existência da substância [70] cujo espectro de massas está apresentado na figura I.37, página 72 com o tempo de retenção em 27,02 minutos. Esta proposta apresenta uma fragmentação que acontece entre os carbonos β e γ à carbonila resultando uma razão m/z de 126 que aumenta de forma considerável na isobutilamida monoinsaturada.

Foi possível fazer comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância [64] e dados de ^{13}C para [63], [65] e [66] (Tab. I.4, p.73); para a substância [69] foram encontrados dados de RMN de ^1H e EM-IE (STRUNZ & FINLAY 1996), valores estes similares aos encontrados na figura I.34b e I.37 páginas 69 e 72 respectivamente. Para as substâncias [67] e [68] não foram encontrados na literatura consultada dados de RMN; e para a [70] não se teve acesso ao periódico.

A ocorrência da substância [63] foi relatada em quatro espécies de *Piper*: *P. novae hollandiae* (LODER *et al.*, 1969), *P. banksii* (LODER & NEARN 1972), *P. nigrum* (NAKATANI & INATANI 1981), *P. marginatum* (SANTOS & CHAVES 1999) e *P. nigrum* (WEI *et al.*, 2004), não possuindo nenhuma atividade biológica relatada. Já a substância pelitorina [64] foi relatada anteriormente em várias espécies do gênero *Piper* tais como: *P. peepuloides* (DHAR & ATAL, 1969), *P. nigrum* (SU & HORVAT 1981; WEI *et al.*, 2004), *P. sarmentosum* (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1987; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2004), *P. longum* (DAS *et al.*, 1997), *P. tuberculatum* (NAVICKIENE *et al.*, 2000), *P. arboreum* (SILVA *et al.*, 2002), *P. retrofractum* (BODIWALA *et al.*, 2007), entre outras. Atividades diversas também já foram relatadas para esta substância: antifúngica (SILVA *et al.*, 2002), antituberculose (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2004), inseticida (SU & HORVAT 1981; GBEWONYO & CANDY 1992^a; PARK *et al.*, 2002), inibição da adesão celular (LEE *et al.*, 2008), antitripanosoma (COTINGUIBA *et al.*, 2009) e enzimática (RHO *et al.*, 2007).

A isobutilamida [65] foi sintetizada em 1991 por PLOBECK & BACKVALL e relatada na espécie *Piper guineense* (ADESOMA *et al.*, 2002). O composto [66] foi isolado de *P. peepuloides* (DHAR & RAINA 1973), *P. guineense* (GBEWONYO & CANDY 1992^b), *P. nigrum* (WEI *et al.*, 2004), *P. chaba* (MATSUDA *et al.*, 2008 e 2009) entre outras espécies de *Piper*; também foi identificado em *Echinacea angustifolia* espécie pertencente à família Asteraceae (MATOVIC *et al.*, 2011). Atividade hepatoprotetora tem sido relatado por MATSUDA *et al.*, 2008 e 2009.

Para a substância [67] verificou-se que a mesma foi identificada utilizando CG-EM-IE de extratos obtidos de *P. guineense* (ADESOMA *et al.*, 2002) e está sendo relatada neste trabalho em *Piper klotzschianum*. O composto [68] foi relatado nas espécies de *Piper magnibaccum* (EMRIZAL *et al.*, 2008), *P. chaba* (MATSUDA *et al.*, 2009) e *P. nigrum* (Ee *et al.*, 2009), e apresentado atividade inseticida (ELLIOTT *et al.*, 1987) e anti-inflamatória (EMRIZAL *et al.*, 2008). Para a substância [69] foi encontrado relato de sua ocorrência nas espécies *Piper sarmentosum* (STOEHR *et al.*, 1999), *Piper guineense* (ADESOMA *et al.*,

2002) e *P.chaba* (MATSUDA *et al.*, 2009), além de ter sido relatada primeiramente em 1985 na família Lauraceae na espécie *Evodia hupehensis* (REISC *et al.*, 1985). A substância [70] foi isolada recentemente de *Piper longum* e apresentou atividade inibitória do crescimento de células que causam leucemia humana, linhagem de células HL-60, e exibiu efeitos de indução de apoptose (MISHRA *et al.*, 2011).

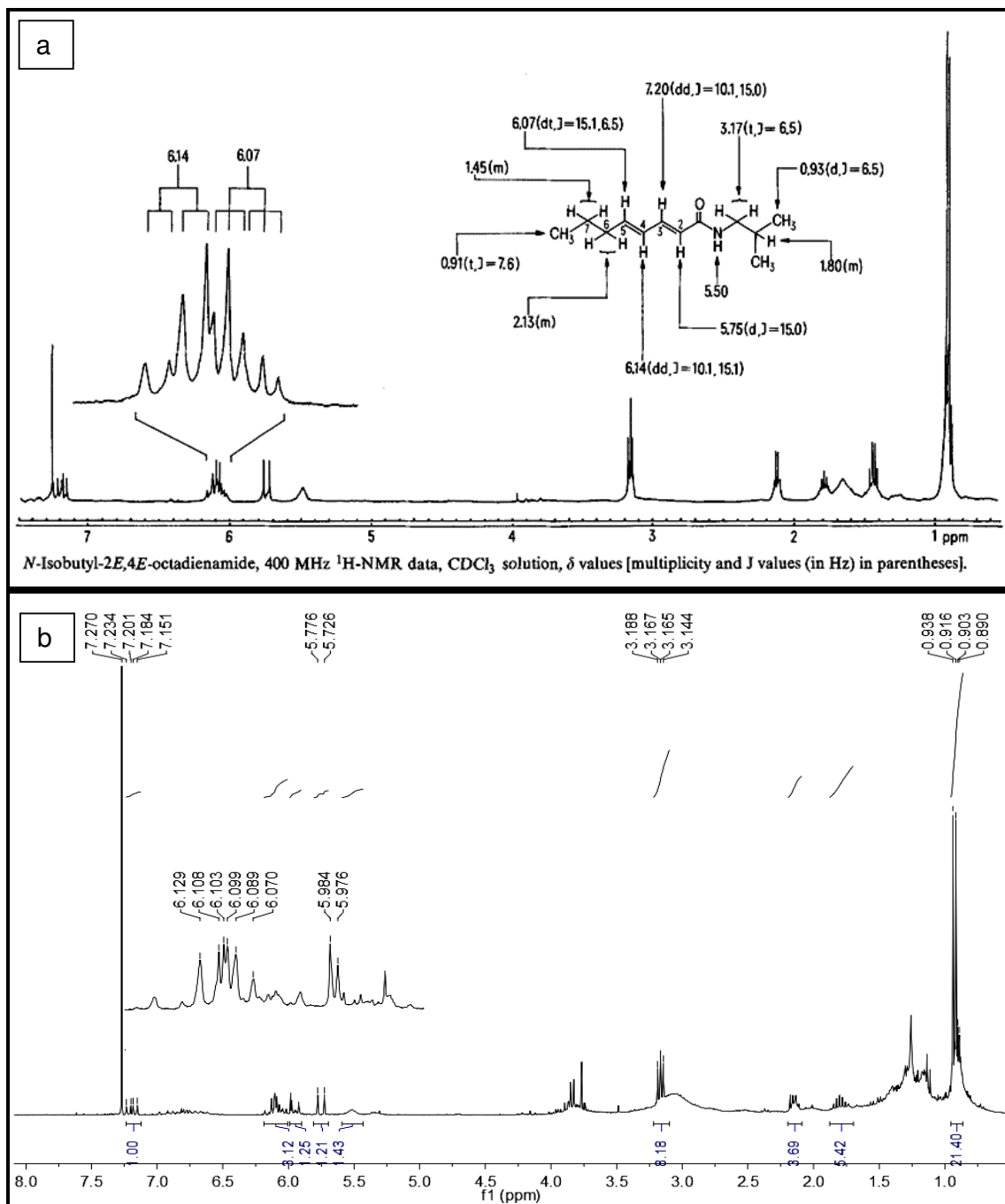


Figura 1.34 – Espectro de RMN de ¹H da: a) (2*E*,4*E*)-*N*-isobutilocta-2,4-dienamida [63] (KUBO *et al.*, 1984), e da fração **HJB59-4** (b) [CDCl₃, δ (ppm) – 300 MHz].

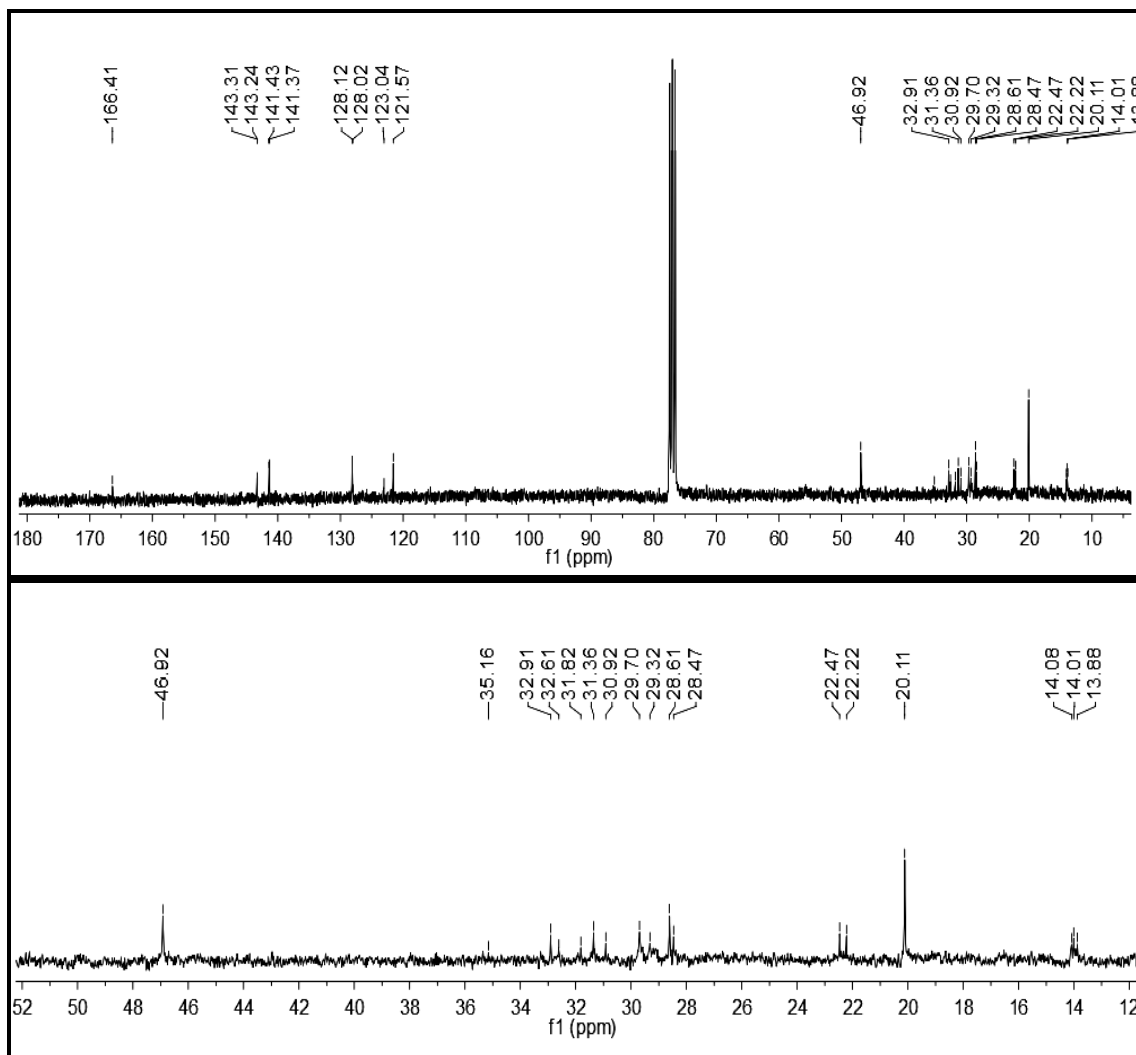


Figura I.35 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração **HJB59-4**, com expansão, [CDCl₃, δ (ppm) – 75 MHz].

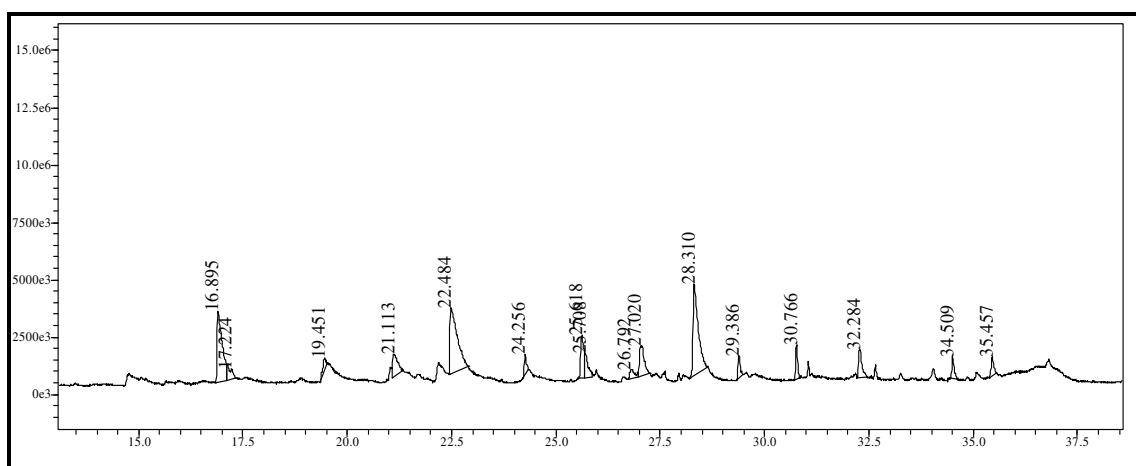
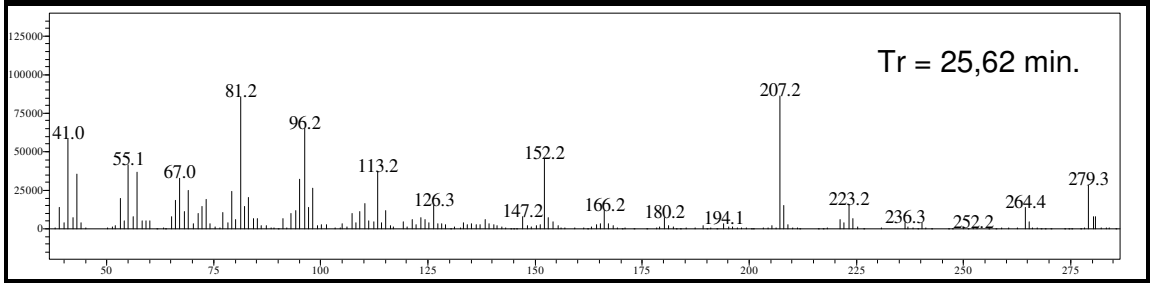
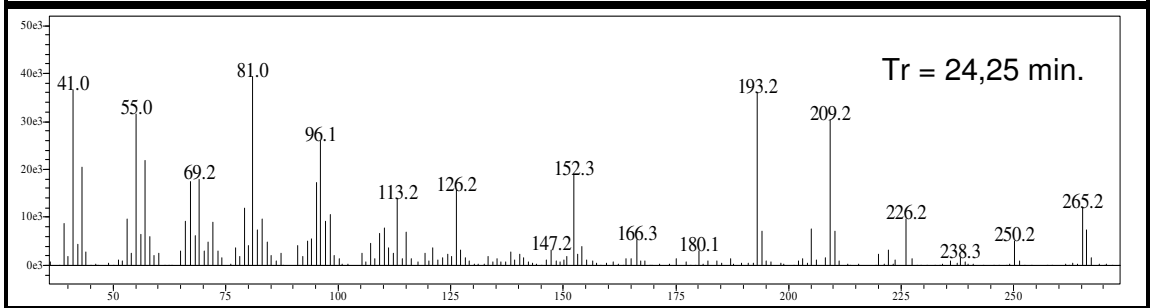
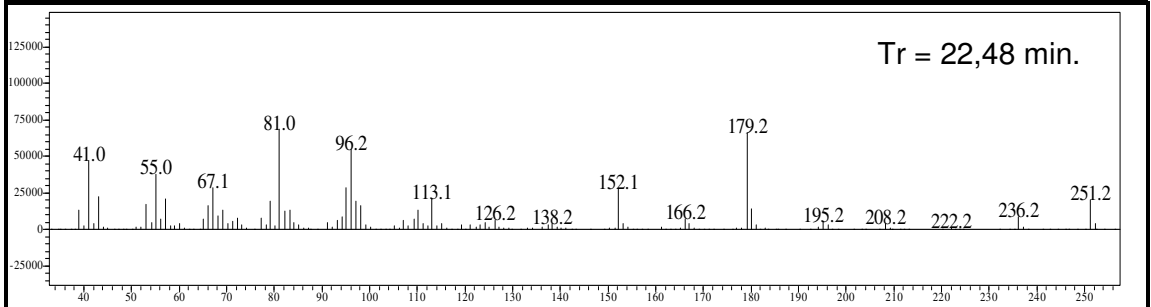
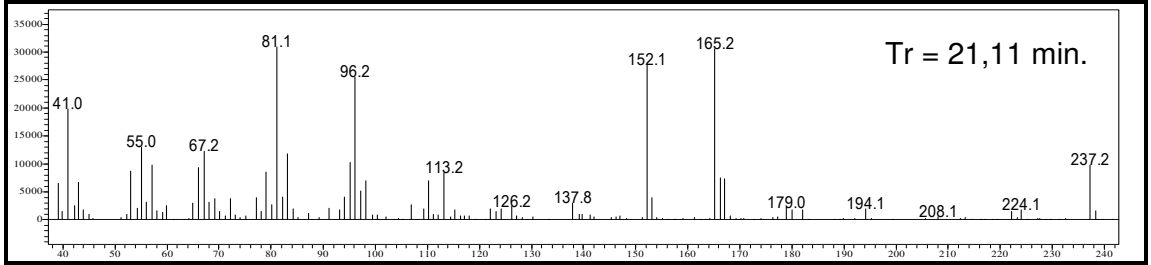
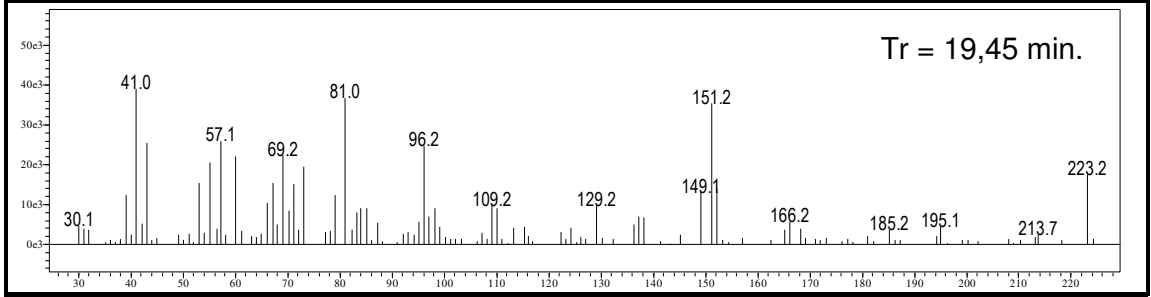
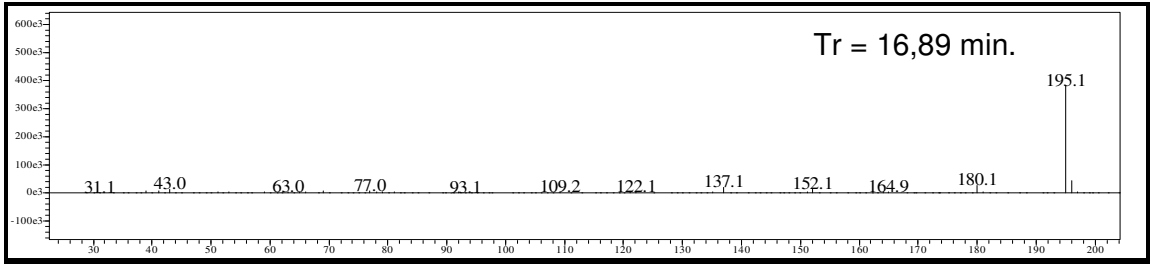


Figura I.36 – Cromatograma adquirido em CG-EM da fração **HJB59-4**.



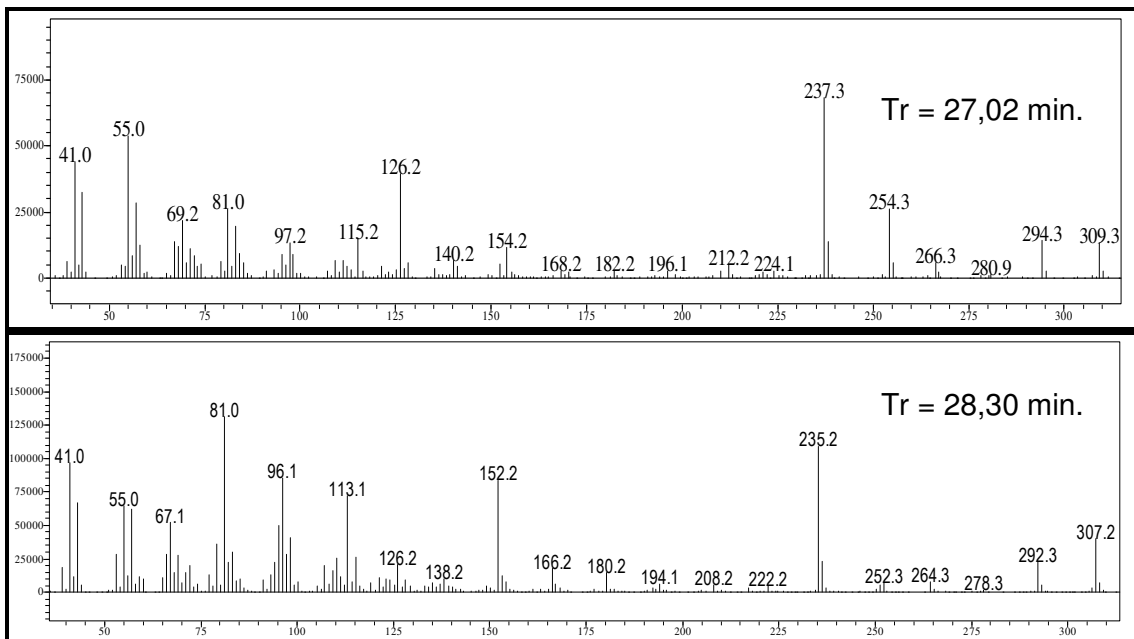


Figura I.37 - Espectros de massas dos picos com Tr = 16,89 min. [63]; Tr = 19,45 min. [64]; Tr = 21,11 [65]; Tr = 22,48 [66]; Tr = 24,25 [67]; Tr = 25,62 [68]; Tr = 27,02 [70] e Tr = 28,30 [69]; da fração HJB59-4 a 70 eV.

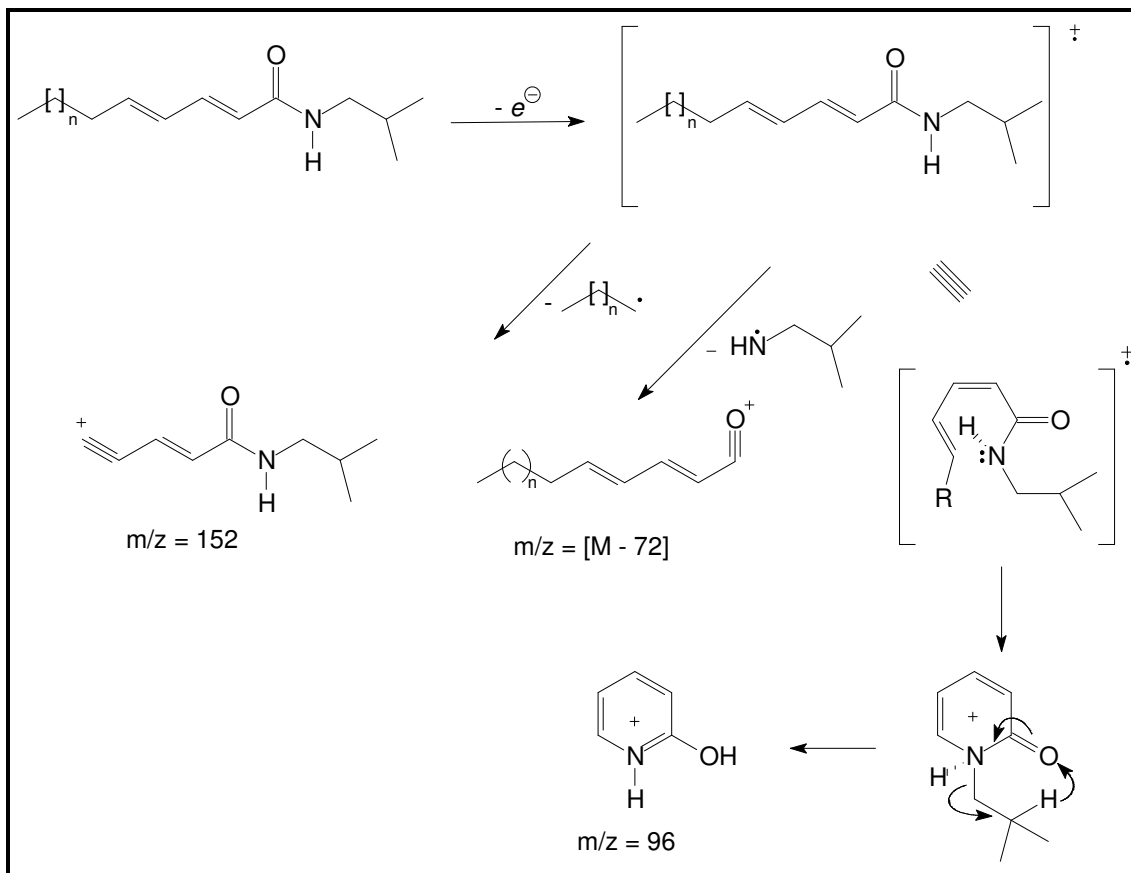


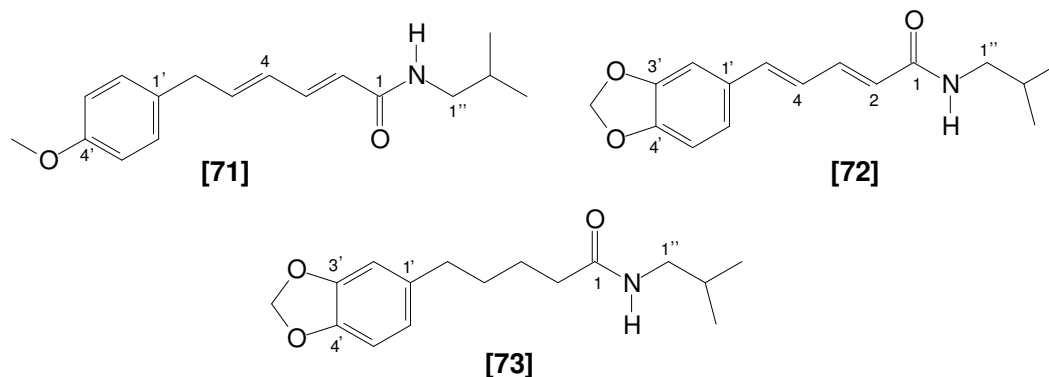
Figura I.38 – Principais fragmentações apresentadas no EM para as isobutilamidas.

Tabela I.4. Dados de RMN de ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] das substâncias [63], [64], [65], [66] e [70], e de RMN de ^1H para a substância [64]; comparados com dados da literatura para substâncias correspondentes

C	[63]	[63] [†]	[64]		Pelitorina ^{&}		[65]	[65] [†]	[66]	[66] ^{††}	[67]	[68]	[69]	[70]
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	166,4	166,4	-	166,4	-	166,4	166,4	166,5	166,4	166,4	166,4	166,4	166,4	166,4
2	121,6	121,8	5,75 d (15,0)	121,6	5,76 d (15,0)	121,8	121,6	121,8	121,6	121,7	121,7	121,7	121,7	121,7
3	141,4	141,3	6,13 - 6,07 m	141,4	6,12 dt (13,1; 7,0)	141,3	141,4	141,1	141,4	141,2	141,2	141,2	141,2	141,2
4	128,1	128,4	6,13 - 6,07 m	128,1	6,10 dd (13,1; 10,0)	128,2	128,1	128,2	128,1	128,2	128,2	128,2	128,2	128,2
5	143,2	142,9	7,19 dd (15,0; 10,0)	143,3	7,19 dd (15,0; 10,0)	143,2	143,2	143,0	143,2	143,1	143,1	143,1	143,1	143,1
6	35,2	35,0	2,14 m	32,9	2,14 dd (6,8; 7,3)	32,9	32,9	32,9	32,9	32,9	32,9- 28,5	32,9- 28,5	32,9- 28,5	32,9- 28,5
7	22,2	22,0	1,42 ni [#]	28,5	1,42 quint (7,1)	28,5	28,5	28,7	28,5	28,8				
8	13,9	13,70	1,30 ni	31,4	1,30 m	31,4	28,6	28,8	29,0	29,0				
9	-	-	1,30 ni	22,5	1,30 m	22,5	31,4	31,6	29,3	29,1				
10	-	-	0,89 ni	14,0	0,89 t (6,9)	14,0	22,5	22,5	31,8	31,7				
11	-	-	-	-	-	-	14,0	14,0	22,5	22,6				
12	-	-	-	-	-	-	-	-	14,0	14,0	22,5			
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,0	22,5		
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,0		
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,5	22,5
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,0	14,0
1'	46,9	46,9	3,17 dd (6,8; 6,2)	46,9	3,16 t (6,5)	46,9	46,9	46,9	46,9	46,9	46,9	46,9	46,9	46,9
2'	28,6	28,6	1,80 m	28,6	1,80 m	28,6	28,6	28,5	28,5	28,6	28,6	28,6	28,6	28,6
3'/4'	20,1	20,1	0,93 d (6,6)	20,1	0,92 d (6,7)	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1
-NH		-	5,51 sl	-	5,60 sl	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[†] SANTOS & CHAVES, 1999; equipamento de RMN de 100 MHz. [&] LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1987, [#] ni – não identificado por está muito alargado esta região do espectro. [†] PLOBECK & BACKVALL, 1991. ^{††} MATOVIC *et al.*, 2011.

I. 3.3.10 Identificação das substâncias piperovatina [71], piperlonguminina [72] e tetra-hidropiperlonguminina [73]



A interpretação dos espectros unidimensionais de RMN ^1H e de ^{13}C , DEPT, IV e CG-EM comparados com os dados obtidos da literatura (RENDÓN *et al.*, 1998; PAULA, 1999; DWUMA-BADU *et al.*, 1976) permitiu propor as estruturas das piperamidas [71], [72] e [73].

O espectro no IV da fração HJB5-5 (Fig. I.39a, p.77) apresentou uma banda forte de absorção em 3299 cm^{-1} (ν N-H) e absorções em 3077 e 3021 cm^{-1} , referentes a estiramento $=\text{C-H}$ em anéis aromáticos e $=\text{C-H}$ em alquenos respectivamente; 2959 , 2928 , 2899 e 2873 cm^{-1} (ν C-H); 1655 , 1612 , 1548 e 1517 cm^{-1} (ν C=C); uma banda em 1627 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C=O de amida; absorções em 1251 e 1033 cm^{-1} foram atribuídos aos estiramentos das ligações $=\text{C-O-C}$ e C-O respectivamente; e por último foi observado uma forte absorção em 993 cm^{-1} atribuído à deformação angular fora do plano da ligação C-H em alquenos *trans* conjugados com o grupo C=O.

O espectro de RMN de ^1H e ^{13}C da fração HJB5-5 (Figs. I.40a, p.78 e I.41a, p.79) registraram 22 sinais de hidrogênios e 14 sinais de carbono (sendo que os sinais em δ 129,5, 113,9 e 20,1 se encontram dobrados); os sinais observados em δ 7,02, (d, 8,4 Hz) e 6,80 (d, 8,4 Hz) integrados para 2H cada foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H2'/H6' e H3'/H5' (sistema AA'BB'); além desses foi registrado um singlete referente a grupo metoxílico, além de outros sinais referentes a um grupo isobutila que encontram-se atribuídos na Tabela I.5, página 84.

Pela análise do DEPT135 (Fig. I.42a, p.80) foi possível verificar a presença de 3 carbonos não hidrogenados, 9 carbonos metínicos, 2 carbonos metilênicos, 1 metoxila e 2 carbonos metílicos (Tab. I.5, p. 84). O cromatograma adquirido em CG-EM juntamente com o espectro de massas (Fig. I.43a e I.43a', p.81) permitiu verificar o grau de pureza da substância bem como registrar sua massa molecular, pela observação do íon molecular em m/z 273, que nos permitiu juntamente com os dados discutidos anteriormente propor a

fórmula molecular $C_{17}H_{23}NO_2$ pertencente a piperovatina - (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-6-(4'-metoxifenil)hexa-2,4-dienamida [71]; seus principais fragmentos gerados a 70 eV estão mostrados na figura I.46, página 83. Sua massa molecular observada em equipamento de alta resolução operando em modo ESI negativo foi de 272,1633 com erro experimental de 1,7 ppm, comprovando a FM anteriormente proposta.

Para a fração HJB52-5 foi possível observar através da RMN de 1H (Fig. I.40b, p.78) sinais referentes ao grupamento metilenodióxido (δ 5,95, s), além de outros sinais similares ao da substância [71] (tab. I.5, p.84). Nesta mesma tabela estão os dados referentes aos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (Fig. I.41b, p.79) e suas atribuições. Por comparação com os dados encontrados na literatura (PAULA, 1999) foi possível identificar a piperlonguminina - (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-5-(3',4'-metilenodioxifenil)-penta-2,4-dienamida [72] cuja massa molecular foi confirmada no seu espectro de massas (Fig. I.43b', p.81). O íon molecular em m/z 273 está em acordo com a fórmula molecular $C_{16}H_{19}NO_3$ e seus principais fragmentos gerados a 70 eV estão apresentados na figura I.46, página 83.

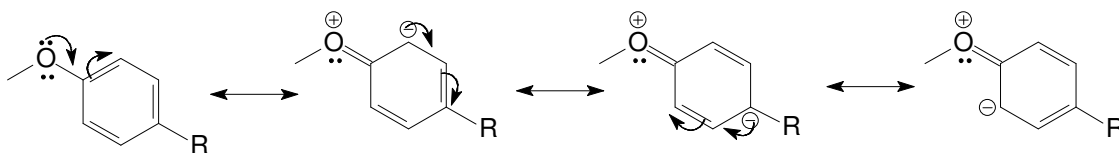
A fração HJB10-4 apresentou-se como um sólido branco, cujo ponto de fusão encontrado foi de 56 - 57 °C. Certa similaridade é observada entre o espectro no IV desta fração (Fig. I.39b, p.77) quando comparado ao da piperovatina [71] (Fig. I.39a, p.77), porém observa-se que as absorções referentes aos estiramentos e a deformação angular fora do plano para o sistema (-CH=CH-CH=CH-C=O) não mais são observadas. Além disso, a absorção para a carbonila da amida (1642 cm^{-1}) sofre um aumento considerável na frequência quando comparado com a carbonila da substância [71] (1627 cm^{-1}). Isso ocorre devido ao fortalecimento da ligação C=O, pois não ocorre mais deslocalização eletrônica (ressonância).

Os dados de RMN de 1H (Fig. I.30c, p.78) aliados à integração dos sinais da fração HJB10-4 permitiram identificar o padrão de substituição do anel aromático AMX (dois dubletos, um em δ 6,70 (7,8 Hz, H5') e outro em δ 6,64 (0,9 Hz, H2') integrados para um átomo de hidrogênio cada, e um dd em δ 6,59 com $J = 7,8$ e $0,9$ Hz foi atribuído a H6'); bem como constatar a presença de outros sinais similares as substâncias [71] e [72] (Tab. I.5, p.84).

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. I.41c, p.79) e do DEPT135 (Fig. I.42b, p.80) foi possível constatar a presença de 4 carbonos não hidrogenados, 4 carbonos metínicos, 6 carbonos metilênicos e 2 carbonos metílicos (Tab. I.5, p.84). Pela análise por CG-EM-IE (Fig. I.44a e a', p.82) pode-se verificar o íon molecular em m/z 277, que juntamente com as informações relatadas anteriormente nos levou a propor a fórmula molecular $C_{16}H_{23}NO_3$, coerente com a massa de alta resolução encontrada em modo ESI negativo, 276,1573 com erro experimental de 2,7 ppm. A formação dos principais fragmentos de massas gerados utilizando impacto de elétron a 70 eV é mostrado na figura

I.45 - página 82, referentes á tetra-hidropiperlonguminina - *N*-isobutil-5-(3',4'-metilendioxfenil)pentanamida [73].

Com a elucidação estrutural dessas três piperamidas observa-se que carbonos β e δ em amidas α , β , γ , δ insaturadas estão desblindados pelo efeito de ressonância (C3 e C5 nas estruturas [71] e [72] (Tab. I.5, p.84). Da mesma forma, esta deslocalização de carga pela ligação dupla torna o carbono da carbonila menos deficiente em elétrons, isto faz com que ela fique mais protegida, por exemplo δ_C para as carbonilas de [71] e [72] ocorrem em δ 166,2 e 166,1 respectivamente, enquanto que em [73] é de δ 172,8, ou seja, ocorre uma proteção para a carbonila de 6,6 a 6,7 ppm. Já para δ_C em anéis aromáticos com o grupo metoxila como substituinte na posição *para* temos o efeito de ressonância como principal fator, conforme representado abaixo:



Logo, para a substância [71] a presença do grupo metoxila na posição *para* ocorre uma proteção nos carbonos *orto* e *para* em relação a este grupo (carbonos C2'/C6' e C3'/C5' (Tab. I.5, p.84).

Cabe ainda ressaltar que dessas três piperamidas a piperovantina [71] tem sido isolada de várias espécies do gênero *Piper* tais como: *P. scutifolium* (MARQUES *et al.*, 2007), *P. ovatum* (SILVA *et al.*, 2008), *P. alatabaccum* (FACUNDO *et al.*, 2005), *P. piscatorum* (MCFERREN *et al.*, 2002), *P. callosum* (PRING 1982); *P. corcovadensis* (FACUNDO *et al.*, 2004), *P. vahlii* (PRICE & PINDER 1970), *P. propinqua* (ANTUNES *et al.*, 2001) e *P. martiana* (CUNICO *et al.*, 2006); e apresentado algumas atividades biológicas: piscicida (MCFERREN & RODRIGUEZ 1998), antifúngica (MARQUES *et al.*, 2007), anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2008), alelopática e antibacteriana (CUNICO *et al.*, 2006); já a piperlonguminina [72] foi isolada anteriormente das seguintes espécies de *Piper*: *P. scutifolium* (MARQUES *et al.*, 2007), *P. ovatum* (SILVA *et al.*, 2008), *P. longum* (DAS *et al.*, 1997), *P. acutisleginum*, *betle*, *klasiana* e *pedicellosum* (PARMAR *et al.*, 1998), *P. amalago* (ACHENBACH *et al.*, 1986), *P. attenuatum* (DASGUPTA & RAY 1979), *P. chaba* (PATRA & GHOSH 1974; MORIKAWA *et al.*, 2004), *P. guineense* (OKOGUM & EKUNG 1974), *P. hancei* (NARUI *et al.*, 1995), *P. nepalense* (GUPTA *et al.*, 1972), *P. novae hollandiae* (LODER *et al.*, 1969), e *P. sylvaticum* (MAHANTA *et al.*, 1974); *P. corcovadensis* (COSTA & MORS 1981) e *P. martiana* (PARMAR *et al.*, 1997); e tem mostrado importantes atividades

biológicas como antifúngica (MARQUES *et al.*, 2007), antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2009), anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2008), hepatoprotetora (MATSUDA *et al.*, 2008), gastroprotetora (MORIKAWA *et al.*, 2004), estimulação na produção de melanócitos (VENKATASAMY *et al.*, 2004) e antihiperlipidêmica (JIN *et al.*, 2009) está comparável ao efeito da sinvastatina – droga utilizada no auxílio do controle do colesterol. No caso da tetra-hidropiperlonguminina [73] esta sendo relatada pela primeira vez como componente do metabolismo de plantas. Porém cabe destacar que a mesma foi sintetizada em 1976 por DWUMA-BADU *et al.*, através da redução da $\Delta^{\alpha\beta}$ -diidropiperlonguminina ([74], p.85).

