

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DOS FRUTOS E RAÍZES DE
Piper caldense C. DC. (PIPERACEAE)**

ÉLIDA BATISTA VIEIRA SOUSA CAVALCANTI

JOÃO PESSOA - PB

2014

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DOS FRUTOS E RAÍZES DE
Piper caldense C. DC. (PIPERACEAE)

ÉLIDA BATISTA VIEIRA SOUSA CAVALCANTI

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Paraíba como requisito
para a obtenção do título de Mestre
em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos. Área de Concentração:
Farmacoquímica.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARIA CÉLIA DE OLIVEIRA CHAVES

JOÃO PESSOA – PB

2014

C376e Cavalcanti, Élide Batista Vieira Sousa.
Estudo fitoquímico e biológico dos frutos e raízes de Piper
caldense C. DC. (Piperaceae) / Élide Batista Vieira Sousa
Cavalcanti.- João Pessoa, 2014.
135f. : il.
Orientadora: Maria Célia de Oliveira Chaves
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Piper caldense C.DC (Piperaceae)
- estudo fitoquímico. 3. Triglicerídeo. 4. Esteroides. 5. Derivados
do ácido benzoico. 6. Atividade antibacteriana.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DOS FRUTOS E RAÍZES DE
Piper caldense C. DC. (PIPERACEAE)

ÉLIDA BATISTA VIEIRA SOUSA CAVALCANTI

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Paraíba como requisito
para a obtenção do título de Mestre
em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos. Área de Concentração:
Farmacoquímica.

Dissertação aprovada em:

João Pessoa, 27 de fevereiro de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Célia de Oliveira Chaves
Universidade Federal da Paraíba – Orientadora

Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho
Universidade Federal da Paraíba – Examinador externo

Prof. Dr. Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha
Universidade Federal de Paraíba – Examinador interno

*“Quanto mais determinado você for, mais espetaculares
serão suas conquistas.” (Pe. Marcelo Rossi)*

*Aos meus pais Ernando e Célida, a minha irmã Gabriela e
ao meu esposo Giancarlo pelo apoio, incentivo e amor.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Pai do céu, por me dar a segurança do Seu amor e a certeza que está comigo sempre, me concedendo força, saúde e coragem para que eu conseguisse chegar até aqui.

À Nossa Senhora, minha Mãe, que sempre intercedeu por mim junto a Jesus e que sempre passa na frente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Ernando e Célida, que me deram a vida e a transformaram numa vida muito feliz, cheia de amor, carinho, confiança, apoio e incentivo, que sempre se dedicaram a mim e fizeram de tudo para eu realizar meus sonhos, vocês são os melhores pais que alguém pode ter. Amo muito vocês!

À minha irmã Gabriela, minha melhor amiga, pelo amor, apoio, incentivo e por sempre torcer pelo meu sucesso e felicidade. amO!

Ao meu esposo Giancarlo, pelo amor, companheirismo, incentivo e paciência durante todo o Mestrado e também pela ajuda na elaboração da dissertação. Muito obrigada por tudo que você me proporciona, você me faz muito feliz. TE!

À Professora Maria Célia de Oliveira Chaves, que além de orientadora se mostrou uma grande pessoa, através dos seus exemplos de honestidade, ética e amor pelo o que faz. Agradeço a amizade, a confiança, a oportunidade de ser sua orientanda e os seus ensinamentos que levarei sempre comigo.

À Jacqueline, pela amizade desde a graduação e pelo incentivo para eu fazer a seleção de Mestrado, por toda a ajuda nas disciplinas, na bancada e na elaboração da dissertação e por não ter me deixado desistir nos momentos difíceis. Não tenho palavras para agradecer tudo que você já fez por mim, você é e, se Deus quiser, continuará sendo minha amiga para sempre.

À Professora Dr^a Maria de Fátima Agra pela identificação do material vegetal.

À Professora Dr^a Hilzeth de Luna Freire Pessôa pela realização dos testes de atividade antibacteriana.

Aos Professores Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha e Petrônio Filgueiras de Athayde Filho por aceitarem compor a minha banca de defesa da dissertação.

À toda minha família e amigos pelas orações, incentivo e torcida.

Às LTF Girls: Galzinha, Jacq, Jéssica, Paula, Rafaela, Ana Silvia, Sara, Vivi, Anne, Carol, Camila, Marianne e Clarice por toda ajuda, apoio, incentivo, pelos empréstimos das inúmeras vidrarias, solventes, entre outros para finalização deste trabalho, pelos momentos de descontração que tornou mais divertido, agradável e menos “sofrido” o dia a dia no laboratório e, principalmente pela amizade verdadeira que construímos, na qual cada uma torce e deseja a felicidade e sucesso para outra.

À equipe da Professora Célia, por toda ajuda na bancada e pelos momentos divertidos no laboratório: Karlienne, Jacq, Mayza e Gracielle.

Aos colegas da turma de mestrado, em especial aos da Farmacoquímica companheiros de estresse, frustração, tristezas e alegrias durante algumas disciplinas e principalmente na bancada: Sallett, Milen, Sany, Evandro, Susyanne e Flávio.

Aos colegas do laboratório Ania, Otemberg, Roseana, Taína, Denise, Katherine, Eugênia, Jéssica Maciel, Ricardo, Severino, Raquel e Tânia pelo convívio diário e ajuda, sempre me dando palavras de apoio e incentivo.

Aos meus amigos de graduação e principalmente aqueles que mantive convivência durante o mestrado e em especial a Fabíola, que me ajudou muito na disciplina Bioquímica avançada.

À todos os professores da Graduação e do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela ajuda na minha formação acadêmica.

À todos os funcionários e técnicos pela competência e apoio, fundamentais para o bom andamento de nossas pesquisas: Nonato, Vicente, Alexsandro, Sócrates, Ataíde, Wellington e Caroline Mangueira.

A UFPB e CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a execução deste trabalho e que sempre acreditaram e torceram por mim. Muito obrigada a todos.

RESUMO

O gênero *Piper* L. é o maior da família Piperaceae, compreendendo pelo menos 1000 espécies, que se encontram distribuídas especialmente na região neotropical do globo terrestre e se destaca por suas propriedades econômicas, culturais, químicas e medicinais, como anti-inflamatória, antibacteriana, anestésica e fungicida, dentre outros. Espécies do gênero *Piper* têm-se tornado fontes de pesquisa de classes específicas de metabólitos secundários com marcantes atividades biológicas, incluindo alcaloides, amidas, chalconas, cromenos, flavonoides, lignanas, terpenos ciclopentanodionas, esteroides, derivados porfirínicos e derivados do ácido benzoico. *Piper caldense* C. DC., conhecida popularmente como “pimenta d’arda”, é utilizada na Paraíba como sedativa, antídoto para picadas de cobras, para dores de dente, bem como na forma de compressa no local afetado para alívio da dor. Este trabalho reporta o estudo fitoquímico das folhas e frutos de *P. caldense* C. DC. Utilizando-se métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV, EM e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e a comparação dos dados com a literatura foi possível isolar e identificar do extrato etanólico bruto dos frutos e raízes de *Piper caldense* C. DC., um triglicerídeo: trilinoleína, uma mistura de esteroides: β -sitosterol e estigmasterol, e três derivados do ácido benzoico: ácido 4-hidroxi-3-((2*E*,6*E*,10*E*)-3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico, ácido 3,4-dihidroxi-2-((2*Z*,6*E*,10*E*)-3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico e ácido 4,5-dihidroxi-3-((2*E*,6*E*,10*E*)-11-carboxi-3',7',15'-trimetilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico. As três últimas substâncias isoladas foram submetidas a ensaios microbiológicos, apresentando atividade antibacteriana frente a bactérias Gram negativas e Gram positivas de importância clínica.