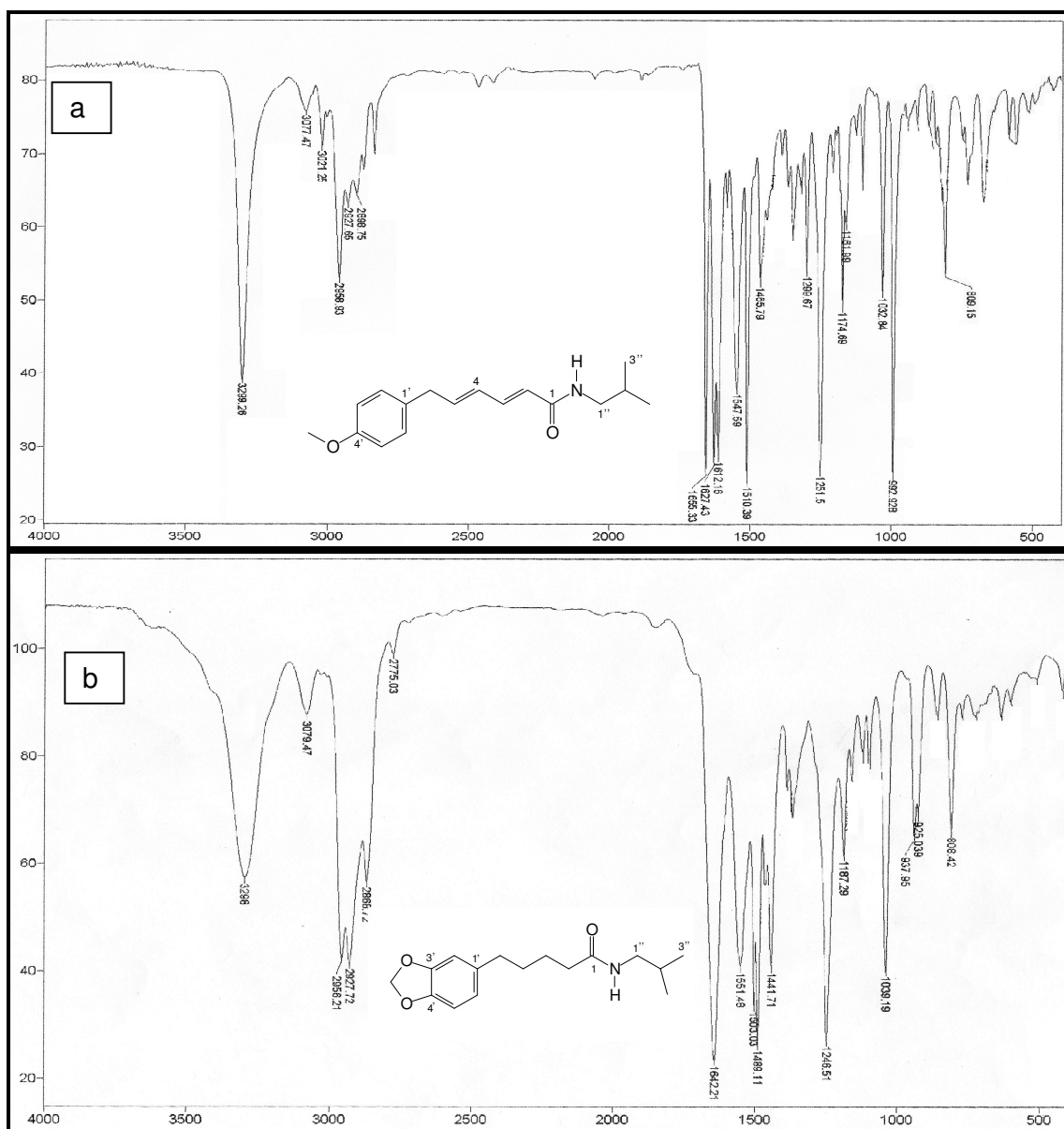


Figura I.39 – Espectro no IV das frações **HJB5-5** (a) e **HJB10-4** (b) em pastilha de KBr.

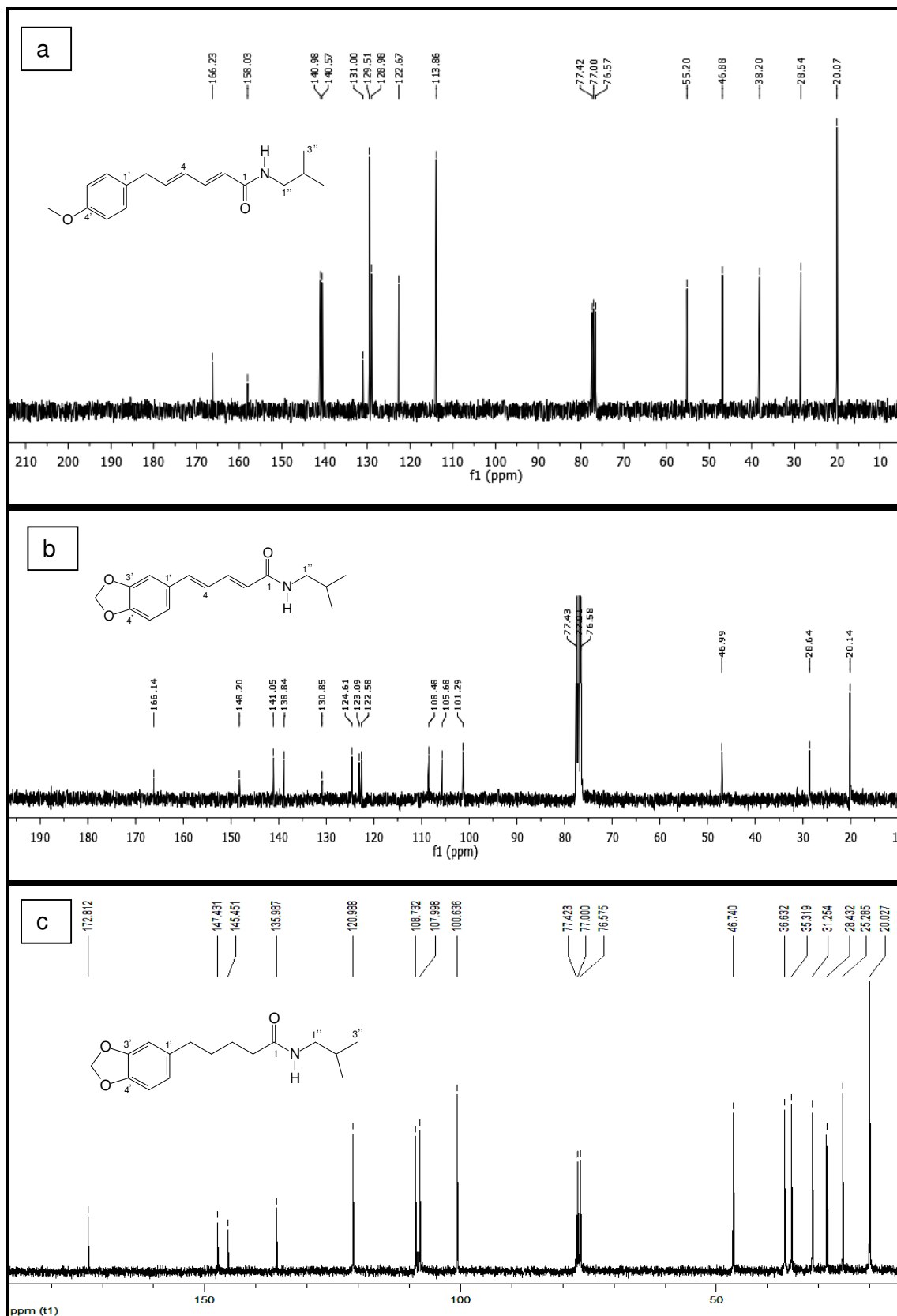


Figura I.41 – Espectros de RMN de ^{13}C das substâncias [71] (a), [72] (b) e [73] (c) [CDCl_3 , δ (ppm) – 75 MHz].

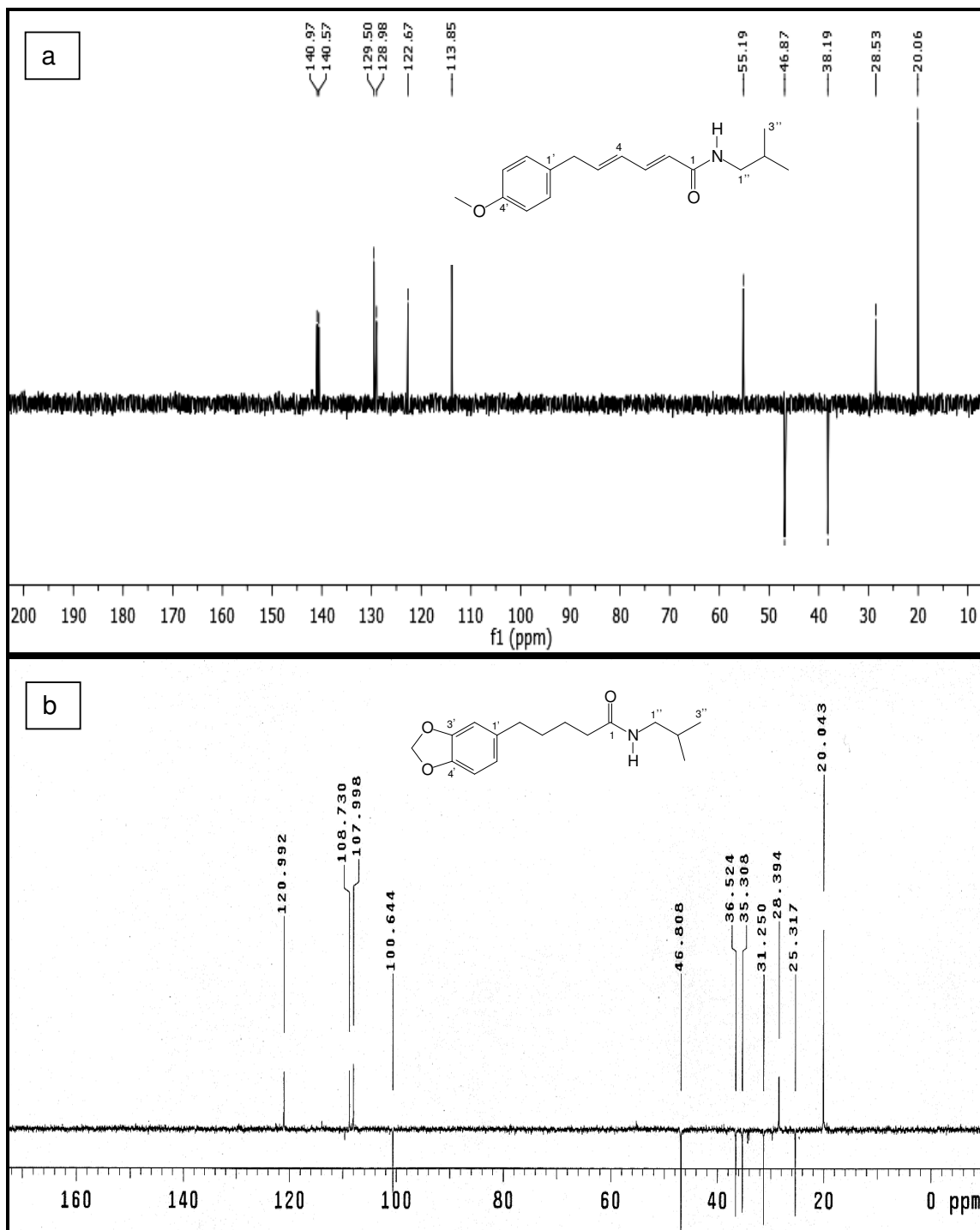


Figura I.42 – Espectro de DEPT 135 das substâncias [71] (a) e [73] (b) [CDCl_3 , δ (ppm)].

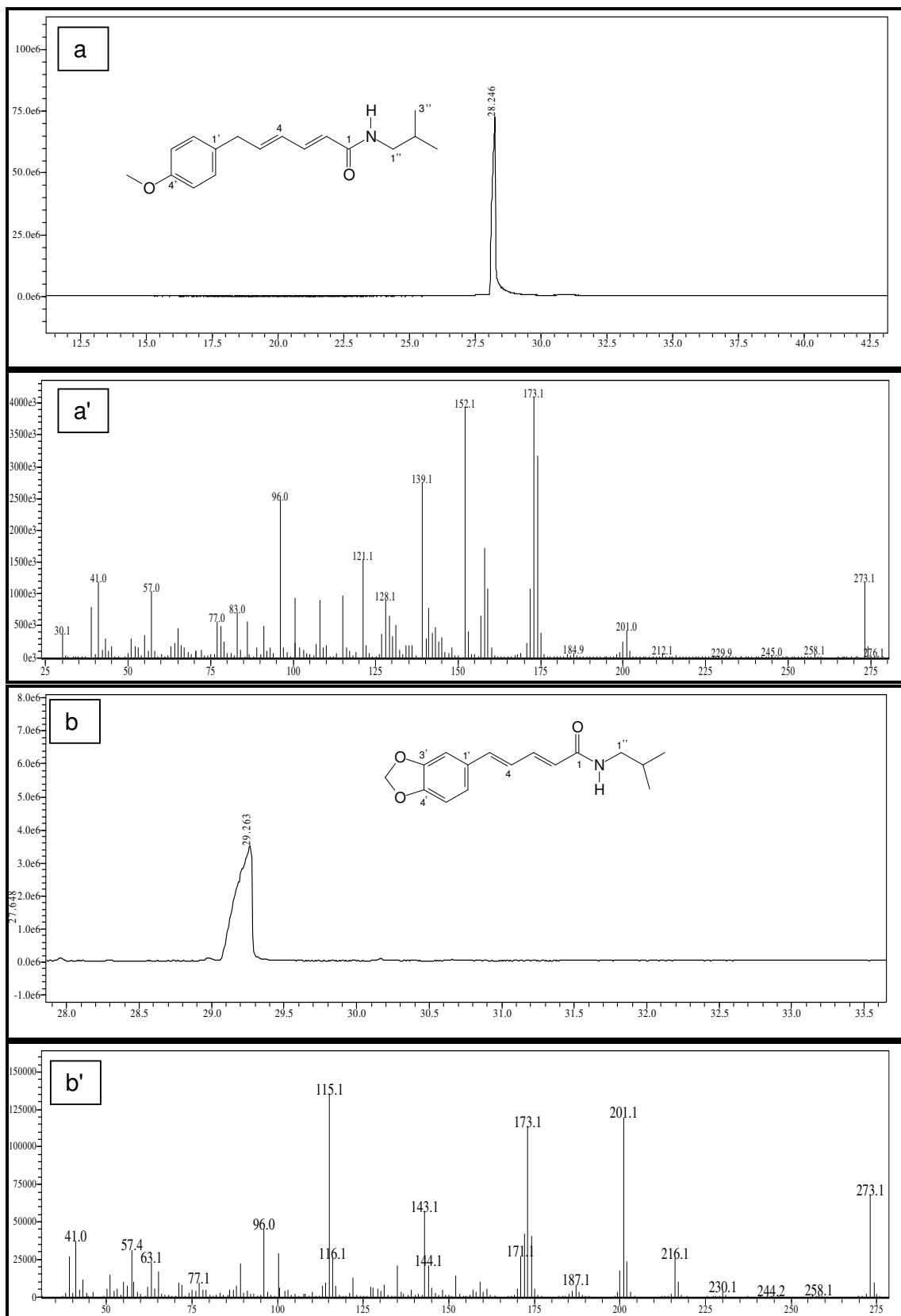


Figura I.43 – Cromatogramas adquirido no CG-EM e espectros de massas das substâncias [71] (a e a') e [72] (b e b').

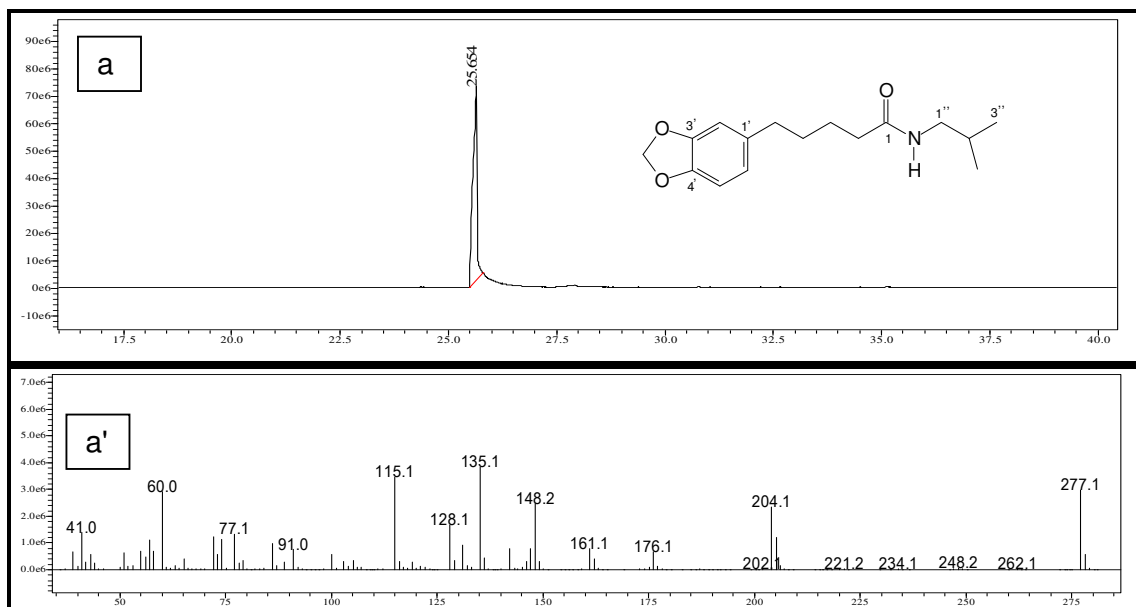


Figura I.44 – Cromatograma adquirido no CG-EM e espectro de massas da substância [73] (a) e (a').

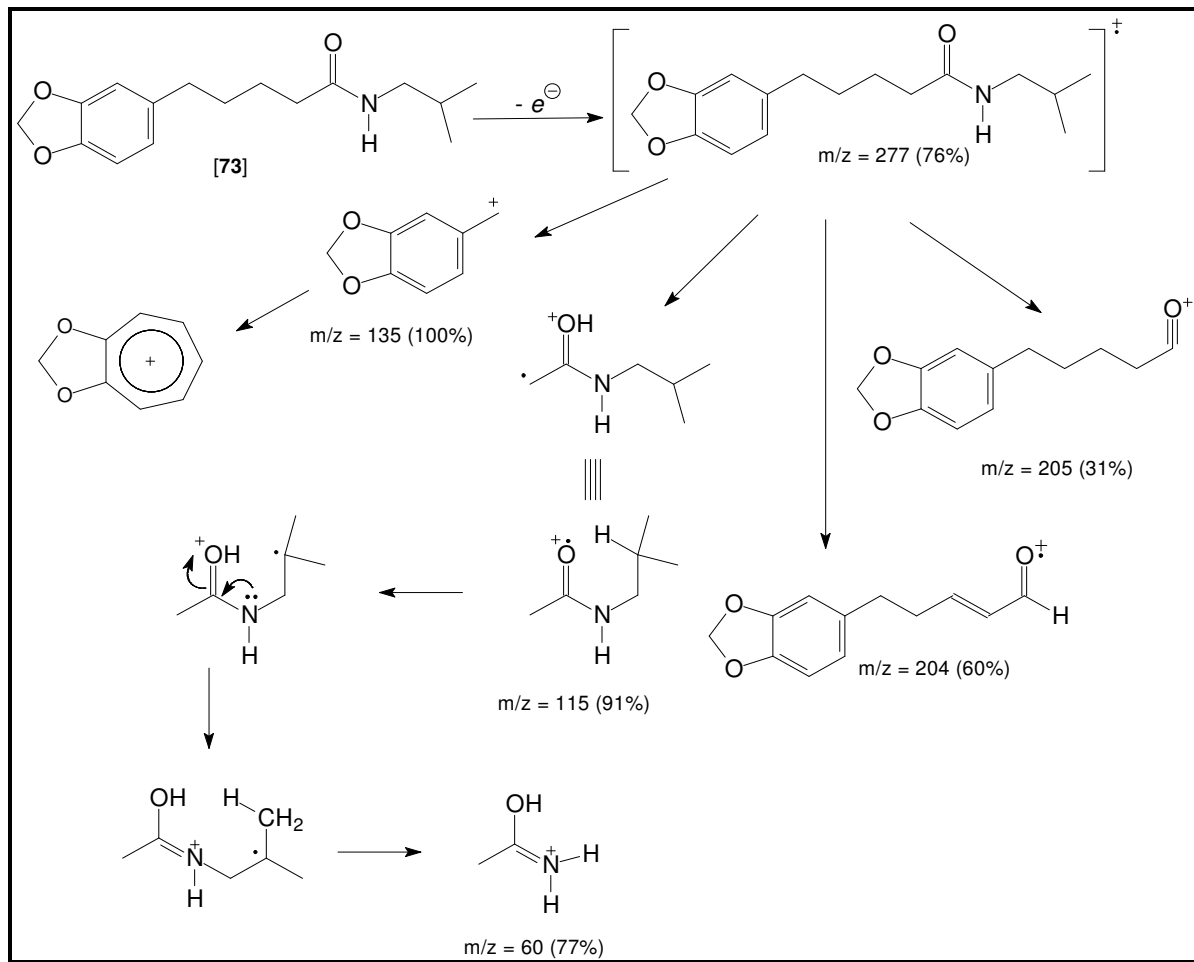


Figura I.45 – Principais fragmentações apresentadas no EM-IE para a substância [73].

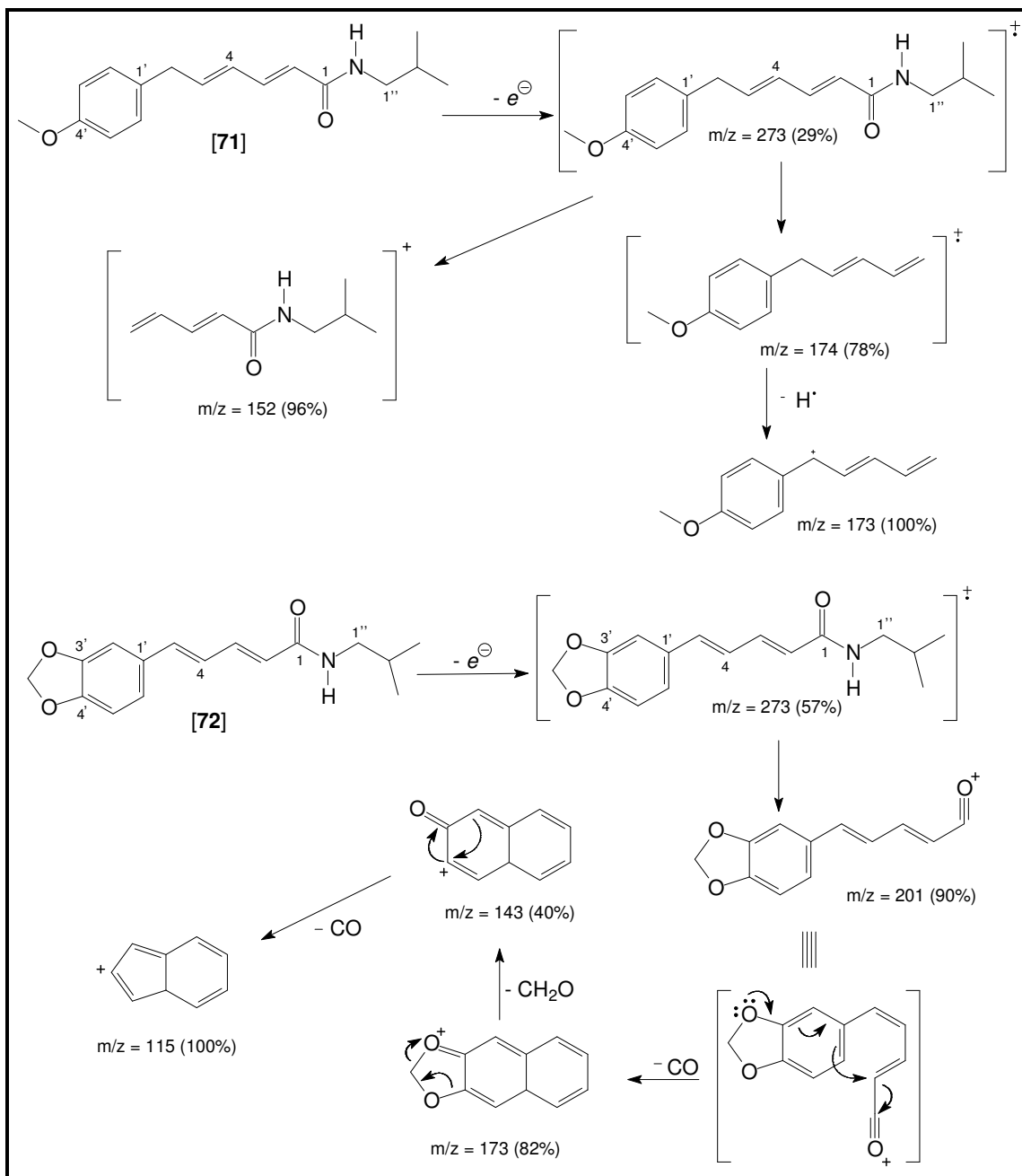


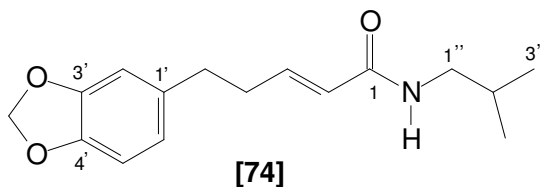
Figura I.46 – Principais fragmentações apresentadas no EM-IE para as substâncias [71] e [72].

Tabela I.5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ C e H (ppm), J (Hz)] de [71], [72] e [73]

C	[71]		Piperovatina [*]		[72]		Piperlonguminina ^{&}		[73]		Tetrahidropiper longuminina [#]
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	-	166,2	-	166,2	-	166,1	-	166,2	-	172,8	-
2	5,78 d (15,0)	122,7	5,78 d (14,9)	122,7	5,96 d (15,0)	123,1	5,94 d (15,0)	123,3	2,19 t (7,2)	31,3	•
3	7,14 dd (15,0; 9,8)	140,6	7,21 dd (14,9; 10,0)	140,6	7,36 dd (15,0; 10,6)	141,0	7,36 dd (15,0; 9,7)	141,0	1,65 m	25,3	•
4	6,09 dd (15,0; 9,8)	129,0	6,12 dd (15,2; 10,0)	129,0	6,66 dd (15,6; 10,6)	124,6	6,65 dd (15,0; 9,7)	124,7	1,65 m	35,3	•
5	6,04 – 6,21 m	141,0	6,20 dt (15,2; 6,6)	140,9	6,79 d (15,6)	138,8	6,77 d (15,0)	138,8	2,56 dd (7,2; 6,9)	36,6	•
6	3,38 d (5,7)	38,2	3,42 d (6,6)	38,2	-	-	-	-	-	-	-
1'	-	131,0	-	131,1	-	130,9	-	130,9	-	136,0	-
2'	7,02 d (8,7)	129,5	7,08 d (8,3)	129,5	6,98 d (1,8)	105,7	6,96 d (1,6)	105,7	6,66 d (0,9)	108,7	6,60 s
3'	6,80 d (8,7)	113,9	6,84 d (8,3)	113,9	-	148,2	-	148,2	-	147,4	-
4'	-	158,0	-	158,1	-	148,2	-	148,2	-	145,4	-
5'	6,80 d (8,7)	113,9	6,84 d (8,3)	113,9	6,78 d (7,8)	108,5	6,76 d (8,0)	108,5	6,71 d (7,8)	108,0	6,60 s
6'	7,02 d (8,7)	129,5	7,07 d (8,3)	129,5	6,89 dd (7,8; 1,8)	122,6	6,88, dd (8,0; 1,6)	122,6	6,61 dd (7,8; 0,9)	121,0	6,60 s
1''	3,08 d (6,9)	46,9	3,16 dd (6,7; 6,1)	46,9	3,20 dd (6,9; 6,0)	47,0	3,22 dd (6,7; 6,3)	47,0	3,08 dd, (6,9; 6,0)	46,7	2,99 t, 7,0
2''	1,75 noneto (6,0)	28,5	1,79 noneto (6,7)	28,6	1,80 m	28,6	1,82 m	28,7	1,75 m	28,4	•
3'' e 4''	0,87 d (6,6)	20,1	0,92 d (6,7)	20,1	0,95 d (6,6)	20,1	0,94 d (6,7)	20,2	0,89 d (6,6)	20,0	0,87 d, 6,0
OCH ₂ O	-	-	-	-	5,98 s	101,3	5,97 s	101,3	5,89 s	100,8	5,85 s
OCH ₃	3,90 s	55,2	3,90 s	55,2	-	-	-	-	-	-	-
NH	-	-	5,49 sl	-	5,45 sl	-	5,71 tl	-	5,43 sl	-	-

* RENDÓN *et al.*, 1998, adquirido em 300 e 75 MHz ; & PAULA, 1999 adquirido em 200 e 50 MHz # DWUMA-BADU *et al.*, 1976, adquirido em 60 MHz (todos em CDCl_3) • δ_{H} 1,59 – 2,48 corresponde a um multiplete integrado para 9 H.

I.3.3.11 Elucidação estrutural da mistura das piperamidas: piperovatina [71], piperlonguminina [72], tetra-hidropiperlonguminina [73] e 4,5-dihidropiperlonguminina [74]



Da fração DJB31-4 foi obtido um sólido branco. A análise dos seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Fig. I.47, p.86 e Fig I.49, p.87), bem como do cromatograma adquirido por CG-EM-IE (Fig. I.50, p.88) indicou tratar-se de uma mistura de piperamidas.

Comparando-se o espectro de RMN de ^1H (Fig. I.47, p.86) com os apresentados pelas 3 piperamidas já elucidadas [71], [72] e [73] (Fig. I.40, p.78), pode-se verificar algumas diferenças tais como presença de um sinal em δ 5,90 atribuído ao grupo metilenodióxido, de um dubleto ($J = 6,6$ Hz) atribuído às metilas do grupo isopropila em δ 0,90, de um duplete em δ 5,81 ($J = 15$ Hz) atribuído a H2, de um multiplete em δ 3,14 atribuído aos hidrogênios H1'', de um dd em δ 2,66 ($J = 8,1$ e 6,9 Hz) atribuído a H5, de um multiplete em δ 2,43, atribuído à H4, além dos sinais na região de δ 6,55 – 6,95. Uma análise minuciosa nos deslocamentos químicos dos átomos de ^{13}C (Tab. I.6, p.89) nos levou concluir que nesta mistura além das três piperamidas relatadas anteriormente (estruturas [71], [72] e [73]) existia outra piperamida [74], que foi elucidada com base em seus deslocamentos químicos de ^{13}C comparados aos encontrados na literatura (Tab. I.6, p.89).

Os fragmentos gerados no espectrômetro de massas para os picos majoritários foram de grande valia para a confirmação das quatro piperamidas (Fig. I.51, p.88). Para os fragmentos gerados a partir do pico com tempo de retenção em 25,95 minutos referentes à substância 4,5-dihidropiperlonguminina [74] encontrou-se como principal fragmento o íon molecular em m/z 135 (100 %), valor este que está em acordo com o relatado por DWUMA-BADU *et al.* (1976) para esta substância. Os principais fragmentos gerados são mostrados na figura I.48, página 86.

A substância 4,5-dihidropiperlonguminina [74] foi previamente isolada de *Piper guineense* (DWUMA-BADU *et al.* 1976), *P. tuberculatum* (NAVICKIENE *et al.*, 2000; BERNARD *et al.*, 1995), *P. longum* (TABUNENG *et al.*, 1983) e *P. chaba* (MATSUDA *et al.*, 2008). Atividades antifúngica (NAVICKIENE *et al.*, 2000) e hepatoprotetora (MATSUDA *et al.*, 2008) foram relatadas para esta substância.

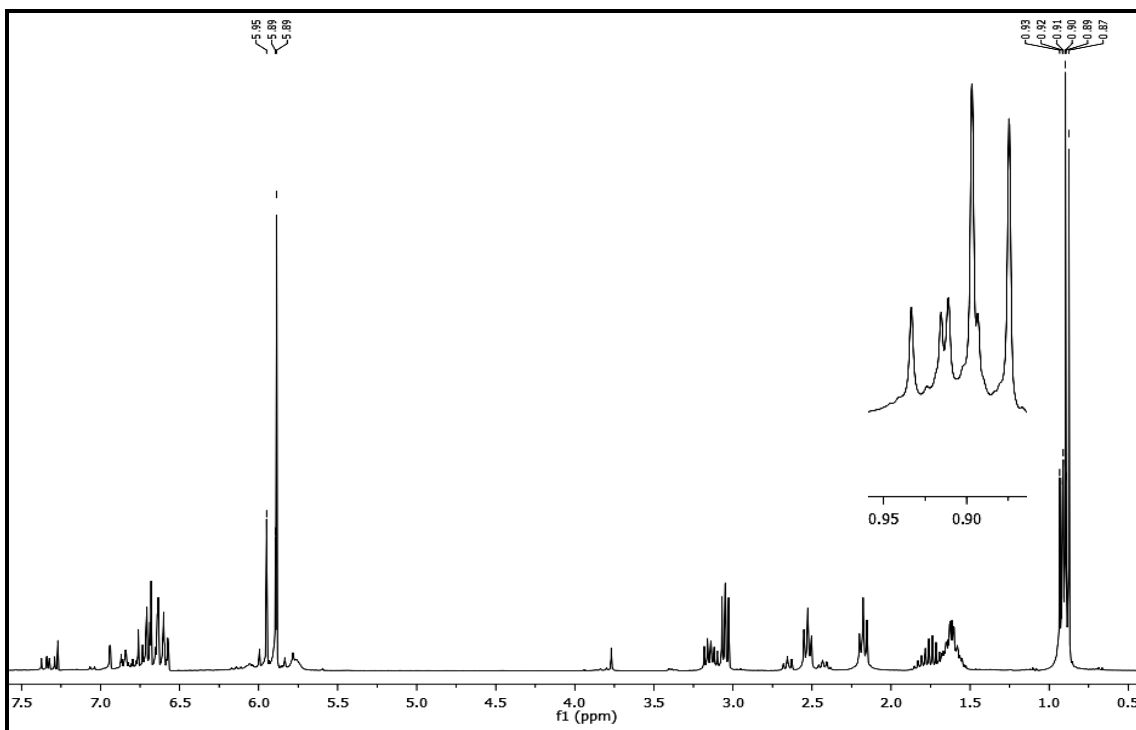


Figura I.47 – Espectro de RMN de ^1H de **DJB31-4** [CDCl_3 , δ (ppm) – 300 MHz].

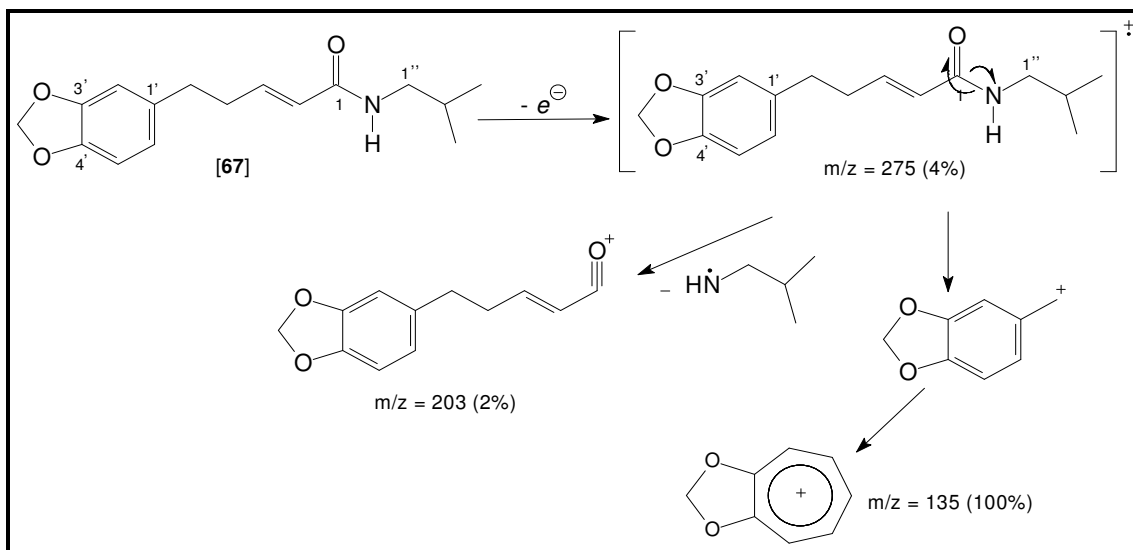


Figura I.48 – Principais fragmentações apresentadas no EM para a substância [74].

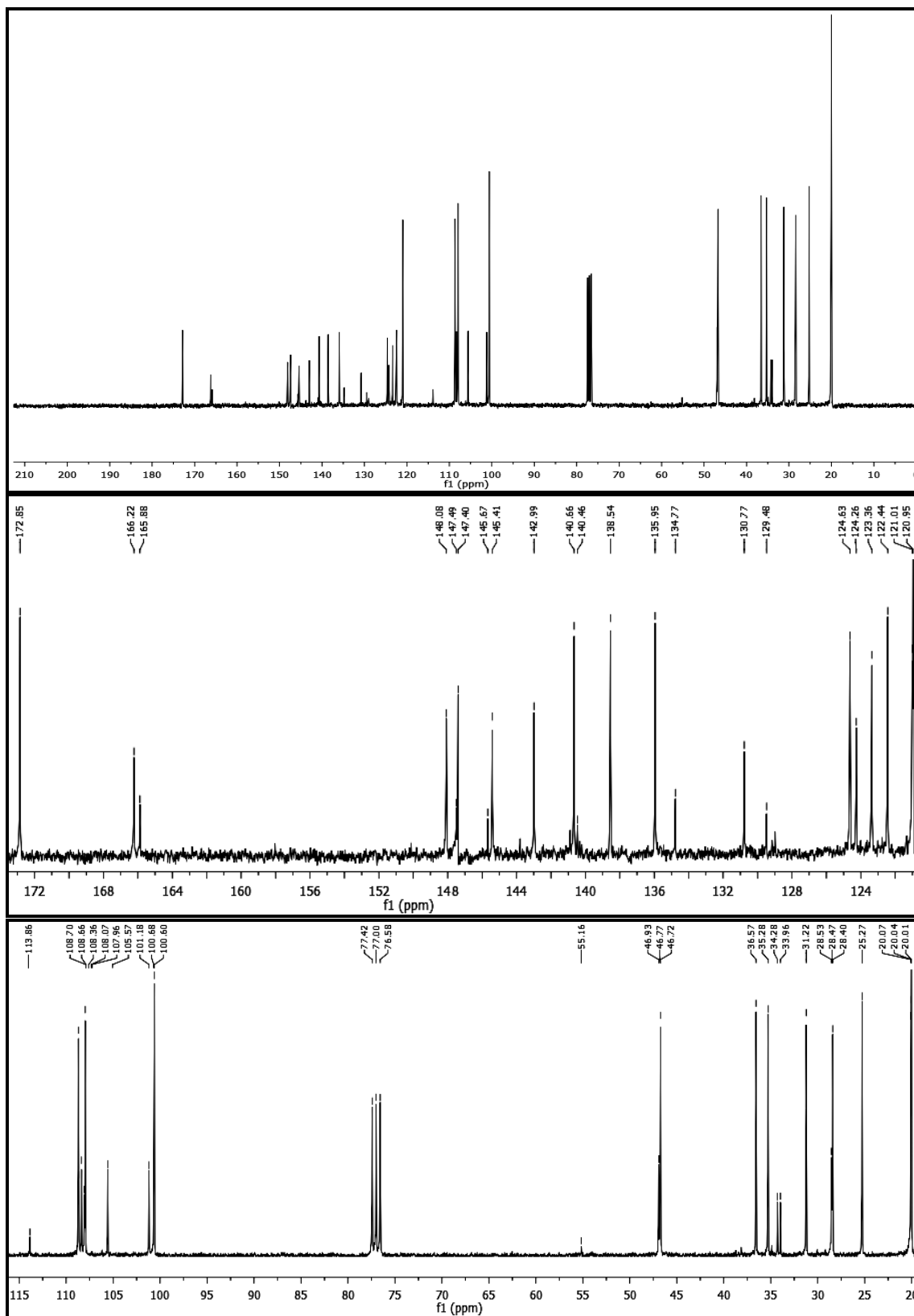


Figura I.49 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração **DJB31-4** com as devidas expansões [CDCl_3 , δ (ppm) – 75 MHz].

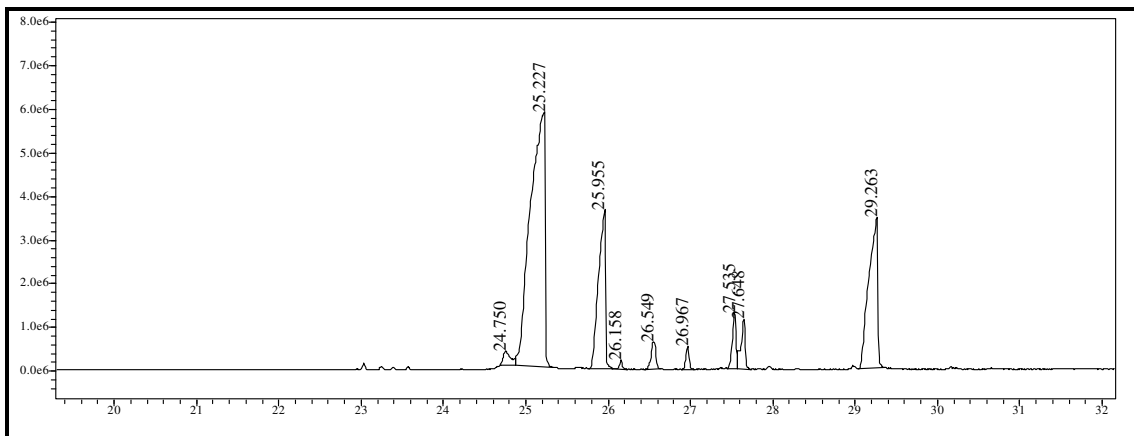


Figura I.50 – Cromatograma adquirido no CG-EM da fração **DJB31-4**.

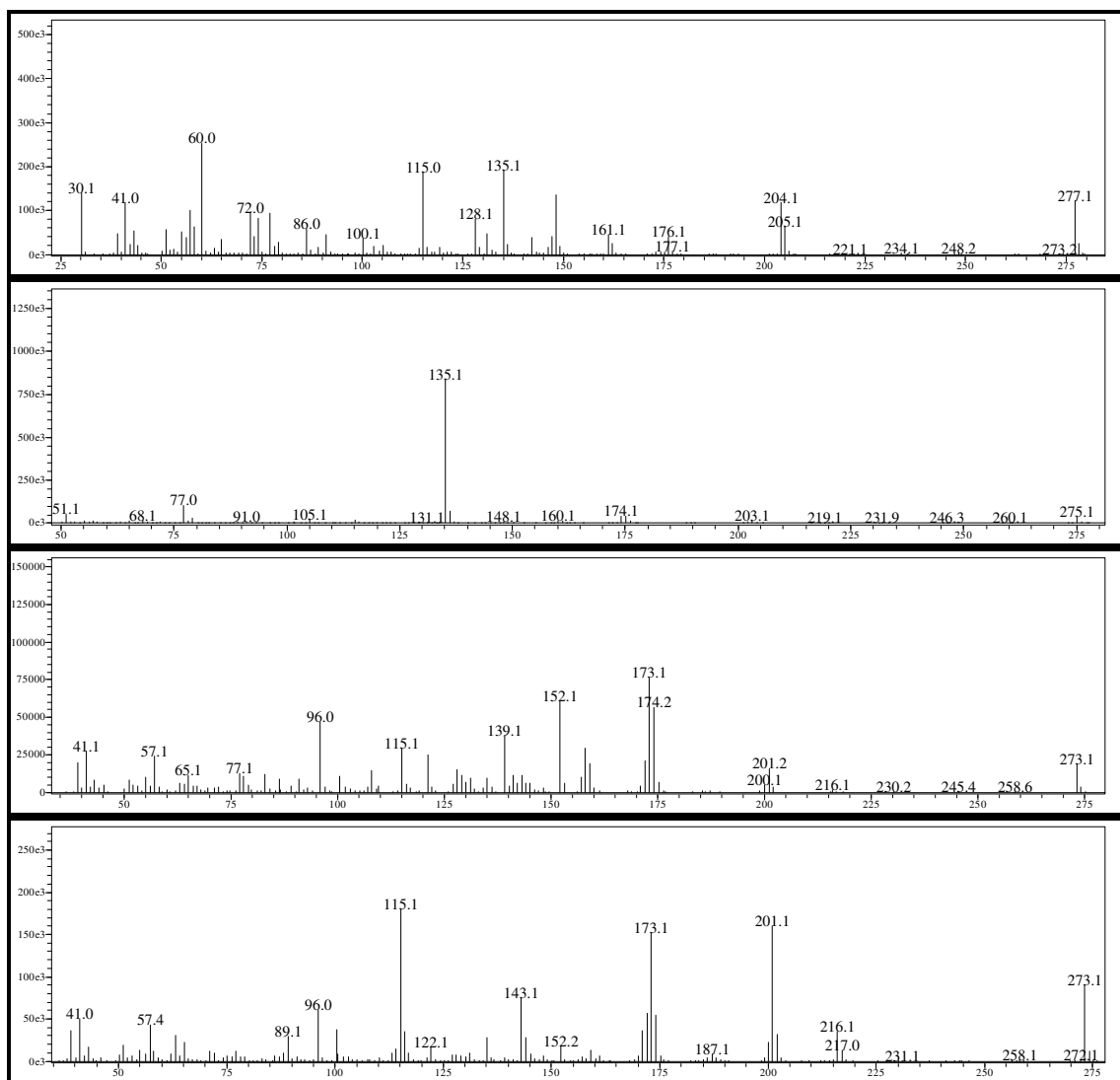


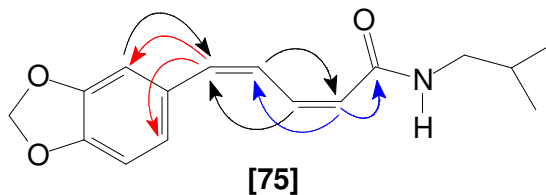
Figura I.51 – Espectros de massas dos picos com Tr = 25,2, 25,9, 27,5 e 29,2 min, correspondentes às substâncias [73], [74], [71] e [72], respectivamente.

Tabela I.6. Dados de RMN de ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ C (ppm)] de [71], [72], [73] e [74]

C	[71]	[72]	[73]	[74]	Di-hidropiperlonguminina^{&}
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	166,2	166,2	172,8	165,9	166.0
2	122,7	123,3	31,2	120,9	120.8
3	140,6	140,7	25,3	143,0	142.6
4	129,0	124,6	35,3	34,0	33.8
5	141,0	138,5	36,6	34,3	34.1
6	38,2	-	-	-	-
1'	131,0	130,8	136,0	134,8	134.6
2'	129,5	105,6	108,7	108,1	107.9
3'	113,9	148,1	147,4	145,7	145.5
4'	158,0	148,1	145,4	147,5	147.5
5'	113,9	108,6	108,0	108,4	108.4
6'	129,5	122,4	121,0	124,3	124.2
1''	46,9	46,9	46,7	46,8	46.7
2''	28,5	28,5	28,4	28,4	28.3
3'' e 4''	20,1	20,1	20,0	20,0	19.9
OCH_2O	-	101,2	100,7	100,6	100,5
OCH_3	55,2	-	-	-	-

[&] NAVICKIENE *et al.*, 2000.

e gHMBC (Fig. I.54, p.94). Estes dados permitiram verificar correlações a três ligações que se encontram apresentadas abaixo:



Cabe ressaltar que os valores de ^{13}C encontrados nesta mistura para a substância [72] foram semelhantes aos relatados anteriormente (Tab. I.5, página 84); além da atribuição do pico com $\text{Tr} = 23,8$ minutos no cromatograma gerado pelo CG-EM (Fig. I.55, p.94).

Um pico com íon molecular em m/z 273 apresentado pelo CG-EM estava sem ser identificado; partiu-se então para as possibilidades estruturais *cis*, *trans* e *trans, cis* para os átomos de hidrogênios ligados aos carbonos $\text{C}2=\text{C}3$ e $\text{C}4=\text{C}5$. Em 2007 MARQUES *et al.*, publicaram a existência dessas duas piperamidas isoladas respectivamente das folhas de *Piper scutifolium* e *P. hoffmanseggianum*. Ao comparar os valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C constatou-se similaridade para a substância Hoffmannseggiamide A [76] (Tab. I.7, p.95), com isso foi proposto a existência dessa molécula nas raízes de *Piper klotzschianum*. Aqui também se observa para a atribuição do H4 um acoplamento a longa distância, ocasionado pela deslocalização eletrônica em sistemas insaturados.

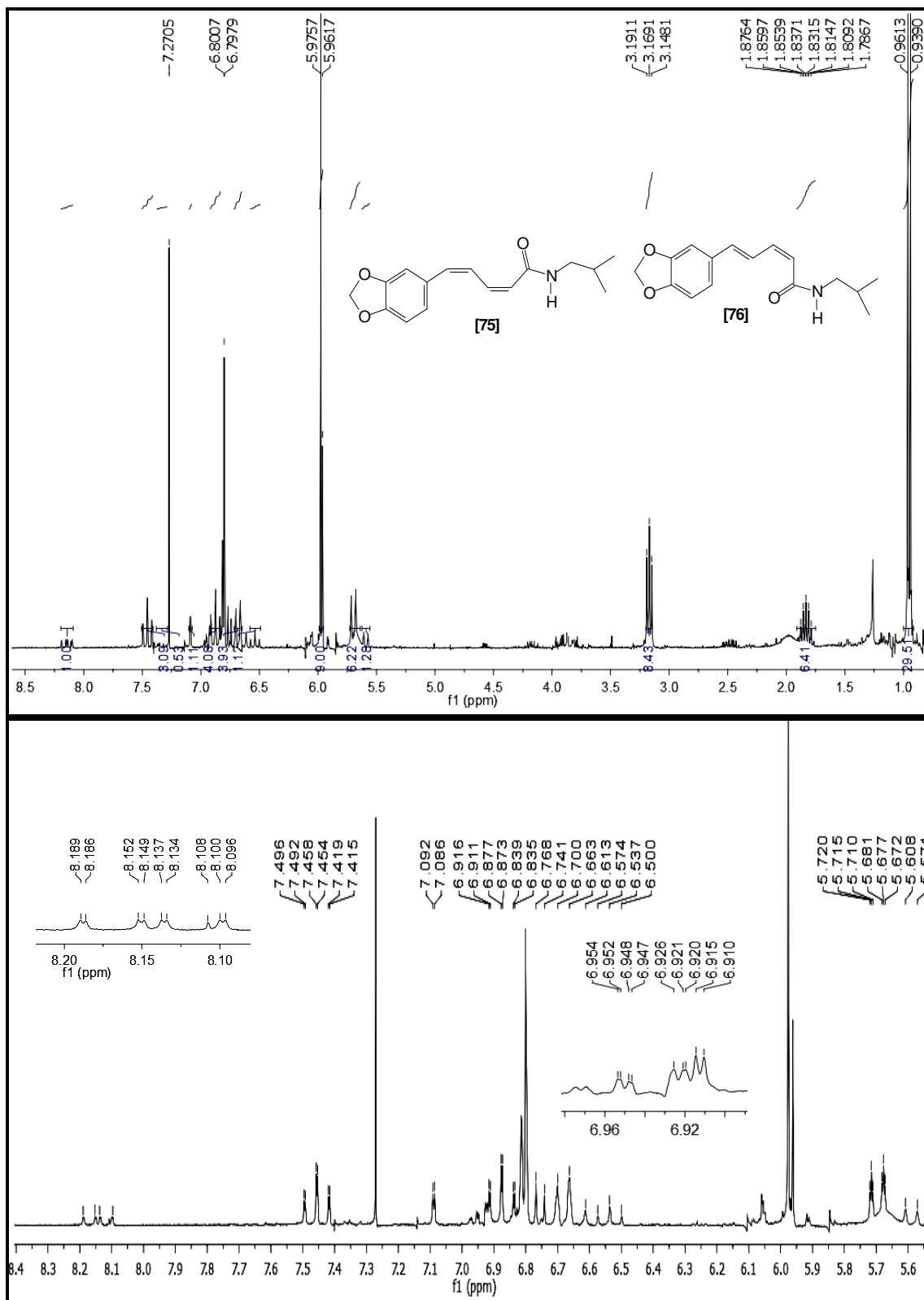


Figura I.52 – Espectro de RMN de ¹H da fração **HJB55-2-9**, com suas devidas expansões [CDCl₃, δ (ppm) – 300 MHz].

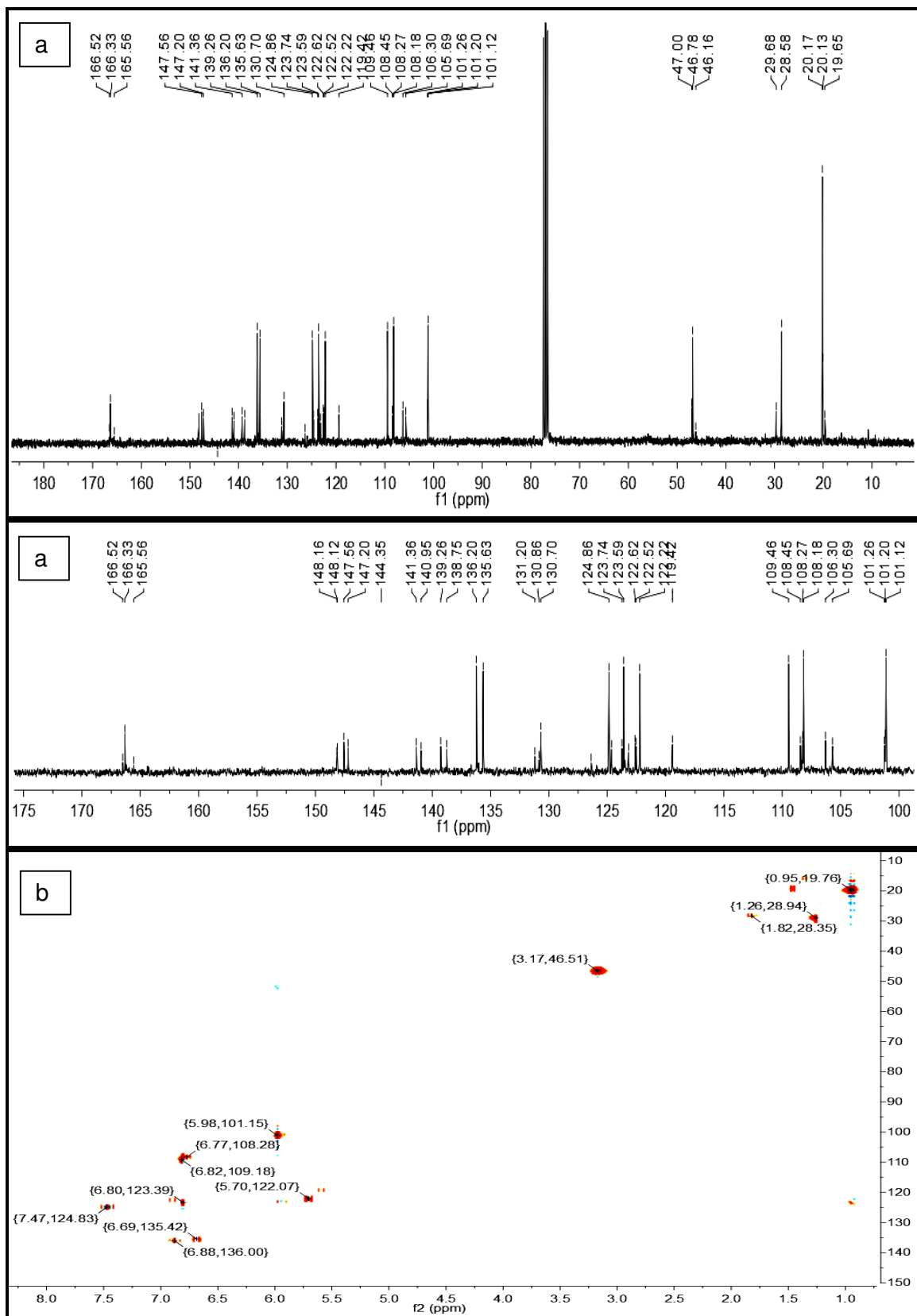
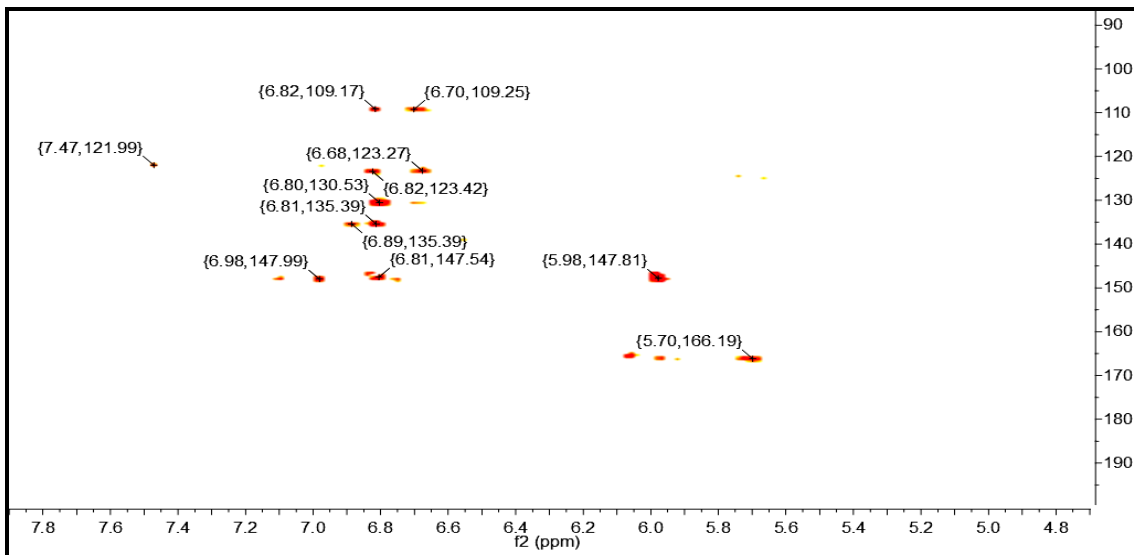


Figura I.53 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração **HJB55-2-9**, com expansão (a) e espectro bidimensional gHMBC (b), [CDCl_3 , δ (ppm) – 75 MHz].



Figural.54 – Espectro bidimensional gHMBC da fração **HJB55-2-9** [CDCl_3 , δ (ppm)].

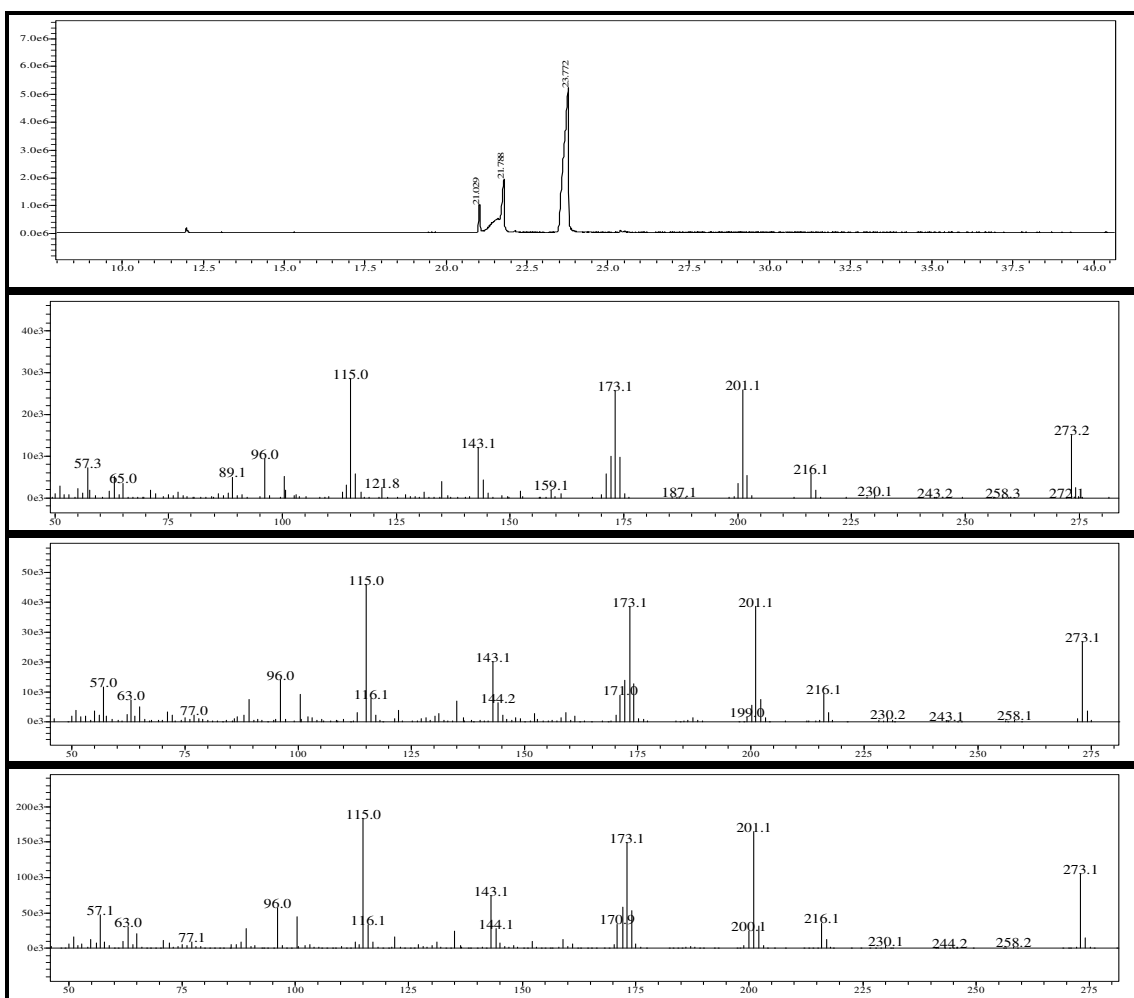


Figura I.55 – Cromatograma e espectros de massas dos picos com $\text{Tr} = 21,0 \text{ min.}$, $21,8 \text{ min.}$ e $23,8 \text{ min.}$ da fração **HJB55-2-9**.

Tabela I.7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ C e H (ppm), J (Hz)] de [72], [75] e [76]

C	[72]	[75]		Isopiperlongu minina ^{&}	[76]		Hoffmannseggiamide A [#]	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	166,3	-	166,3	-	-	165,5	-	165,1
2	123,2	5,70 dt (11,4; 1,4; 1,4)	122,2 QC*	5,69 d (11,0)	5,59 d (11,1)	119,4	5,61 d (11,4)	118,4
3	141,3	6,87 td (11,5; 11,5; 1,2)	136,2 QC	6,85 t (11,0)	6,54 t (11,1)	139,2	6,47 t (11,4)	138,9
4	124,6	7,45 td (11,5; 11,5; 1,2)	124,9 QC	7,45 t (11,0)	8,14 dddd (15,6; 11,1; 1,0)	123,7	8,08 dd (15,8; 11,4)	123,7
5	138,8	6,68 d (11,1)	135,6 QC	6,66 d (11,0)	6,64 d (15,0)	140,9	6,66 d (15,8)	140,5
1'	130,8	-	130,7	-	-	131,2	-	131,2
2'	105,7	6,80 d (0,9)	109,5 QC	6,78 s	7,09 d (1,8)	106,3	7,02 d (1,8)	107,2
3'	148,2	-	147,6 [†]	-	-	147,6	-	147,1
4'	148,2	-	147,2 [†]	-	-	147,6	-	147,0
5'	108,4	6,76 d (8,1)	108,2 QC	6,78 s	6,76 d (8,1)	108,4	6,70 d (7,8)	107,5
6'	122,5	6,80 m	123,6 QC	6,78 s	6,94 dd, (8,1; 1,8)	122,6	6,89 dd (7,8; 1,8)	122,1
1''	47,0	3,17 t (6,6)	46,8 QC	3,16 t (7,0)	3,17 t (6,6)	46,2	3,10 t (6,6)	45,9
2''	28,6	1,83 m	28,6 QC	1,80 m	1,83 m	28,6	1,80 m	28,6
3'' e 4''	20,2	0,95 d (6,9)	20,1 QC	0,95 d (7,0)	0,95 d (6,9)	19,6	0,89 d (6,9)	19,2
OCH ₂ O	101,3	5,97 s	101,2 QC	5,96 s	5,96 s	101,1	5,89 s	100,2
NH	-	5,68 sl	-	5,69 sl	5,68 sl	-	-	-

^{*} Valores confirmados através de HMQC, [†]valores podem está trocados, [&] COSTA & MORS, 1981; equipamento de RMN de 100 MHz. [#] MARQUES *et al.*, 2007.

deslocamentos dos carbonos C3, C4, C5, C6, C7 e C10; essas mudanças foram devido ao maior efeito de proteção (ressonância) da metoxila na posição C5, pois aumenta a nuvem eletrônica do anel aromático protegendo principalmente as posições *orto* a este grupo. Essas observações juntamente com os dados de EM-IE e RMN de ^1H sugere que [77] é o (2*S*,3*S*)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona como um dos componentes presentes na mistura. Outra possibilidade estrutural seria o componente (2*R*,3*R*), porém os valores das constantes de acoplamentos não eram condizentes com os observados.

A estereoquímica relativa de [78] foi determinada pelos valores das constantes de acoplamento observadas para H2 (dq, J = 6,5 e 3,2 Hz) e H3 (dq, J = 7,2 e 3,2 Hz), além disso, os singletos em δ 5,98 e 6,05 indicam que as duas metoxilas estão ligadas aos carbonos C6 e C7; concluindo-se assim que [78] é um isômero constitucional da substância [77]. A determinação da estereoquímica relativa foi comprovada também pela comparação com os valores encontrados para os deslocamentos químicos de ^{13}C referentes aos carbonos C2, C3, 2- CH_3 e 3- CH_3 das duas substâncias (Tab. I.8, p.100). As diferenças observadas podem ser explicadas baseadas na mudança espacial entre o H3 com o grupo CH_3 ligado ao carbono correspondente. Comparando-se [77] e [78], a mudança espacial leva o grupo 3- CH_3 para posição pseudo-axial em mesma região que o grupo 2- CH_3 , faz com que ocorra um efeito γ -*gauche* o que implica em uma maior proteção do grupo 3- CH_3 (δ 9,4 contra 10,8 para a substância [77]). A maior proteção observada para o grupo 2- CH_3 (δ 16,3 contra 19,7 para a substância [77]) também é explicado pelo efeito γ -*gauche* dos grupos metilas em posição *cis* (mesmo lado do plano), além disso, a metila 3- CH_3 está dentro do cone de proteção da carbonila o que justifica ainda mais esta proteção; este fato levou propor a existência na mistura do isômero (2*S*,3*R*)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona [78] ou de seu enantiômero (2*R*,3*S*).

Cabe ressaltar que estas duas cromanonas estão sendo relatadas aqui como sendo inéditas; além de confirmar a grande variabilidade química presente na família Piperaceae.

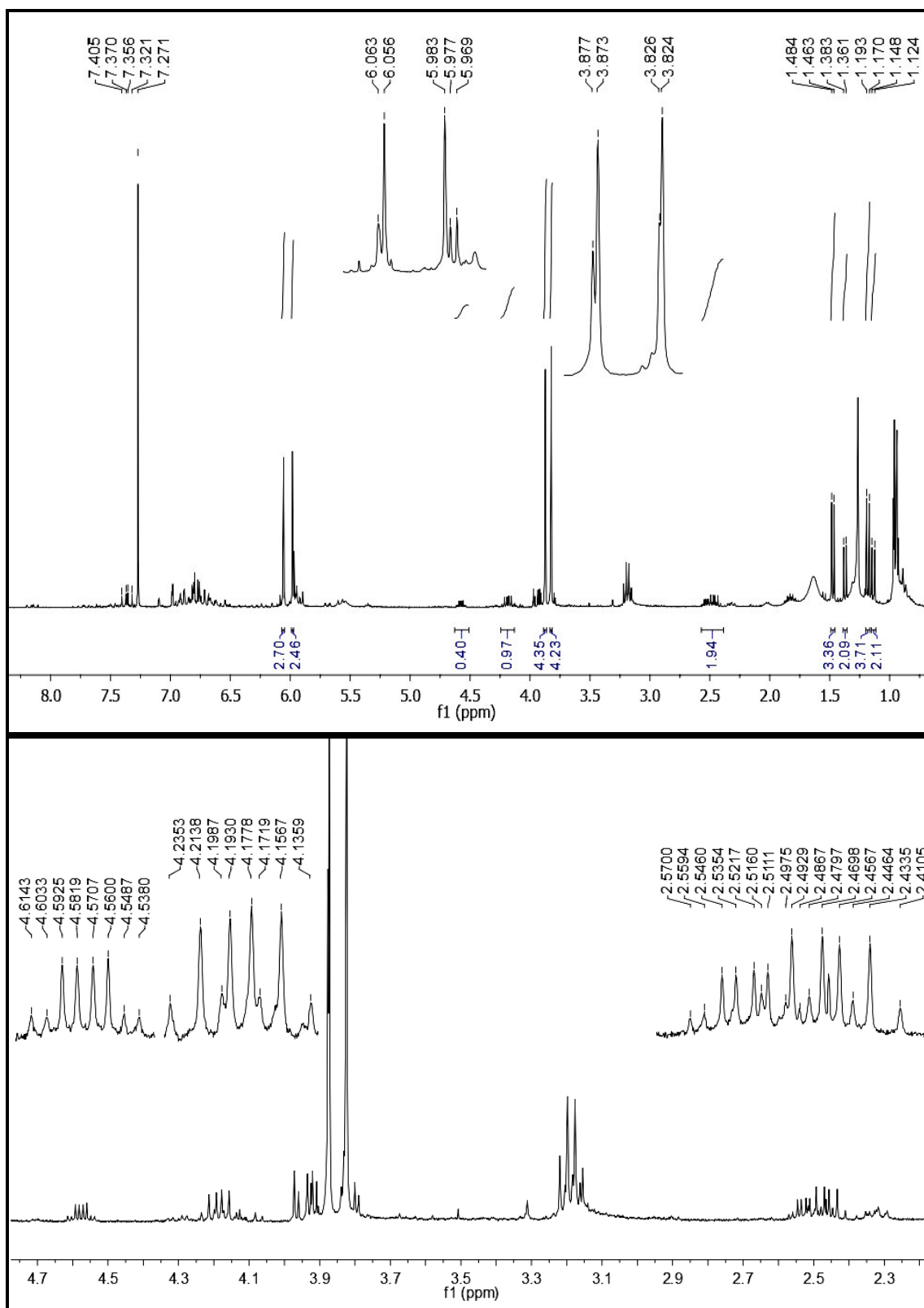


Figura I.56 – Espectro de RMN de ¹H da fração **HJB55-2-9**, com suas devidas expansões [CDCl₃, δ (ppm) – 300 MHz].

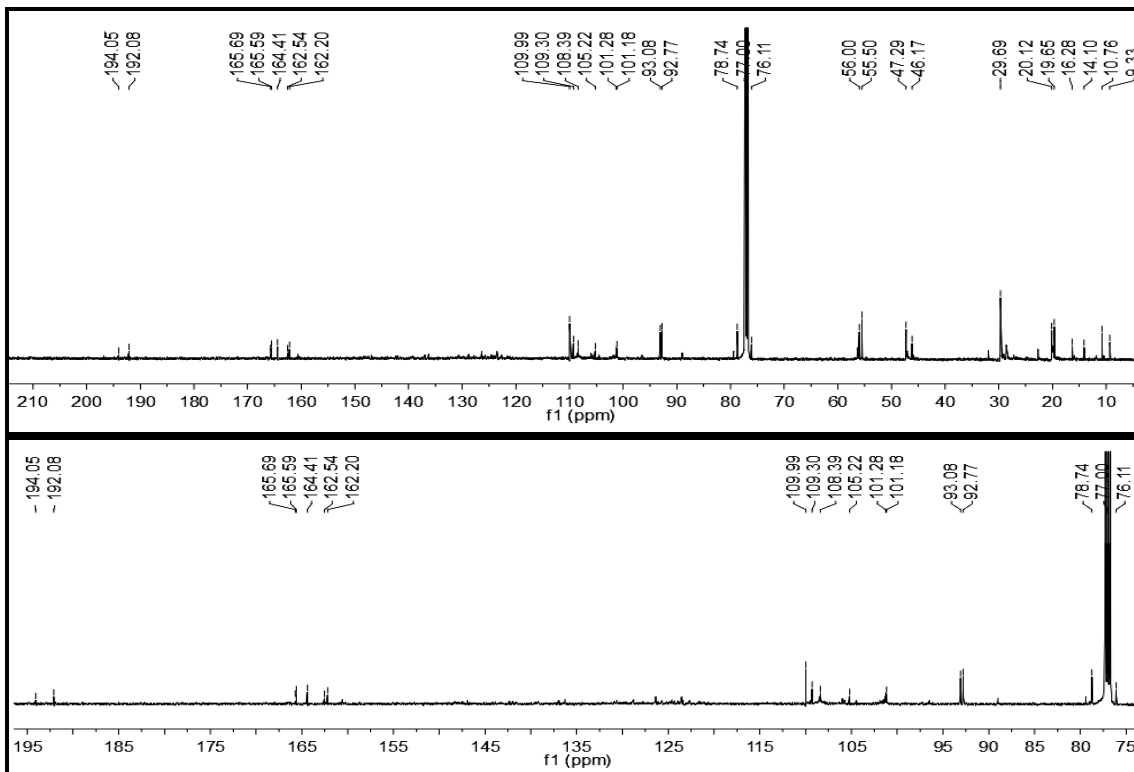


Figura I.57 – Espectro de RMN de ^{13}C da fração HJB55-2-7, com expansão $[\text{CDCl}_3, \delta \text{ (ppm)} - 75 \text{ MHz}]$.

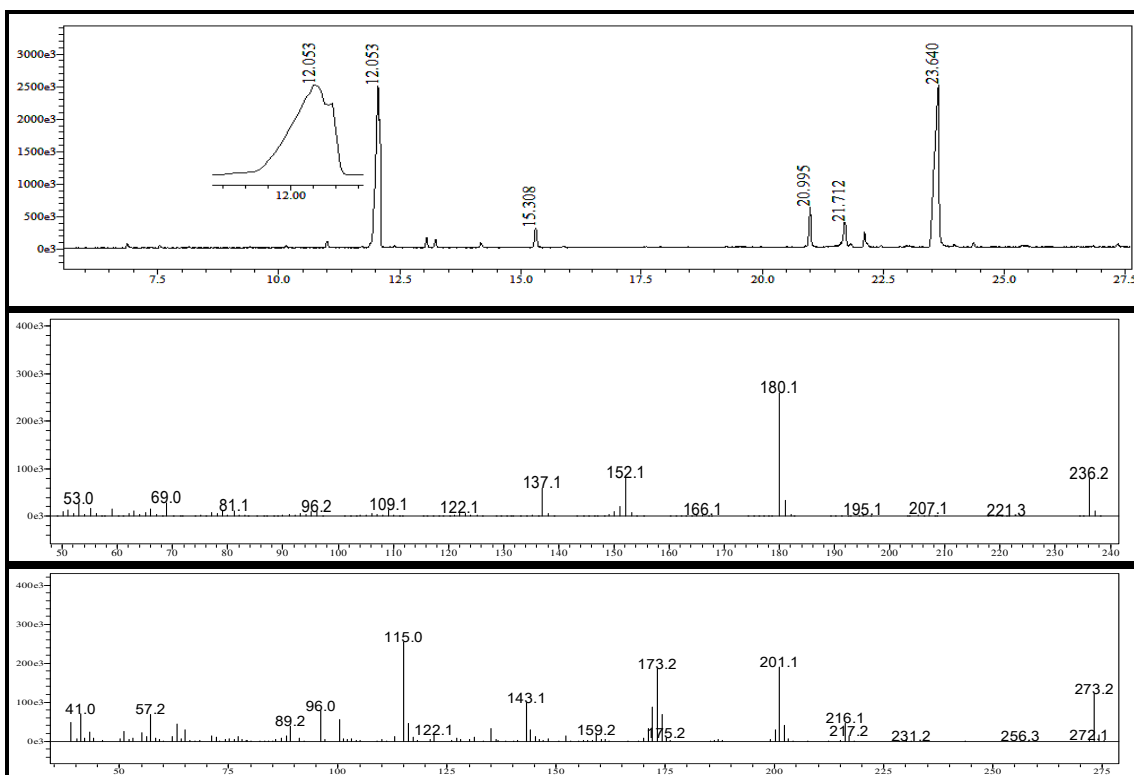
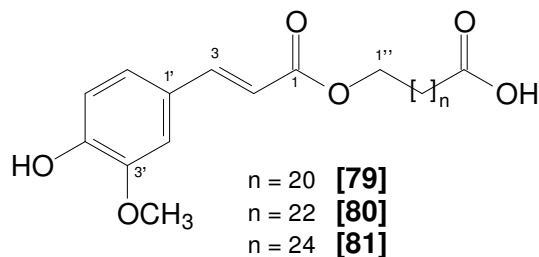


Figura I.58 – Cromatograma e espectros de massas dos picos com $\text{Tr} = 12,05 \text{ min. e } 23,6 \text{ min.}$ da fração HJB55-2-7.

Tabela I.8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ C e H (ppm), J (Hz)] de [60], [77] e [78]

C	[60]		[77]		[78]	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	-	-	-	-	-
2	4,18 dq (11,1; 6,3)	78,9	4,18 dq (10,8; 6,3)	78,7	4,57 dq (3,2; 6,5)	76,1
3	2,56 dq (11,1; 6,9)	45,7	2,46 dq (10,8; 6,9)	47,3	2,53 dq (3,2; 7,2)	46,2
4	-	198,6	-	192,1	-	194,0
5	-	164,1	-	162,5	-	92,7
6	6,03 d (2,1)	94,8	5,98 d (2,1)	92,7	5,98 s	162,2
7	-	167,6	-	165,5	-	164,4
8	5,95 d (2,1)	93,6	6,06 d (2,1)	93,0	6,05 s	93,0
9	-	162,5	-	162,5	-	162,5
10	-	102,3	-	101,2	-	101,3
2-CH ₃	1,49 d (6,3)	19,6	1,47 d (6,3)	19,7	1,37 d (6,5)	16,3
3-CH ₃	1,21 d (6,9)	10,2	1,18 d (6,9)	10,8	1,13 d (7,2)	9,4
5-OH	12,14 s	-	-	-	-	-
5-OCH ₃	-	-	3,87 s	56,0	3,88 s	56,0
7-OCH ₃	3,79 s	55,6	3,82 s	55,5	3,83 s	55,5

I.3.3.14 Elucidação estrutural dos ferulatos ácidos *trans*-feruloiloxidocosanóico [79], *trans*-feruloiloxitetracosanóico [80] e *trans*-feruloiloxihexacosanóico [81]



A fração **DJB8-2** apresentou-se como um sólido amarelo amorfo, cujo ponto de fusão encontrado foi de 70 - 73 °C. O espectro no infravermelho desta fração (Fig. I.59, p.102) apresentou banda de absorção entre 3650 e 2600 cm^{-1} característica de estiramento O-H de ácidos carboxílicos, bandas em 2917 e 2850 cm^{-1} (ν C-H), bandas de estiramento C=O de ester (ν 1730 cm^{-1}) e ácidos (ν 1710 cm^{-1}), 1632, 1618 e 1517 cm^{-1} (ν C=C); absorções entre 1270 e 1040 cm^{-1} que foram atribuídos aos estiramentos das ligações =C-O-C e C-O de fenóis. O sinal de deformação angular assimétrica para o grupo $[\text{CH}_2]_n$ em compostos de cadeia longa pode ser visto em 720 cm^{-1} .

A análise dos dados e integração observada no espectro de RMN de ^1H dessa fração (Fig. I.60, p.103) permitiram identificar o padrão de substituição do anel aromático como sendo um sistema AMX, (Tab. I.9, p.103). Além disso, pode-se verificar a presença de uma dupla ligação com estereoquímica *E* que pode ser determinada a partir da constante de acoplamento de 16 Hz observada para os dubletos de H-2 e H-3. O sinal da metoxila em δ 3,93 é indicativo que o grupo encontra-se ligado a anel aromático. O tripleto em δ 4,19 ($J = 6,6$ Hz, H1''), típico de hidrogênios oximetilênico foi atribuído a hidrogênios da cadeia alcoólica esterificado com o derivado do ácido cinâmico. Os demais deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H podem ser visualizados no item **I.3.2.16**, página 38. Pelo espectro de RMN de ^{13}C , da análise do DEPT135 e HMQC (Fig. I.60a, I.60b e I.60c, p.104) foi possível constatar a presença de 5 carbonos não hidrogenados, 5 carbonos metínicos, uma metoxila e 21 [79], 23 [80] e 25 [81] carbonos metínicos respectivamente (item **I.3.2.16**, p.39). A presença de dois sinais no espectro de RMN de ^{13}C referentes a grupos acila (δ 178,0 e 167,4), aliados aos dados no IV; permitem confirmar que a mistura de substâncias presentes na fração possuem um grupo éster e um ácido. Os dados referentes aos carbonos aromáticos corroboram com os dados de RMN de ^1H quanto a presença de um anel aromático 1,3,4 trissubstituído. Além disso, o grupo metoxila foi atribuído ao carbono C3' baseado nos dados relatados para a substância [82] (Tab. I.9,

p.103). As propostas estruturais estão coerentes com os valores apresentados pelo espectro de HMBC (Fig. I.62, p.105) em especial as correlações mostradas na figura I.63, página 106.

Esta fração foi analisada em CLAE cujo cromatograma pode ser visualizado na figura I.64a, página106; na qual ocorre boa separação cromatográfica. Em seguida esta fração foi submetida à análise por EMAR–MicroTOF/ESI(modos negativos) (Fig. I.64b, p.106). Os espectros de massas mostraram íons pseudo-moleculares em m/z 531,3694; 559,4020 e 587,4332 referentes às fórmulas moleculares $C_{32}H_{52}O_6$ (requer 531,3685) para [79]; $C_{34}H_{56}O_6$ (requer 559,3998) para [80] e $C_{36}H_{60}O_6$ (requer 587,4311) para [81] respectivamente.

Os valores de RMN de 1H e ^{13}C observados para a parte do ferulato nas moléculas são todos similares aos apresentados para a substância 1,24-diferulato de tetracosandiol [82] (Tab. I.8, p.103; Fig. I.65, p.106) relatada por Ma *et al.*, 2002 isolada à partir das sementes da espécie *Hyoscyamus niger* (Solanaceae). A única diferença apresentada no espectro de infravermelho foi à absorção em 1730 cm^{-1} referente ao ácido carboxílico presente na fração DJB8-2.

Em 1987 estas três substâncias foram relatadas pela primeira vez na literatura sendo identificadas em uma mistura a partir do extrato benzênico de duas espécies de *Viola*: *V. sebifera* e *V. melinonii* pertencentes à família Myristicaceae (KAWANISHI & HASHIMOTO 1987). A substância [80] foi também recentemente relatada na espécie *Acorus calamus* L. pertencente à família Araceae, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa (DONG *et al.*, 2010). Porém cabe ressaltar que estas substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez na família Piperaceae; o que reforça ainda mais a grande diversidade estrutural no gênero *Piper*.

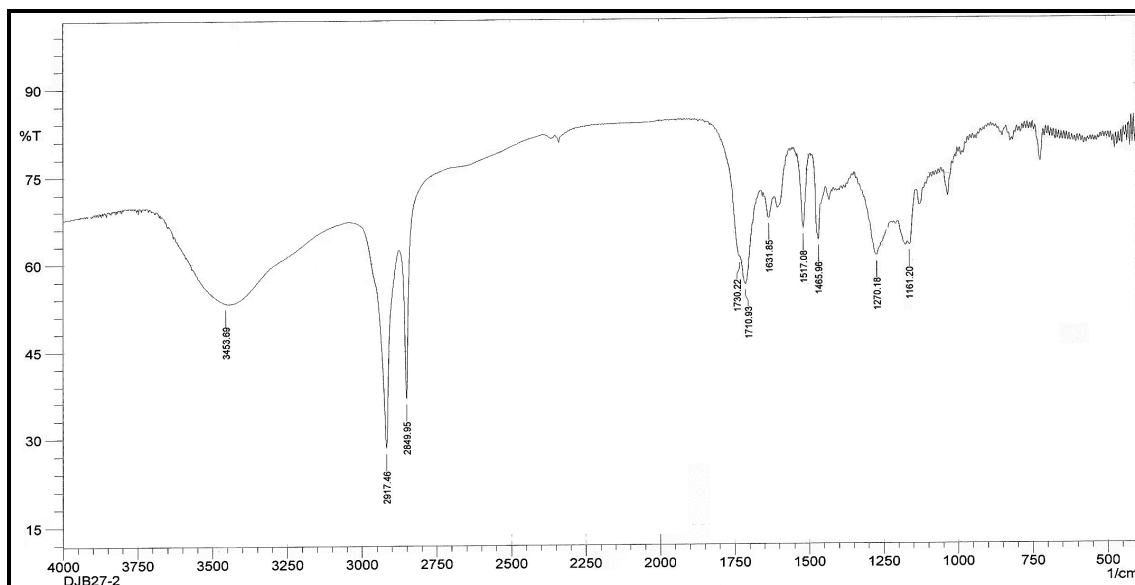


Figura I.59 – Espectro no infravermelho da fração **DJB8-2** em pastilha de KBr.