Palavras-chave: Piperaceae. *Piper caldense* C. DC. Triglicerídeo. Esteroides. Derivados do ácido benzoico. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The genus *Piper* L. is the largest one among the Piperaceae. Containing at least 1000 species, they are located mainly on the neotropical region of Earth and it draws our attention due to its economical, cultural, chemical and medical properties, such as anti-inflammatory, antibacterial and fungicide actions. Species of the genus *Piper* have been becoming research sources for specific classes of secondary metabolites which play an important role concerning biological activities, including alkaloids, amides, chalcones, chromenes, flavonoids, lignans, cyclopentanediones terpenes, steroids, porphyrin derivatives and benzoic acid derivatives. *Piper caldense* C. DC., which is commonly known as “Pimenta d’arda”, is used in Paraíba as sedative, snake venom antidote, anti-toothache agent, and as active in located pain treatments through the use of compresses. This research reports the phytochemical study of *P. caldense* C. DC. fruits and roots. Through usual chromatographic methods and spectroscopic techniques such as IR, MS and one and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR techniques and comparison with literature data it was possible to isolate and identify a triglyceride: trilinolein, a mixture of steroids: β -sitosterol and stigmasterol and three benzoic acid derivatives: 4-hydroxy-3-((2*E*, 6*E*, 10*E*) -3', 7', 11', 15'-tetramethylhexadeca-2', 6', 10', 14'-tetraen-1-yl) benzoic acid, 3,4-dihydroxy-2-((2*Z*, 6*E*, 10*E*) -3',7', 11', 15'-tetramethylhexadeca-2', 6', 10', 14'-tetraen-1-yl) benzoic acid e 4,5-dihydroxy-3-((2*E*, 6*E*, 10*E*)-11-carboxy-3', 7', 15'-trimethylhexadeca-2', 6', 10', 14'-tetraen-1-yl) benzoic acid. The last three compounds were subjected to microbiological tests, showing antibacterial activity against Gram negative and Gram positive bacteria of clinical importance.

Keywords: Piperaceae. *Piper caldense* C. DC. Triglyceride. Steroids. Benzoic acid derivatives. Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i> L.....	33
Figura 2: Arbusto, folhas e frutos de <i>Piper caldense</i> C. DC.....	34
Figura 3.....	34
Figura 4: Via das pentoses-fosfato.	39
Figura 5: Estrutura química de Pc-1.	64
Figura 6: Espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-1.....	66
Figura 7: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-1 na região de 165,0 a 181,0 ppm.	66
Figura 8: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-1 na região de 120,0 a 136,0 ppm.	67
Figura 9: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-1 na região de 57,0 a 74,0 ppm.	67
Figura 10: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-1 na região de 28,8 a 34,4 ppm.	68
Figura 11: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-1 na região de 22,0 a 27,6 ppm.	68
Figura 12: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-1 na região de 11,0 a 16,6 ppm.	69
Figura 13: Espectro de massas (ESI-MS) de Pc-1.....	69
Figura 14: Estruturas químicas de Pc-2a e Pc-2b.....	71
Figura 15: Espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de Pc-2a/Pc-2b.....	73
Figura 16: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de Pc-2a/Pc-2b na região de 0,65-2,50 ppm.	73
Figura 18: Espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-2a/Pc-2b.....	74
Figura 17: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de Pc-2a/Pc-2b na região de 3,20 a 5,50 ppm.	74
Figura 19: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-1a/Pc-1b na região de 65,0-79,0 ppm.	75
Figura 20: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-2a/Pc-2b na região de 9,0-22,0 ppm.	75
Figura 21: Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) de Pc-2a/Pc-2b na região de 102,0-150,0 ppm.	76

Figura 22: Anel trissubstituído de Pc-3	77
Figura 23: Grupo geranyl-geranyl.....	77
Figura 24: Estrutura química de Pc-3.....	79
Figura 25: Anel aromático tetrassubstituído de Pc-4.....	82
Figura 26: Estrutura química de Pc-4.....	82
Figura 27: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500MHz) de Pc-3/Pc-4.	84
Figura 28: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 6,60-8,0 ppm.	84
Figura 29: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 5,0-5,4 ppm.	85
Figura 30: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 3,14-3,70 ppm.	85
Figura 31: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,86-2,42 ppm.	86
Figura 32: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,51-1,87 ppm.	86
Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4.....	87
Figura 34: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região 122,0-174,0 ppm.	87
Figura 35: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região 115,0-133,0 ppm.	88
Figura 36: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região 24,0-42,0 ppm.	88
Figura 37: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região 15,0-26,0 ppm.	89
Figura 38: Espectro de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4.....	89
Figura 39: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 6,6-8,1 e 110,0- 145,0 ppm.....	90
Figura 40: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,35 -1,90 e 8,0-34,0 ppm.....	90
Figura 41: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,0- 3,1 e 5,0-45,0 ppm.....	91

Figura 42: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4.	91
Figura 43: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 6,58-6,98 e 115,0-155,0 ppm.	92
Figura 44: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 7,30 -8,25 e 110,0-180,0 ppm.	92
Figura 45: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 3,10-3,65 e 105,0-170,0 ppm.	93
Figura 46: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,45-1,90-e 115,0-145,0 ppm.	93
Figura 47: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,88-2,36 e 115,0-145,0 ppm.	94
Figura 48: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,42-1,90 e 10,0-45,0 ppm.	94
Figura 49: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,82-2,30 e 10,0-45,0 ppm.	95
Figura 50: Anel tetrassubstituído de Pc-5.	96
Figura 51: Estrutura química de Pc-5.	98
Figura 52: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5.	102
Figura 53: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5 na região de 7,25-8,00 ppm.	102
Figura 54: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5 na região de 1,36-1,82 ppm.	103
Figura 55: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5 na região de 4,85-5,50 ppm.	103
Figura 56: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5 na região de 7,80-6,55 ppm.	104
Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-5.	104
Figura 58: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-5 na região de 126,0-180,0 ppm.	105
Figura 59: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-5 na região de 113,0-147,0 ppm.	105
Figura 60: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-5 na região de 15,0-40,0 ppm.	106

Figura 61: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5.	106
Figura 62: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 8,0-7,0 e 134,0-108,0 ppm.	107
Figura 63: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 3,9-2,8 e 44,0-20,0 ppm.	107
Figura 64: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 2,1-1,0 e 36,0-10,0 ppm.	108
Figura 65: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 2,35-1,85 e 46,0-24,0 ppm.	108
Figura 66: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 5,6-4,5 e 136,0-110,0 ppm.	109
Figura 67: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 7,3-6,2 e 156,0-130,0 ppm.	109
Figura 68: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 2,5-1,9 e 44,0-14,0 ppm.	110
Figura 69: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5.	110
Figura 70: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 7,70-6,95 e 190,0-90,0 ppm.	111
Figura 71: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 7,70-6,70 e 50,0-15,0 ppm.	111
Figura 72: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 7,55-6,55 e 185,0-150,0 ppm.	112
Figura 73: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 3,56-3,16 e 175,0-105,0 ppm.	112
Figura 74: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 1,90-1,30 e 150,0-105,0 ppm.	113
Figura 75: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 1,95-1,30 e 55,0-5,0 ppm.	113
Figura 76: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 5,8-4,4 e 65,0-5,0 ppm.	114
Figura 77: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 1,74-1,38 e 150,0-110,0 ppm.	114