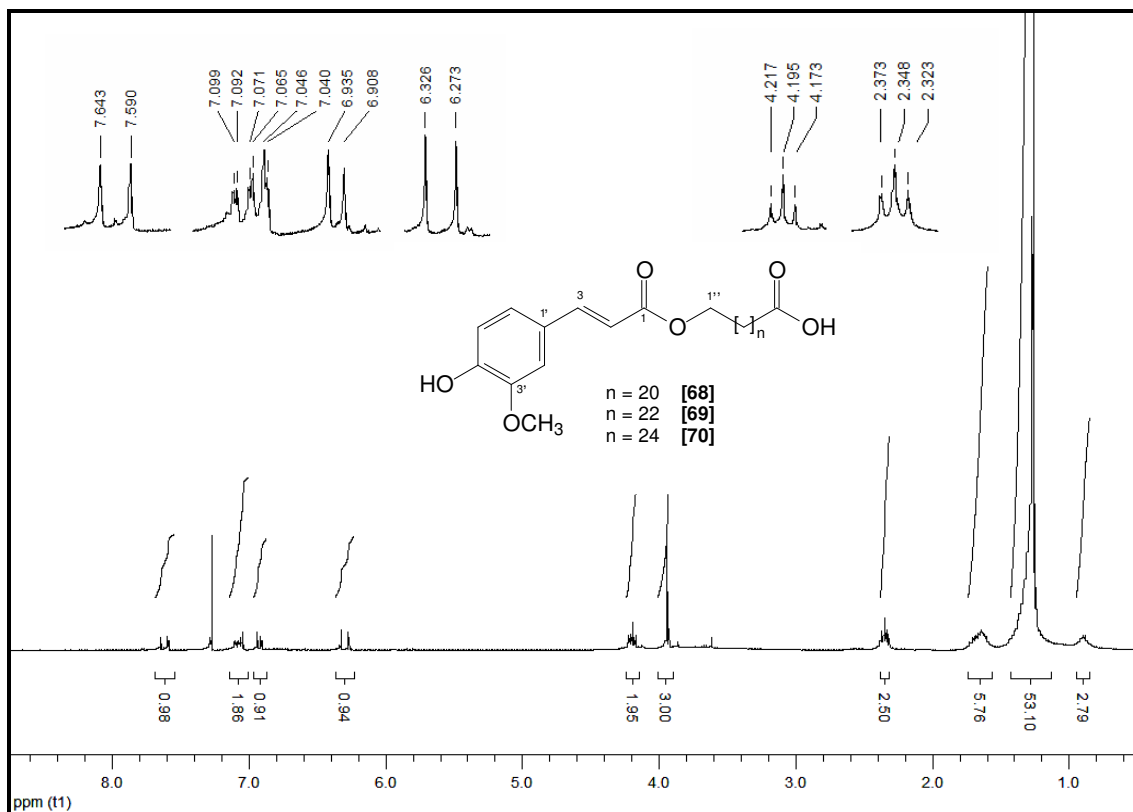


Figura I.60 – Espectro de RMN de ¹H de **DJB8-2** [CDCl₃, δ (ppm)].

Tabela I.9. Dados de RMN de ¹H e ¹³C [300 MHz (H) e 75 MHz (C), CDCl₃, δC e H (ppm), J (Hz)] do grupo ferulato de **[79]**, **[80]**, **[81]** e **[82]***

Posição	δ _H ([79], [80], [81])	δ _H [*]	δ _C ([79], [80], [81])	δ _C [*]
1	-	-	167,4	167,3
2	6,30 d (16,0)	6,29 d (15,6)	115,7	115,6
3	7,62 d (16,0)	7,61 d (15,6)	144,6	144,5
1'	-	-	127,0	126,9
2'	7,04 d (1,8)	7,04 d (2,0)	109,3	109,2
3'	-	-	147,9	147,8
4'	-	-	146,7	146,6
5'	6,92 d (8,1)	6,92 d (8,4)	114,7	114,6
6'	7,07 dd (8,1; 1,8)	7,07 dd (8,4; 2,0)	123,0	122,9
3'-OCH ₃	3,93 s	3,93 s	55,9	56,0

* MA *et al.*, 2002.

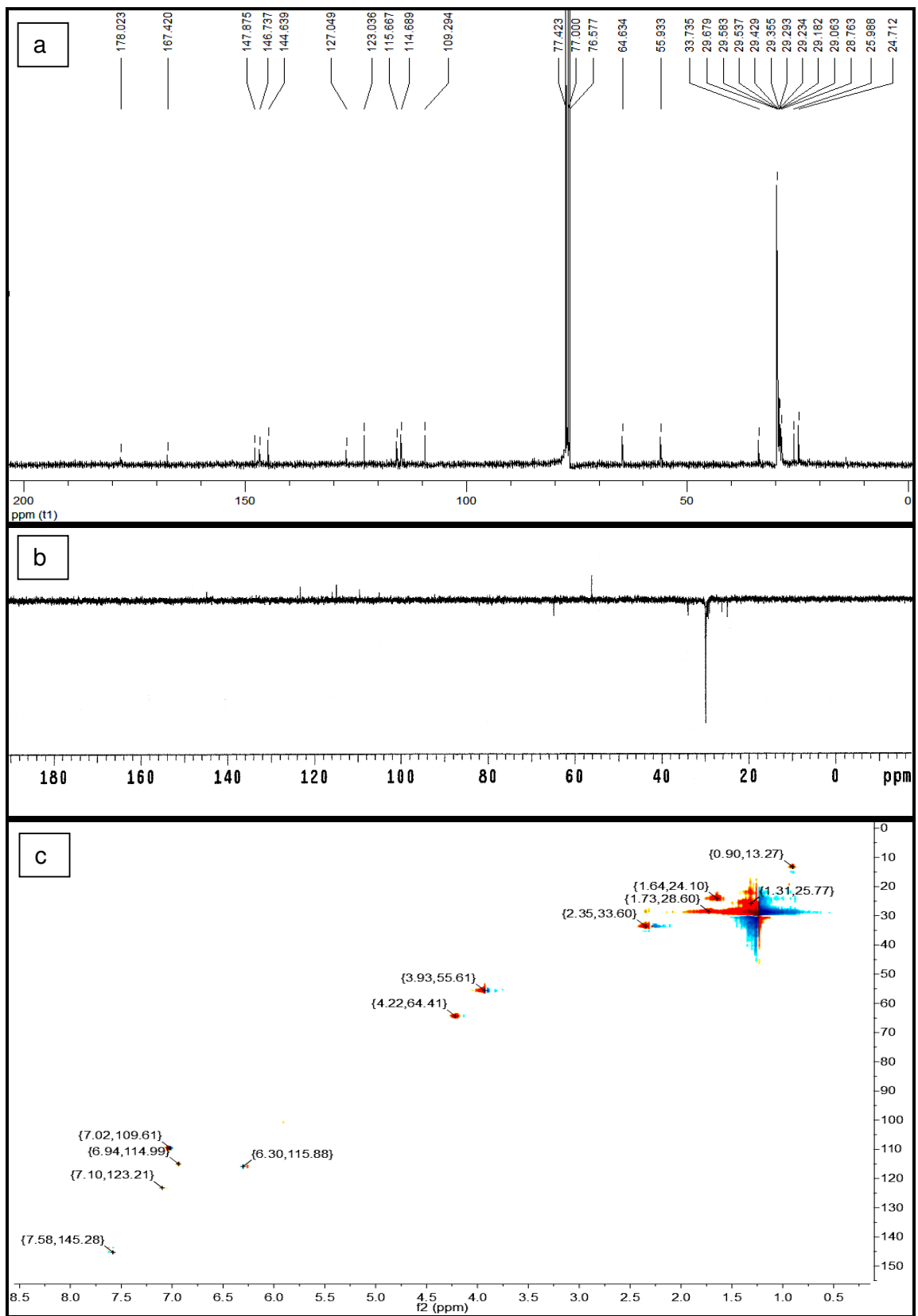


Figura I.61 – Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135 (b) e HMQC de **DJB8-2** [CDCl_3 , δ (ppm)] (c).

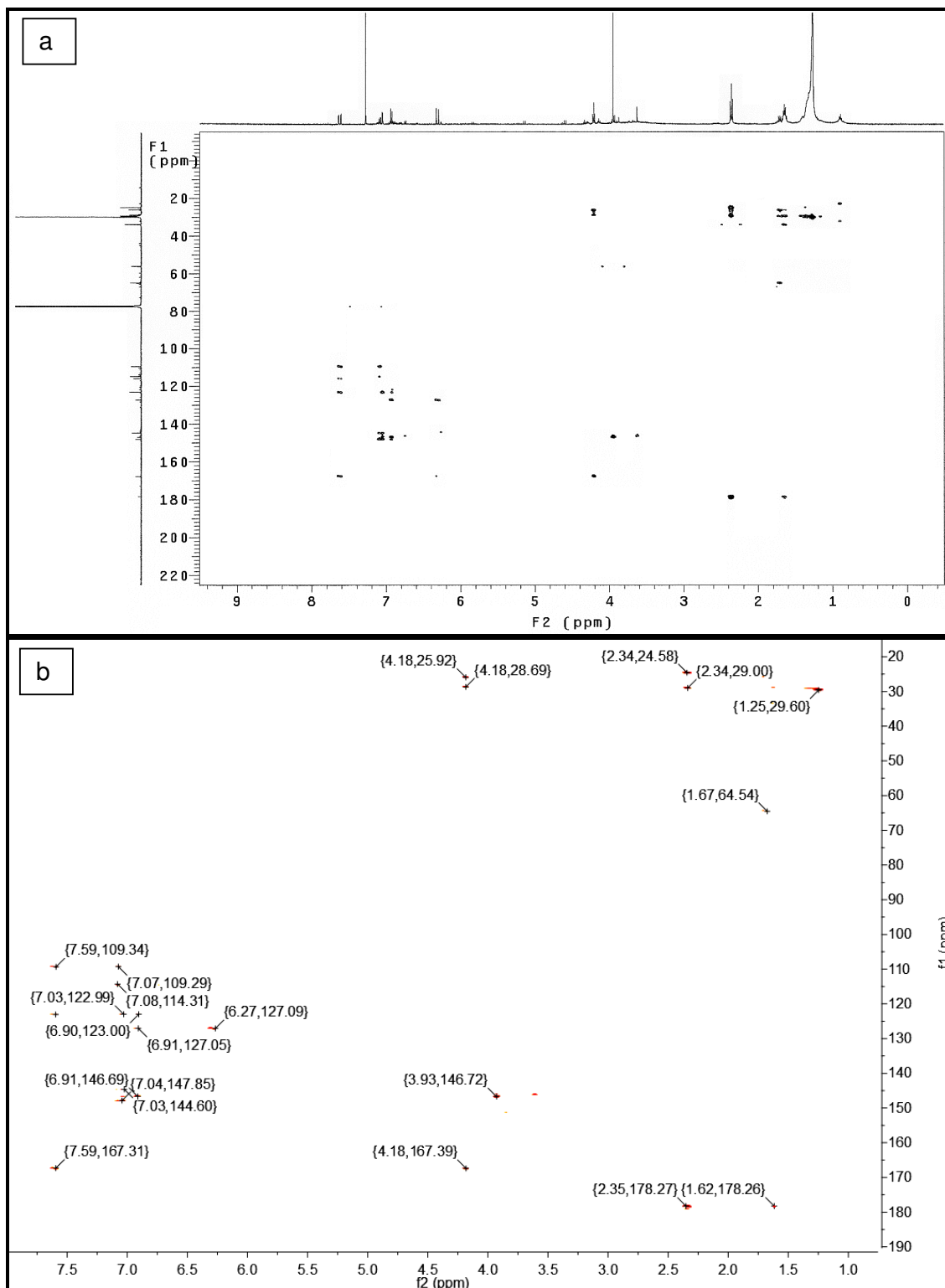


Figura I.62 – Espectros bidimensionais de gHMBC: (a) visão geral e (b) com valores numéricos referentes a fração **DJB8-2** [CDCl_3 , δ (ppm)].

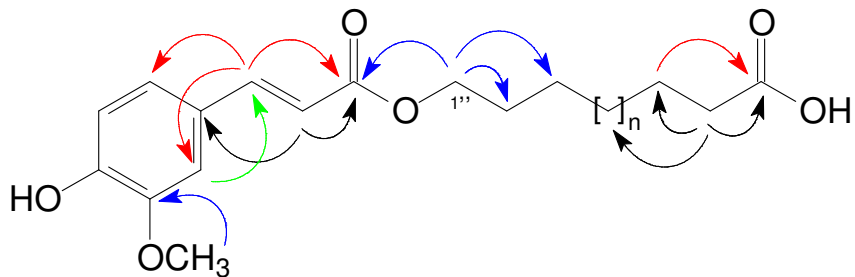


Figura I.63 – Principais correlações observadas no espectro de gHMBC de **DJB8-2**.

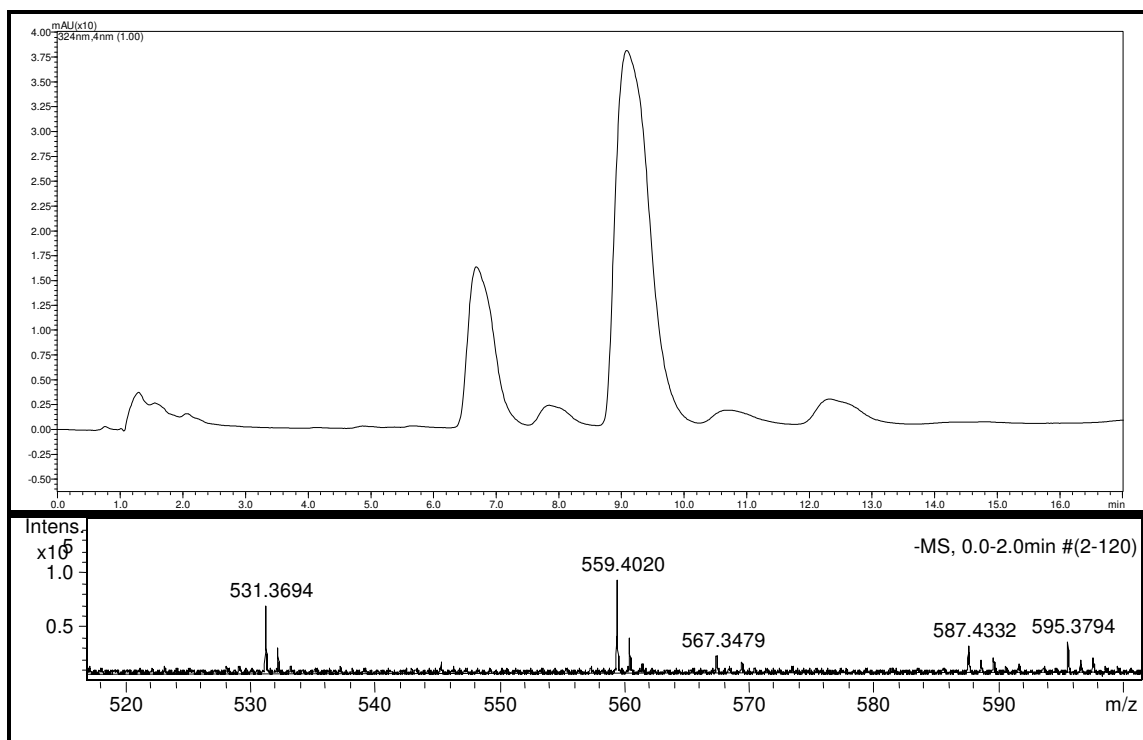


Figura I.64 – Cromatograma adquirido em CLAE (a) e espectro de massas em EMAR-MicroTOF/ESI(-) (b) da fração **DJB8-2**.

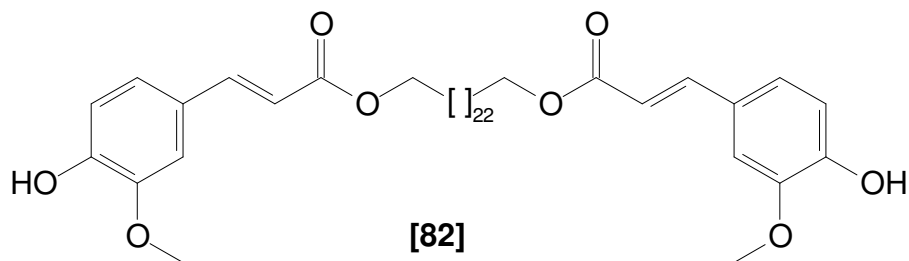


Figura I.65 – Estrutura da substância 1,24-diferulato de tetracosandiol.

I.3.4 Identificação por CG-EM dos Ácidos Graxos e Ésteres de Ácidos Graxos

I.3.4.1 Mistura de ésteres de ácidos graxos e de ácidos graxos da fração HJB15-2

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da fração HJB15-2 (91 mg) podem ser observados na figura I.65a e I.65b, página 109. Através de suas análises pode verificar no espectro de RMN de ^1H sinais na região de δ 5,40 típicos de **H** ligados a carbonos olefínicos bem como sinais intensos na região de δ 1,26 característicos de cadeia alifática. Já pelo espectro de RMN de ^{13}C aparece sinal em δ 180,0 de intensidade alta, indicativo da presença de ácidos graxos livres na fração. Estes dados foram confirmados pela ausência de sinais de hidrogênios oximetílicos ou oximetilênicos no espectro de RMN de ^1H da fração. Porém acreditando na possibilidade da existência de uma pequena quantidade de ésteres de ácidos graxos na fração resolveu-se promover uma hidrólise alcalina seguida de esterificação, de acordo com o procedimento descrito no item I.2.5.1 página 22.

A análise do cromatograma adquirido em CG-EM (Fig. I.65c, p.109) referente à mistura padrão mostrou uma boa separação de seus componentes; os tempos de retenção e a razão massa carga (m/z) dos padrões estão visualizados na tabela I.10, página 108. A análise do cromatograma da fração **HJB15-2** (Fig. I.65d, p.109) foi baseado na comparação dos tempos de retenção e da razão massa carga apresentados pelos padrões. Para os ésteres metílicos sugeridos como presentes na mistura da fração **HJB15-2** e que não tinham na mistura padrão, estes foram sugeridos com base na razão massa carga e em banco de dados da biblioteca Wiley 7 (Tab. I.10, p.108). Altas percentagens de similaridades (acima de 93 %) foram observadas.

Um total de 17 ésteres metílicos foram identificados na mistura, sendo 7 confirmados através da comparação com o Tr dos padrões bem como pela sua massa molecular a saber, miristato de metila; palmitato de metila; oleato de metila (9-*cis*); estearato de metila; araquidato de metila; dodosanoato de metila e lignocerato de metila (Tab. I.10, p.108). Já para os 10 outros ésteres sugeridos 6 deles possuem número ímpar de átomos de carbono, que pela biossíntese sugere-se que são oriundos da Propionil-CoA. É interessante destacar que a presença de ésteres com número ímpar de carbonos ainda não são comuns em óleos vegetais.

Após estas considerações podemos concluir que a mistura da fração **HJB15-2** é rica em ácidos graxos. Cabe ressaltar que para termos certeza da existência dos ésteres que foram sugeridos na mistura é necessária uma injeção com padrões destes ésteres metílicos.

Tabela I.10 – Ésteres metílicos identificados por CG-EM da fração HJB15-2

Nº. de C: Insaturações	Tempo de Retenção (min.)		Relação massa / carga (<i>m/z</i>) [M ⁺]	Ésteres Metílicos
	Padrões	Amostra		
C8:0	4,03	-	127 [M ⁺ - 31]	Octanoato de metila
C10:0	6,87	-	155 [M ⁺ - 31]	Decanoato de metila
C12:0	10,62	-	214	Laurato de metila
C14:0	14,33	14,33	242	Miristato de metila
C15:0	-	16,10	256	Pentadecanoato de metila
C16:1	17,43	-	236 [M ⁺ - 32]	Palmitoleato de metila (9- <i>cis</i>)
C16:0	17,80	17,88	270	Palmitato de metila
C17:0	-	19,42	284	Heptadecanoato de metila
C18:2	20,45	-	294	Linoleato de metila
C18:1	20,56	20,58	296	Oleato de metila (9- <i>cis</i>)
C18:1	-	20,66	296	Oleato de metila (9- <i>trans</i>)
C18:0	20,98	20,99	298	Estearato de metila
C18:3	-	-	-	Linolenato de metila
C19:0	-	22,47	312	Nonadecanoato de metila
C18:1	-	23,23	155 [M ⁺ - 157]	<i>trans</i> -9,10-epoxiestereato de metila
C20:0	23,90	23,90	326	Araquidato de metila
C21:0	-	25,27	340	Heneicosanoato de metila
C22:1	26,26	-	320 [M ⁺ - 32]	Erucato de metila (13- <i>cis</i>)
C22:0	26,60	26,60	354	Docosanoato de metila
C23:0	-	27,88	368	Tricosanoato de metila
C24:0	29,11	29,11	382	Lignocerato de metila
C25:0	-	30,30	396	Pentacosanoato de metila
C26:0	-	31,45	410	Hexacosanoato de metila
C28:0	-	33,98	438	Octacosanoato de metila

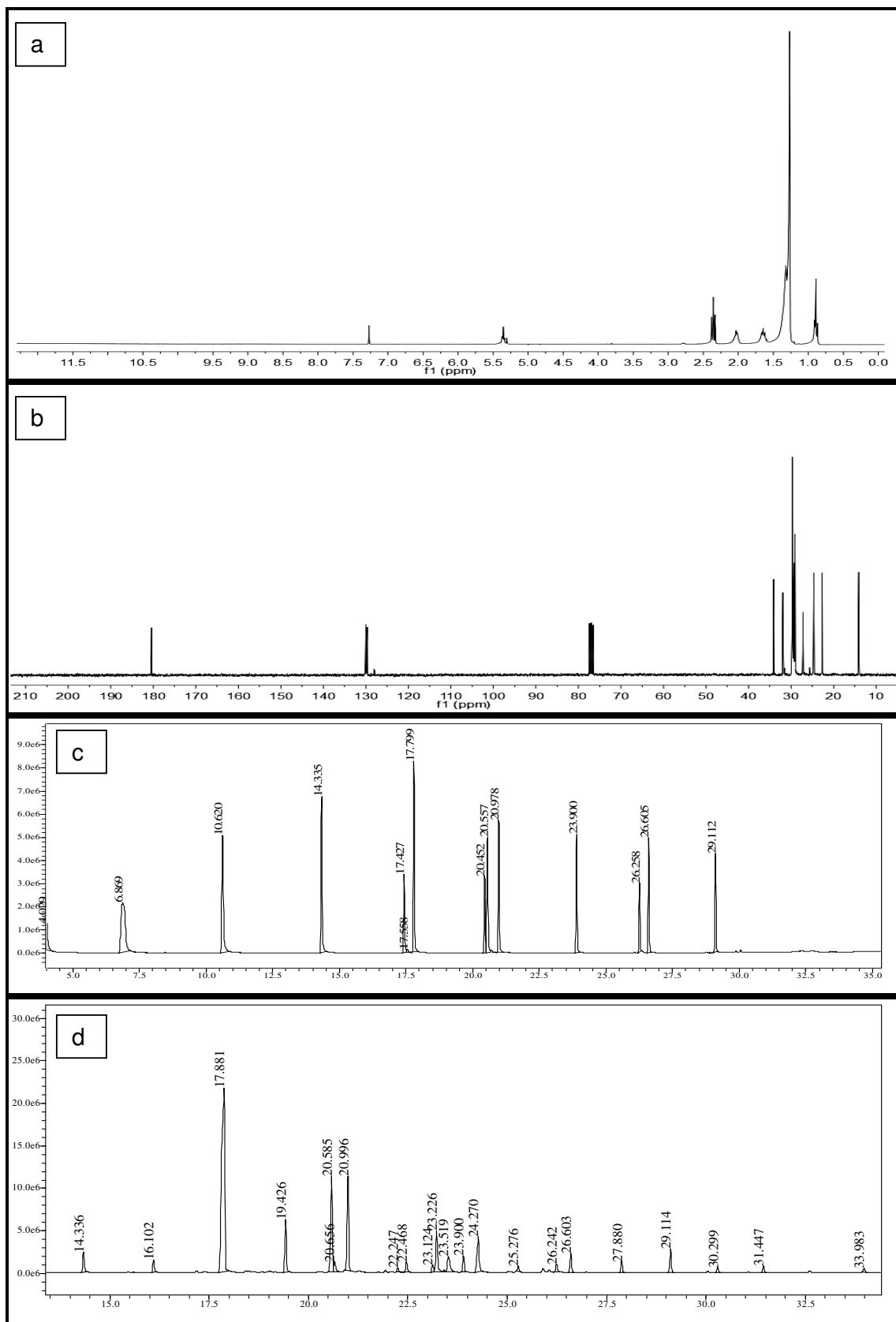


Figura I.66 – Espectro de RMN de ^1H (a) e ^{13}C (b) [CDCl_3 , δ (ppm)]; e cromatogramas em CG-EM a 70 eV da mistura padrão [C8-C24] (c) e da fração **HJB15-2** (d).

CAPITULO II

**ESTUDO QUÍMICO DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS DE *Piper klotzschianum*
Kunth (PIPERACEAE) E *Croton grewioides* Baill (EUPHOBIAEAE); E
INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

II.1 INTRODUÇÃO

II.1.1 Voláteis e Atividades Biológicas no Gênero *Croton*

O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae que apresenta ampla distribuição geográfica, além de ser conhecida pela importância econômica de alguns dos seus representantes. Esta família possui cerca de 6.300 espécies distribuídas em 249 gêneros (RADCLIFFE-SMITH, 2001). Dentre os gêneros mais importantes, destaca-se o gênero *Croton*, que representa o segundo maior dentro da família, o qual é subdividido em 40 seções e possui mais de 1.200 espécies de distribuição principalmente pantropical. No Brasil, é o gênero com maior número de espécies, com um total de 350 espécies identificadas (GOVAERTS *et al.*, 2000; BERRY *et al.*, 2005). Na Região Nordeste estima-se um total de 68 espécies distribuídas em 18 seções (CORDEIRO & TORRES, 2006).

A química do gênero *Croton* é bastante diversificada; terpenóides são os constituintes predominantes, principalmente diterpenóides e triterpenóides. Substâncias fenólicas têm sido frequentemente relatadas, entre as quais flavonóides, proantocianidinas e lignóides predominam; diferentes classes de alcalóides também foram encontradas (SALATINO *et al.*, 2007). Óleos voláteis contendo fenilpropanóides e terpenóides (mono e sesquiterpenos) são frequentemente relatados para o gênero.

Dos óleos voláteis das folhas e casca do caule de *C. nepetaefolius* foram identificados monoterpenos (tais como 1,8-cineol e terpineol), sesquiterpenos (como biciclogermacreno), e fenilpropanóides (como metileugenol) (MAGALHÃES *et al.*, 1998; MORAIS *et al.*, 2006^a). Dos brotos e partes aéreas da espécie *C. zehntneri* foram extraídos óleos essenciais compostos principalmente dos fenilpropanóides metileugenol, anetol e estragol (BATATINHA *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O *trans*-metiliso Eugenol foi encontrado nos óleos extraídos das raízes de *C. sarcopetalus* (HELUANI *et al.*, 2000); já o metileugenol foi relatado nos óleos das folhas de *C. jimenezii* como componente principal (CICCIO & SEGNINI 2002;). Metileugenol, metiliso Eugenol, elemicina, isoelemicina, veratral e δ -cadinol representam os principais componentes dos óleos essenciais das partes aéreas de *C. malambo* (SUÁREZ *et al.*, 2005).

O α -11-eudesmeno um álcool sesquiterpênico foi relatado como principal constituinte nos óleos da parte aérea de *Croton cuneatus* (SUÁREZ *et al.*, 2005). O monoterpeno linalol aparece como um dos principais constituintes nas espécies *C. cajuçara* (ALVIANO *et al.*, 2005), *C. stellulifer* (MARTINS *et al.*, 2000) e *C. oligandrum* (AGNANIET *et al.*, 2005). Já o α -pineno aparece como constituinte majoritário nos óleos das folhas de *C. adenocalyx* e *C.*

argyrophyloides (MORAIS *et al.*, 2006^a; LIMA *et al.*, 2010) e, o biciclogermacreno como um dos constituintes majoritário das folhas de *Croton sonderianus* (SANTOS *et al.*, 2005).

Os sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno estão presentes em quantidades consideráveis nos óleos das espécies *C. ovalifolius* (MECCIA *et al.*, 2000) e *C. zambesicus* (BLOCK *et al.*, 2006). Estudos anteriores sobre a composição química dos óleos essenciais extraídos das folhas e caules de *C. grewoides* coletados na cidade de Bezerro no Estado de Pernambuco mostram o fenilpropanóide *trans*-anetol como constituinte majoritário (SILVA *et al.*, 2008).

O gênero *Croton* possui forte potencial econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido aos diversos metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e terpenóides, que conferem propriedades terapêuticas a muitas espécies (RIZSCK 1987; PAYO *et al.* 2001).

Os ensaios farmacológicos frequentemente vêm corroborando os usos tradicionais das espécies de *Croton*. Efeitos citotóxicos também vêm sendo observados em ensaios com alcalóides e diterpenóides. Várias atividades biológicas foram relatadas a partir dos óleos essenciais de *Croton*, incluindo inseticida (SILVA *et al.*, 2008), fungicida (FONTENELLI *et al.*, 2008), larvicida (MORAIS *et al.*, 2006^b), anti-helmítica (VASCONCELOS *et al.*, 2007), antinociceptiva (BIGHETTI *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2005), analgésica (OLIVEIRA *et al.*, 2001), , antiinflamatória (BIGHETTI *et al.*, 1999), leishmanicida (ROSA *et al.*, 2005), antimicrobiana (MARTINS *et al.*, 2000; ALVIANO *et al.*, 2005), antiespasmódico (SOUZA *et al.*, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 2004), anti-hipertensiva (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995), antiulcerogênica (PAULA *et al.*, 2008) e antioxidante (MORAIS *et al.*, 2006^a).

II.1.2 Descrição botânica de *Croton grewoides* Baill

Croton grewoides (Fig. 1, p.4) apresenta-se como arbusto a subarbusto, ereto, 0,70 - 2,5 m de altura, ramos esverdeado, tricomas estrelados e fasciculados. Folhas alternas, simples, ápice agudo, base cuneada a levemente arredondada, simétrica e margem serrilhada. Inflorescência terminal, contínua de 17 - 83 mm comprimento, flores estaminadas no ápice e pistiladas na base. Flor estaminada amarelo-esverdeada de 3,5 - 6 mm de comprimento; sépalas 5 e pétalas 5. Flor pistilada verde de 4,5 - 6 mm de comprimento com estiletos unidos na base. Fruto verde-ferrugíneo; semente globosa e lisa.

Espécie restrita ao bioma Caatinga (PI, CE, RN, PB, PE, AL, SE, BA e MG), ocorre nas caatingas arbustivas e arbóreas sobre solo arenoso e argiloso com afloramento rochoso, entre 250 e 1.200 m. LIMA & PIRANI (2003) registraram pela primeira vez essa

espécie para a porção mineira da Cadeia do Espinhaço. Encontrada florida e/ou frutificada por todo o ano. Esta espécie é conhecida popularmente pelos nomes angico, angélica, canelinha, caatinga-de-cheiro, crioula e alecrim-de-caboclo.

II.1.3 Voláteis e Atividades Biológicas no Gênero *Piper*

O gênero *Piper*, o mais representativo da família Piperaceae, inclui espécies já conhecidas como produtoras de óleo essenciais tais como *P. arboreum*, *Piper cernuum*, *P. hispidum*, *P. regnellii*, e *P. tuberculatum*. Do estudo dos óleos essenciais no gênero *Piper* destacam-se principalmente as classes: fenilpropanóides (ex: *trans*-anetol, elemicina, chavicol), hidrocarbonetos monoterpênicos (ex: α -pineno, β -mirceno, limoneno), hidrocarbonetos sesquiterpênicos, (ex: α -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno), monoterpênicos oxigenados (ex: 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol) e sesquiterpenos oxigenados (espatulenol, *E*-nerolidol, óxido de cariofileno) (EVANS *et al.*, 1984; MUNDINA *et al.*, 2001; VILA *et al.*, 2001; CONSTANTIN *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2001; MESQUITA *et al.*, 2005; PESSINI *et al.*, 2005; NAVICKIENE *et al.*, 2006; PÉRES *et al.*, 2009).

Três espécies do Cerrado brasileiro apresentaram predominância de sesquiterpenos. *Piper arboreum* subsp *arboreum* apresentou como constituintes majoritários biciclogermacreno (12,1%), 10-epi- γ -eudesmol (11,6%) e óxido de cariofileno (10,1%). Em *P. dilatatum* os constituintes em maior quantidade foram *cis*- β -ocimeno (19,6%) e β -cariofileno (11,3%) e em *P. hispidum* foram β -pineno (19,7%) e α -pineno (9,0%) (POTZERNHEIM *et al.*, 2006).

Óleos essenciais extraídos das folhas de oito espécies de *Piper* apresentaram como constituintes majoritários os hidrocarbonetos monoterpênicos não oxigenados α -pineno (*P. amplum*) e β -mirceno (*P. dilatatum*), os sesquiterpenos não oxigenados, germacreno D (*P. goesii*) e α -cariofileno (*P. hispidum*), e os sesquiterpenos oxigenados γ -eudesmol (*P. arboreum*), *E*-nerolidol (*P. anisum* e *P. mollicomum*) e hinesol (*P. hoffmanseggianum*) (SANTOS *et al.*, 2001). Óxido de cariofileno (32,1%), um sesquiterpeno oxigenado, foi encontrado a partir dos frutos de *P. tuberculatum* (FACUNDO *et al.*, 2008); e outro não oxigenado β -elemeno (24,6 %) foi identificado a partir das folhas de *P. reticulatum* (LUZ *et al.*, 2003).

Das folhas de *P. regnellii* foram extraídos óleos essenciais que apresentam em sua constituição química alta concentração relativa do monoterpêneo não oxigenado β -mirceno (70,0 %) (PESSINI *et al.*, 2005); já para a espécie *P. variable* foi encontrado como constituinte majoritário presente nos óleos essenciais extraídos das folhas o monoterpêneo oxigenado cânfora (28,4 %) (CRUZ *et al.*, 2011). Outro monoterpêneo oxigenado relatado

como constituinte majoritário presente nos óleos essenciais extraídos da espécie *P. jacquemontianum* foi o linalol (69,4 %) (CRUZ *et al.*, 2011).

Fenilpropanóides foram encontrados como componentes majoritários nas espécies: *P. auritum* (safrol 70 % - GUPTA *et al.*, 1985), *P. aduncum* (dilapiol 62,0% - CICCIO & BALLESTERO 1997), *P. hispidum* (dilapiol 57,5% - FACUNDO *et al.*, 2008), *P. guineense* (dilapiol 44% - MARTINS *et al.*, 1998), *P. lanceaefolium* (elemicina 24,4% - MUNDINA *et al.*, 2001), *P. divaricatum* (SILVA *et al.*, 2010^b), *P. fulvescens* (*trans*-anetol 26,4% - VILA *et al.*, 2001) *P. solmsianum* (sarisan 39,2% - MOREIRA *et al.*, 2001) e *P. marginatum* (*Z*-asarona 30,4% [folhas] e *E*-asarona 32,6% [caules] – AUTRAN *et al.*, 2009).

Dos óleos essenciais extraídos do gênero *Piper* algumas atividades biológicas são relatadas na literatura, incluindo inseticida (MIKICH *et al.*, 2003; ESTRELA *et al.*, 2006; FAZOLIN *et al.*, 2007), fungicida (EVANS *et al.*, 1984; NAVICKIENE *et al.*, 2006; SILVA & BASTOS 2007), larvicida (MORAIS *et al.*, 2007; AUTRAN *et al.*, 2009; MATASYOH *et al.*, 2011), citotóxica (PÉRES *et al.*, 2009; AVELLA & MOTTA 2010), leishmanicida (MONZOTE *et al.*, 2010), alelopática (FILHO *et al.*, 2009), analgésica (ANDRADE *et al.*, 1998), antimicrobiana (MASUDA *et al.*, 1991; CONSTANTIN *et al.*, 2001; RUEGG *et al.*, 2006), anti-helmítica (EVANS *et al.*, 1984), antioxidante (SILVA *et al.*, 2010^b; CRUZ *et al.*, 2011), psicotrópica (MOREIRA *et al.*, 2001), e genotóxica (PÉRES *et al.*, 2009).

II.1.4 Descrição Botânica de *Piper klotzschianum* Kunth

Piper klotzschianum (Kunth) C.DC; Basiônimo – *Ottonia klotzschiana* Kunth Linnaea (Fig. 2, p.5), arbusto em torno de 1,5 m de altura; caule estriado, dotado de glândulas quando jovens. Folhas com pecíolos de 0,5 - 1 cm de comprimento, base assimétrica com um dos lados diferindo do outro cerca de 1 mm, obtusa ou arredondado-cordada, por vezes curtamente peltada. Espiga de 7-11 cm de comprimento, ereta com pedúnculo rugoso 0,7-1 cm de comprimento. Fruto de 0,6-1,2 mm de diâmetro, ovóide, sulcado, obscuramente glanduloso. Sementes escuras quando secas.

A espécie é conhecida por habitar a costa atlântica do sudeste do Brasil, nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, estendendo até o Estado da Bahia. Também assinalada para o Brasil Central no Estado do Mato Grosso e na região Norte, ocorrendo no Acre, Tocantins e Pará. Vegeta no sub-bosque sendo relativamente abundante nas florestas de galeria de Minas Gerais e Tocantins (CALLEJAS, 1986; DE CANDOLLE 1869; YUNKER, 1973; GUIMARÃES *et al.*; 2007). Esta espécie é endêmica do Brasil e conhecida popularmente como João Barandinho e João Barandi.

II.2 PARTE EXPERIMENTAL

II.2.1 Materiais e Métodos (Procedimentos Gerais)

1 - Os solventes e reagentes utilizados nas extrações, na solubilização das amostras, nas análises cromatográficas e nos testes de atividades biológicas foram todos de grau analítico Merck, Sigma, Quimex, e Quemis.

2 – Para identificação dos componentes presentes nos óleos essenciais as amostras obtidas foram submetidas à análise em um cromatógrafo em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução (CG-EM) da Shimadzu, com detector seletivo de massas, modelo QP 5050A, do Laboratório de Análise e Sínteses de Agroquímicos da UFV/MG. Coluna cromatográfica e condições de análises: coluna Elite-5 (5% de fenil, 95% dimetilpolissiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 μm . Fluxo de gás de arraste (He) foi de 1,8 mL.min⁻¹; a temperatura do injetor foi 220 °C; a temperatura da interface foi 240 °C; e a temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, aumentando 3 °C. min⁻¹, até atingir 240 °C, permanecendo constante nesta temperatura por 35 minutos. A razão de *split* 1/5; volume injetado 1 μL de cada amostra, preparada a partir de 10 mg diluídos em 1 mL de diclorometano. As condições do espectrômetro de massas foram, energia de impacto 70 eV; velocidade de varredura 1000; intervalo de varredura de 0,5 e registro da razão *m/z* de 30,00 a 500,00. A identificação dos compostos foi feita por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com os existentes no banco de dados (Wiley, 7^a ed.), e também pela comparação dos índices de Kovats com aqueles da literatura (ADAMS, 1995; 2007), calculados a partir das injeções de uma mistura de hidrocarbonetos lineares de C8 a C26.

3 – Para quantificação dos componentes identificados no item acima, as amostras dos óleos essenciais foram analisadas em um Cromatografo em fase gasosa (CG-FID) da Shimadzu, modelo CG 17A, operando com coluna HP-5% (5 % de fenil, 95 % dimetilpolissiloxano) nas mesmas condições relatadas no ítem acima.

4 – Para determinação da atividade antioxidante foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS da Varian (modelo Cary 50 conc, Austrália). Este teste foi realizado no Laboratório da Faculdade de Farmácia da UFBA, coordenado pela professora Dr^a. Juceni P. David.

5 – No teste de atividade antimicrobiana foram utilizadas placas estéreis de 96 orifícios (TPP 92096 – SWITZERLAND); o meio de cultura utilizado foi o Meio Müeller-Hinton. Estes ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biomedicina, da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, com a colaboração e supervisão do professor Dr. Renato Fontana.

6 - Nos ensaios larvicidas, para esterilização da ração animal, utilizou-se autoclave vertical modelo 415. A alimentação dos insetos adultos de *Aedes aegypti* foi feita com sacarose anidra PA (Vetec) ou glicose anidra (amresco). Os experimentos foram realizados no Insetário do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL (LPqPN-IQB/UFAL) em colaboração com a professora Dr^a. Lucia Maria Conserva.

II.2.2 Coleta do Material Vegetal e Identificação das Espécies

A coleta de *Croton grewioides* Baill foi realizada em Novembro de 2009. Os espécimes foram coletados nas proximidades do posto Dantas, no município de Jequié – BA, aproximadamente 20 Km do centro da cidade. O voucher foi herborizado, inserido no herbário HUESB, sob o registro HUESB 5388 (coletado no dia 15/11/2009 às 7:30 horas – aroma de “erva-doce”) e 5389 (coletado no dia 15/11/2009 às 7:45 horas – aroma de “cravo da Índia”), duplicatas foram enviadas para os herbários ALCB e HUEFS. Esse material foi identificado pela especialista do gênero Dra. Daniela dos Santos Carneiro Torres (DCB – UEFS).