Figura 78: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 1,74-1,38 e 50,0-5,0 ppm.	115
Figura 79: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5 na região de 2,32-1,96 e 155,0-110,0 ppm.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica de <i>Piper caldense</i> C. DC.	30
Tabela 2: Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C (125 MHz) de Pc-1 com modelo encontrado na literatura (RAGASA et al., 2012).	65
Tabela 3: Comparação dos dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) de Pc-2a/Pc-2b com dados de RMN ^{13}C dos modelos da literatura (KOJIMA, 1990, CDCl_3 , 25MHz).....	72
Tabela 4: Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Pc-3 registrados em CDCl_3	80
Tabela 5: Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Pc-3 com modelo encontrado na literatura (MAXELL & RAMPERSAD et al., 1989).....	81
Tabela 6: Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Pc-4 com modelo encontrado na literatura (SILVA, 2013).....	83
Tabela 7: Dados espectrais de HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5.....	99
Tabela 8: Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Pc-5 com modelo encontrado na literatura (δ , CD_3OD , 500/150 MHz, KATO, et al., 2009).....	100
Tabela 9: Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Pc-5 com modelo encontrado na literatura (δ , piridina d5, 500/150 MHz, CHAVES, et al., 2010).....	101
Tabela 10: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos Pc-3, Pc-4 e Pc-5 sobre as linhagens bacterianas	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Compostos isolados em <i>Piper caldense</i> C. DC.....	36
Quadro 2: estruturas químicas de alguns derivados dos ácidos benzoicos.....	41
Quadro 3: Ácidos benzóicos prenilados identificados no gênero <i>Piper</i> L.....	42
Quadro 4: Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC, utilizando como eluentes Hex/AcOEt e MeOH em diversas proporções (Coluna 1).....	54
Quadro 5: Fracionamento cromatográfico da Fração 16 da Coluna 1, utilizando como eluentes Hex e AcOEt em diversas proporções (Coluna 1.1).....	55
Quadro 6: Fracionamento cromatográfico da Fração 18-27 da Coluna 1.1, utilizando como eluentes Hex e AcOEt em diversas proporções (Coluna 1.1.1).....	56
Quadro 7: Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila, utilizando como eluentes CH ₂ Cl ₂ e MeOH na mesma proporção (Coluna 2).....	58
Quadro 8: Fracionamento cromatográfico da Fração 10-12 da Coluna 2, utilizando como eluentes Hex e AcOEt em diversas proporções (Coluna 2.1).....	58

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: processo de extração do pó dos frutos de <i>Piper caldense</i> C. DC.	52
Esquema 2: Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C. DC.	57
Esquema 3: Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila dos frutos de <i>Piper caldense</i> C. DC.	59
Esquema 4: Processo de extração do pó dos frutos de <i>Piper caldense</i> C. DC.	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt: Acetato de etila

APT: Attached Proton Test

CC: Cromatografia em Coluna

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CD₃OD: Metanol deuterado

CD₃OD: Metanol deuterado

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CHCl₃: Clorofórmio

CH₂Cl₂: Diclorometano

Col: Coluna

COSY: *Correlation Spectroscopy*

d: Dubleto

dd: Duplo dubleto

dl: Dubleto largo

Fr: Frações

Hex: Hexano

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HMQC: *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*

Hz: Hertz

J: Constante de acoplamento

Kg: Quilograma

L: Litro

LTF: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

m: Multiplete

MeOH: Metanol

MHz: Megahertz

NOESY: *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*

ppm: partes por milhão

Rf: Fator de Retenção

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Singleto

sl: Singleto largo

t: Tripleto

UV: Ultra Violeta

δ : Deslocamento Químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	30
3.1 Considerações sobre a família Piperaceae Baill.....	30
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Piper</i> Linnaeus (<i>Piper</i> L.).....	31
3.3 Considerações sobre a espécie <i>Piper caldense</i> C. DC.....	34
3.4 Constituintes Químicos Isolados do gênero <i>Piper</i>	37
3.4.1 Compostos fenólicos derivados do ácido benzoico.....	38
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	51
4.1 Coleta e identificação do material botânico.....	51
4.2 Estudo fitoquímico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC.....	51
4.2.1 Processamento da planta e preparação dos extratos.....	51
4.2.2 Isolamento e Purificação dos constituintes químicos.....	52
4.2.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C. DC.....	53
4.2.2.2 Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila dos frutos de <i>Piper caldense</i> C. DC.....	57
4.3 Estudo Fitoquímico das raízes de <i>Piper caldense</i> C. DC.....	59
4.3.2 Processamento da planta e preparação dos extratos.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos de <i>Piper caldense</i> C. DC.....	64
5.1.4 Determinação estrutural de Pc-1.....	64
5.1.1 Determinação estrutural de Pc-2.....	70
5.1.2 Determinação estrutural de Pc-3/Pc-4.....	77
5.1.4 Determinação estrutural de Pc-5.....	96
6. ESTUDO MICROBIOLÓGICO.....	118
6.1 Material e métodos.....	118
6.1.1 Linhagens bacterianas.....	118
6.1.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos frente a bactérias de importância clínica.....	118
6.2 Resultados e discussão.....	119
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	122
8. REFERÊNCIAS.....	124

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diversas formas de terapia para prevenção e cura de doenças, as plantas sempre foram uma das mais utilizadas desde o início da humanidade, sendo inicialmente empregadas na forma natural, na preparação de chás, unguentos, emplastos e outras. Posteriormente, especialmente no início do século XIX, serviram como fonte de matéria-prima para síntese de fármacos. Mais recentemente, estas emergiram como peças-chave na descoberta de protótipos que servem de base racional para o desenvolvimento de medicamentos (VILEGAS & CARDOSO, 2007).

O desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais de plantas era limitado ao isolamento e definição da estrutura de substâncias ativas e feito ao acaso (VIEGAS, 2006). Hoje, o foco da fitoquímica tradicional voltou-se para estudos que envolvam atividade biológica e/ou biossíntese de macromoléculas vegetais, por exemplo (PINTO, 2002).

Grande parte dos compostos orgânicos naturais de origem vegetal são biologicamente ativos (PLETSCHI, 1998) e, inseridas nesse contexto, as plantas medicinais, apresentam potencial farmacológico, são úteis terapeuticamente (CUNHA, 2005) e fornecem, ainda, substâncias enantiomericamente puras (MONTANARI, 2001).

Além disso, elas podem fornecer metabólitos primários e secundários, que, após extração e transformação, pela Indústria Farmacêutica, em moléculas farmacologicamente viáveis, podem compor medicamentos (CUNHA, 2005).

Durante o século XX, pesquisas químicas e farmacêuticas foram responsáveis pela cura ou alívio de diversos problemas de saúde, no entanto não puderam resolver os problemas da grande maioria da população mundial (VEIGA JUNIOR, 2008). Nos países em desenvolvimento, mais de 80% da população depende da medicina tradicional para suas necessidades de cuidados em saúde (GERMAN-CASTELLI, 2004).

As plantas medicinais e seus derivados constituíam a base terapêutica medicamentosa até meados do século XX. Depois disso, a síntese química, que teve início no final do século XIX, começou uma fase de crescimento abrupto. Na atualidade, aproximadamente 50% dos medicamentos são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese, ou seja, advém direta ou indiretamente de um precursor vegetal (RODRIGUES; REALI, 2008) e os outros 25%

restantes referem-se às outras fontes de produtos naturais, como marinhos, microbiológicos, entre outros (CALIXTO, 2000).

A produção de medicamentos fitoterápicos é um emprego importante da biodiversidade. “Esses medicamentos constituem-se em preparações contendo extratos padronizados de uma ou mais plantas, hoje amplamente comercializados em países pobres ou ricos” (CALIXTO, 2003).

Segundo Matos (2002), as plantas medicinais, sendo corretamente utilizadas, só irão diferir do medicamento a que deu origem pela embalagem e pelas substâncias secundárias que acompanham o princípio ativo (RODRIGUES; REALI, 2008).

Calixto (2003) afirma que o grande desafio para o aproveitamento racional da biodiversidade brasileira visando a produção de medicamentos é saber como transformar um patrimônio genético natural tão grande em riquezas, criando indústrias de base tecnológica e gerando empregos qualificados.

Os produtos naturais continuam sendo uma fonte de protótipos e de possíveis fármacos, visto que: grande parte de importantes fármacos é oriunda de produtos naturais ou foram obtidos considerando um produto natural como protótipo; para a maioria dos fármacos desenvolvidos por via sintética existem produtos naturais com o mesmo modo de ação já identificados; e existem muitos alvos moleculares relacionados a problemas patológicos, para os quais os produtos naturais podem ser considerados protótipos, possuindo um bom efeito, ainda que não tenham desenvolvidos os fármacos correspondentes (YUNES & CECHINEL-FILHO, 2007).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

A relativa facilidade de coleta, a condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável, a biodiversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de descoberta de princípios ativos entre tais constituintes químicos permitem diagnosticar e destacar as plantas brasileiras como a principal fonte renovável para o

surgimento e desenvolvimento de novos fármacos, além de outros produtos que podem ser utilizados para finalidades sociais adicionais (BRAZ FILHO, 2010).

Atualmente, a resistência bacteriana vem sendo considerada como um problema de saúde pública crescente no mundo inteiro e o maior obstáculo para o sucesso dos tratamentos de doenças infecciosas, (BENGHEZAL et al., 2007; OLIVEIRA; SILVA., 2008).

Essa situação tem levado os pesquisadores a buscar novas substâncias tóxicas para as bactérias, que funcionem como antimicrobianas, a partir de várias fontes, tais como as plantas medicinais. A triagem de extratos de plantas, assim como de compostos sintetizados no metabolismo secundário, para evidenciar a presença de novos compostos com atividade antimicrobiana é uma fonte potencial de medicamentos mais efetivos (KARAMAN et al., 2003).

Analisando os medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2002, observa-se que 28% destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semi-sintéticos, ao passo que 24% são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais. Portanto, mais da metade dos novos medicamentos lançados no referido período são derivados de produtos naturais, revelando a grande importância dessa fonte nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN et al., 2003; BRANDÃO et al., 2010).

Durante o último século vivenciou-se um imenso desenvolvimento no conhecimento das substâncias químicas presentes nos vegetais, material de estudo da Química de Produtos Naturais. Pode-se dizer que o estudo de espécies da família Piperaceae teve importante participação neste desenvolvimento. Desde os primeiros passos da pesquisa fitoquímica encontram-se espécies desta família, principalmente do gênero *Piper*, fazendo parte do material de estudo de pesquisadores, que têm desvendado substâncias de grande interesse comercial, medicinal e científico (PARMAR et al.; 1997 SHU, 1998).

Compreendendo o potencial farmacológico das substâncias isoladas de espécies da família Piperaceae e reconhecendo a importância do gênero *Piper*, no qual suas espécies são amplamente utilizadas na medicina popular para diversas enfermidades, optamos por estudar a espécie *Piper caldense* C. DC., cujos estudos químicos e farmacológicos ainda são poucos conhecidos, como também investigar a atividade antimicrobiana desta espécie contra bactérias

Gram positivas e Gram negativas responsáveis por uma série de doenças no homem, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, o que poderá conduzir a descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas com atividade biológica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento do perfil químico da família Piperaceae especialmente do gênero *Piper*, tendo em vista o potencial etnobotânico e etnofarmacológico desta família.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar fitoquimicamente a espécie *Piper caldense* C. DC., através de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos;
- ✓ Determinar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos isolados de *Piper caldense* C. DC., através de métodos espectroscópicos;
- ✓ Integrar estudos biológicos ao estudo fitoquímico de *Piper caldense* C. DC., através da disponibilização de seus extratos e/ou substâncias isoladas para realização de testes;
- ✓ Disponibilizar substâncias isoladas de *Piper caldense* C. DC. para investigar a atividade antibacteriana frente a bactérias Gram negativas e Gram positivas de importância clínica.

Fundamentação Teórica

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Piperaceae Baill

A família Piperaceae é classificada entre as mais primitivas famílias entre as Angiospermas (WANKE, et al., 2007). É constituída de 14 gêneros e um número de espécies estimado em 1450 amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, a família é representada por 5 gêneros e um total de 500 espécies, encontradas principalmente na Mata Atlântica. (SOUZA & LORENZI, 2005). *Piper* e *Peperomia* são os dois gêneros mais representativos na flora brasileira. As espécies de Piperaceae possuem importância econômica e medicinal, em virtude das inúmeras indicações terapêuticas (PARMAR, 1997).

Suas plantas vivem principalmente nas matas úmidas (ARAÚJO, 2012) ocupando frequentemente locais sombreados (CARVALHO-OKANO, 1999) e habitando diversos estratos da floresta, particularmente na Mata Atlântica. Apresentam-se geralmente como ervas trepadeiras ou lenhosas, que se fixam aos troncos das árvores por meio de raízes adventícias (ANGELY, 1958; KINGHORN, 1996; BLANCO, 1998), arbustos e menos frequentemente árvores.

A família Piperaceae pertence à superordem Nymphaeiflorae, ordem Piperales Dahlgren (1980), sendo formada por cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis* (DAHLGREN, 1980). No sistema de Engler, a ordem Piperales é considerada como um dos grupos mais primitivos das dicotiledôneas, apresentando células oleíferas, sendo em sua maioria plantas herbáceas e tropicais. Quanto à classificação botânica, a espécie estudada *Piper caldense* C. DC. é classificada da seguinte forma (Tabela 1, p. 30):

Tabela 1: Classificação taxonômica de *Piper caldense* C. DC.

Classificação taxonômica	Táxon
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Piperales
Família	Piperaceae
Gênero	<i>Piper</i> L.
Espécie	<i>Piper caldense</i> C. DC.

De importância econômica e medicinal, a família Piperaceae é fonte de muitas substâncias biologicamente ativas com grande potencial para usos medicinais e agrícolas. As espécies do gênero *Piper* contém uma grande variedade de metabólitos secundários, tendo sido utilizadas na alimentação, como inseticidas e na medicina tradicional. As principais classes de metabólitos biologicamente ativos são fenilpropanoides, lignanas/neolignanas, pironas, amidas alifáticas e aromáticas, alcaloides, policetídeos e cromenos, além de outros com biossíntese mista (BALDOQUI et al., 2009).

Conforme Simões (2003) as espécies desta família possuem várias propriedades terapêuticas e são conhecidas amplamente pelo seu uso popular, como por exemplo: *P. aduncun* e *P. hispidum*: usadas para dores no estômago e como repelentes de insetos; *P. amalogo*: usadas para aliviar dores no peito e como agente antiinflamatório; *P. sylvaticum*: suas raízes são usadas como antídoto contra veneno de cobra; *P. chaba*: suas raízes e frutos são utilizados para asma brônquica, febre, dor no abdômen e como estimulante; *P. methysticum*, suas raízes são utilizadas no tratamento da dor, neuralgia, convulsões, inquietude, insônia e ainda utilizada em bebidas não fermentadas e *P. brachystachyum* apresenta propriedades inseticidas (JACOBSON e CROSBY, 1975);

Neste contexto, enfatiza-se a presença de amidas (DA SILVA et. al., 2002; MARQUES et. al., 2007), propiofenonas (GUERRINI et al., 2009; RAFAEL et. al., 2008) e piperolídeos (MATA et. al., 2004) com atividade antimicrobiana; chalconas (LAGO et. al., 2007) e ácidos benzoicos prenilados (BALDOQUI et. al., 1999) com potencial antifúngico; flavonoides (XUAN et. al., 2008) e amidas (SCOTT et. al., 2008; SIDDIQUI et. al., 2008) como inseticidas, além de lignanas tetrahidrofurânicas e cromonas com atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (BATISTA-JÚNIOR et. al., 2008), dentre outras.