A coleta da espécie *Piper klotzschianum* Kunth, foi realizada em Janeiro de 2009, na mata da Gimuna, em Vila do Riacho-Aracruz, ES. Sua identificação está descrita no capítulo I, item I.2.2, página 16.

II.2.3 Extração dos Óleos Essenciais

Para extração dos óleos essenciais de *C. grewioides*, foram coletadas aproximadamente 100 g de material vegetal fresco (Caules e folhas); e para *P. klotzschianum* aproximadamente 25 g do material vegetal fresco das folhas, caules e raízes, e 6 g das sementes. Todos foram submetidos, em triplicadas, a hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Fig. II.1, p.117) por um período de 120 minutos, utilizando 300 mL de água destilada. Os óleos resultantes (Tab. II.1, p.117) foram secos com sulfato de sódio anidro (Merck), pesados e os rendimentos calculados em relação ao peso do material fresco. Os óleos obtidos foram armazenados a aproximadamente 0 °C, até que fossem analisados por CG-FID e CG-EM-IE.

Tabela II.1 - Codificação dos óleos essenciais das espécies estudadas

Amostras	NOMES
OERPCK	Óleo essencial das raízes de <i>Piper klotzschianum</i>
OECPK	Óleo essencial dos caules de <i>Piper klotzschianum</i>
OEFPK	Óleo essencial das folhas de <i>Piper klotzschianum</i>
OESPK	Óleo essencial das sementes de <i>Piper klotzschianum</i>
OEFCG1	Óleo essencial das folhas de <i>Croton grewoides</i> “erva-doce”
OECCG1	Óleo essencial do caule de <i>Croton grewoides</i> “erva-doce”
OEFCG2	Óleo essencial das folhas de <i>Croton grewoides</i> “cravo da Índia”
OECCG2	Óleo essencial do caule de <i>Croton grewoides</i> “cravo da Índia”
OEFCG3	Óleo essencial da folha de <i>Croton grewoides</i> “erva-doce” adulta*
OECCG3	Óleo essencial do caule de <i>Croton grewoides</i> “erva-doce” adulta

* Os Espécimes de *C. grewoides* foram diferenciados, em jovem e adulta considerando-se a altura, onde arbustos de até 1,2 m de altura foram considerados espécimes jovens, enquanto arbustos acima de 2,5 m de altura foram considerados espécimes adultos.

II.2.4 Atividades Biológicas das Espécies Estudadas

Os óleos essenciais extraídos das duas espécies em estudo foram investigados quanto às atividades citotóxicas, larvicidas, antimicrobianas e antioxidantes. Já para as substâncias isoladas de *Piper klotzschianum* **HJB4-2**; **HJB5-5**; **HJB10-4**; **HJB52-5**; **DJB8-2**; **DJB28-5** e **ERC8-2** foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana e, atividade larvicidas foram também avaliadas para as substâncias **HJB1-3**; **HJB4-2**; **HJB5-5** e **HJB10-4**.



Figura II.1 - Aparelhagem do tipo Clevenger, utilizado na extração dos óleos essenciais.

II.2.4.1 Teste para Avaliação da Atividade Citotóxica

O procedimento utilizado no teste de atividade citotóxica foi baseado no método desenvolvido por MEYER *et al.*, 1982, e adaptado por SERRANO *et. al.*, 1996. Para realização deste teste os ovos de *Artemia salina* foram adquiridos em uma loja local de produtos para aquários, e foram adicionados a um aquário adaptado dividido em dois compartimentos assimétricos com pequenas interligações entre eles. A parte maior foi iluminada com o auxílio de uma lâmpada incandescente de 60 W, para que os nauplios (estágio larval do camarão) recém eclodidos migrassem e pudessem ser recolhidos com maior facilidade. Foi utilizada uma bomba comum de aquário para a oxigenação da água. Depois de 24 h, os nauplios foram utilizados no bioensaio. A água do mar utilizada no bioensaio foi coletada na praia de Ondina, Salvador-BA em um volume aproximado de quatro litros; e submetida à filtração em papel de filtro.

A solução teste foi preparada dissolvendo-se 20 mg dos óleos essenciais em uma gota de Tween-80 e completado para 5,0 mL com água do mar previamente filtrada. Esta solução correspondeu à concentração de 4 mg/mL e foi considerada a solução estoque. As demais soluções de concentração inferior (50, 100, 200, 300 e 500 µg/mL), foram obtidas a partir da diluição da solução estoque. Para os óleos essenciais que a 50 µg/mL apresentaram 100% de mortalidade frente ao controle, estes foram novamente submetidos ao teste com concentrações inferiores a 50 (50, 40, 30, 20, 10 e 5 µg/mL).

Na avaliação da toxicidade, dez larvas recém eclodidas de *A. salina* foram adicionadas em cada um dos cinco frascos, contendo as soluções dos óleos essenciais, nas concentrações descritas acima. Cada frasco teve seu volume completado para 5 mL de água do mar, para que se pudesse chegar às concentrações, que foram previamente descritas aqui, em µg/mL. As análises foram realizadas em triplicatas. Os frascos foram mantidos sob iluminação e as larvas sobreviventes foram contadas após 24 h. Foi utilizado um grupo controle, contendo apenas uma solução de Tween-80, submetido ao mesmo procedimento experimental, contendo idênticos números de larvas, para efeitos comparativos do veículo. Os nauplios foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação. Os valores de CL₅₀ (concentração letal) foram calculados através do programa PROBIT.

II.2.4.2 Teste da Avaliação da Atividade Larvicida

II.2.4.2.1 Criação e Manutenção dos Mosquitos

Os ensaios larvicidas foram realizados segundo recomendações da OMS com algumas modificações (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Larvas de *Aedes aegypti* (Fig. II.2, p.119)

foram obtidas a partir de ovos depositados em papéis de filtro e adicionados em bacias com água destilada. Seu desenvolvimento em diferentes estádios (**L1**, **L2**, **L3** e **L4**), que posteriormente evoluíram para pupa e por fim até a forma adulta do mosquito (Fig. II.3, p.120), foram mantidos em uma temperatura média de $28,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80 \pm 4\%$, com fotoperíodo de aproximadamente 12 horas. Durante este período, as larvas foram alimentadas com ração (autoclavada) para gatos. Os insetos adultos foram mantidos em gaiolas teladas com nylon, alimentados com uma solução de glicose a 10% em chumaços de algodão, trocados diariamente. Para maturação dos ovos, o repasto sanguíneo das fêmeas do mosquito foi feito com pombos da espécie *Columbia livia*.

II.2.4.2.2 Ensaios para Avaliação da Atividade Larvicida

Os ensaios com os óleos essenciais e com as substâncias isoladas (HJB1-3; HJB4-2; HJB5-5 e HJB10-4) foram realizados utilizando-se larvas jovens do 4º estágio (cabeça branca). Após a triagem de acordo com o estágio, as larvas foram colocadas em recipientes plásticos (copos de 200 mL). 15 larvas por teste foram utilizadas, com três réplicas para cada amostra analisada (cada concentração). Todas as amostras foram dissolvidas em solução aquosa de DMSO a 1% até a concentração a ser testada (250, 100 e 10 ppm). Após este teste preliminar foram executados novos experimentos a fim de determinar o CL_{50} de cada amostra (concentrações entre 1 e 100 ppm). Para avaliação da mortalidade cada grupo foi exposto à solução teste durante 48 horas. Para o controle negativo utilizou-se solução aquosa de DMSO a 1%, o qual foi mantido nas mesmas condições do teste; e para controle positivo foi utilizado temofós em uma concentração de 3 ppm.

As larvas foram consideradas mortas caso não exibissem nenhum movimento durante alguns segundos de observação. Os valores de CL_{50} (concentração letal média) foram calculados através do programa PROBIT.



Figura II.2 - Larvas de *Aedes aegypti* (Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:123ATC003_2.image_media_vertical.jpg), acessado no dia 13/08/2011.

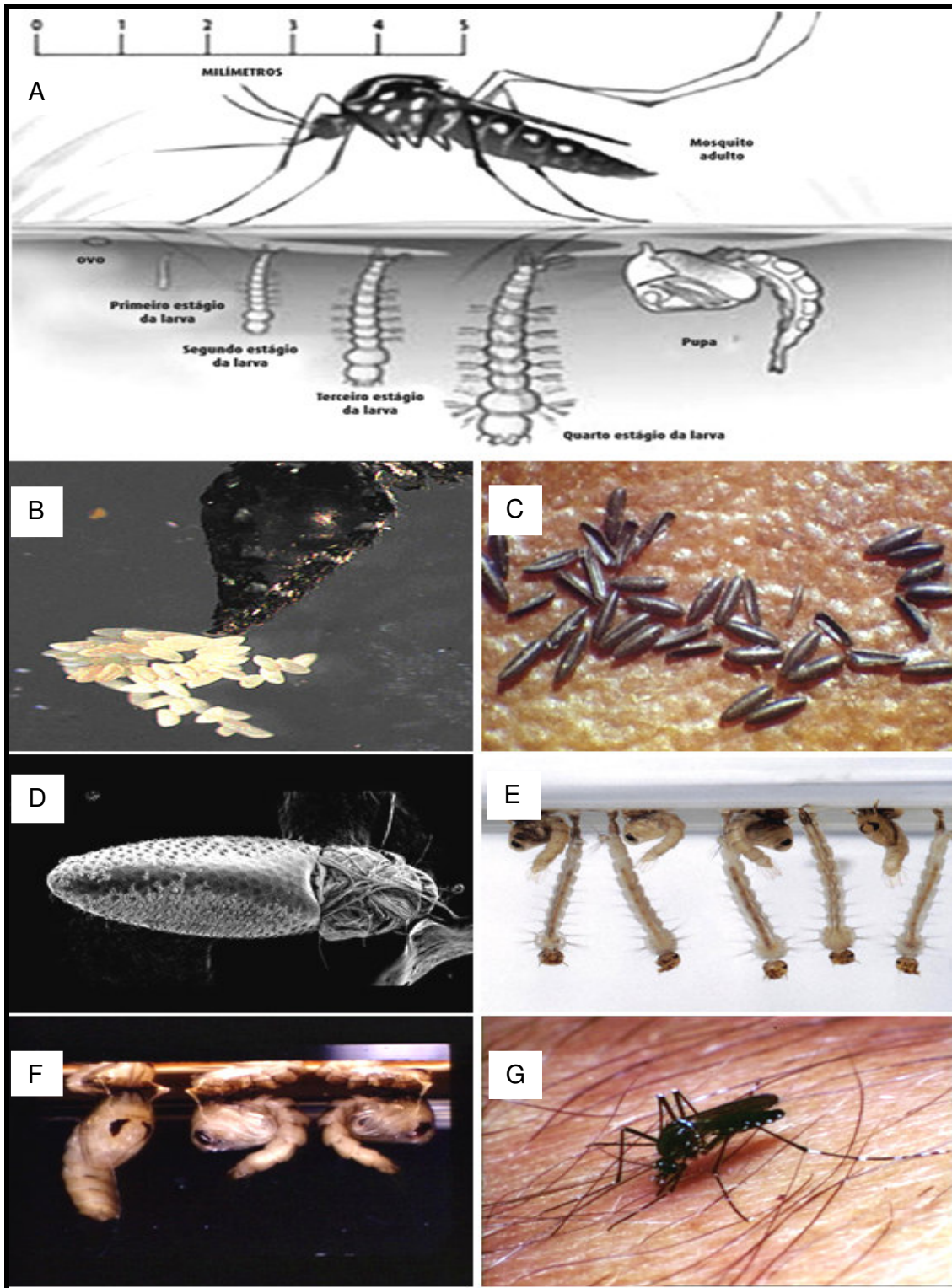


Figura II.3 - A) Ciclo do *Aedes Aegypti*; B) Ovoposição (entre 5 e 500 ovos); C) Ovos do mosquito; D) Larva quebrando a casca do ovo; E) Larvas (quatro estágios de desenvolvimento); F) Pupas e G) Fêmea adulta. (Fonte: http://www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/ca/DENGUE/3dengue_unicamp.html e <http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=32&sid=12>); acessado no dia 13/08/2011.

II.2.4.3 Atividade Antimicrobiana

II.2.4.3.1 Triagem Antimicrobiana

O teste para investigação da atividade antimicrobiana dos óleos extraídos e das substâncias isoladas das espécies estudadas foi realizado pelo método da difusibilidade em ágar, descrito por BAUER *et al.*, 1966; e adaptado por FONTANA *et al.*, 2004. O efeito antimicrobiano foi testado contra quatro microorganismos de importância médica para o homem: um coco gram-positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), dois bacilos gram-negativo *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC28853); e uma levedura *Cândida albicans* (UMP). A suspensão testada com microrganismo (0,5 da escala de MacFarland) foi espalhada em placas de Petri com Agar Müller-Hinton com o auxílio de uma zaragatoa. Foram abertos orifícios de dois milímetros de diâmetro na superfície das placas inoculadas no qual foram adicionados 15 µL das amostras de óleos essenciais na concentração de 10.000 ppm e 15 µL das substâncias isoladas na concentração de 4.000 ppm. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, a atividade antibacteriana foi analisada, medindo-se o diâmetro do halo de inibição formado ao redor do orifício. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos com um paquímetro, e expressos em milímetros. O controle negativo foi feito através da adição de DMSO (solvente utilizado) em três dos poços.

II.2.4.3.2 Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM foram feitas diluições seriadas em microplacas estéreis para cultura de tecido de 96 orifícios (TPP 92096 – SWITZERLAND), em um volume final de 100 µL. A cada orifício foram adicionados 85 µL do caldo Müller-Hinton, 10 µL da amostra a ser testada na diluição apropriada e 5 µL da suspensão bacteriana ou da levedura perfazendo um volume final de 100 µL.

As concentrações utilizadas para os óleos essenciais foram de 1000, 500 e 250 ppm e para as substâncias puras foram de 400, 200 e 100 ppm. Utilizou-se como Padrão de atividade antibacteriana os antibióticos sulfato de Gentamicina e Cloranfenicol nas concentrações de 140 a 3,5 ppm e de 400 a 10 ppm, respectivamente. Para o controle do crescimento microbiano a mesma quantidade de suspensão microbiana foi inoculada em 85 µL de caldo Müller-Hinton e 10 µL de DMSO. No controle negativo nenhum microorganismo foi inoculado no orifício contendo 100 µL de meio de cultura.

II.2.4.4 Teste para Avaliação da Atividade Antioxidante

II.2.4.4.1 Teste de seqüestro do radical 1,1-difenil -2- picrilhidrazil (DPPH)

Este teste baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em seqüestrar o radical DPPH reduzindo-o à sua correspondente hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com simultânea mudança na coloração de violeta a amarelo pálido (Figura II.4, p.122) [BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995].

O teste foi realizado com os óleos essenciais das duas espécies estudadas: *C. grewoides* (caules e folhas) e *P. klotzschianum* (raízes, caules, folhas e sementes). O extrato etanólico das raízes de *Piper* também foi avaliado. Inicialmente foi preparada uma solução metanólica de DPPH (40 µg/mL - 10 mg do DPPH, dissolvidos em 250 mL de MeOH) e soluções com as amostras nas concentrações de: 10, 30, 60, 120 e 200 µg/mL em MeOH. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução dos extratos ou do padrão ou de metanol para o controle e 2,7 mL da solução estoque de DPPH), foram realizadas a 517 nm, imediatamente e após 30 minutos. Como controle positivo foi empregada a solução metanólica de ácido gálico nas concentrações de 120, 60, 30, 10 e 5 µg/mL. Todo o teste foi realizado em triplicata.

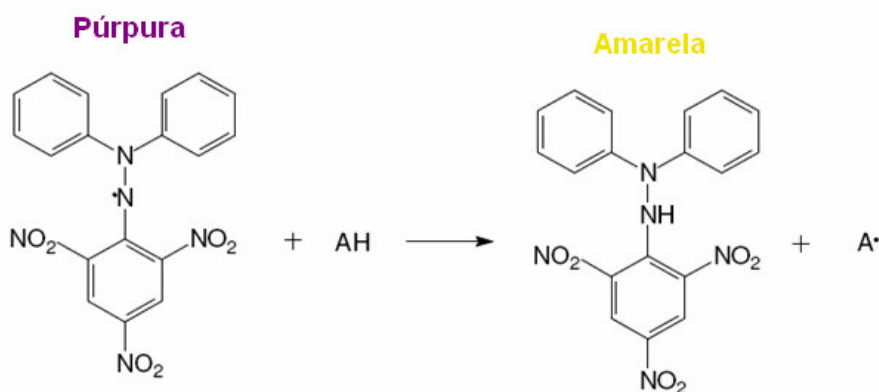


Figura II.4 - Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.

Fórmula para cálculo de Atividade Antioxidante:

$$AA = [(A_C - A_A) / A_C] \times 100$$

Onde:

A_C = Absorvância do controle no tempo final

A_A = Absorvância da amostra no tempo final.

II.3 Resultados e Discussão

II.3.1 Teor dos Óleos Essenciais das Espécies Estudadas

O resultado do rendimento dos óleos extraídos da espécie *C. Grewioides* está detalhado na Tabela II.2 e II.3, páginas 124 e 125. Estes óleos foram obtidos a partir das extrações utilizando o processo de hidrodestilação. Avaliando o teor de óleos extraídos das folhas e caules para a espécie *Croton grewioides* “erva-doce” - **CG1** durante o verão e inverno de 2007 percebe-se uma diminuição em torno de 42% (folhas) e 32% (caules). Já para as folhas de *Croton grewioides* “cravo da Índia” - **CG2** ocorreu um aumento em torno de 60%, isso provavelmente se deve ao fato das folhas estarem mais murchas; ou seja, havia uma maior concentração de óleos em **CG2** que em **CG1**.

Quando a idade (“altura”) da planta é avaliada observa-se que o teor de óleos extraídos das folhas de **CG1** e **CG2** (Tab. II.2 e II.3, páginas 124 e 125) são maiores nos espécimes adultos. Destaque para o grande aumento observado para as folhas em **CG2**; este aumento provavelmente tenha ocorrido, pois em Outubro de 2008 foi um período de grande estiagem na região e, este espécime encontrava-se com poucas folhas e todas murchas. Já para os teores de óleos extraídos dos caules não se observou variações consideráveis quando comparado a idade das plantas. Os óleos extraídos das amostras **OEFCG2** e **OECCG2**, tanto jovens quanto adultas mostraram uma coloração amarela e, com aroma bastante acentuado de “cravo da Índia”. Para as demais amostras de *C. grewioides* os óleos mostraram-se incolores com aroma que lembravam a “erva-doce”.

Os óleos essenciais extraídos das raízes, folhas, caules e sementes de *P. klotzschianum* apresentaram aspecto claro, com aroma bastante agradável. O resultado detalhado do rendimento dos óleos essenciais obtidos a partir das extrações utilizando o processo de hidrodestilação a partir da massa fresca são mostrados na Tabela II.4, página 125. Destaque para o rendimento encontrado nas folhas $1,81 \pm 0,063$ % (m/m). Para a semente foi realizada apenas uma extração, pois a quantidade da mesma era pequena. Logo esta percentagem alta de óleos encontrada fica dependendo de novas extrações para validar este resultado.

Tabela II.2 - Resultado detalhado dos rendimentos encontrados para os óleos essenciais de *Croton Grewioides* aroma “erva-doce” **CG1**

	Massa utilizada (g)	Quantidade extraída (g)	% de extração (m/m)	Média/Desvio padrão
FCG1* MAR/07	1 ^a – 100,00	2,36	2,36	2,44 ± 0,09
	2 ^a – 80,00	1,94	2,42	
	3 ^a – 75,00	1,91	2,54	
FCG1* AGO/07	1 ^a – 84,70	1,65	1,27	1,40 ± 0,18
	2 ^a – 129,00	1,12	1,32	
	3 ^a – 130,00	2,11	1,62	
CCG1* MAR/07	1 ^a – 50,50	0,72	1,19	1,13 ± 0,07
	2 ^a – 64,00	0,68	1,05	
	3 ^a – 60,00	0,70	1,16	
CCG1* AGO/07	1 ^a – 88,00	0,72	0,82	0,77 ± 0,08
	2 ^a – 100,00	0,68	0,68	
	3 ^a – 100,00	0,81	0,81	
FCG1 Jovem	1 ^a – 21,10	0,84	4,00	4,12 ± 0,10
	2 ^a – 24,00	1,01	4,20	
	3 ^a – 26,20	1,08	4,15	
FCG1 Adulto	1 ^a – 4,40	0,30	6,90	6,36 ± 0,58
	2 ^a – 4,05	0,26	6,42	
	3 ^a – 3,65	0,21	5,75	
CCG1 Jovem	1 ^a – 57,30	0,47	0,82	0,79 ± 0,02
	2 ^a – 45,40	0,35	0,78	
	3 ^a – 43,00	0,33	0,78	
CCG1 Adulto	1 ^a – 41,00	0,29	0,70	0,77 ± 0,07
	2 ^a – 65,70	0,49	0,76	
	3 ^a – 64,70	0,54	0,84	

*Folhas e caules foram coletadas do espécime jovem.

Tabela II.3 - Resultado detalhado dos rendimentos encontrados para os óleos essenciais de *Croton Grewioides* aroma "cravo da Índia" CG2

	Massa utilizada (g)	Quantidade extraída (g)	% de extração (m/m)	Média/Desvio padrão
FCG2* MAR/07	1ª – 100,00	1,30	1,30	1,11 ± 0,19
	2ª – 100,00	1,11	1,11	
	3ª – 100,00	0,92	0,92	
FCG2* AGO/07	1ª – 56,20	1,04	1,85	1,77 ± 0,11
	2ª – 55,50	1,00	1,81	
	3ª – 45,40	0,75	1,65	
FCG2 Jovem	1ª – 25,0	0,511	2,04	1,81 ± 0,202
	2ª – 25,0	0,425	1,70	
	3ª – 25,0	0,420	1,68	
FCG2 Adulto	1ª – 8,00	0,450	5,63	6,01 ± 0,35
	2ª – 8,90	0,560	6,30	
	3ª – 8,00	0,490	6,12	
CCG2 Jovem	1ª – 25,0	0,136	0,54	0,53 ± 0,032
	2ª – 25,0	0,139	0,55	
	3ª – 30,0	0,147	0,49	
CCG2 Adulto	1ª – 39,10	0,290	0,74	0,77 ± 0,03
	2ª – 47,00	0,370	0,79	
	3ª – 27,00	0,213	0,79	

*Folhas e caules foram coletadas do espécime adulto.

Tabela II.4 – Resultado detalhado dos rendimentos encontrados para os óleos essenciais de *P. klotzschianum*

	Massa utilizada (g)	Quantidade extraída (g)	% de extração (m/m)	Média/Desvio padrão
Raízes	1ª – 16,0	0,122	0,76	0,77 ± 0,014
	2ª – 16,0	0,126	0,78	
	3ª – 16,0	0,124	0,77	
Folhas	1ª – 25,0	0,463	1,85	1,81 ± 0,063
	2ª – 21,0	0,388	1,85	
	3ª – 26,3	0,458	1,74	
Caules	1ª – 43,0	0,051	0,12	0,13 ± 0,017
	2ª – 43,0	0,066	0,15	
	3ª – 70,0	0,085	0,12	
Semen-tes	1ª – 6,0	0,782	13	-

II.3.2 Identificação e Quantificação dos Constituintes Presentes nos Óleos Essenciais

II.3.2.1 *Croton grewoides* Baill, aroma “erva-doce” - CG1

O resultado da identificação e quantificação dos componentes presentes em **CG1** encontram-se na tabela II.5 página 130. Um total de oito compostos foi identificado: um monoterpeno hidrocarboneto (α -pineno), um monoterpeno oxigenado (cânfora), dois compostos benzenóides (metilchavicol [83] e *trans*-anetol [84]), dois sesquiterpenos hidrocarbonetos (*trans*-cariofileno e biciclogermacreno) e dois sesquiterpenos oxigenados (espatulenol e *trans*, *trans*-farnesoato de metila). Dos dois constituintes majoritários encontrados o metilchavicol (estragol) chegou a 96% em Outubro de 2008, como constituinte principal nas folhas da planta adulta; já o *trans*-anetol a 42% nos caules da planta adulta (Fig. II.5, p.127). Verifica-se que o teor de *trans*-anetol é maior nos caules que nas folhas.

Continuando a análise da tabela II.5 página 130, percebemos que os constituintes químicos presentes não sofrem grandes variações durante as estações avaliadas (verão x inverno de 2007). Porém ao compararmos o fator idade da planta (jovem x adulta) percebemos variação nos teores dos constituintes majoritários (metilchavicol e *trans*-anetol) presentes nos caules das plantas adultas. Já para as folhas não se observou uma variação significativa do constituinte majoritário (metilchavicol).

Para confirmação do constituinte majoritário (metilchavicol [83]), espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT135 foram adquiridos (Figura II.6, página 128). Os valores de deslocamentos químicos foram idênticos aos apresentados para o metilchavicol (GUERRINI *et al.*, 2006). Através desta confirmação podemos concluir que a espécie **CG1** apresenta-se como uma potencial fonte natural de estragol.

Os óleos essenciais ricos em estragol são famosos por suas propriedades antifúngicas (SHIN & KANG 2003). O estragol provocou altas taxas de mortalidade nos mosquitos *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* [BHATNAGAR *et al.*, 1993]; além de apresentar efeito carcinogênico em ratos [DEMILLO *et al.*, 1994]. O estragol é considerado ser genotóxico e cancerígeno e, conseqüentemente, a redução da exposição e restrições nos níveis de utilização como substância aromatizante têm sido recomendados pelo Comité Científico da Alimentação Humana (DE VINCENZI *et al.*, 2000; RAFFO *et al.*, 2011). Sua adição como substância aromatizante em alimentos foi proibida na Europa em 2008 (European Commission 2008).

II.3.2.2 *Croton grewioides* Baill aroma “cravo da Índia” CG2

O resultado da identificação e quantificação dos 18 constituintes voláteis identificados em **CG2** encontram-se na tabela II.6, página 131; o benzenóide eugenol [85] foi o constituinte majoritário presente nas folhas e caules dessa planta, com teores superiores à 75% dos constituintes identificados (Fig. II.5, página 127). Outro fato que nos chamou a atenção foi à variação nos teores dos constituintes químicos quanto à idade da planta: tendo maior variação nos caules que nas folhas (93,6 % de eugenol nos caules da planta jovem e, 76,6% da planta adulta). Outro constituinte que teve um aumento considerável em seu teor foi o metileugenol [86] que passou de 1,9% nos caules da planta jovem para 8,9 % na planta adulta. Já quando se analisa o fator sazonalidade no caso das folhas percebe-se que o mesmo não parece ser um fator marcante.

Por apresentar alto teor do constituinte majoritário, espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT135 foram adquiridos (Figura II.7, página 129). Os valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C e DET135 são idênticos aos apresentados para o eugenol [85] (PEREIRA & MAIA 2007). Isso confirma de forma inequívoca a presença do eugenol como constituinte majoritário para as folhas e caules de *C. grewioides* aroma “cravo da Índia” – **CG2**.

Resultado relatado na literatura para *C. grewioides* coletado em Bezerro/PE trás o *trans*-anetol como constituinte majoritário (SILVA *et al.*, 2008^b), isso nos sugere que a espécie coletada em Jequié/BA trata de um novo quimiotipo.

O eugenol (4-hidroxi-3-metoxialilbenzeno) encontra-se distribuído no reino vegetal como constituinte dos óleos essenciais de plantas (FISCHER & DENGLER 1990). Este alilbenzeno é obtido do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum* Mer & Per), muito apreciado como condimento, e do óleo de algumas espécies de *Ocimum* (COSTA 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2011). O Brasil é também um grande exportador de eugenol. Entre os usos do eugenol destacam-se o emprego no alívio da dor de dente, como anti-séptico em odontologia e na fabricação de dentifrícios, em perfumaria, saboaria e como clarificador em histologia. O eugenol é também usado como matéria-prima para a obtenção de vanilina, empregada na aromatização de doces, chocolates, sorvetes e tabacos (COSTA 2000).

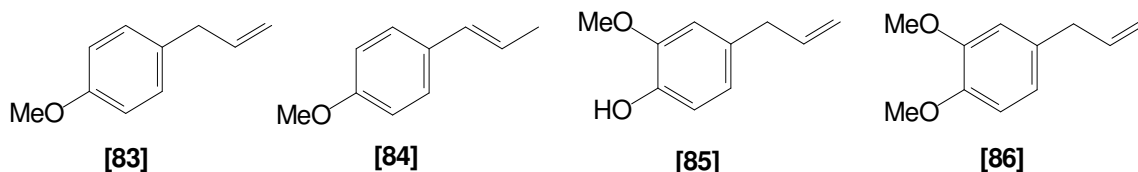


Figura II.5 - Constituintes majoritários dos óleos essenciais de *C. grewioides*.

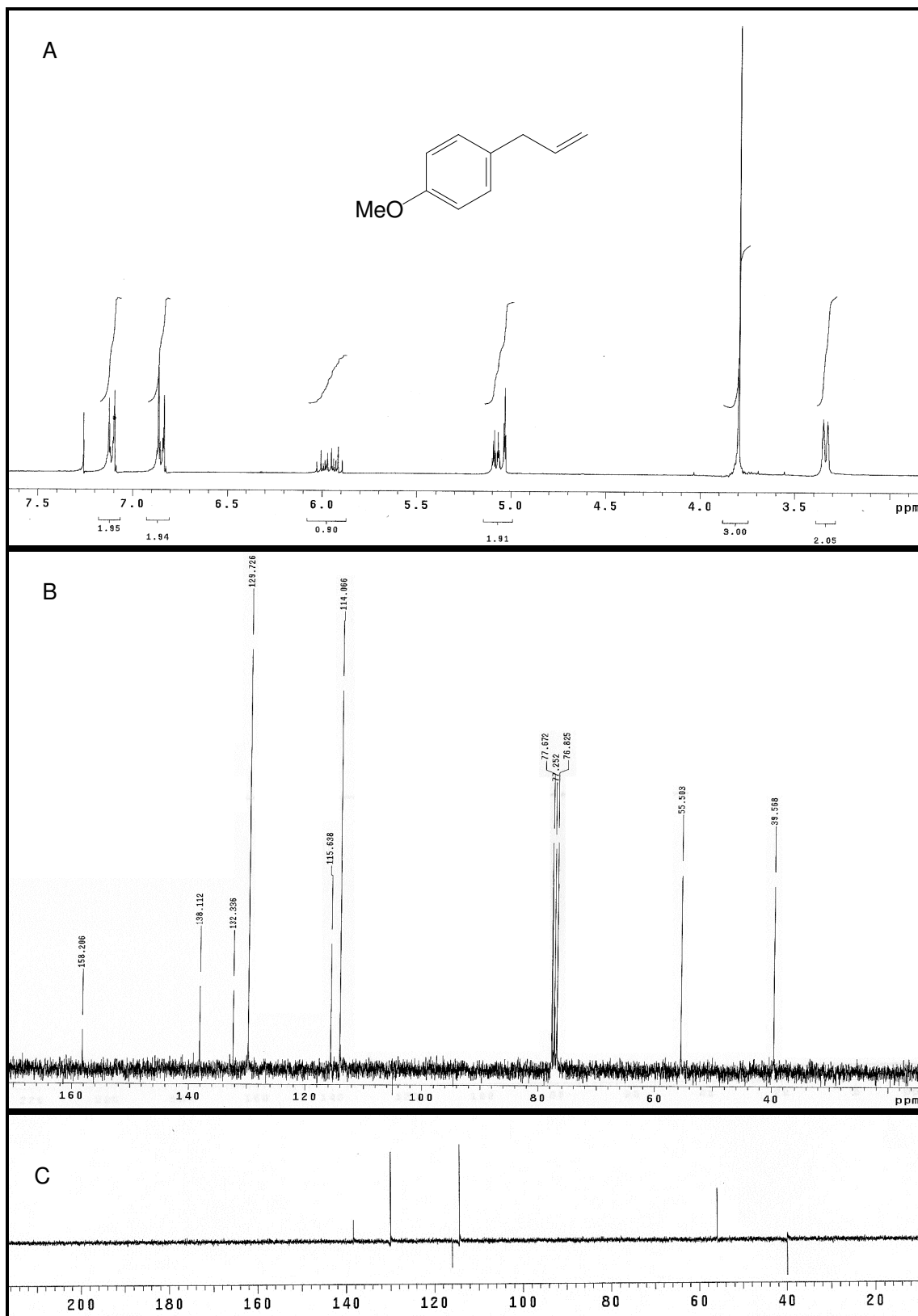


Figura II.6 - Espectro de RMN de ^1H (A), ^{13}C (B) e DEPT135 (C) [CDCl_3 , δ (ppm)] do óleo essencial das folhas de *C. grewoides* (FCG1).

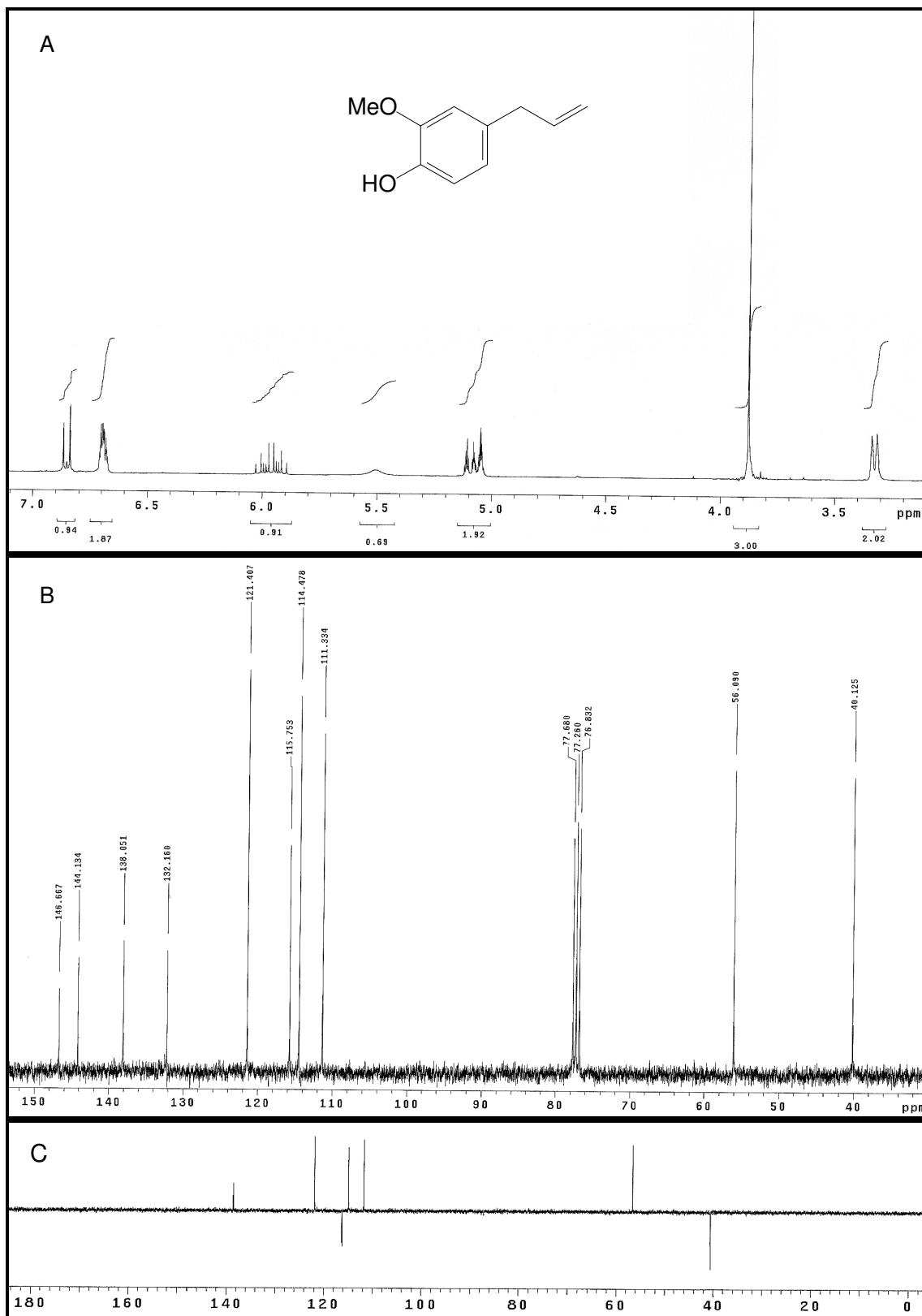


Figura II.7 - Espectro de RMN de ^1H (A), ^{13}C (B) e DEPT135 (C) [CDCl_3 , δ (ppm)] do óleo essencial do caule de *C. greviodes* (CCG2).

Tabela II.5 - Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Croton Grewioides* aroma “erva-doce” CG1

Compostos	IK _{Cal.}	IK _{Lit.}	Percentagem em relação à área *							
			FCG1		CCG1		FCG1 (OUT/2008)		CCG1 (OUT/2008)	
			MAR/2007	AGO/2007	MAR/2007	AGO/2007	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta
α -pineno	935	939	-	-	0,5 ± 0,04	0,3 ± 0,02	-	-	-	-
cânfora	1143	1143	-	Tr	0,5 ± 0,03	1,0 ± 0,34	-	-	0,9 ± 0,21	0,5 ± 0,20
metilchavicol	1195	1195	99,0 ± 0,05	96,7 ± 1,82	87,4 ± 0,93	90,1 ± 2,07	94,7 ± 3,26	96,4 ± 1,08	91,8 ± 2,15	53,7 ± 2,12
trans-anetol	1283	1283	-	0,2 ± 0,07	11,5 ± 0,86	7,5 ± 0,81	0,7 ± 0,20	2,6 ± 0,32	5,7 ± 0,81	42,5 ± 3,59
<i>trans</i> -cariofileno	1418	1418	-	-	-	-	Tr	0,11 ± 0,03	Tr	0,2 ± 0,04
biciclogermacreno	1495	1500	0,9 ± 0,05	1,4 ± 0,88	-	-	2,0 ± 0,43	0,34 ± 0,02	0,4 ± 0,02	2,1 ± 1,60
espatulenol	1577	1576	Tr	0,2 ± 0,15	-	-	0,5 ± 0,05	0,17 ± 0,09	Tr	Tr
<i>trans, trans</i> -farne soato de metila	1783	1783	Tr	0,3 ± 0,24	-	-	1,4 ± 0,40	Tr	Tr	Tr
Total			99,9	98,8	99,9	98,9	99,3	99,6	98,8	99,0

*Todos os valores são médias de três repetições ± desvio padrão; Tr – traço (menos que 0.10%); IK_{Cal.} = Índice de Kovats Calculado, IK_{Lit.} = Índice de Kovats Literatura.

Tabela II.6 - Constituintes químicos dos óleos essenciais de Croton Grewioides aroma “cravo da Índia” CG2

Compostos	IK _{Cal.}	IK _{Lit.}	Porcentagem em relação à área *					
			FCG2		FCG2 (OUT/2008)		CCG2 (OUT/2008)	
			MAR/2007	AGO/2007	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta
cânfora	1143	1143	-	Tr	-	-	-	2,5 ± 0,91
borneol	1167	1165	-	-	-	-	-	0,1 ± 0,01
metilchavicol	1195	1195	0,8 ± 0,49	1,7 ± 1,33	Tr	1,1 ± 0,21	Tr	3,2 ± 0,60
chavicol	1250	1253	-	0,2 ± 0,02	-	0,2 ± 0,02	-	-
<i>trans</i> -anetol	1283	1283	-	Tr	-	-	-	3,2 ± 0,81
eugenol	1356	1356	90,8 ± 0,92	86,9 ± 4,55	96,5 ± 0,72	86,8 ± 2,25	93,6 ± 0,72	76,6 ± 0,66
metileugenol	1404	1401	Tr	0,5 ± 0,06	Tr	Tr	1,9 ± 0,04	8,9 ± 0,62
<i>cis</i> -metiliso Eugenol	1457	1456	-	0,2 ± 0,03	-	-	Tr	0,4 ± 0,13
<i>trans</i> -metiliso Eugenol	1495	1495	-	-	-	-	-	2,2 ± 0,18
<i>trans</i> -cariofileno	1418	1418	Tr	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,04	0,4 ± 0,08	-	Tr
<i>α-trans</i> -bergamoteno	1434	1436	Tr	0,4 ± 0,01	Tr	0,5 ± 0,03	-	Tr
aromadendreno	1439	1439	0,7 ± 0,06	Tr	0,2 ± 0,03	0,8 ± 0,21	0,5 ± 0,02	-
aloaromadendreno	1460	1461	-	-	Tr	0,5 ± 0,07	-	-
biciclogermacreno	1495	1494	5,4 ± 0,32	4,2 ± 0,30	2,4 ± 0,23	2,8 ± 0,12	1,4 ± 0,10	Tr
acetileugenol	1527	1524	1,3 ± 0,32	0,8 ± 0,06	-	Tr	0,7 ± 0,09	-
espatulenol	1577	1576	Tr	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,13	1,1 ± 0,30	0,8 ± 0,17	0,2 ± 0,05
globolol	1589	1583	-	-	-	0,3 ± 0,08	-	-
<i>trans, trans</i> -farnesoato de metila	1783	1783	0,8 ± 0,42	0,8 ± 0,19	Tr	2,6 ± 0,15	1,0 ± 0,09	Tr
Total			99,8	96,5	99,9	97,1	99,9	97,3

*Todos os valores são médias de três repetições ± desvio padrão; Tr – traço (menos que 0.10%); IK_{cal.} = Índice de Kovats Calculado, IK_{Lit.} = Índice de Kovats Literatura.