3.2 Considerações sobre o gênero *Piper* Linnaeus (*Piper* L.)

O gênero *Piper* é um dos maiores da família Piperaceae, com pelo menos 1.000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente da Ásia e do Novo Mundo. É um gênero com boa representatividade comercial e destaque no cenário econômico (NUNES et al., 2007).

As espécies do gênero *Piper* possuem como características, aroma forte e agradável e sabor picante. Tais espécies oferecem grande variedade de usos como condimentos,

aromatizantes e medicinais. Economicamente são importantes como a pimenta utilizada como condimento nos mercados em todo o mundo. O fruto amadurecido de *P. nigrum* é a fonte da pimenta branca, enquanto o fruto verde da mesma espécie é a fonte da pimenta-do-reino.

Espécies de *Piper* são utilizadas na medicina chinesa, no sistema ayurvedica e nas práticas da medicina popular da América Latina e do Ocidente Indiano, sendo aplicadas para tratar a asma, bronquite, febre, doenças gastrointestinais, e reumatismo, e as preparações obtidas destas plantas tem demonstrado efeitos anti-inflamatório, inseticida, anti-hipertensivo, antidiabético, imunomodulador e antimutagênico (BEZERRA et al., 2008). Pesquisas relataram vários compostos bioativos com atividade antimicrobiana (CORDOVA, et al., 2010; LEMOS et al., 2011), antioxidante (YAMAGUCHI et al., 2006), inseticida (SOUTO et al., 2006), tripanocida (MARTINS et al., 2003; BATISTA et al., 2008; LOPES et al., 2008) e antifúngica (LAGO et al., 2004; MARQUES et al., 2007). Estudos realizados recentemente mostram que algumas espécies de *Piper* podem trazer muitos benefícios, como propriedades analgésicas e energéticas, promover vasodilatação, ter ação antioxidante, antifúngica, anticâncer e anti-inflamatória (BAUMGARRT, 2007).

A investigação fitoquímica de espécies de *Piper* originou inúmeros trabalhos científicos em várias partes do mundo, o que levou ao isolamento de diversos compostos bioativos, tais como cavalactonas (XUAN et al., 2008; WHITTON et al., 2003), aristolactamas (CARDOSO, et al., 2002; CHAVES et al., 2006), fenilpropanoides (CHAVES et al., 2002; SANTOS e al., 1997), lignoides (CHEN et al., 2007; BODIWALA et. al., 2007), cromonas (MORANDIM et. al., 2005), flavonoides e chalconas (LAGO et al., 2007; ALVES, 2004; CHAVES et al., 2010), terpenos (BALDOQUI et al., 2009; PÉRES et al., 2009), esteróides (PARMAR et al., 1997), ácidos benzoicos prenilados (LAGO et al., 2009; CHAVES et al., 2010), e ainda amidas (ARAÚJO-JÚNIOR, 1997; SANTOS, 1998; CHAVES et al., 2001; 2003; SRINIVASAN, 2007; COTINGUIBA et. al., 2009), sendo estes os metabólitos mais característicos deste gênero.

Nesse gênero evidenciou-se a existência de amidas, sendo este o tipo mais abundante. Além destas, também são verificadas isobutilamidas, amidas do tipo piperidínicas, piridônicas e pirrolidínicas, perfazendo quase a totalidade das amidas do gênero (PARMAR et al., 1997).

Suas espécies estão distribuídas especialmente na região neotropical do globo terrestre, onde cerca de dois terços das espécies descritas são encontrados (Figura 1, p. 33). A

maioria dos seus representantes habita lugares úmidos, quentes e várzeas de florestas tropicais e sua diversidade e abundância geralmente diminuem com o aumento da altitude ou com o decréscimo da precipitação (DYER & PALMER, 2004; JARAMILLO, et al. 2001).

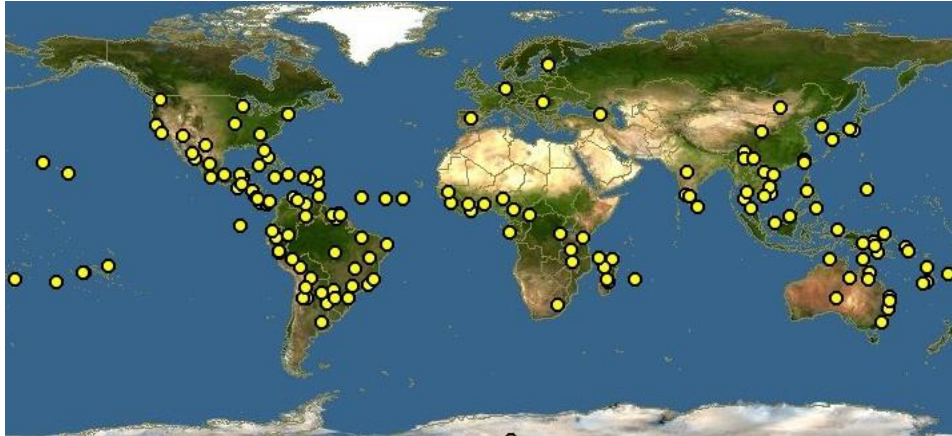


Figura 1: Distribuição geográfica do gênero *Piper* L. (Fonte: <http://data.gbif.org/species/>)

Morfologicamente as espécies de *Piper* L. são relativamente uniformes, com folhas simples e alternadas e apresentando caules divididos por nodos salientes, onde os galhos quebram-se com mais facilidade, semelhantes aos nodos observados em bambus ou na cana de açúcar. São arbustos, subarbustos ou arvoretas, geralmente variando entre 1 e 10 m de altura, mais ou menos lignificados, ramosos, não raro nodosos e as inflorescências são espigas solitárias opostas às folhas pedunculadas que estão dispostas de forma alternada (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

As inflorescências geram infrutescências em espigas simples, mas também podem ser compostas do tipo umbelas ou racemos. Souza (2003) salienta a necessidade de promover estudo ontogenético de frutos, caso contrário, pode-se incorrer em erros de classificação. Estudos recentes sobre espécies de Piperaceae têm confirmado isso. Oliveira et al. (2005) e Albiero (2005), estudando algumas espécies de *Piper* L., classificaram os frutos como baga e bacóide, e não como drupa, como é indicado para a família (YUNCKER, 1972; JUDD et al., 2002).

3.3 Considerações sobre a espécie *Piper caldense* C. DC

Arbusto glabro de 0,5-3,0 m de altura, suavemente arborizado, com internodos superiores de 2-5 cm ou mais longo e com pontilhados glandulares. Suas folhas são oblonga-lanceolar-elíptica, com ápice acuminata e cuspidata, e base inequilateralmente aguda a cuneada, um lado acima de 2-4 mm mais curto que o pecíolo, com pontilhados glandulares, com nervos de 5 a 7 ou 8 a 10 de cada lado, com pequenos intermediários e conectadores transversais (CALDERARI, 2002). Espiga medindo de 3-5 × 0,3-0,6 cm, esverdeado-alvacentas, ereta, sutilmente curva, reflexa na maturidade; pedúnculo com 0,7-1,5 cm comprimento; bractéola triangular-peltada, franjada; 4 estames; ovário com estilete longo, 3 estigmas, filiformes. O fruto mede 2,5-3 mm comprimento, estiloso, globoso, às vezes anguloso, glabro, agudo no ápice, estigmas persistentes (Figura 2, p. 34) (GUIMARÃES & VALENTE, 2001).



Figura 2: Arbusto, folhas e frutos de *Piper caldense* C. DC. (Fonte: <http://www.ufrgs.br/>)

Tem distribuição nas Regiões Nordeste a Sul do Brasil, nos estados de Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Hábitat: floresta ombrófila densa submontana, às vezes nas margens de córregos onde possa penetrar luz difusa, e muito raramente em área de pasto, apresentando dispersão zoocórica. (GUIMARÃES & VALENTE, 2001).

Quanto aos estudos fitoquímico e biológico, a espécie *Piper caldense* C. DC. é pouco investigada. Os únicos trabalhos encontrados para essa espécie referem-se à investigação do potencial antifúngico do extrato etanólico (FREITAS et al., 2009), do estudo fitoquímico das

raízes (CARDOZO & CHAVES, 2003) e do extrato diclorometânico e metanólico das folhas (KATO, et al., 2009).

Outras denominações oficiais são atribuídas a esta espécie, como *Piper pseudolanceolatum* C. DC., *Piper pardinum* C. DC., *Piper resacatum* (CALDERARI, 2002). *Piper caldense* C. DC., conhecida pelo nome vernacular de “pimenta d’arda”, “pimenta d’água” é utilizada na Paraíba como sedativa, antídoto para picadas de cobras, para dores de dente, bem como na forma de compressa no local afetado para alívio da dor (CARDOSO JÚNIOR; CHAVES, 2003).

Estudos das raízes de *Piper caldense* C. DC., conduziram ao isolamento da caldensina, uma *N*-aristolactama, composto natural inédito, cuja fonte de obtenção até então descrita era de origem sintética (CARDOSO JÚNIOR; CHAVES, 2003).

O extrato bruto das folhas de *Piper caldense* C. DC. mostrou atividade antibacteriana frente às espécies *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (CORDOVA et al., 2007).

O fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Piper caldense* resultou no isolamento da flavona 7,3'- di-*O*-metilluteolina, cuja ocorrência ainda não havia sido relatada para essa espécie (FREITAS; KATO, 2008).

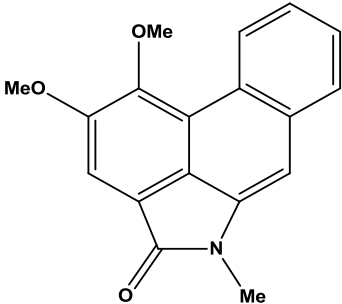
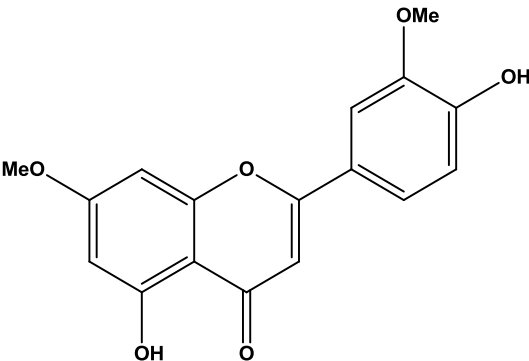
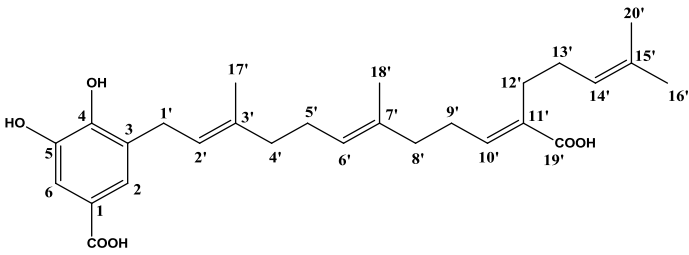
Os extratos brutos metanólico e o diclorometânico das folhas de *Piper caldense* C. DC. mostraram potente atividade antifúngica contra espécies do gênero *Cladosporium*. Das folhas de *Piper caldense* C. DC. foi isolado o ácido caldensínico, um novo derivado prenilado do ácido benzoico, o qual apresentou intensa atividade contra as espécies fúngicas patogênicas *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (KATO et al., 2009).

Têm-se investigado também o potencial acaricida dos óleos essenciais de *Piper caldense* C. DC., os quais apresentaram excelente atividade acaricida para *Tetranychus urticae*. (De acordo com estudos já realizados os óleos de *P. tuberculatum* e *P. caldense* foram 25,5 e 5 vezes mais repelentes do que o eugenol, respectivamente. Esses dados sugerem que esses óleos apresentam potencial acaricida para o controle de *T. urticae*). O componente principal identificado no óleo de *Piper caldense* C. DC. foi γ -muuroleno, seguido de óxido de

cariofileno. Este é o primeiro relato da composição química do óleo essencial de *P. caldense* (ARAÚJO, 2011).

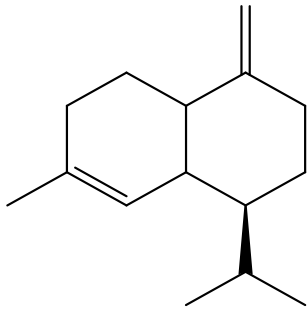
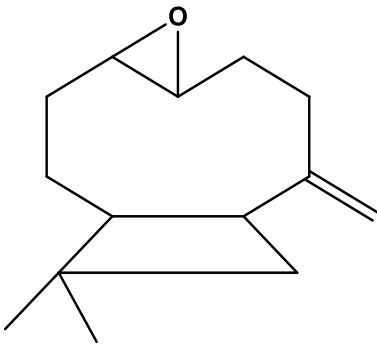
Na literatura consta o isolamento dos seguintes compostos em *Piper caldense* C. DC. (Quadro 1, p. 36):

Quadro 1: Compostos isolados em *Piper caldense* C. DC.

Nomeclatura	Estrutura	Referências
3,4-dimetóxi- <i>N</i> -metil- aristolactama	 <p>The structure shows a benzene ring fused to a five-membered lactam ring. The benzene ring has methoxy (MeO) groups at the 3 and 4 positions. The nitrogen atom of the lactam ring is substituted with a methyl (Me) group.</p>	CARDOSO JÚNIOR; CHAVES, 2003
7,3'-di- <i>O</i> - metilluteolina	 <p>The structure consists of a luteolin core (a chromone ring system) with a methoxy (MeO) group at the 7-position and a hydroxyl (OH) group at the 3-position. It is substituted at the 3'-position with a 3-methoxyphenyl group.</p>	FREITAS; KATO, 2008
ácido caldensínico	 <p>The structure is a long-chain polyunsaturated fatty acid. It features a benzene ring with hydroxyl (OH) groups at the 4 and 5 positions and a carboxylic acid (COOH) group at the 1 position. The side chain is numbered from 1' to 20' and contains several double bonds.</p>	KATO, 2009; CHAVES, 2009

Continua...

Quadro 1 (Continuação): Compostos isolados em *Piper caldense* C. DC.

Nomeclatura	Estrutura	Referências
y-muuroleno		ARAÚJO, 2011
óxido de cariofileno		ARAÚJO, 2011

3.4 Constituintes Químicos Isolados do gênero *Piper*

Várias espécies do gênero *Piper* L. já foram estudadas e uma infinidade de metabólitos secundários tem sido encontrada, incluindo kavalactonas (XUAN, et. al., 2008; WHITTON, et. al., 2003), aristolactamas (CHAVES et al., 1999; 2003; 2006), lignoides (MARTINS et. al., 2000; CHEN, et. al., 2007; BODIWALA, et. al., 2007), cromenos (BALDOQUI et. al., 1999; MORANDIM et. al., 2005), flavonoides e chalconas (LAGO et al., 2007; ALVES, 2004; CHAVES et al., 2010), terpenos (BALDOQUI et. al., 2009), ácido benzoico prenilado (BALDOQUI et. al., 1999; RAMOS et. al., 2009; LAGO et al., 2009; KATO, et al., 2009; CHAVES et al., 2010;) e também amidas (ARAÚJO-JÚNIOR, 1997; SANTOS, 1998; CHAVES et al., 2001; 2003; SRINIVASAN, 2007).