II.3.2.4 *Piper klotzschianum* Kunth

Os resultados das análises dos óleos essenciais CG-EM obtidos das raízes, caules, folhas e sementes são mostrados na tabela II.7, página 133. Foi identificado um total de 22 compostos nos óleos essenciais; sendo que a composição química da semente mostrou maior diversidade. Destaque para o constituinte majoritário o fenilpropanóide 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno [61] que aparece em todas as partes da planta estudada (raízes 96,2%; caules 84,7%; folhas 81,0% e sementes 36,9%). Além deste constituinte observa-se que na semente aparecem com destaque os monoterpenos α -felandreno (17,0%) e limoneno (17,8%), o sesquiterpeno α - *trans*-bergamoteno (8,8%) e outro fenilpropanóide *o*-cimeno (7,4%). Estas cinco substâncias representam 87,9% da composição do óleo essencial.

Essas substâncias relatadas foram identificadas e quantificadas pela primeira vez na espécie estudada; sendo o componente majoritário elucidado por meio de técnicas espectrométricas de RMN de ^1H e ^{13}C (Fig. II.8, p.134). Toda a discussão da elucidação para este componente pode ser consultada no item **I.3.3.7** página 57 do capítulo I. Este componente provavelmente é o responsável pelo aroma agradável do óleo. Cabe ainda destacar que no capítulo I foi relatada a presença desta substância, além da isoasarona (2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno) [59], como constituintes isolados do extrato hexânico das raízes. Observando novamente a tabela II.7, página 139, constata-se a presença da isoasarona como componente do óleo essencial das folhas em uma concentração relativa de 9,0%.

A substância majoritária encontrada nos óleos desta espécie foi identificada anteriormente nos óleos extraídos das folhas de *P. ovatum* em uma concentração relativa de 95% (MOREIRA *et al.*, 1997). Desta mesma espécie foi isolada esta substância dos extratos apolares das folhas e raízes (MARQUES *et al.*, 2008). Porém esta substância não foi identificada nos óleos extraídos das folhas de *P. ovatum* coletada no Estado do Rio de Janeiro (SANTOS *et al.*, 2001).

Tabela II.7 - Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Piper klotzschianum*

Compostos	IK _{Cal.}	IK _{Lit.}	Percentagem em relação à área *			
			Raízes	Caules	Folhas	Sementes **
α -pineno	935	939	-	-	-	1,37
β -pineno	977	980	-	-	-	0,47
β -mirceno	990	991	-	-	-	0,40
α-felandreno	1004	1005	-	-	-	16,96
<i>o</i> -cimeno	1028	1022	-	-	-	7,37
limoneno	1029	1031	-	-	-	17,75
NI	1348	-	-	0,41 \pm 0,05	-	-
α -cubebeno	1350	1351	-	-	tr	0,47
α -copaeno	1377	1376	tr	tr	tr	0,70
β -cubebeno	1390	1390	tr	0,20 \pm 0,09	1,44 \pm 0,23	1,66
β -elemeno	1392	1391	-	0,24 \pm 0,09	tr	Tr
1-butil-3,4-metilenodi oxibenzeno	1408	Ne	96,19 \pm 0,01	84,75 \pm 1,08	81,04 \pm 3,89	36,92
NI	1419	-	-	1,95 \pm 0,36	1,56 \pm 0,19	TR
3,4-metilenodioxiben zilmetilcetone	1423	Ne	0,47 \pm 0,06	0,36 \pm 0,11	tr	0,81
α - <i>trans</i> -bergamoteno	1434	1436	-	1,44 \pm 0,26	-	8,84
β (<i>E</i>)-farneseno	1458	1458	tr	0,36 \pm 0,02	-	-
germacreno D	1482	1480	0,21 \pm 0,01	0,39 \pm 0,07	1,05 \pm 0,18	0,78
NI	1486	-	-	0,71 \pm 0,11	-	1,62
eremofileno	1488	Ne	-	tr	0,76 \pm 0,20	TR
biciclogermacreno	1496	1494	tr	0,96 \pm 0,15	2,68 \pm 0,60	1,16
torreiol	1503	-	0,47 \pm 0,03	0,36 \pm 0,03	tr	TR
β -bisabolono	1508	1509	0,28 \pm 0,01	1,20 \pm 0,30	-	-
δ -cadineno	1525	1524	0,11 \pm 0,01	0,38 \pm 0,07	0,72 \pm 0,20	0,45
(<i>Z</i>)-isoelemicina	1571	1573	-	0,82 \pm 0,13	1,23 \pm 0,35	0,25
2,4,5-trimetoxi-1-prope nilbenzeno	1589	Ne	1,84 \pm 0,20	5,36 \pm 0,51	9,10 \pm 2,22	1,37
Total identificado			99,57	99,89	99,58	99,35

*Todos os valores são medias de três repetições \pm desvio padrão; ** Tentativa de quantificação (não teve repetição); Tr – traço (menos que 0.10%); NI – não identificado e Ne – não encontrado na literatura consultada.

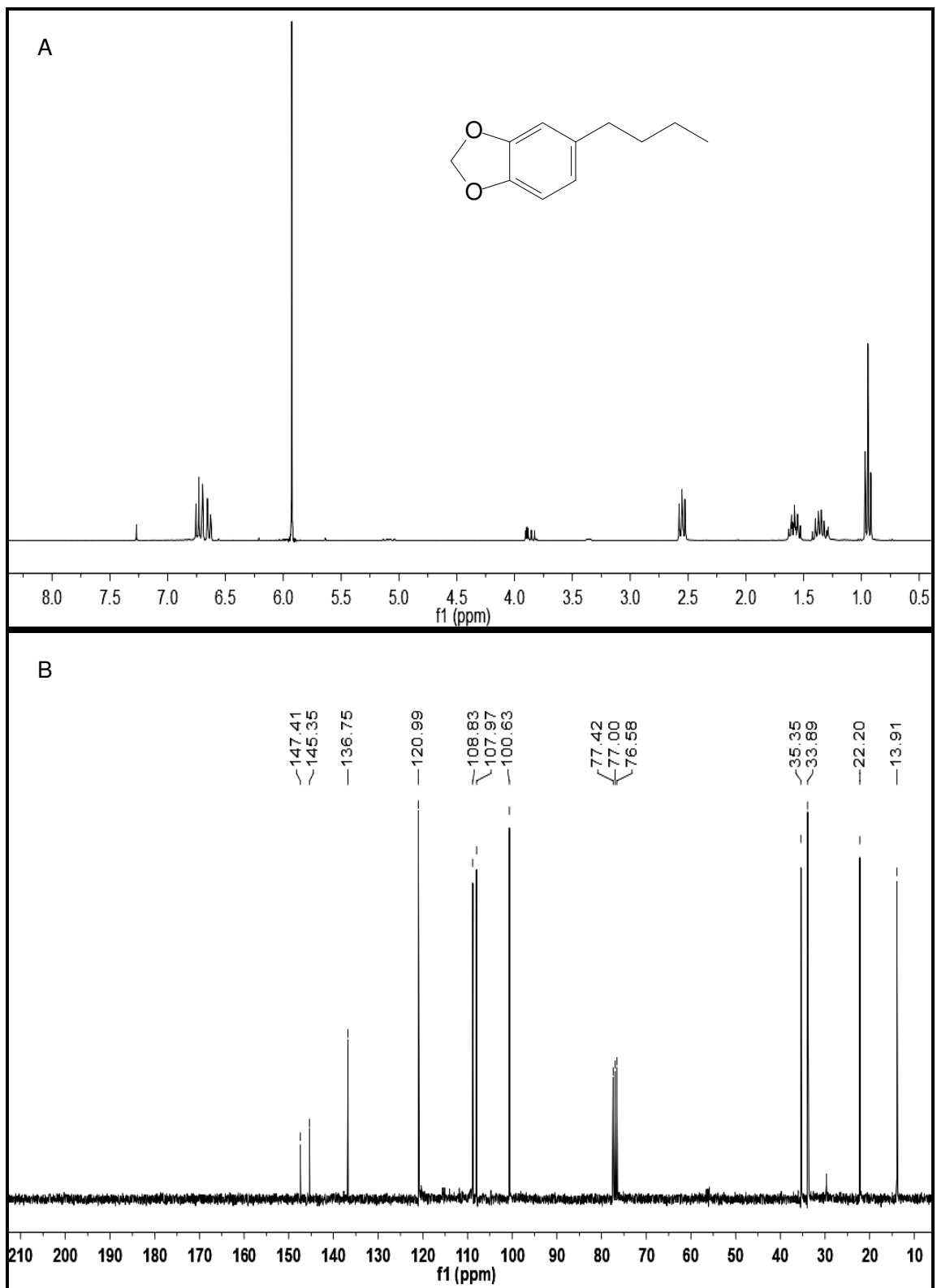


Figura II.8 - Espectro de RMN de ^1H (A) e ^{13}C (B) [CDCl_3 , δ (ppm)] do óleo essencial das raízes de *Piper klotzschianum* (**OERP**K).

II.3.3 Atividades Biológicas das Espécies Estudadas

A triagem é importantíssima como parte das etapas iniciais no processo de descoberta de medicamentos frente a alvos biológicos propostos. Os testes para avaliação das atividades biológicas propostos são primários e, portanto simples, rápidos, reprodutíveis e de baixos custos. Neste trabalho são apresentados testes biológicos para avaliação das atividades: citotóxicas, larvicidas, antimicrobianas e antioxidantes.

II.3.3.1 Avaliação da Atividade Tóxica

Artemia salina Leach é um microcrustáceo amplamente conhecido como indicador de toxicidade em um bioensaio que utiliza a CL_{50} (concentração letal média) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (NUNES, *et al.*, 2008). A letalidade da *A. salina* foi o indicador da toxicidade utilizado para as amostras testadas (extrato, óleos essenciais e substância isolada). Este teste não é específico para atividade antitumoral, porém é útil em estudos biomonitorados na busca de compostos com atividade citotóxica. De acordo com ANDERSON *et al.*, 1991; a substância que apresentar $CL_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ é comparável com a camptotecina e sulfato de vincristina, duas substâncias consideradas muito ativas e, aquela que apresentar $CL_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$, no intervalo entre 100 a 900 $\mu\text{g/mL}$, comparável ao ácido hipúrico é considerada medianamente ativa. Enquanto que é considerada inativa a substância que apresentar $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$.

Os resultados das amostras testadas (extrato, óleos essenciais e substância isolada) são mostrados na tabela II.8, página 136. Verificou-se 100% de mortalidade para o controle positivo e foi constatado que todas as larvas se mativeram vivas no caso do controle negativo. A análise da tabela permite afirmar que com exceção do extrato etanólico das raízes de *Piper klotzschianum*, todas as demais amostras apresentaram CL_{50} inferior a 90 $\mu\text{g/mL}$, observando-se um intervalo de confiança de 95%, com destaque especial para os óleos extraídos das diversas partes da Piperaceae em estudo, bem como para a substância **HJB1-3** (1-butil-3,4-metilenodióxi-benzeno) isolada do extrato hexânico desta planta e, presente em grandes concentrações nas raízes, caules e folhas. Apesar de esta substância estar presente em uma concentração bem menor nos óleos das sementes (37%); estes apresentaram uma CL_{50} de 14,04 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado nos sugere que a substância **HJB1-3** deve estar relacionada com a citotoxicidade encontrada nos óleos desta espécie, porém não deve ser a única, pois se fosse o resultado para a CL_{50} da amostra **OERPCK** deveria ser diferente, pois ela apresenta uma alta concentração deste componente (96%).

Para os óleos extraídos das folhas e caules de *Croton grewoides* observa-se uma maior citotoxicidade para os óleos essenciais de *Croton grewoides* “cravo da Índia” (OECG2); fato este provavelmente devido à alta concentração do eugenol (SILVA *et al.*, 2010^b).

Tabela II.8 - Atividades tóxicas dos óleos essenciais sobre *Artemia salina* expressas em concentrações letais de 50 % (CL₅₀).

Amostras	Atividade citotóxica	
	CL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança (95 %) (µg/mL)
OERPCK	15,43	8,85 – 24,56
OCEPK	7,07	6,25 – 7,99
OEFPK	7,62	6,70 – 8,62
OESPK	14,04	12,00 – 16,18
ERPCK	102,74	91,35 – 114,01
HJB1-3	7,06	6,25 – 7,99
OEF CG1*	67,13	57,02 – 77,74
OEC CG1*	80,16	70,54 – 89,84
OEF CG2 [†]	16,23	8,93 – 27,52
OEC CG2 [†]	19,20	13,07 – 26,74
OEC CG3	59,16	55,83 – 62,68

*espécime jovem, [†] espécime adulto – ambas coletadas em Outubro de 2008.

II.3.3.2 Ensaio da Avaliação da Atividade Larvicida

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 500 mil pessoas com dengue hemorrágica necessitem de internação a cada ano; dessas uma proporção muito grande são de crianças. Cerca de 12.500 (2,5%) pessoas atingidas morrem (WHO, 2009). Na busca por controle químico alternativo contra *A. aegypti* L., muitas pesquisas são desenvolvidas e estimuladas no intuito de se descobrirem novas substâncias inseticidas de origem vegetal.

Neste trabalho foram constatados 100% de mortalidade das larvas para o controle positivo e, todas utilizadas no controle negativo permaneceram vivas. O resultado da CL₅₀ para as amostras testadas estão na tabela II.9, página 137. Resultados promissores foram constatados para todas as amostras submetidas ao teste, principalmente para os óleos extraídos das raízes de *P. klotzschianum* que apresentou uma CL₅₀ entre 1 e 10 µg/mL, e para a substância HJB5-5 (piperovatina [71]) que apresentou CL₅₀ de 1,5 µg/mL. No caso da

amostra **OERP** novos testes deveram ser executados para a determinação precisa da CL_{50} . Cabe ressaltar que a 10 $\mu\text{g/mL}$ todas as larvas do quarto instar do *A. aegypti* foram mortas após 48 horas do início do teste. A tetra-hidropiperlonguminina [73] (**HJB10-4**) uma piperamida inédita do metabolismo especial de plantas apresentou uma ótima atividade larvicida com CL_{50} de 10,4 $\mu\text{g/mL}$.

Para a amostra **OECCG3** foi encontrado CL_{50} de 34,55 $\mu\text{g/mL}$. Estudo realizado com óleos essenciais extraídos das folhas da espécie *Croton zenhtneri* exibiram alta atividade larvicida com CL_{50} de 28 $\mu\text{g/mL}$, onde o constituinte majoritário identificado foi o fenilpropanóide *trans*-anetol numa concentração relativa a 94% (MORAIS *et al.*, 2006). Este dado justifica uma maior CL_{50} da amostra **OECCG3** que apresenta em sua composição uma quantidade bem menor de *trans*-anetol (11,5%).

Conforme relatado anteriormente a composição química dos óleos de *C. grewoides* estudados neste trabalho apresentam altas concentrações de metilchavicol e eugenol. O fenilpropanóide eugenol foi submetido ao teste de susceptibilidade de larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* e apresentou CL_{50} de 44,5 $\mu\text{g/mL}$ (SIMAS *et al.*, 2004), o que justifica a CL_{50} de 63,0 $\mu\text{g/mL}$ exibida pela amostra **OECCG2**, além de identificar um dos princípios ativo.

Tabela II.9 - Atividades larvicidas dos óleos essenciais e substâncias sobre larvas do quarto instar do *Aedes aegypti* expressas em concentrações letais de 50 % (CL_{50}).

Amostras	Atividade larvicida	
	$CL_{50}(\mu\text{g/mL})$	Intervalo de confiança (95 %) ($\mu\text{g/mL}$)
OERP	[10 – 1] [*]	-
OESP	13,27	10,99 – 17,13
HJB1-3	□ 200	-
HJB4-4	31,35	25,47 - 40,00
HJB5-5	1,50	1,29 - 1,79
HJB10-4	10,43	7,64 - 14,00
OEFCG1 jovem	49,30	41,47 – 55,90
OECCG2 adulto	62,99	49,79 – 98,29
OECCG3	34,55	29,89 – 39,44

*Material insuficiente para cálculo do CL_{50}

II.3.3.3 Ensaio para Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Na busca de novos agentes antimicrobianos devem-se enfatizar aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitas plantas já vêm sendo vastamente usadas e testadas há centenas de anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro (FERRONATTO *et al.*, 2007). Nesta pesquisa os resultados dos halos de inibição no teste de triagem antimicrobiana (Fig. II.9, p.141) e a da CIM (Fig. II.10, p.141) apresentadas para as amostras avaliadas estão mostradas nas tabelas II.10 e II.11, páginas 139 e 140; respectivamente.

Pela análise da tabela II.10 foi constatada atividade antimicrobianas no teste de difusibilidade em Agar para os óleos essenciais extraídos das raízes e sementes de *P. klotzschianum*. Para os óleos essenciais das raízes observou atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*; e atividade contra a levedura *C. albicans*. A concentração inibitória mínima (CIM) encontrada para cada microorganismo testado foi respectivamente 1000, 1000 e 500 µg/mL. Para os óleos das sementes a CIM encontrada para *C. albicans* foi de 500 µg/mL.

Para os óleos extraídos das folhas e caules de *C. grevoldes* apenas para os óleos das folhas de **OEFCG1** e **OEFCG3** não foram observados qualquer indicio de atividade contra os microorganismos testados. Os óleos das amostras **OEFCG2** e **OEFCG2** apresentaram respectivamente CIM 500 µg/mL para a bactéria gram-positiva *S. aureus* e para a levedura *C. albicans*. A atividade contra a bactéria *S. aureus* pode estar relacionada à alta concentração do eugenol presentes no óleo, conforme relatado por NAKAMURA *et al.*, 1999.

As piperamidas **HJB 5-5** [71] e **HJB10-4** [73] apresentaram resistência para *S. aureus* nas concentrações testadas. Porém a fração **DJB28-5** (mistura das duas substâncias) mostrou atividade com CIM de 200 µg/mL; o que pode estar ocorrendo uma ação sinérgica. A cromanona (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona (**HJB4-2** [60]) mostrou ação antibacteriana tanto para a bactéria gram-positiva *S. aureus*, como para a gram-negativa *E. coli*.

Nenhuma das amostras testadas teve qualquer indicio de atividade contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Atividades antimicrobianas foram constatadas para os óleos essenciais contra bactérias e leveduras de grande importância médica para o homem. Resultados esses de bastante interesse investigativo, uma vez se tratar de uma mistura de substâncias.

Tabela II.10 - Halo de inibição (mm) apresentado pelas substâncias na triagem antimicrobiana.

Amostras	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
OEFCG1*	-	-	-	-
OECCG1*	-	6	8	10
OEFCG2[†]	-	6	8	7
OECCG2[†]	-	-	6	7
OEFCG3	-	-	-	-
OECCG3	-	-	-	8
OERPK	-	5	6	7
OEFPK	-	-	-	-
OESPK	-	-	-	7
HJB 4-2	-	5	6	-
HJB 5-5	-	-	-	-
HJB10-4	-	-	-	-
DJB 28-5	-	-	7	-
DJB8-2	-	-	-	-
ERC8-4	-	-	-	-
HJB 52-5	-	-	-	-

*espécime jovem, [†] espécime adulto – ambas coletadas em Outubro de 2008.

Tabela II.11 - Resultado da CIM para as amostras avaliadas contra *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Amostras	Concentração inibitória mínima		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
OEFCG1	R	R	R
OECCG1	1000	500	500
OEFCG2	500	1000	500
OECCG2	500	R	500
OEFCG3	R	R	R
OECCG3	R	R	500
OERPK	1000	1000	500
OEFPK	R	R	R
OESPK	R	R	500
HJB 4-2	400	400	R
HJB 5-5	R	R	R
HJB10-4	R	R	R
DJB 28-5	200	R	R
DJB8-2	R	R	R
ERC8-4	R	R	R
Gentamicina	7.0	7,0	NT(R)
Clorafenicol	20,0	*R	NT(R)

NT – NÃO TESTADO.

*Cloranfenicol CIM 40 µg/mL.

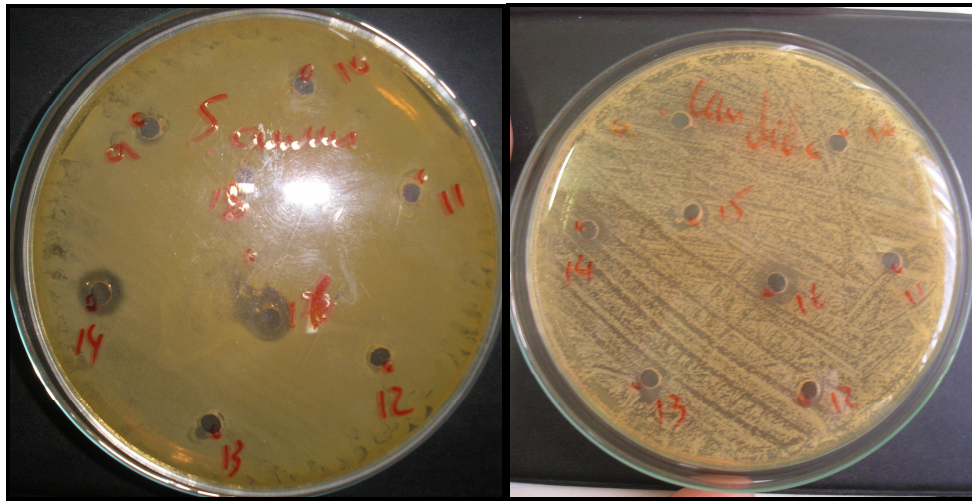


Figura II.9 - Halos de inibição das amostras contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

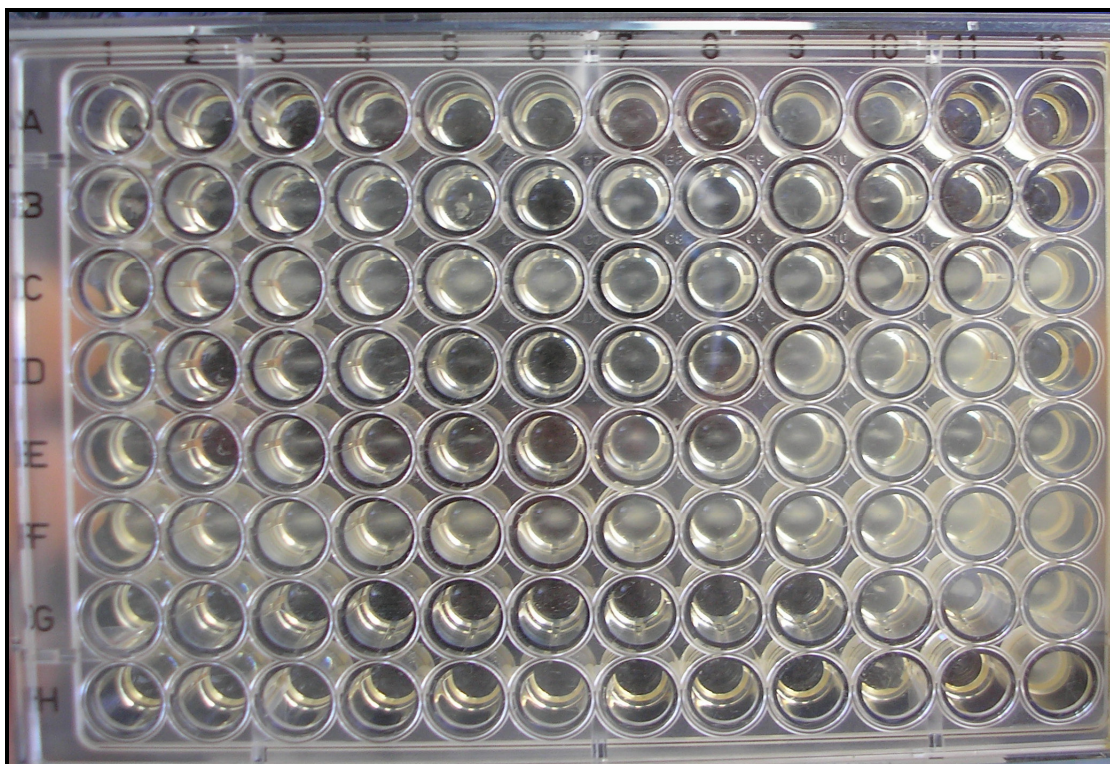


Figura II.10 - Placa de Elisa ilustrativa mostrando atividade antimicrobiana das amostras testadas.

II.3.3.4 Ensaio para Avaliação da Atividade Antioxidante

A atividade metabólica humana produz, normalmente, radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres bastante reativos. A produção excessiva desses radicais apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, se encontram envolvidos em diversas patologias a exemplo de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, etc (HALLIWELL *et al.*, 1992).

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES *et al.*, 2010). O método que foi utilizado neste trabalho é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras (REYNERTSON *et al.*, 2006; SZABO *et al.*, 2007; MARXEN *et al.*, 2007).

Os resultados da atividade antioxidante dos óleos essenciais e do extrato analisado foram expressos em percentual da atividade antioxidante. Para os óleos essenciais de *C. grewoides* (caules e folhas – aroma “erva-doce”) e *P. klotzschianum* (raízes, caules, folhas e sementes) os resultados não foram promissores (Tab. II.12, p.143). Estes resultados se justificam no caso dos óleos essenciais, quando analisamos a composição química destes: ricos em metilchavicol [83] e 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno [61], respectivamente. Resultados promissores foram encontrados para a espécie de *C. grewoides* que possui aroma de “cravo da Índia” (Fig. II.11, p.143); bem como para o extrato etanólico das raízes de *P. klotzschianum* (Tab. II.12, p.143). Este pela possibilidade futura do isolamento de algum componente que possa expressar potencial atividade antioxidante.

Através da constatação da atividade antioxidante apresentada para **OECG2** rico em eugenol [85] e a baixa atividade para **OECG1** rico em metilchavicol [83], conclui-se que o grupo OH (hidroxila) é de suma importância para AA em compostos aromáticos.

Percebe-se pela análise da figura II.11, página 143 que os óleos essenciais extraídos das folhas e caules de *C. grewoides* aroma “cravo da Índia” a uma concentração de 60 µg/mL apresentam atividade antioxidante superior a 50%, o que é um dado importante por se tratar de uma mistura de componentes. Análises da curva padrão através de regressão linear desses resultados indicam para as amostras **OEECG2** e **OECCG2** potencial

antioxidante uma vez que o $EC_{50} = 64,77 \mu\text{g/mL}$ (folhas) e o $EC_{50} = 57,72 \mu\text{g/mL}$ (caules) mostrou resultado não muito distante do $EC_{50} = 16,48 \mu\text{g/mL}$ para o ácido gálico (padrão). Provavelmente a atividade apresentada por estes óleos deve-se a presença do eugenol como constituinte majoritário (PEREIRA & MAIA, 2007).

Tabela II.12 - Resultado das Atividades Antioxidante de *Croton grewoides* e *Piper klotzschianum* a $200 \mu\text{g/mL}$.

Amostras	AA (%)
OERPCK	0,54
OECPK	0,35
OEFPK	1,93
OESPK	0,10
OEFCG1 jovem	5,70
OECCG1	0,50
OEFCG2 adulto	90,30
OECCG2	89,00
ERJB	40,76
Ácido gálico	96,00

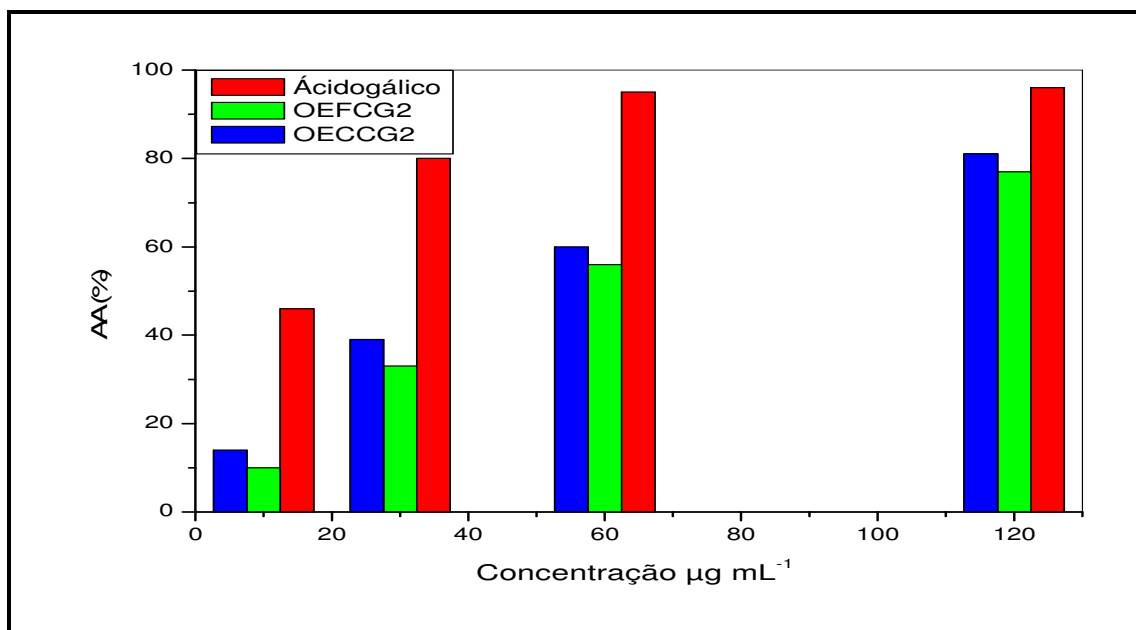


Figura II.11 - Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos OEFCG2 e OECCG2 e do Ácido gálico.

Considerações Finais

Este trabalho contribuiu para o conhecimento químico dos constituintes fixos isolados das raízes, e dos constituintes voláteis presentes nas raízes, caules, folhas e sementes de *P. klotzschianum* Kunth. Outras contribuições foram o estudo dos constituintes voláteis em *C. grewioides* Baill, e investigações de atividades biológicas (citotóxicas, larvicidas, antimicrobianas e antioxidantes) realizadas nos óleos essenciais das duas espécies, e de algumas substâncias isoladas das raízes de *P. klotzschianum*. Este estudo foi de grande importância por se tratar da primeira investigação fitoquímica e biológica em *P. klotzschianum*; bem como a ampliação do conhecimento químico e biológico dos óleos de *C. grewioides*.

Pode-se verificar pelos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho que foram isoladas substâncias das mais variadas classes, o que confirma a grande diversidade estrutural encontrada no gênero *Piper*. Do estudo dos extratos orgânicos das raízes de *P. klotzschianum* foram isoladas substâncias naturais utilizando métodos fitoquímicos clássicos. Dentre elas destaque para 1-(2'-metoxi-4',5'-metilenodioxifenil)-ciclopropil-cetona, (2*S*,3*S*)-5,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona e (2*S*,3*R*)-6,7-dimetoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona as quais são inéditas na literatura; os compostos (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona e tetra-hidropiperlonguminina que estão sendo relatados pela primeira vez como componentes do metabolismo secundário de plantas também merecem destaque, assim como a mistura dos ácidos *trans*-feruloiloxidocosanóico, tetracosanóico e hexacosanóico as quais são relatadas pela primeira vez na família Piperaceae.

O principal constituinte volátil identificado nos óleos das raízes, caules e folhas de *P. klotzschianum* foi o fenilpropanóide 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, e para os óleos das sementes as substâncias 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, limoneno, α -felandreno, *o*-cimeno e *α-trans*-bergamoteno. Já para *C. grewioides* aroma “erva-doce” – **CG1**, os componentes majoritários presentes nas folhas e caules foram metilchavicol e *trans*-anetol, e para *C. grewioides* aroma “cravo da Índia” – **CG2**, foram eugenol, biciclogermacreno e metileugenol. Cabe observar que ocorre variação nos teores dos constituintes majoritários presentes nos caules de **CG1** e **CG2** quando a idade da planta é avaliada.

Nos ensaios contra náuplios de *A. salina* todas as amostras apresentaram altamente ativas, com destaque para os valores de $CL_{50} = 7,06, 7,07$ e $7,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno e óleos dos caules e folhas de *P. klotzschianum* respectivamente. Atividades larvicidas contra o terceiro instar do *A. aegypti* foram constatadas para os óleos essenciais presentes nas raízes e sementes de *P. klotzschianum*, folhas e caules de *C. grewioides* e para as substâncias 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, piperovantina, tetra-hidropiperlonguminina e (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona. Destaque para

a alta atividade apresentada pelas piperamidas piperovatina ($CL_{50} = 1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tetra-hidropiperlonguminina ($CL_{50} = 10,43 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dos óleos das raízes de *P. klotzschianum* foram observadas atividades antimicrobianas contra *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) e *C. albicans* (UMP), e para o óleo das sementes, apenas contra *C. albicans* (UMP) mostrando-se assim um espectro refeito de ação; já para os óleos presentes nas folhas de *C. grewoides* – **CG2** foi observada atividade para os três microorganismos testados, no entanto para os óleos dos caules não foi encontrada atividade para *E. coli* na concentração máxima testada ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para a substância (2S,3S)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-dimetilcroman-4-ona foi encontrada uma CIM de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. coli*. Atividades antioxidantes frente ao radical DPPH foram apenas constatadas nos óleos essenciais de *C. grewoides* aroma “cravo da Índia”; o $EC_{50} = 64,77 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (folhas) e o $EC_{50} = 57,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (caules) mostrou resultado similar ao ácido gálico ($EC_{50} = 16,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizado como padrão.

Assim, este estudo contribui para o conhecimento quimiotaxinômico dos gêneros *Piper* (Piperaceae) e *Croton* (Euphorbiaceae). Além disso, devido à alta toxicidade encontrada para os óleos e substâncias isoladas de *P. klotzschianum*, bem como para a atividade antioxidante encontrada para a espécie *C. grewoides* aroma “cravo da Índia”, salienta-se a possibilidade de exploração destas potenciais atividades biológicas.

Referências Bibliográficas

- ACHENBACH, H.; KARL, W. Constituents of *Piper methysticum*. III. Investigation of the acids from Kawa (*Piper methysticum*). **Chemische Berichte**, v.104, n.5, p.1468-77, 1971.
- ACHENBACH, H.; FIETZ, W.; WOERTH, J.; WAIBEL, R.; PORTECOP, J. Constituents of tropical medicinal plants, IXX GC/MS – investigations of the constituents of *Piper amalago* – 30 new amides of the piperine-type. **Planta Medica**, v.12, p.12-18, 1986.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy. Carol stream, Illinois, USA, **1995 e 2007**.
- ADESOMA, S. K.; ADEBAYO, A. S.; ADESINA, S. K. O.; GROENING, R. GC/MS investigations of the minor constituents of *Piper guineense* stem . **Pharmazie**, v.57, n.9, p.622-627, 2002.
- AGNANIET, H.; AKAGAH, A.; MOUNZEO, H.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M. Aromatic Plants of Tropical Central Africa. XLI. Volatile Constituents of *Croton oligandrum* Pierre ex Hutch Growing in Gabon. **Journal Essential Oil Research**, v.17, n.3, p.201-205, 2005.
- AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v.31, n.10, p.3307-3330, 1992.
- AHMAD, F.; JAMIL, S.; READ, R. W. Isobutylamides from *Piper ridleyi*. **Phytochemistry**, v.40, n.4, p.1163-1165, 1995.
- ALBUQUERQUE, A. A. C.; SORENSON, A. L.; CARDOSO, J. H. L. Effects of oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, n.1, p.41-49, 1995.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- ALVIANO, W. S.; MENDONÇA, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. G. **Oral Microbiology Immunology**, v.20, p.101-105, 2005.
- ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; MCLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M.; A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v.2, n.3, p.107-111, 1991.
- ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. G.; SANTOS, A. S.; MAIA, J. G. Essential oil of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C.D.C. **Journal of Essential Oil Research**, v.10, n.4, p.465-467, 1998.
- ANTUNES, P. A.; CHIERICE, G. O.; CONSTANTINO, C. J. L.; AROCA, R. F. Spectroscopic characterization of piperavontine extracted from *Ottonia propinqua*. **Vibrational Spectroscopy**, v.27, p.175–181, 2001.
- ARAMBEWELA, L. S. R.; ARAWWAWALA, L. D. A. M.; RATNASOORIYA, W. D. Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts of *Piper betle* leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.239-245, 2005.

- ARAÚJO-JUNIOR, J. X.; CHAVES, M. C. O.; CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p.325-327, 1999.
- AUTRAN, E. S.; NEVES, I. A.; DA SILVA, C. S. B.; SANTOS, G. K. N.; DA CÂMARA, C. A. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v.100, p.2284–2288, 2009.
- AVELLA, E.; MOTTA, J. R. Main constituents and cytotoxic activity of the essential oil of *Piper artanthe*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.46, n.4, p.651-653, 2010.
- AZEVEDO, S. K. S.; INÊS, M. S. Plantas medicinais e de uso religioso comercializado em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v.20, n.1, p.185-194, 2006.
- BARBOSA, P. P. P.; TEIXEIRA, J. R. M.; MELO, M. F. B.; GUSMÃO, Q. M. W. B. Metil-Eugenol: Uma Avaliação Laboratorial em Animais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 38, N.6, p.393-397,1988.
- BARCELOS, F. F., “**Isolamento e avaliação da atividade nematocida de constituintes químicos de *Mucuna aterrima***”. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 1997.
- BATATINHA, M. J. M.; SOUZA-SPINOSA, H.; BERNARDI, M. M. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, n.1, p.53-57, 1995.
- BAUER, A. W.; KERBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, N. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v.52, n.2, p.339-343, 1999.
- 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. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, n.6, p.801-814, 1995.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN EE, B. & RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* sequence data. **American Journal of Botany**, v.92, p.1520-1534, 2005.
- BHATNAGAR, M.; KAPUR, K.K.; JALEES, S.; SHARMA, S. K. Laboratory evaluation of insecticidal properties of *Ocimum basilicum* L. and *O. sanctum* L. plant's essential oils and their major constituents against vector mosquito species. **Journal of Entomological Research**, v.17, n.1, p.21-26, 1993.
- BIGHETTI, E. J. B.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BRITO, A. R. M. S. Anti-inflammatory and Antinociceptive Effects in Rodents of the Essential Oil of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, n.12, p.1447-1453, 1999.

- BIZERRIL, M. X. A.; RAW, A. Feeding behaviour of bats and dispersal of *Piper arboreum* seeds in Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v.14, p.109–114, 1998.
- BLOCK, S.; FLAMINI, G.; BRKIC, D.; MORELLI, I.; QUETIN-LECLERCQ, Analysis of the essential oil from leaves of *Croton zambesicus* Muell. Arg. growing in Benin **Flavour and Fragrance Journal**, v.21, n.2, p.222-224, 2006.
- BODIWALA, H. S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C. S.; SHARMA, S. S.; BHUTANI, K.K.; SINGH, I. P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n.4, p.418-421, 2007.
- 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.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie**, v. 28, n.5, p.25-30, 1995.
- CALLEJAS, R. Taxonomic revision of *Piper* subgenus *Ottonia* (Piperaceae). PhD Thesis, City University of New York, New York, **1986**.
- CARERI, M.; ELVIRI, L. Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. **Journal of chromatography A**, v. 935, n.1-2, p. 249-257, 2001.
- CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Insecticide targets: learning to keep up with resistance and changing concepts of safety. **Agricultural Chemistry Biotechnology**, v.43, p.185-191, 2000.
- CHANDRE, F.; DARRIET, F.; DARDER, M.; CUANY, A.; DOANNIO, J. M. C.; PASTEUR, N.; GUILLET, P. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, n.4, p.359-366, 1998.
- CHAVES, M. C. O.; OLIVEIRA, A. H.; SANTOS, B. V. O. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, n.1, p.75-77, 2006.
- CHEN, Y. C.; LIAO, C. H.; CHEN, I. S. Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. **Phytochemistry**, v.68, n.15, p.2101–2111, 2007.
- CICCIO, J. F.; BALLESTERO, C. M. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *Piper aduncum* (Piperaceae) de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v.45, 783-790, 1997.
- CICCIO, J. F.; SEGNINI, M. J. Composition of the essential oil from leaves of *Croton jimenezii* from Costa Rica. **Journal of Essential Oil Research**, v.14, n.5, p.357-360, 2002.
- CONSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M. J. P.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; KATO, M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta Medica**, v.67, p.771-773, 2001.

- CORDEIRO, I. & CARNEIRO-TORRES, D. Euphorbiaceae. *In*: Checklist das plantas do nordeste brasileiro: Angiospermas e Gimnospermas. Brasília: **Ministério de Ciência e Tecnologia**, p.71-74, 2006.
- COSTA, S. S.; MORS, W. B. Amides of *Ottonia corcovadensis*. **Phytochemistry**, v.20, n.6, p.1305-1307, 1981.
- COSTA, P. R.R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v.23, n.3, p.357-369, 2000.
- COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v.18, p.703–711, 2009.
- CRUZ, S. M.; CÁCERES, A.; ÁLVAREZ, L.; MORALES, J.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; SALAMANCA, E.; GIMÉNEZ, A.; VÁSQUEZ, Y.; GUPTA, M. P. Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variabile* from Guatemala and bioactivity of the dichloromethane and methanol extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.4, p.587-593, 2011.
- 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.
- DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v.64, n.2, p.555-559, 2003.
- DALLMEIER K R, CARLINI E A – Anesthetic, hypodermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogs. **Pharmacology**, v.22, p.113-127, 1981.
- DAS, B.; KASHINATHAM, A.; MADHUSUDHAN, P. Baker's yeast treatment of some naturally occurring amides. **Tetrahedron Letters**, v.38, n.42, p.7457-7458, 1997.
- DASGUPTA, S.; RAY, H. B. Amides of *Piper attenuatum* Ham **Indian Journal of Chemistry**, v.17B, p.538-540, 1979.
- DE CANDOLLE, C. PIPERACEAE. *In*: DE CANDOLLE, C. (ed.) **Prodromus Systematis naturalis regni vegetabilis**. Masson. Paris, v. 16, n.1, p.235-471, 1869.
- DEMILLO, A. B.; CUNNINGHAM, R.T.; McGOVERN, T.P. Structural variants of methyl eugenol and their attractiveness to the oriental fruit fly (Diptera:Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v.7, p.957-964, 1994.
- DE VINCENZI, M.; SILANO, M.; MAIALETTI, F.; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. **Fitoterapia**, v.71, n.6, p.725-729, 2000.
- DHAR, K. L.; ATAL, C. K. Genus *Piper*. VI. Occurrence of N-isobutyldeca-*trans*-2-*trans*-4-dienamide in *Piper longum* and *Piper peepuloides* **Indian Journal of Chemistry**, v.5, p.588-589, 1967.