Várias investigações fitoquímicas no gênero *Piper* L. tem sido realizadas por conter vários derivados prenilados dos ácidos benzoicos com interessante atividade biológica e também foram descritas por conter compostos estruturalmente similares que exibem diversas

atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, inseticida e antiparasitária (MALAMI, 2012).

3.4.1 Compostos fenólicos derivados do ácido benzoico

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos de produtos naturais mais importantes, amplamente distribuídos no reino vegetal. Muitos são fisiológicos e ecologicamente significativos para as plantas que os produzem (PINÖL & PALAZÓN, 1996). Estes compostos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO, 2007).

Possuem em comum um anel aromático substituído por um ou mais grupos hidroxila ou outros substituintes, podendo ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas às quais estão ligados e compreendem um grupo quimicamente heterogêneo (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

Os principais subgrupos são os derivados do ácido benzoico (ácido vanílico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido elágico, ácido siríngico, ácido gentísico, ácido *o*-hidróxi-benzoico e ácido *p*-hidróxi-benzoico), os fenilpropanóis simples (ácido cafeico e ácido ferúlico), as cumarinas (umbeliferona e psoraleno), os flavonoides (antocianinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas), os taninos (condensados e hidrolisáveis) e as ligninas (CARVALHO *et al.*, 1999).

A biogênese dos compostos fenólicos acontece através de duas rotas conhecidas que vão determinar o padrão de substituição do composto fenólico resultante: a via do ácido chiquímico, a partir do ácido cinâmico que tem como precursores biossintéticos o fosfoenolpiruvato proveniente da glicólise e a eritrose-4-fosfato proveniente da via das pentoses-fosfato (Figura 4, p. 39) sendo obtidos compostos com grupos hidroxilas dispostos na posição *orto*, ou pela via do acetato-polimalato que inicia com a acetil-coenzima A e a malonil-coenzima A, originando compostos com substituição *meta* das hidroxilas. (GEISSMAN & CROUT, 1969; DIXON & PAIVA, 1995). Os ácidos benzoicos são derivados dos correspondentes ácidos cinâmicos, com o mesmo padrão de substituição do anel aromático.

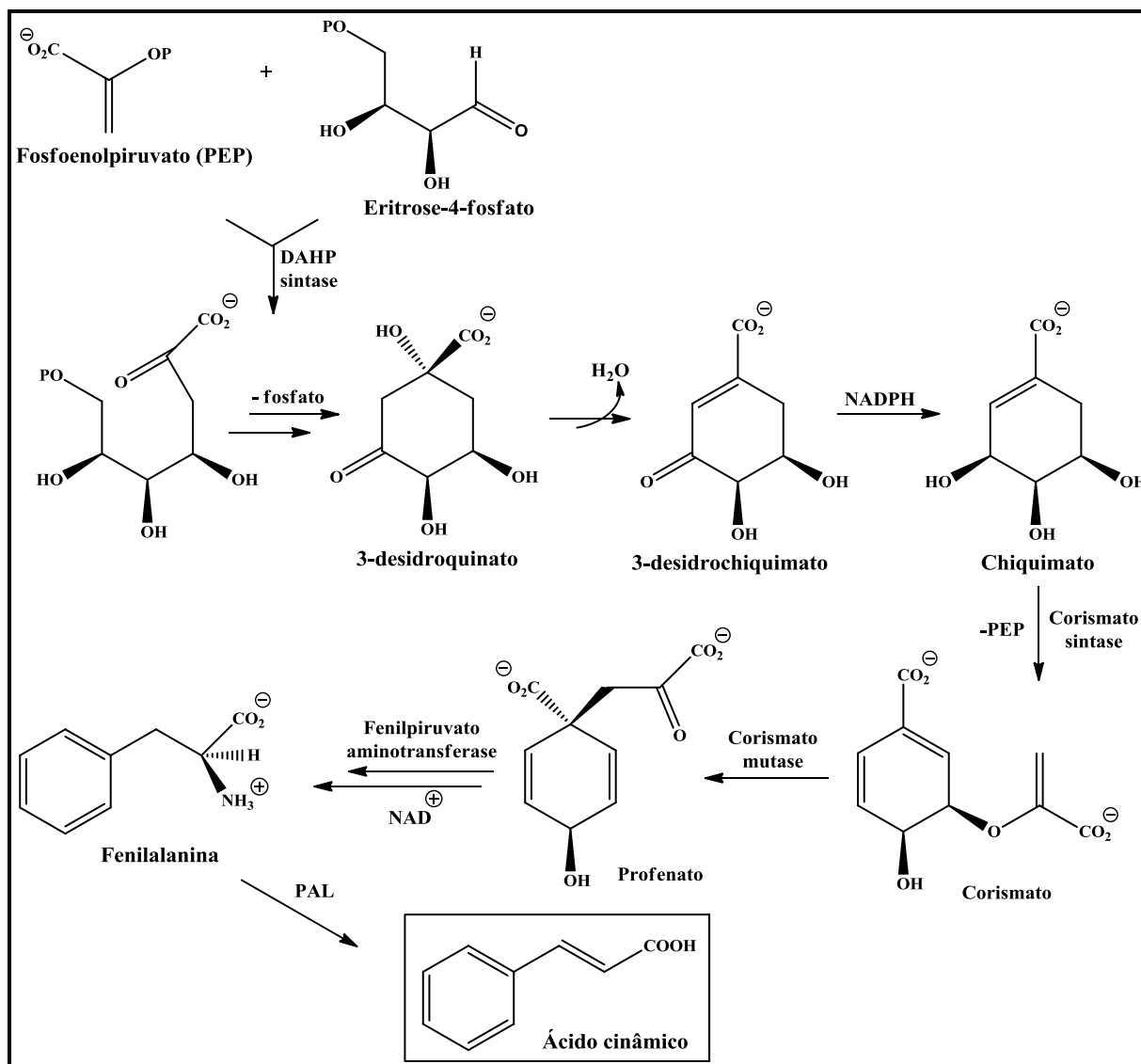


Figura 4: Via das pentoses-fosfato.

Compostos fenólicos podem atuar como inibidores em vários processos de desenvolvimento. Em nível celular, influenciam o metabolismo de lipídios e o mecanismo bioquímico da respiração, inibindo o transporte de glicose e a síntese de celulose. No que se refere à floração, existem evidências experimentais da participação direta dos compostos fenólicos nesse processo, por meio de sua inter-relação com hormônios, podendo tanto inibir quanto estimular a floração, dependendo do tipo de composto e de sua concentração (LADEIRA et al., 1987).