- DHAR, K. L.; RAINA, M. L. Chemical studies of *Piper peepuloides*. **Planta Medica**, v.23, n3, p.295, 1973.
- DONG, W.; YANG, D.; LU, R. Chemical Constituents from the Rhizome of *Acorus calamus* L., **Planta Medica**, v.76, p.454–457, 2010.
- 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.
- EE, G. C. L.; LIM, C. M.; LIM, C. K.; RAHMANI, M.; SHAARI, K.; BONG, C. F. J. Alkaloids from *Piper sarmentosum* and *Piper nigrum*. **Natural Product Research**, v. 23, n. 15, p.1416–1423, 2009.
- EFDI, M.; OHGUCHI, K.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y.; KOKETSU, M.; ISHIHARA, H. *N-trans-Feruloyltyramine* as a Melanin Biosynthesis Inhibitor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, n.10, p.1972-1974, 2007.
- EMRIZAL, A. F.; SIRAT, H. M.; JAMALUDIN, F.; MUSTAPHA, N. M.; ALI, R. M.; ARBAIN, D. Anti-inflammatory activity of *Piper magnibaccum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v.3, n.10, p.1719-1721, 2008.
- ESTRELA, J. L. V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.217-222, 2006.
- European Commission (EC), **2008**. Regulation (EC) no 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Flavourings and Certain Food Ingredients with Flavouring Properties for Use in and on Foods and Amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC. < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0034:0050:en:PDF>> acessado no dia 17 de Setembro de 2011.
- EVANS, P. H.; BOWERS, W. S.; FUNK, E. J. Identification of fungicidal and nematocidal components in the leaves of *Piper betle* (Piperaceae). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.32, n.6, p.1254-1256, 1984.
- FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M. Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.111-113, 2003.
- ^aFACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; FILHO, R. B. Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. Da floresta Amazônica – atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, v.27, n.1, p.79-83, 2004.
- ^bFACUNDO, V. A.; FILHO, R. B. C-methylated flavonoids from the roots of *Piper carniconnectivum* C.DC. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, n.12, p.1215-1217, 2004.
- FACUNDO, V. A.; SILVEIRA, A. S. P.; MORAIS, S. M. Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.753-756, 2005.

- FACUNDO, V. A.; POLLI, A. R.; RODRIGUES, R. V.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**, v.38, n.4, p.733-742, 2008.
- FATTORUSSO, E.; SCAFATI, O. T. Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology, WILEY VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2008**.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervium* C. DC.; *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum against *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n.1, p.113-120, 2007.
- FELIPE, C. B. F.; FILHO, J. T. S.; SOUZA, L. E. O.; SILVEIRA, J. A.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; VIANA, G. S. B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v.14, n.9, p.605–612, 2007.
- FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.224-230, 2007.
- FILHO, A. P. S. S.; VASCONCELOS, M. A. M.; ZOGHBI, M. G. B.; CUNHA, R. L. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**, v.39, n.2, p.389-396, 2009.
- FISCHER, I. U.; DENGLER, H. J. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of eugenol in body fluids. **Journal of Chromatographic B**, v. 525, n. 2, p. 369-377, 1990.
- FONTANA, R.; MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; DONNO, K.; CÉSAR, L. M. M.; PALMA, M. S. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Peptides**, v.27, p.2624-2631, 2004.
- FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. S.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1383-1390, 2008.
- FREITAS, H. C. P.; NAVARRO, F. O chá verde induz o emagrecimento e auxilia no tratamento da obesidade e suas comorbidades. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v.1, n.2, p.16-23, 2007.
- FRIEDRICH, C.; VON DOMARUS, C. [Carl Friedrich Wilhelm Meissner (1792-1853) - pharmacist and alkaloid researcher]. **Pharmazie**, v.53, n.1, p.67-73, 1998.
- ^aGBEWONYO, W. S. K.; CANDY, D. J. Separation of insecticidal components from an extract of the roots of male *Piper guineense* (West African black pepper) by gas chromatography. **Toxicon**, v.30, n.9, p.1037-1039, 1992.
- ^bGBEWONYO, W. S. K.; CANDY, D. J. Chromatographic isolation of insecticidal amides from *Piper guineense* root. **Journal of Chromatography A**, v.607, n.1 p.105-111, 1992.

- GOULART, M. O. F., SANTANA, A. E. G., LIMA, R. A., CAVALCANTE, S. H., CARVALHO, M. G., BRAZ-FILHO, R. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jathopha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**, v.16, n.2, p.95-100, 1993.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. 2000, *Croton*. Pp. 417- 536. In: **World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. Kew, Royal Botanic Gardens Kew.
- GREIG, N. Regeneration mode in neotropical Piper: habitat and species comparisons. **Ecology**, v.74, p.2125-2135, 1993.
- GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; MUZZOLI, M.; RUEDA, G. M.; MEDICI, A.; BESCO, E.; BRUNI, R. Composition of the Volatile Fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) Calyces by GC-MS and NMR Fingerprinting and Its Antimicrobial and Antioxidant Activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, n.20, p.7778-7788, 2006.
- GUIMARAES, E. F.; SILVA, M. C.; CAVALCANTI, T. B. Piperaceae. In: RIZZO, J. A. (Coord.). Flora dos Estados de Goiás e Tocantins. Goiânia, vol. 32, 66p, **2007**.
- GUPTA, O. P.; ATAL, C. K.; GAIND, K. N. Constituents of *Piper nepalense* **Phytochemistry**, v.11, n. 8, p.2646, 1972.
- GUPTA, M. P.; ARIAS, T. D.; WILLIAMS, N. H.; BOS, R.; TATTJE, D. H. E. Safrole, the main component of the essential oil from *piper auritum* of panama. **Journal of Natural Products**, v.48, n.2, p.330-343, 1985.
- GRECA, M. D.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Stigmasterols from *Typha Latzfolza*. **Journal of Natual Products**, v. 53, n. 6, p.1430-1435, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E.; Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, p.598-620, 1992.
- HEGNAUER, R. The taxonomic significance of alkaloids, In Swain T. (Ed.) Chemical Plant Taxonomy, Academic Press, New York, **1963**.
- HELUANI, C. S.; CATALAN, C. A. N.; HERNANDEZ, L. R.; BURGUENO-TAPIA, E.; JOSEPH-ATHAN, P. Three New Diterpenoids Based on the Novel Sarcopetalane Skeleton from *Croton sarcopetalus*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.2, p.222-225, 2000.
- HERMOSO, A.; JIMENEZ, I. A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI, I. L.; PINERO, J. E.; RAVELO, A. G.; VALLADARES, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, n.18, p.3975-3980, 2003.
- 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.
- IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A. B. Components of *Bauhinia candicans*. **Journal of Natural Products**, v.46, n.5, p.752-753, 1983.

- 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.
- JIN, Z.; BORJIHAN, G.; ZHAO, R.; SUN, Z.; HAMMOND, G. B.; URYU, T. Antihyperlipidemic Compounds from the Fruit of *Piper longum* L.. **Phytotherapy Research**, 23, p.1194–1196, 2009.
- KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v.79, p.529-538, 2007.
- KAWANISHI, K.; HASHIMOTO, Y. Long chain esters of *Virola* species, **Phytochemistry**, v.26, n.3, p.749-752, 1987.
- 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.
- KOROISHI, A. M.; FOSS, S. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, n.2, p.270–277, 2008.
- KOYAMA, J.; MORITA, I.; TAGAHARA, K.; HIRAI, K. I. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v.53, n.8, p.869-872, 2000.
- KUBO, I.; MATSUMOTO, T.; KLOCKE, J. A.; KAMIKAWA, T. Molluscicidal and insecticidal activities of isobutylamides isolated from *Fagara macrophylla*. **Experientia**, v.40, p.340-341, 1984.
- 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. Ihotzkyanum* (Piperaceae). **Quimica Nova**, v.30, n.5, p.1222-1224, 2007.
- LEE, S. E.; KIM, J. E.; LEE, H. S. Insecticide resistance in increasing interest. **Agricultural Chemistry Biotechnology**, v.44, p.105-112, 2001.
- LEE, S. W.; KIM, Y. K.; KIM, K.; LEE, H. S.; CHOI, J. H.; LEE, W. S.; JUN, C. D.; PARK, J. H.; LEE, J. M.; RHO, M. C. Alkamides from the fruits of *Piper longum* and *Piper nigrum* displaying potent cell adhesion inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, n.16, p.4544–4546, 2008.
- LI, C. Y.; TSAI, W. J.; DAMU, A. G.; LEE, E. J.; WU, T. S.; DUNG, N. X.; THANG, T. D.; THANH, L. Isolation and Identification of Antiplatelet Aggregatory Principles from the Leaves of *Piper lolot*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.23, p.9436-9442, 2007.
- LIN, L. C.; SHEN, C. C.; TSAI, T. H. Anti-inflammatory Neolignans from *Piper kadsura*. **Journal of Natural Products**, v.69, n.5, p.842-844, 2006.

- LIMA, R. L.; PIRANI, J. R. O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. **Boletim Botânica Universidade de São Paulo**, v.21, n.2, p.299-344, 2003.
- LIMA, S. G.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; NETO, J. M. M.; CHAVES, M. H.; SILVEIRA, E. R. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* Baill - euphorbiaceae. **Revista Latinoamericana de Química**. v.38, n.3, p.133-144, 2010.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; RUANGRUNGSI, N.; LANGE, G. L.; DECICCO, C. P. Structural elucidation and synthesis of new components isolated from *Piper sarmentosum* (piperaceae). **Tetrahedron**, v. 43, v.16, p.3689-3694,1987.
- LIN, X. W.; BO, H. Y.; HONG, Q. J.; OU, S.; QIONG. W. Y. Separation and purification of stigmaterol and β -sitosterol from phytosterol mixtures by solvent crystallization method. **Separation and Purification Technology**, v. 41, n.2, p.173-178, 2005.
- LODER, J. W.; MOORHOUSE, A.; RUSSEL, G. B. Tumor inhibitory plants; amides of *Piper novae-hollandiae*. **Australian Journal of Chemistry**, v.22, n.7, p.1531, 1969.
- LODER, J. W.: NEARN, R. H. Constituents from *Piper banksii*. **Phytochemistry**, v.11, n.8, p.2645-2646, 1972.
- LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Os Óleos Essenciais de *Piper reticulatum* L. e *P. crassinervium* H. B. K. **Acta Amazonica**, v.33, n.2, p.341-344, 2003.
- 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.
- MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; **Phytotherapy Research**, v.12, n.3, p.172-177, 1998.
- MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; CARDOSO, J. H. L. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* onguinea-pig ileum: amyogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.18, p.539-546, 2004.
- MAHANTA, P. K.; GHANIM, A.; GOPINATH, K. W. Chemical constituents of *Piper sylvaticum* and *Piper boeherifolium* **Journal of Pharmaceutical Science**, v.63, n.7, p.1160, 1974.
- MARQUES, D. D.; MACHADO, M. I. L.; DE CARVALHO, M. G.; MELEIRA, L. A. D. C. BRAZ-FILHO, R. Isoflavonoids and Triterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n.3, p.295-301, 1998.
- MARQUES, J. V.; KITAMURA, R. O. S.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Antifungal Amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. **Journal of Natural Products**, v.70, p.2036-2039, 2007.
- MARQUES, A. M.; VELOSO, S. M. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Caracterização de derivado arilbutanoídico em folhas e raízes de *Ottonia anisum* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18 (supl.), p.709-712, 2008.
- MARTINS, A. P.; SALGUEIRO, L.; VILA, R.; TOMI, F.; CANIGUERAL, S.; CASANOVA, J.; PROENÇA, A. C.; ADZET, T. **Phytochemistry**, v.49, n.7, p.2019-2023, 1998.

- MARTINS, A. P., SALGUEIRO, L. R., GONÇALVES, M. L. R. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Bark Oil of *Croton stellulifer*, an Endemic Species from S. Tomé e Príncipe. **Planta Medica**, v.66, p.647-650, 2000.
- MARTINS, R. C. C.; LAGOA, J. H. J.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v.64, n.2, p.667-670, 2003.
- MARXEN, K.; VANSELOW, K. H.; LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U. P. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. **Sensors**, v. 7, n.10, p.2080-2095, 2007.
- MASUDA, T.; INAZUMI, A.; YAMADA, Y.; PADOLINA, W. G.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Constituents of Piperaceae. Antimicrobial Phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. **Phytochemistry**, v.30, n.10, p.3227-3228, 1991.
- MATA, R.; MORALES, I.; PÉREZ, O.; CRUZ, I. R.; ACEVEDO, L.; MENDOZA, I. E.; BYE, R.; FRANZBLAU, S.; TIMMERMANN, B. Antimycobacterial Compounds from *Piper sanctum*. **Journal of Natural Products**, v.67, n.12, p.1961-1968, 2004.
- MATASYOH, J. C.; WATHUTA, E. M.; KARIUKI, S. T.; CHEPKORIR, R. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.14, n.1, p.26-28, 2011.
- MATOS, F. J. A. “**Farmácias vivas**”, 3ª ed. Fortaleza: UFC, 1998. 219p.
- MATOVIC, N. J.; HAYES, P. Y.; PENMAN, K.; LEHMANN, R. P.; DE VOSS, J. J. Polyunsaturated alkyl amides from *Echinacea*: synthesis of diynes, enynes, and dienes. **The Journal of Organic Chemistry**, v.76, p.4467–4481, 2011.
- 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- α -induced cell death in mouse hepatocytes **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.2038–2042, 2008.
- MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; MORIKAWA, T.; YASUDA, D.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIKAWA, M. Hepatoprotective amide constituents from the fruit of *Piper chaba*: Structural requirements, mode of action, and new amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.20, p.7313-7323, 2009.
- MAXWELL, A.; DABIDEEN, D.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Neolignans from *Piper aequale*. **Phytochemistry**, v.50, n.3, p.499-504, 1999.
- MBAH, J. A.; TCHUENDEM, M. H. K.; TANE, P.; STERNERB, O. Two chromones from *Peperomia vulcanica*. **Phytochemistry**, v.60, n.8, p.799-801, 2002.
- MCFERREN, M. A.; RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, p.183-187, 1998.
- MCFERREN, M. A.; CORDOVA, D.; RODRIGUEZ, E.; RAUH, J. J. In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.201-207, 2002.

- MECCIA, G.; ROJAS, L. B.; ROSQUETE, C.; SAN FELICIANO, A. Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. **Flavour and Fragrance Journal**, v.15, n.3, p.144-146, 2000.
- MESQUITA, J. M. O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A. P.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p. 6-12, 2005.
- MIKICH, S. B.; BIANCONI, G. V.; MAIA, B. H. L. N. S.; TEIXEIRA, S. D.; **Journal of Chemical Ecology**, v.29, n.10, p.2379-2383, 2003.
- MIYAZAWA, M.; KOHNO, G. Suppression of chemical mutagen-induced sos response by allylbenzenes from *Asiasarum heterotropoides* in the *Salmonella typhimurium* TA1535/PSK1002 *umu* test. **Natural Product Research**, v.19, n. 1, p. 29-36, 2005.
- MISHRA, P.; SINHA, S.; GURU, S. K.; BHUSHAN, S.; VISHWAKARMA, R. A.; GHOSAL, S. Two new amides with cytotoxic activity from the fruits of *Piper longum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.13, n.2, p.143-148, 2011.
- MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. FLORA DO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA – BRASIL: *Peperomia* (PIPERACEAE). **Rodriguésia**, v.59, n.1, p.161-195, 2008.
- MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*, **Memoria do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, p.168-173, 2010.
- ^aMORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L. L.; RODRIGUES, J. R. B.; CARDOSO, J. H. L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian croton species against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.22, n.1, p.161-164, 2006.
- ^bMORAIS, S. M.; JÚNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. R.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v.29, n.5, p.907-910, 2006.
- MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; JÚNIOR, J. F. A.; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; NETO, M. A. S.; Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, n.10, p.670-675, 2007.
- MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; GUIMARAES, E. F. 1-Butyl-3,4-methylenedioxybenzene as the major constituent of the essential oil from *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.9, n.5, p.565-568, 1997.
- MOREIRA, D. L.; SOUZA, P. O.; KAPLAN, M. A. C.; PEREIRA, N. A.; CARDOSO, G. L.; GUIMARÃES, E. F. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.73, n.1, p.33-37, 2001.
- ^aMOREIRA, D. L.; GUIMARAES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Chromene from *P. aduncum* L., **Phytochemistry**, v.48, n.6, p.1075-1077, 1998.
- ^bMOREIRA, D. L.; GUIMARAES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Non-polar constituents from leaves of *piper lhotzkyanum*. **Phytochemistry**, v.49, n.5, p.1339-1342, 1998.

- MORIKAWA, T.; MATSUDA, H.; YAMAGUCHI, I.; PONGPIRIYADACHA, Y.; YOSHIKAWA, M. New amides and gastroprotective constituents from fruit of *Piper chaba*. **Planta Medica**, v.70, p.152-159, 2004.
- MUNDINA, M.; VILA, R.; TOMI, F.; TOMÁS, X.; CICCIO, J. F.; ADZET, T.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Composition and chemical polymorphism of the essential oils from *Piper lanceaefolium*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, n.7, p.739–748, 2001.
- NAIR, M. G.; BURKE, B. A. Antimicrobial Piper metabolite and related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n.4, p.1093-1096, 1990.
- NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, U. T.; BANDO, E.; MELO, A. F. N. ; CORTEZ, D. A. G.; DIAS, B. P. F.; Antibacterial activity of *Ocimum grantissimum* L. essential oil, **Memoria do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.675-678, 1999.
- NAKATANI, N.; INATANI, R. Isobutyl Amides from Pepper (*Piper nigrum* L.). **Agriculture and Biological Chemistry**, v.45, n.6, p. 1473-1476, 1981.
- NASCIMENTO, J. C. “**Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinérea* e quantificação de L-dopa em três espécies de *Mucuna***”. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 1999.
- NASCIMENTO, J. C.; BARBOSA, L. C. A.; PAULA, V. F.; DAVID, J. M.; FONTANA, R.; SILVA, L. A. M.; FRANÇA, R. S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, n.3, p.787-799, 2011.
- NARUI, T.; TAKEUCHI, M.; ISHII, R.; ISHIDA, T.; OKUYAMA, T. Studies on the constituents of *Piper hancei* of spice from Okinawa. **Natural Medicines**, v.49, n.4, p. 438-439, 1995.
- NAVICKIENE, H. M. D.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p.621-626, 2000.
- 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.
- NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.718-723, 2008.
- NUNEZ, V.; CASTRO, V.; MURILO, R.; SOTO, L. A. P.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v.66, n.9, p.1017-1025, 2005.
- OKOGUN, J. I.; EKUNG, D. E. U. Extracts from the fruits of *Piper guineense* **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.19, p.2195-2196, 1974.

- OLIVEIRA, A. C.; CARDOSO, J. H. L.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; SOUZA, A. N. C. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.11 p.1471-1474, 2001.
- OLIVEIRA, P. V.; FERREIRA JR, J. C.; MOURA, F. S.; LIMA, G. S.; OLIVEIRA, F. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; GIULIETTI, A. M.; LEMOS, R. P. L. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.107, p.403–407, 2010.
- PARK, I. K.; LEE, S. G.; SHIN, S. C.; PARK, J. D.; AHN, Y. J. Insecticidal and acaricidal activity of piperonaline and piperocetadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.7, p.1866-1870, 2002.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the Genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.597-673, 1997.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; GUPTA, S.; TALWAR, S.; RAJWANSHI, V. K.; KUMAR, R.; AZIM, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JAIN, R.; SHARMA, N. K.; TYAGI, O.D.; LAWRIE, S. J.; ERRINGTON, W.; HOWARTH, O. W.; OLSEN, C. E.; SINGH, S. K.; WENGEL, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry**, v.49, n.4, p.1069-1078, 1998.
- PATRA, A.; GHOSH, A. Amides of *Piper chaba* **Phytochemistry**, v.13, n.12, p.2889-2890, 1974.
- PAULA, A. C. B.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; CARNEIRO, E. M.; BRITO, A. R. M. S. The antiulcer effect of *Croton cajucara* Benth in normoproteic and malnourished rats. **Phytomedicine**, v.15, n.10, p.815-825, 2008.
- PAULA, V. F. “**Estudo químico e da interação inseto-planta em *Ochroma lagopus***”. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 1995.
- PAULA, V. F. “**Estudo químico de *Ochroma lagopus* Swartz e síntese de amidas derivadas da piperina, com avaliação das suas respectivas atividades inseticidas**”. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 1999.
- PAYO, H.A.; DOMINICIS, M.E.; MAYOR, J.; OQUENDO, M.; SARDUY, R. Tamizaj e fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmácia**, v.35, p.203-206, 2001.
- PRASAD, A. K.; TYAGI, O. D.; WENGEL, J.; BOLL, P. M.; OLSEN, C. E.; BISHT, K. S.; SINGH, A.; SARANGI, A.; KUMAR, R.; JAIN, S. C.; PARMAR, V. S. Neolignans and a lignan from *Piper clarkii*. **Phytochemistry**, v.39, n.3, p.655-658, 1995.
- PELLETIER S. W. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, Wiley, New York, **1983**.
- PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.3, p.624-632, 2007.
- PÉRES, V. F.; MOURA, D. J.; SPEROTTO, A. R. M.; DAMASCENO, F. C.; CARAMÃO, E. B.; ZINE, C. A.; SAFFI, J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n.9, p. 2389-2395, 2009.

- PESSINI, G. L.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. G. Neolignanas e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.199-204, 2005.
- PINDER, A. R.; PRICE, S. J. The chemistry of *Ottonia vahlii*. Part I. The volatile constituent. **Journal of the Chemical Society, section C**, p.2597-2598, 1967.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, supl. 1, 45-61, 2002.
- POLONSKY, J.; BASKEVITCH, Z. Structures of calophyllolide, inophyllolide, and calophyllic acid. VI. Synthesis of dihydroinophyllolide and dihydrocalophyllic acid. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, p.929-44, 1958.
- 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.
- POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.246-251, 2006.
- PRAGER, N.; BICKETT, K.; FRENCH, N.; MARCOVICI, G. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Determine the Effectiveness of Botanically Derived Inhibitors of 5- α -Reductase in the Treatment of Androgenetic Alopecia. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 8 n.2, p.143–152, 2002.
- PRICE, S. J.: PINDER, A. R. Chemistry of *Ottonia vahlii* Kth. II. constitution of the nonvolatile component. *The Journal of Organic Chemistry*, v.35, n.8, p.2568–2571, 1970.
- PRING, B. G. Isolation and identification of amides from *Piper callosum*. Synthesis of pipercallosidine and pipercallosine. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v.1, p.1493-1498, 1982.
- PLOBECK, N. A.; BACKVALL, J. E. Synthesis of 2(E),4(E)-dienamides and 2(E),4(E)-dienoates from 1,3-dienes via 2-phenylsulfonyl 1,3-dienes. **The Journal of Organic Chemistry**, vol. 56, n.14, p.4508-4512, 1991.
- QIN, W.; HUANG, S.; LI, C.; CHEN, S.; PENG, Z. Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: *Hispididae*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.96, p.132–139, 2010.
- RADCLIFFE-SMITH, A. *Genera Euphorbiacearum*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. 2001.

- RAFFO, A.; NICOLI, S.; LECLERCQ, C. Quantification of estragole in fennel herbal teas: Implications on the assessment of dietary exposure to estragole. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.2, p.370–375, 2011.
- RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolism of (–)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. **Phytochemistry**, v.69, n. 11, p.2157-2161, 2008.
- RAO, V. R. S.; SURESH, G.; BABU, K. S.; RAJU, S. S.; VARDHAN, M.V.P.S.V.; RAMAKRISHNA, S.; RAO, J. M. Novel dimeric amide alkaloids from *Piper chaba* Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis. **Tetrahedron**, v.67, p.1885-1892, 2011.
- REIGADA, J. B.; TCACENCO, C. M.; ANDRADE, L. H.; KATO, M. J.; PORTO, A. L. M.; LAGO, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)—antifungal activities and kinetic resolution of (*RS*)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, n.9, p.1054–1058, 2007.
- REISCH, J.; HUSSAIN, R. A.; ADESINA, S. K.; ZENDREI, K. A new amide from *Evodia hupehensis* Fruit Hull. **Journal of Natural Products**, v.48, n.5, p.862-863, 1985.
- RENDÓN, W.; CHÁVEZ, G.; RODRÍGUEZ, M. M.; NATHAN, P. J. Total assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of piperovatine. **Spectroscopy**, v.14, p.35–40, 1998.
- REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; HUI, Y.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. **Journal of Natural Products**, v.69, p.1228-, 2006.
- RHO, M. C.; LEE, S. W.; PARK, H. R.; CHOI, J. H.; KANG, J. Y.; KIM, K.; LEE, H. S.; KIM, Y. K. ACAT inhibition of alkaloids identified in the fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v.68, n.6, p.899–903, 2007.
- RIZSK, A. F. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.94, p.293-326, 1987.
- ROSA, M. S. S.; FILHO, R. R. M.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; PADRÓN, T. S.; SALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.6, p.1895-1901, 2003.
- RUEGG, T.; CALDERÓN, E. F.; QUEIROZ, P. N.; SOLIS, A.; MARSLON, F.; RIVAS, E.; ORTEGA BARRIC, K.; HOSTETTMANN, K.; GRUPTA, M. P. 3-Farnesil-2-hydroxy benzoic acid is a new anti-*Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, n.3, p.461-467, 2006.
- RUKACHAISIRIKUL, T.; SIRIWATTANAKIT, P.; SUKCHAROENPHOL, K.; WONGVEIN, C.; RUTTANAWEANG, P.; WONGWATTANAVUCH, P.; SUKSAMRARN, A. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, n.2-3, p.173-176, 2004.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G.; Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.1, p.11-33, 2007.

- SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. **Phytochemistry**, v.66, n.5, p.573-579, 2005.
- 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, B. V. O.; CHAVES, M. C. O. (*E,E*)-*N*- Isobutyl-2,4-octadienamides from *Piper marginatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p.113-114, 1999.
- SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian atlantic forest. **Phytochemistry**, v.58, n.4, p.547-551, 2001.
- SANTOS, F.A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C.C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**, v.77, p.2953-2963, 2005.
- 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.7, n.1, p.65-75, 2008.
- SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* bioassay: a revision. **Phytotherapy Research**, v.10, p.118-120, 1996.
- SHIN, S.; KANG, C. A. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, n.2, p.111-115, 2003.
- SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.59, p.521-527, 2002.
- SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.2, p.143-145, 2007.
- ^aSILVA, D. R.; BARONE, S.; SVIDZINSKI, A. E.; BERSANI-AMADO, C. A.; CORTZ, D. A. G. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.569-573, 2008.
- ^bSILVA, C. G. V.; ZAGO, H. B.; JÚNIOR, H. J. G. M.; DA CAMARA, C. A. G.; DE OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O. E.; LUCENA, M. F. A. Composition and Insecticidal Activity of the Essential Oil of *Croton grewoides* Baill. against Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). **Journal of Essential Oil Research**, v.20, n.2, p.179-182, 2008.
- SILVA, D. R.; ENDO, E. H.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SOUZA, A.; YOUNG, M. C.; NAKAMURA, T. U.; CORTEZ, D. A. G. Chemical Composition and Antimicrobial Properties of *Piper ovatum* Vahl. **Molecules**, v.14, p.1171-1182, 2009.

- ^aSILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; TORRES, D. S. C. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, 24(2): 441-453. 2010.
- ^bSILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; GUIMARAES, E. F.; MAIA, J. G. S. Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. **Natural Product Communications**, v.5, n.3, p.477-480, 2010.
- SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; FILHO, A. M. O.; LAGE, C. L. S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quimica Nova**, v. 27, n.1, p.46-49, 2004.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. (eds). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3^a ed. Porto alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 467p.
- SINGH, J.; SANTANI, D. D.; DHAR, K. L. Structure of tricholein, a new pyrrolidine alkaloid from *Piper trichostachyon*. **Phytochemistry**, v.15, n.12, p. 2018-2019, 1976.
- SINGH, S. K.; PRASAD, A. K.; OLSEN, C. E.; JHA, A., JAIN, S. C., PARMAR, V. S. WENGE, J. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. **Phytochemistry**, v.43, n.6, p.1355-1360, 1996.
- SOUZA, A. N. C.; CRIDDLE, D. N.; CARDOSO, J. H. L. Selective and modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea pig. **Phytotherapy Research**, v.12, n.2, p.189-194, 1998.
- STOEHR, J. R.; XIAO, P.-G.; BAUER, RUDOLF Isobutylamides and a new (methylbutyl)amide from *Piper sarmentosum*. **Planta Medica**, v.65, n.2, p.175-177, 1999.
- SUÁREZ, A. I.; VÁSQUEZ, L. J.; MANZANO, M. A.; COMPAGNONE, R. S.; Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela **Flavour and Fragrance Journal**, v.20, n.6, p.611-614, 2005.
- SZABO, M. R.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A. X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical Papers**, v.61, n.3, p.214-216, 2007.
- STRUNZ, G. M.; FINLAY, H. J. Expedient synthesis of unsaturated amide alkaloids from *Piper spp*: Exploring the scope of recent methodology. **Canadian Journal of Chemistry**, v.74, n.3, 419-432, 1996.
- SU, H. C. F.; HORVAT, R. Isolation, identification, and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, n.1, p.115-118, 1981.
- TABOPDA, T. K.; NGOUPAYO, J.; LIU, J.; MITAINE, O. A. C.; TANOLI, S. A. K.; KLAN, S. N.; ALI, M. S.; NGADJUI, B. T.; TSAMO, E.; DUBOIS, M. A. L.; LUU, B. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. **Phytochemistry**, v.69, n.8, p.1726-1731, 2008.
- 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.

- TERREAUX, C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper Dilatatum* in honour of Professor G. H. Neil Towers 75th birthday. **Phytochemistry**, v.49, n.2, p.461-464, 1998.
- THIES, W.; KALKO, E. K. V. Phenology of neotropical pepper plants (Piperaceae) and their association with their main dispersers, two short-tailed fruit bats, *Cavollia pevspidllata* and *C. castanea* (Phyllostomidae). **Oikos**, v.104, n.2, p.362-376, 2004.
- TSUKAMOTO, S.; TOMISE, K.; MIYAKAWA, K.; CHA, B. C.; ABE, T.; HAMADA, T.; HIROTA, H.; OHTA, T. CYP3A4 Inhibitory Activity of New Bisalkaloids, Dipiperamides D and E, and Cognates from White Pepper. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p.2981–2985, 2002.
- TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; PHANSA, P.; POOTAENG-ON, Y.; TAYLOR, W. C. Chemical Constituents of the Roots of *Piper Sarmentosum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n.2, p.149-151, 2006.
- VASCONCELOS, A. L. F. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.288–294, 2007.
- VENKATASAMY, R.; FAAS, L.; YOUNG, A. R.; RAMAN, A.; HIDER, R. C. Effects of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p.1905–1920, 2004.
- VILA, R.; MILO, B.; TOMI, F.; CASANOVA, J.; FERRO, E. A.; CAÑIGUERAL, S. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Piper fulvescens*, a plant traditionally used in Paraguay. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.1, p.105-107, 2001.
- VINCENZI, M. D.; SILANO, M.; STACCHINI, P.; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: I. Methyleugenol. **Fitoterapia**, v.71, p.216-221, 2000.
- WEE, s. I.; TAN, k. h.; NISHIDA, R. Pharmacophagy of Methyl Eugenol by Males Enhances Sexual Selection of *Bactrocera carambolae*. **Journal of Chemical Ecology**, v.33, p.1272–1282, 2007.
- WEI, K.; LI, W.; KOIKE, K.; PEI, Y.; CHEN, Y.; NIKAIDO, T. New Amide Alkaloids from the Roots of *Piper nigrum* **Journal of Natural Products**, v.67, n.6, p.1005-1009, 2004.
- WEI, K.; LI, W.; KOIKE, K.; CHEN, Y.; NIKAIDO, T. Nigramides A-S, Dimeric Amide Alkaloids from the Roots of *Piper nigrum*. **The Journal of Organic Chemistry**, v.70, n.4, p.1164-1176, 2005.
- WILLIAMS, V. L.; BALKWILL, K.; WITKOWSKI, E. T. F. Unraveling the commercial market for medicinal plants and parts on the Witwatersrand, South Africa. **Economic Botany**, v.54, n.3, p.310-327, 2000.
- WHO (World Health Organization) website (2009) WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. Dengue and dengue hemorrhagic fever Fact sheet N°117. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>, Acessado no dia 13/08/2011.

- WU, D.; NAIR, M. G.; DEWITT, D. L. Novel Compounds from *Piper methysticum* Forst (Kava Kava) Roots and Their Effect on Cyclooxygenase Enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.4, p.701-705, 2002.
- XUAN, T. D.; ELZAAWELY, A. A.; FUKUTA, M.; TAWATA, S. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, n.3, p.720-725, 2006.
- 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.
- YANG, Y. C.; LEE, S. G.; LEE, H. K.; KIM, M. K.; LEE, S. H.; LEE, H. S. A Piperidine Amide Extracted from *Piper longum* L. Fruit Shows Activity against *Aedes aegypti* Mosquito Larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.13, p.3765-3767, 2002.
- 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 II: *Piper* -Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorliachis*. **Hoehnea**, v.3, p.29-284, 1973.
- YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. III: *Peperomia*; Taxa of uncertain status. **Hoehnea**, v.4, p.71-413, 1974.
- ZAKARIA, Z.A.; PATAHUDDIN, H.; MOHAMAD, A. S.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, n.1, 42-48, 2010.
- ZHANG, H.; MATSUDA, H.; NAKAMURA, S. YOSHIKAWA, M. Effects of amide constituents from pepper on adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, n.11, p.3272–3277, 2008.
- ZHAO, G.; HUI, Y. RUPPRECHT, J. K.; MCLAUGHLIN, J. L.; WOOD, K. V. Additional Bioactive Compounds and Trilobacin, a Novel Highly Cytotoxic Acetogenin, from the Bark of *Asimina triloba*. **Journal of Natural Products**, v.55, n.3, p.347-356, 1992.
- <http://www.plantasquecuram.com.br/ervas/camomila-comun.html>, pagina acessada no dia 01/08/2011.
- <http://chemicaland21.com/specialtychem/finechem/p-anisic%20acid.htm>, pagina acessada no dia 01/08/2011.

APÊNDICE

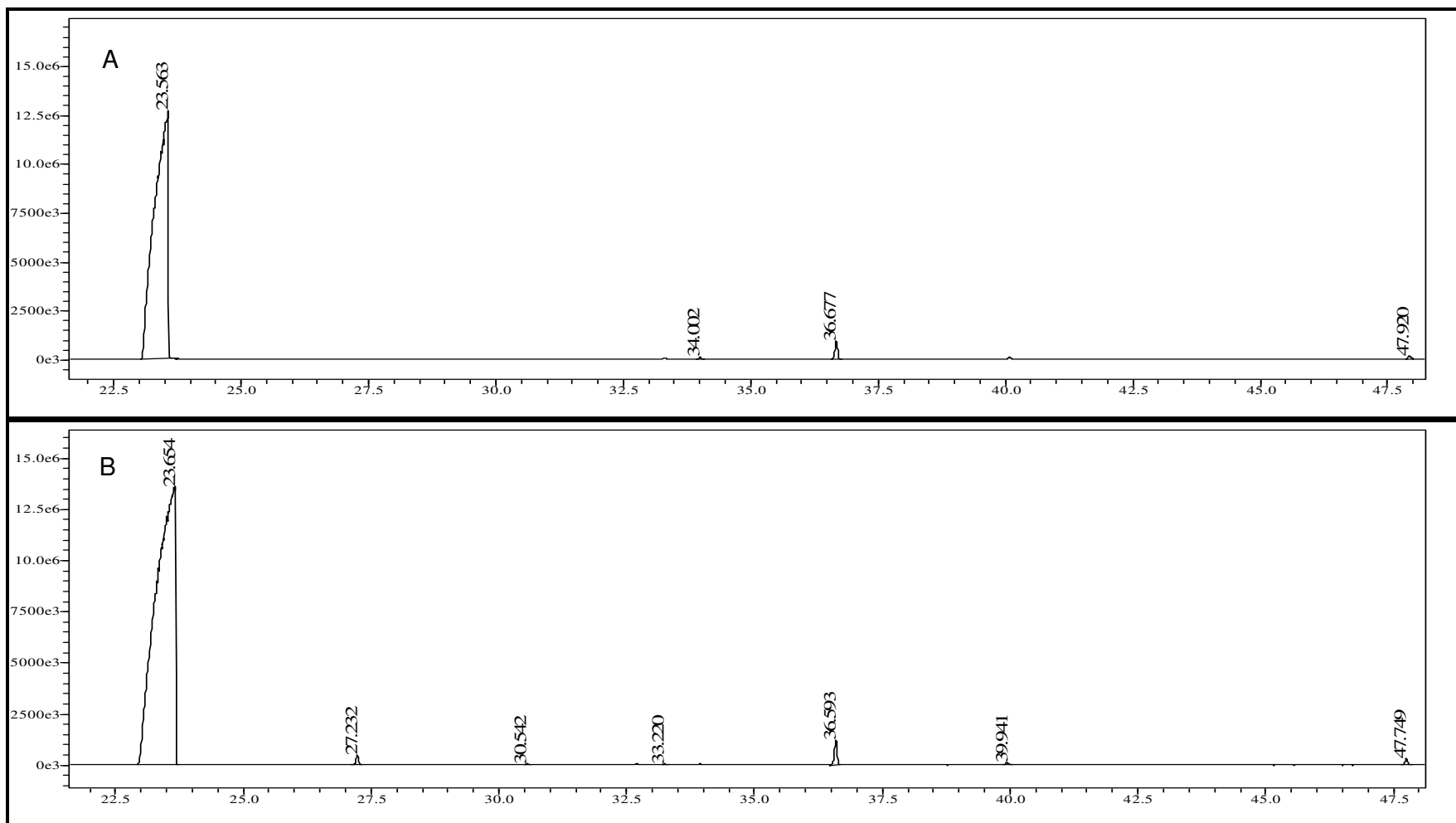


Figura 3 - Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas (A – MAR/2007) e (B – AGO/2007) de *Croton Grewioides* CG1.

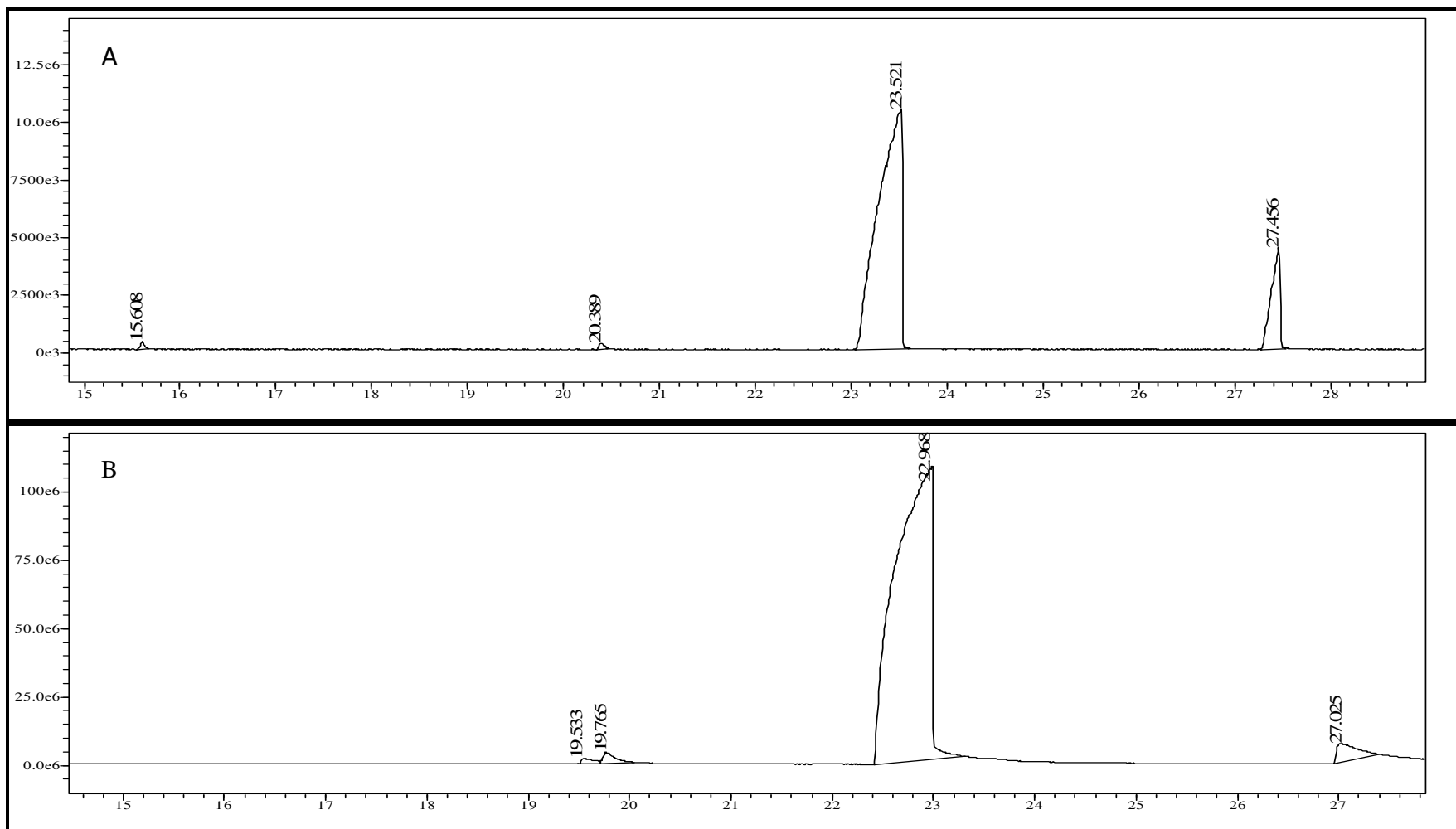


Figura 4 - Cromatogramas dos óleos essenciais dos caules (A – MAR/2007) e (B – AGO/2007) de *Croton Grewioides* **CG1**.

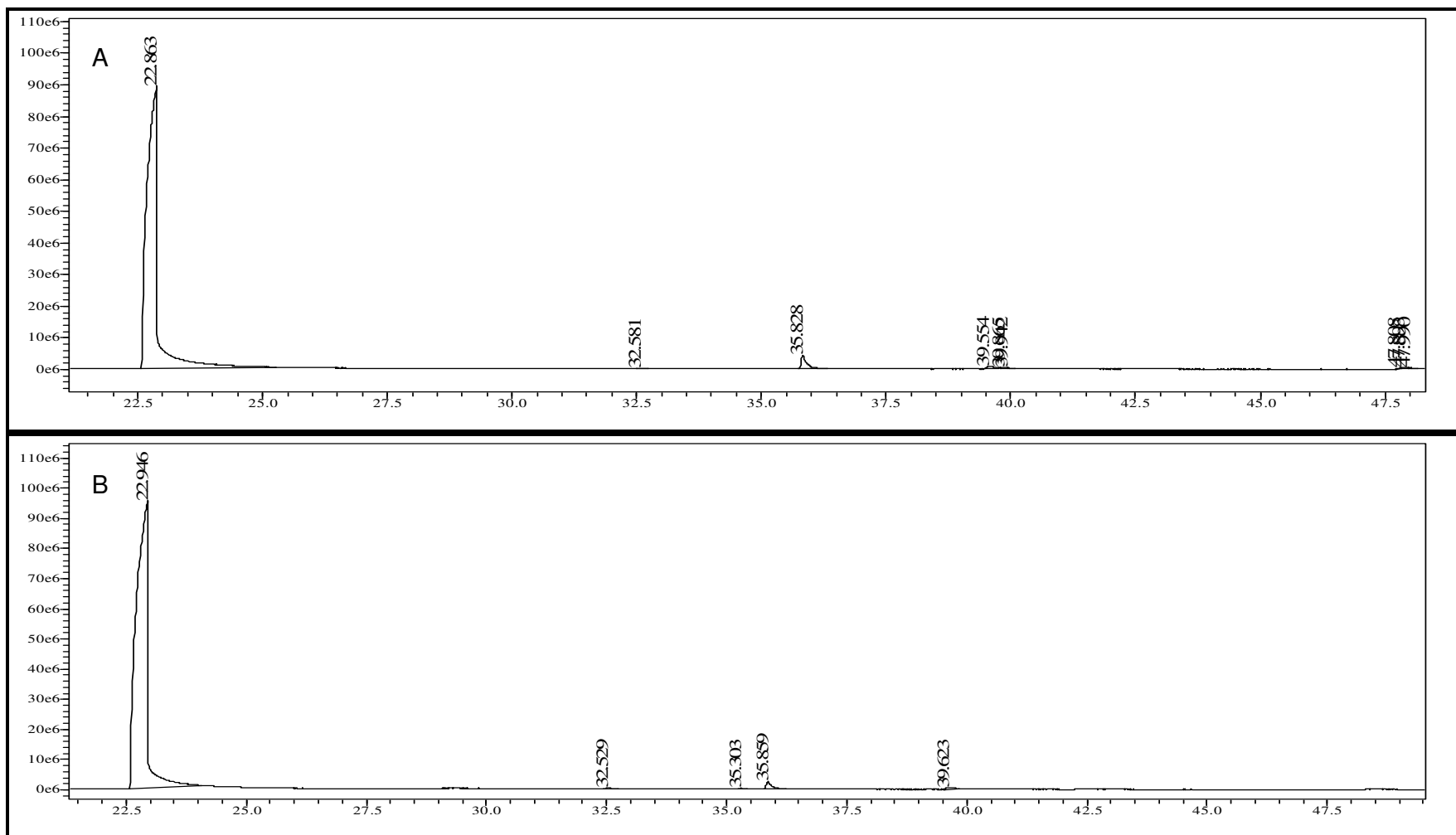


Figura 5 - Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas (A – Jovem) e (B – adulta) de *Croton Grewioides* CG1.

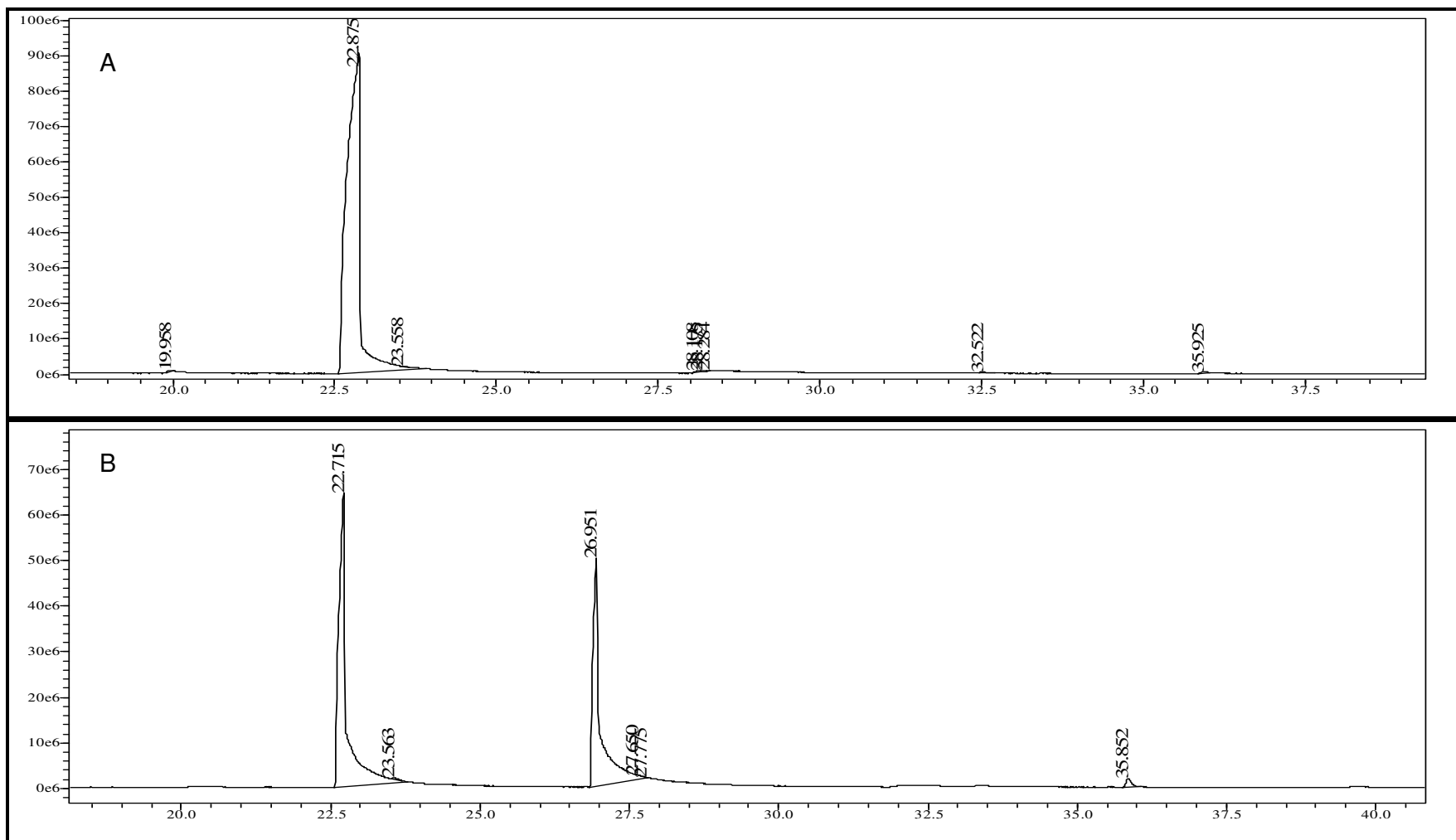


Figura 6 - Cromatogramas dos óleos essenciais dos caules (A – Jovem) e (B – adulta) de *Croton Grewioides* CG1.

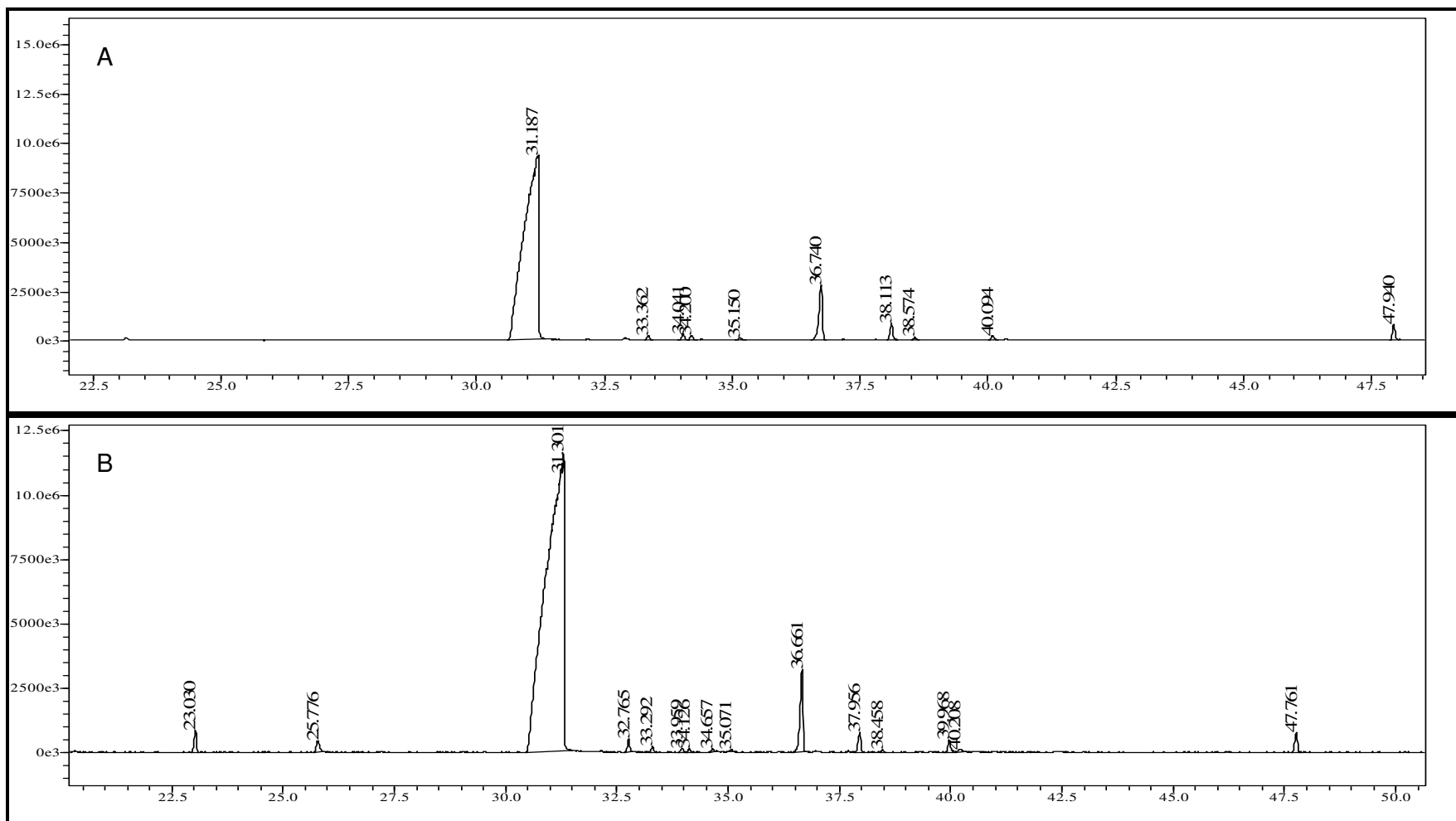


Figura 7 - Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas (A – MAR/2007) e (B – AGO/2007) de *Croton Grewioides* **CG2**.

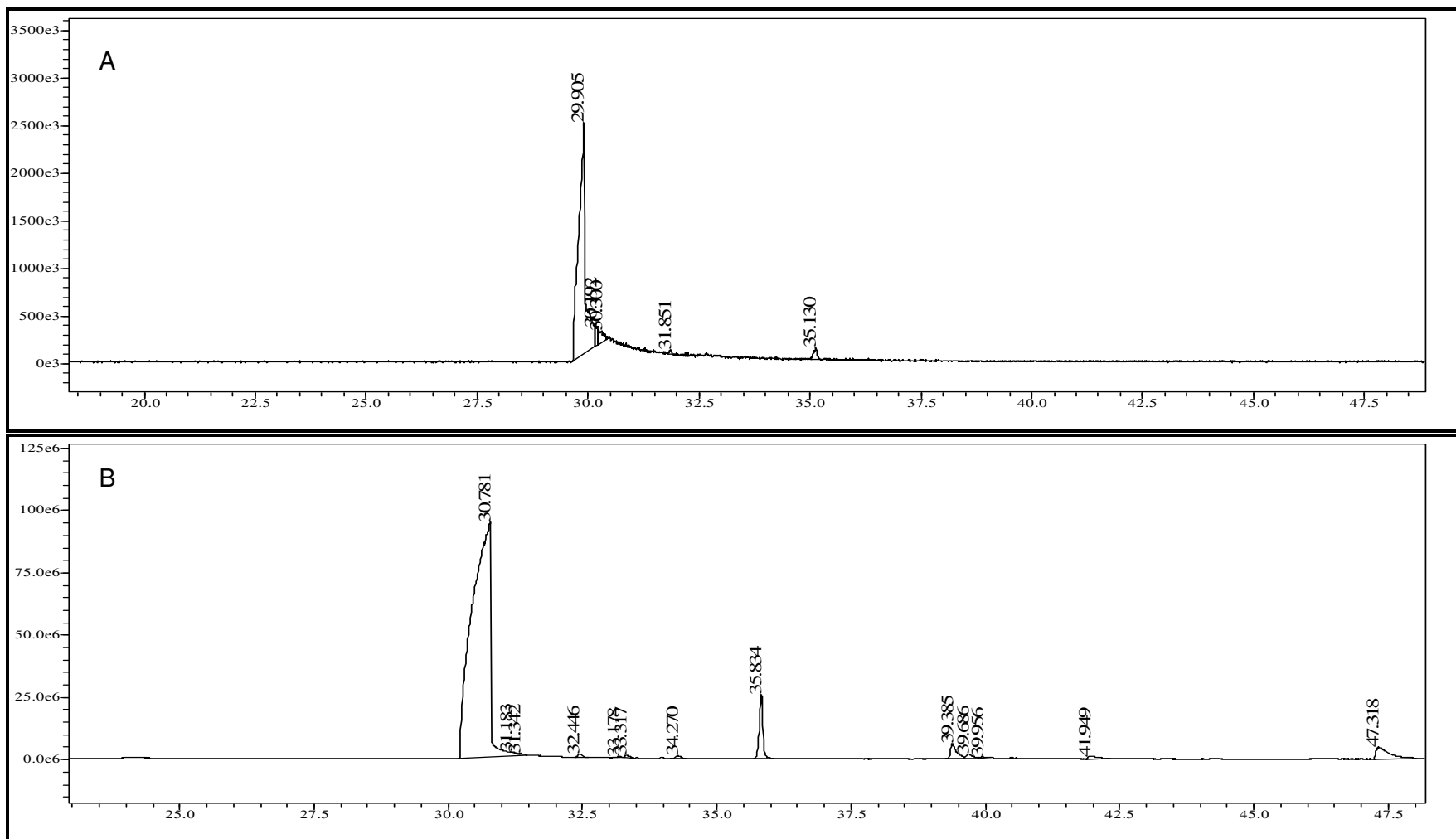


Figura 8 - Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas (A – Jovem) e (B – adulta) de *Croton Grewioides* CG2.

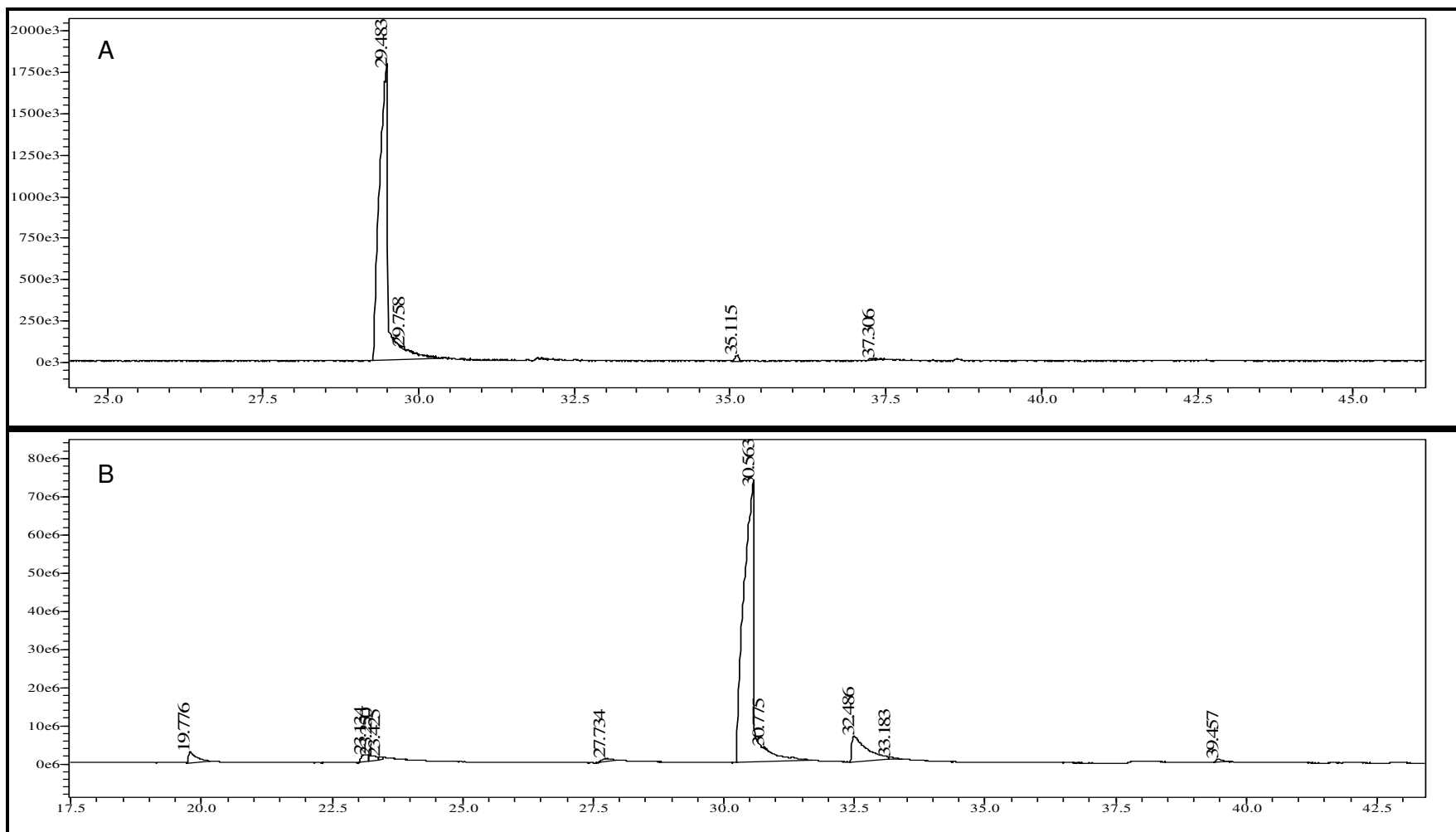


Figura 9 - Cromatogramas dos óleos essenciais dos caules (A – Jovem) e (B – adulta) de *Croton Grewioides* **CG2**.

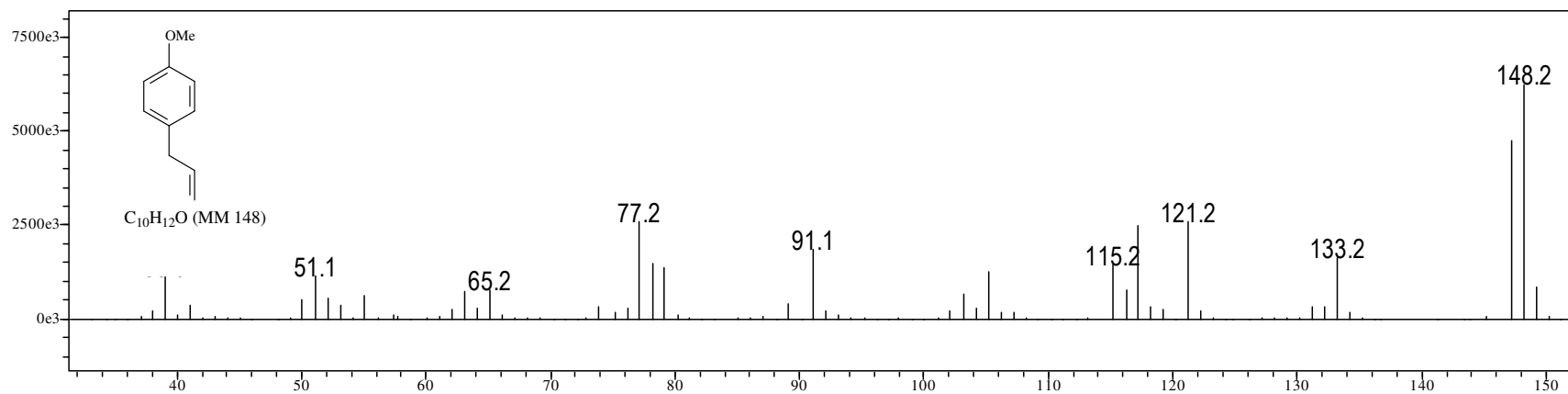


Figura 10 - Espectro de massas do composto metilchavicol presente nos óleos essenciais de **FCG1**, **CCG1**, **FCG2** e **CCG2**.

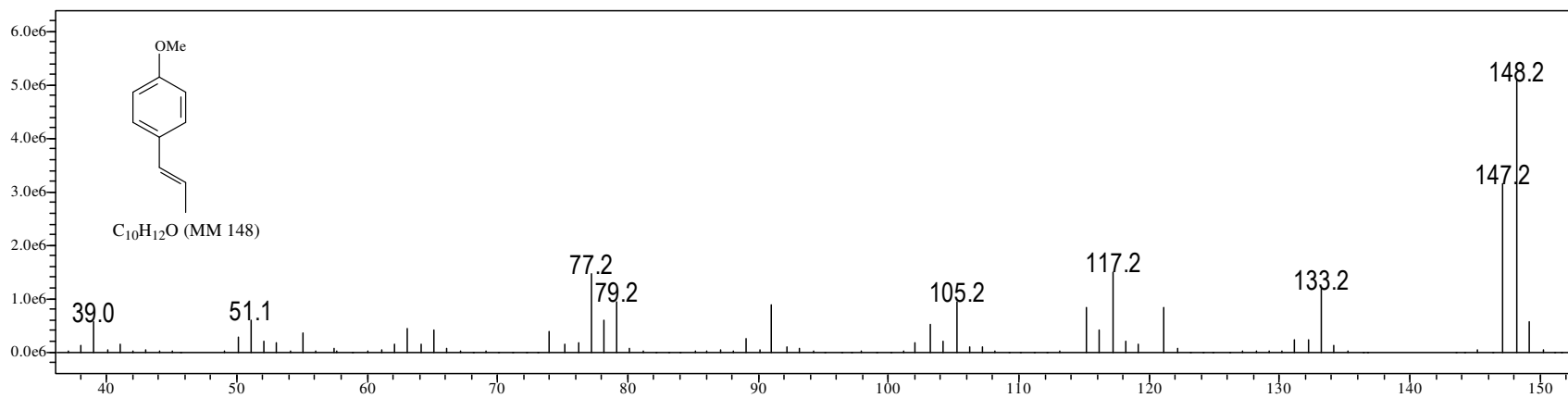


Figura 11 - Espectro de massas do composto *trans*-anetol presente nos óleos essenciais de **FCG1**, **CCG1** e **CCG2**.

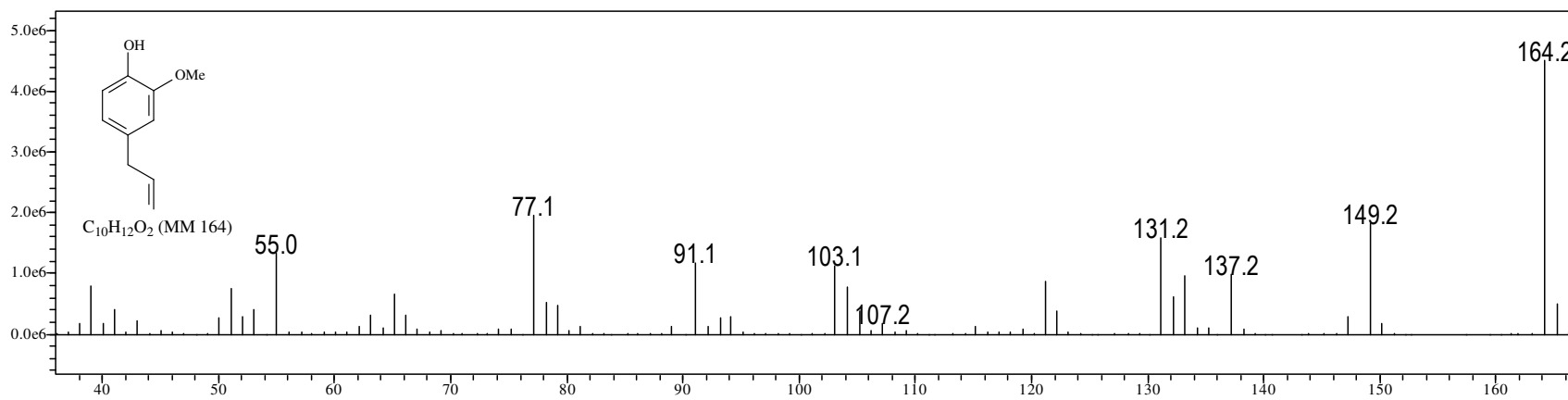


Figura 12 - Espectro de massas do composto eugenol presente nos óleos essenciais de **FCG2** e **CCG2**.

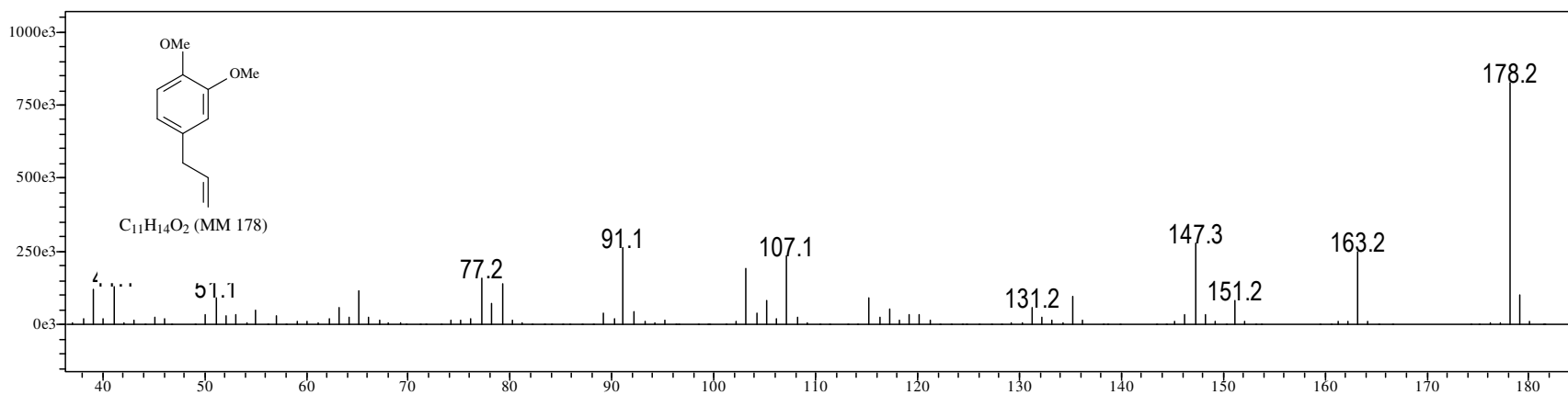


Figura 13 - Espectro de massas do composto metileugenol presente nos óleos essenciais de **CCG2**.

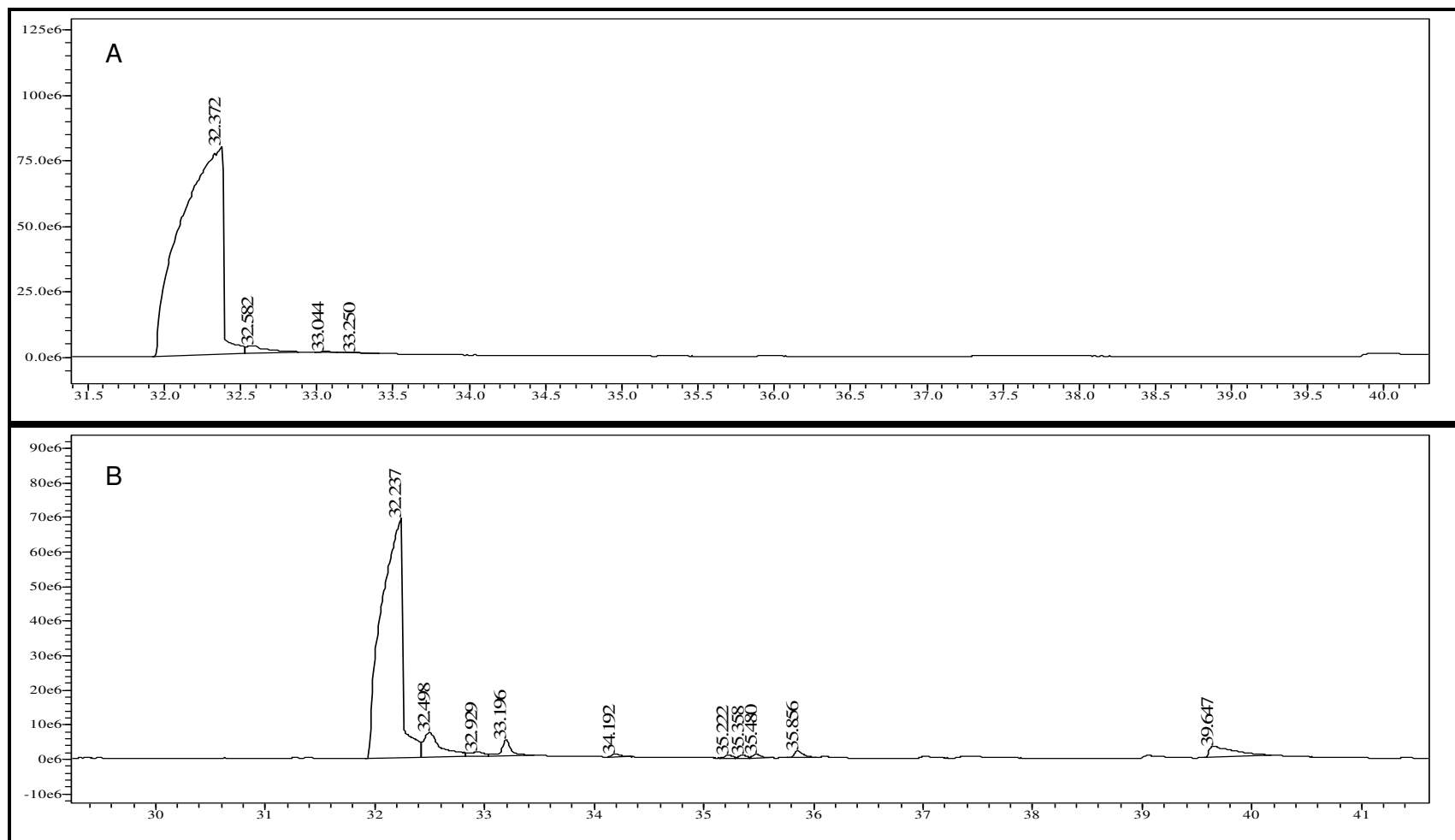


Figura 14 - Cromatogramas dos óleos essenciais das raízes (A) e caules (B) de *Piper klotzschianum*.

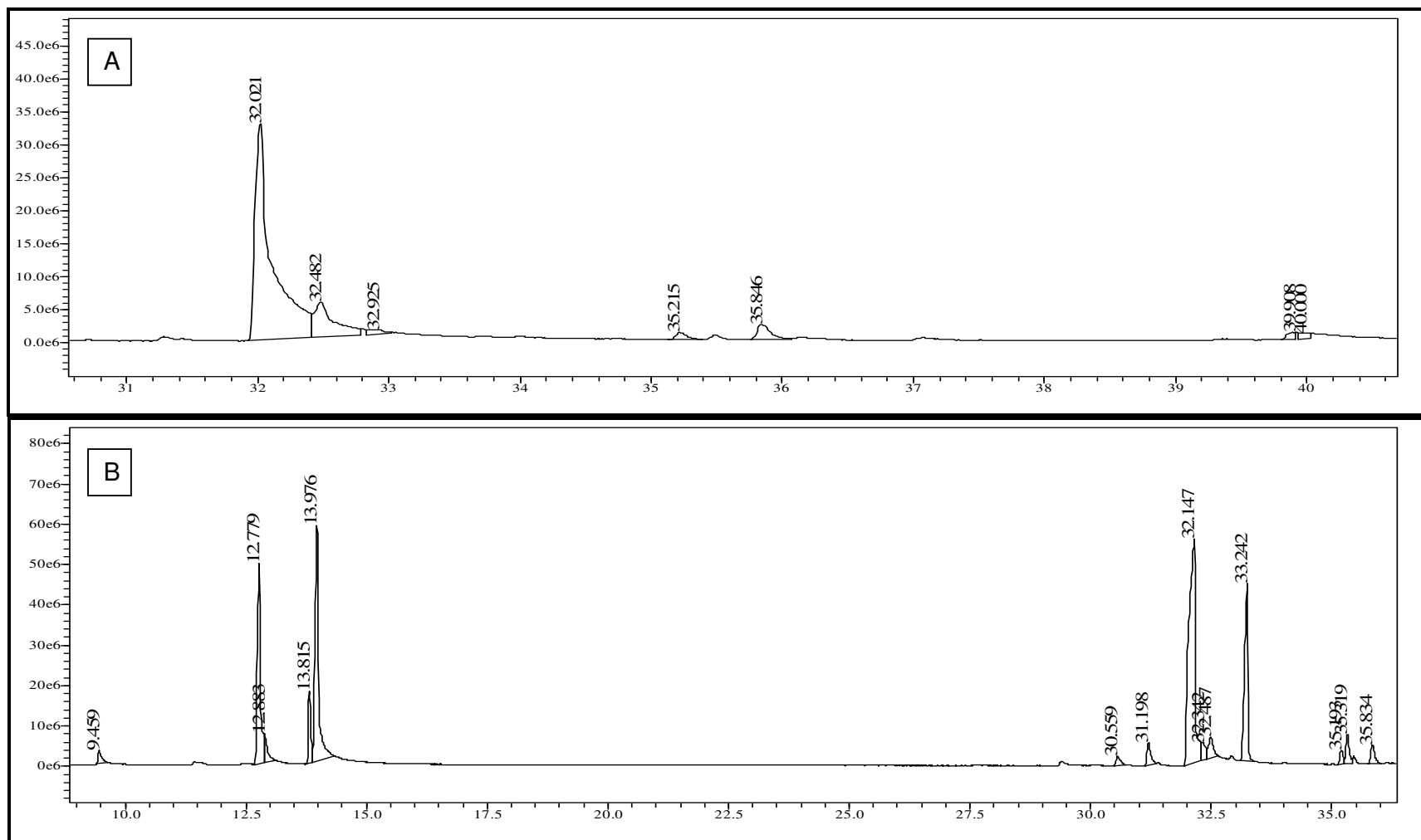


Figura 15 - Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas (A) e sementes (B) de *Piper klotzschianum*.

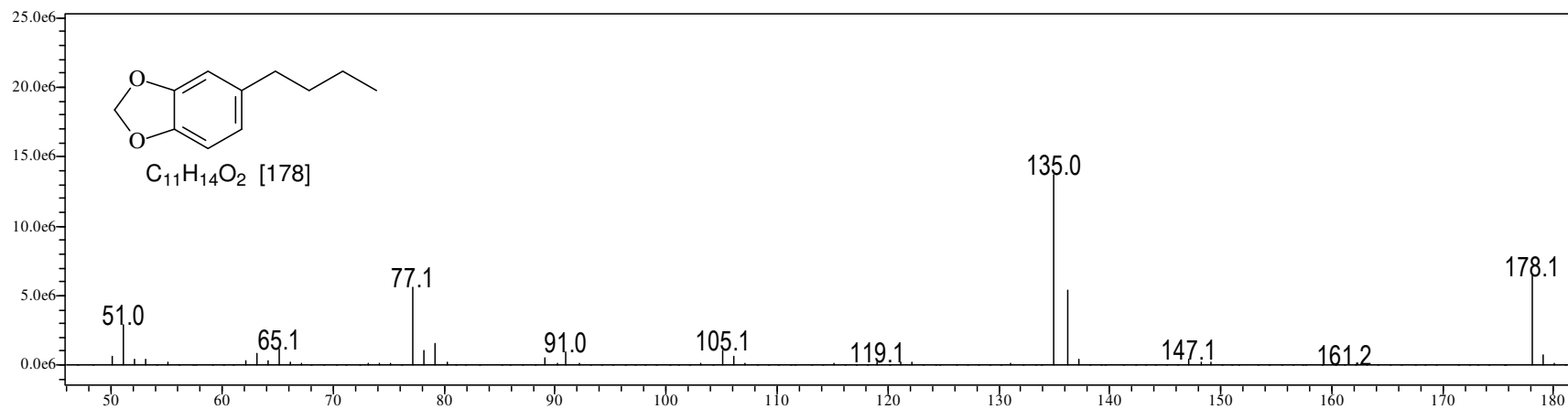


Figura 16 - Espectro de massas do composto 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno presente nos óleos essenciais de *P. klotzschianum*.

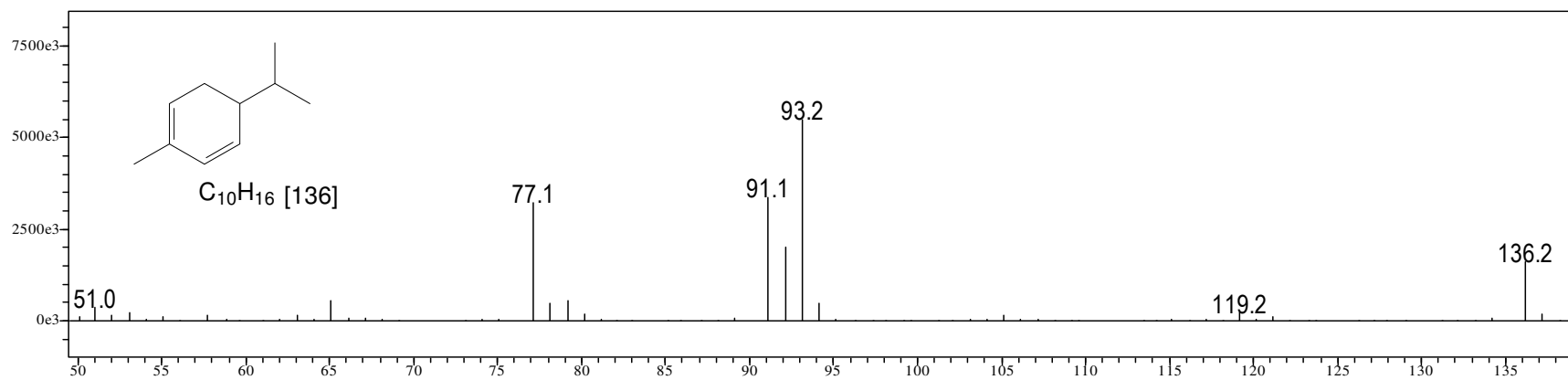


Figura 17 - Espectro de massas do composto α -felandreno presente nos óleos essenciais de SPK.

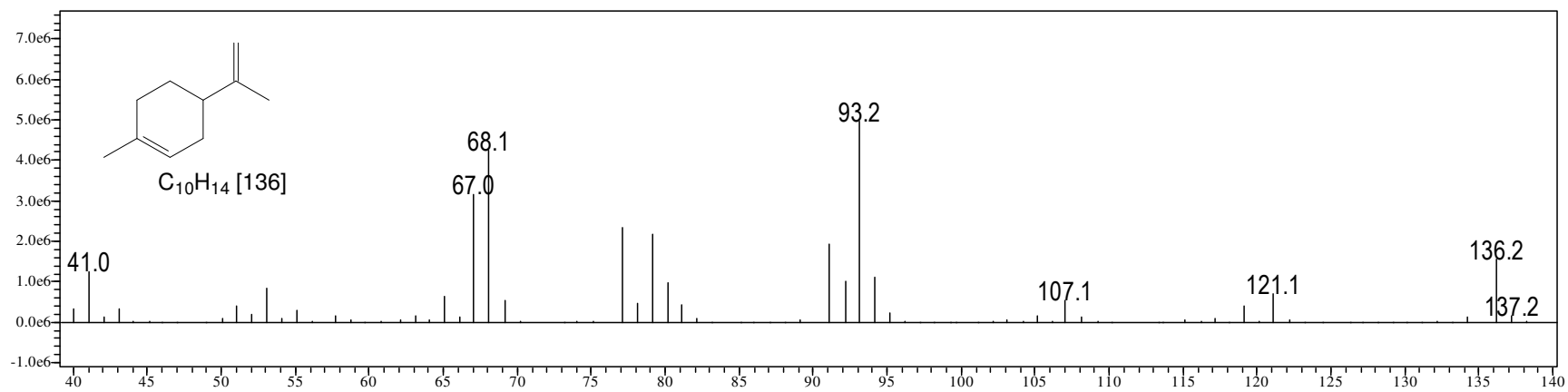


Figura 18 - Espectro de massas do composto limoneno presente nos óleos essenciais de **SPK**.