São amplamente distribuídos na Natureza, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem ser pigmentos, que dão a

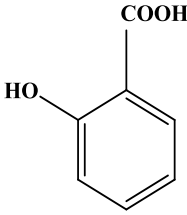
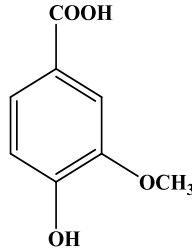
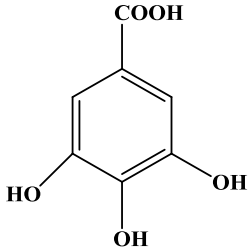
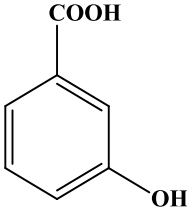
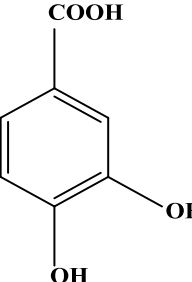
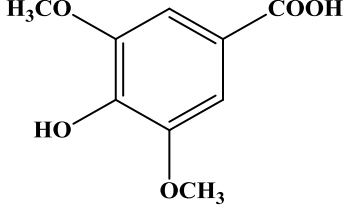
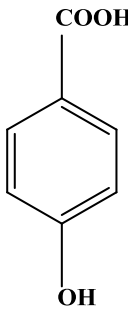
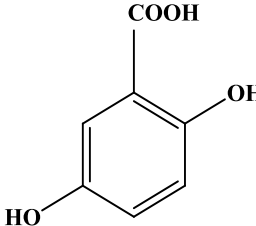
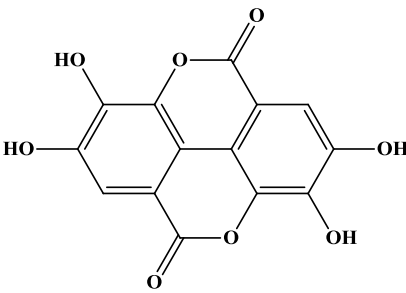
aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Os derivados do ácido benzoico são encontrados tanto nas angiospermas como nas gimnospermas, com ampla distribuição. São abundantes em frutas, vegetais e alimentos derivados dos mesmos, que são consistentemente associados à redução no risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas, devido à sua propriedade de sequestrar radicais livres e metais pró-oxidantes explicando, em parte, esta associação (SPENCER *et al.*, 2008), formando segundo Beta e Skerget, 2005, um grande grupo de fitometabólitos aos quais é creditada uma bem conhecida ação antioxidante. Ademais, podem exercer a modulação da atividade de diferentes enzimas como telomerase, lipoxigenase e cicloxigenase, interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outras, essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

São muito reativos quimicamente, possuindo características ácidas. Podem ainda se complexar com metais e, por serem aromáticos, apresentam intensa absorção na região do UV. Os ácidos *o*-hidroxi-benzoico (ácido salicílico), vanílico e siríngico são obtidos após hidrólise ácida das folhas de gimnospermas e angiospermas. O ácido protocatéquico tem ampla distribuição. Os ácidos gálico e elágico também são obtidos por hidrólise ácida, sendo os constituintes dos taninos hidrolisáveis. Além destes, ácidos metoxilados como o ácido *p*-metóxi-benzóico (ácido anísico), ácido 3,4-dimetóxi-benzóico (ácido verátrico) e o ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico podem ser citados.

No Quadro 2 (p. 411) observa-se algumas estruturas químicas de derivados dos ácidos benzoicos, que são largamente distribuídos nas plantas superiores, e ocorrem geralmente, como ésteres alquílicos (-COOR) ou glicosídicos (-COO-gli: açúcares ligados à hidroxila fenólica).

Quadro 2: Estruturas químicas de alguns derivados dos ácidos benzoicos.

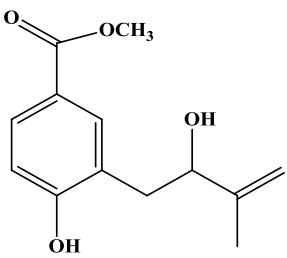
Mono-hidroxilados	Di-hidroxilados	Tri ou poli-hidroxilados
 <p data-bbox="245 719 592 752">Ácido <i>o</i>-hidroxi-benzoico</p>	 <p data-bbox="735 719 927 752">Ácido vanílico</p>	 <p data-bbox="1182 719 1350 752">Ácido gálico</p>
 <p data-bbox="245 1111 592 1144">Ácido <i>m</i>-hidroxi-benzoico</p>	 <p data-bbox="687 1133 983 1167">Ácido protocatéquico</p>	 <p data-bbox="1158 1111 1366 1144">Ácido siríngico</p>
 <p data-bbox="245 1570 592 1603">Ácido <i>p</i>-hidroxi-benzoico</p>	 <p data-bbox="727 1547 935 1581">Ácido gentísico</p>	 <p data-bbox="1174 1547 1358 1581">Ácido elágico</p>

Os derivados do ácido benzoico compreendem uma importante classe de substâncias dentro do gênero *Piper* L. em virtude de seu potencial farmacológico. López (2002) cita a atividade fungicida dos derivados prenilados do ácido benzoico de *Piper lanceafolium*. De *Piper multiplinervium*, espécie encontrada nas regiões da Nicarágua ao Peru (Yuncker, 1950), foi relatada presença de tais compostos, os quais apresentaram atividade bactericida e antimicrobiana frente à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus* (RÜEG et al., 2006).

Certo número de derivados prenilados do ácido benzoico com diversas atividades biológicas tem sido isolado e caracterizado a partir de diferentes espécies da família Piperaceae, sendo possível observar semelhanças estruturais entre esses compostos destacando-se dentre elas as espécies *Piper tuberculatum* (frutos e talos finos), *Piper hispidum* H.B.K (raízes) (PARMAR et al., 1997), *Piper aduncum* (folhas) (ORJALA et al., 1993 & 1994), *Piper carniconnectivum* (partes aéreas). Das raízes de *Piper crassinervium* isolou-se o ácido 4-hidroxi-3-[3',7'-dimetil-1'-oxo-octa-2'-E-6'-dienil]-benzóico (KATO, 2006), dentre outros. Os compostos isolados das folhas de *P. aduncum* revelaram atividade antiparasitária contra *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*. Mais recentemente, um artigo de revisão a respeito dos derivados benzóicos já identificados no gênero *Piper* L. foi realizada por MALAMI, 2012 (Quadro 3, p. 42).

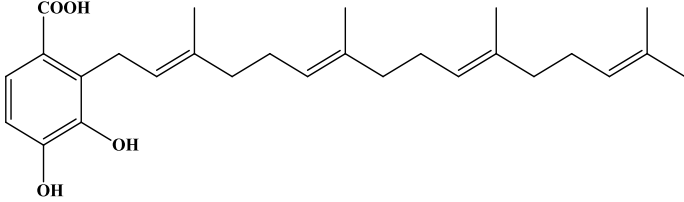
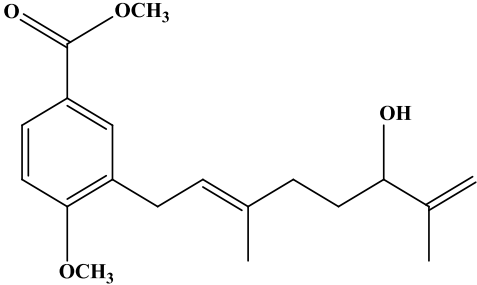
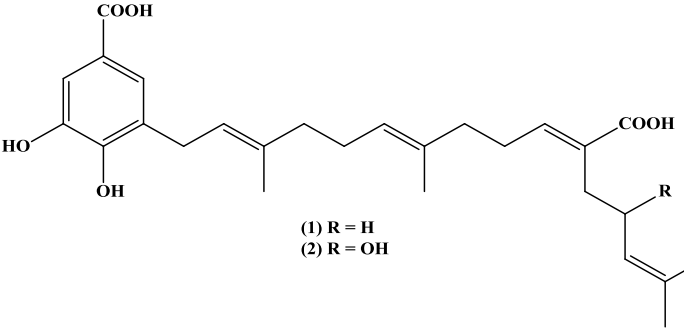
Dessa forma, *Piper* sp. pode ser considerada como uma fonte terapêutica potencial de agentes anti-infecciosos, através do desenvolvimento de uma rota para a síntese de ácidos benzoicos prenilados derivados de produtos naturais, como um sistema de defesa química. Apesar do isolamento frequente destes compostos interessantes com forte atividade biológica não há registros de desenvolvimento de agentes terapêuticos envolvendo as espécies do gênero, uma área da pesquisa científica a ser ainda explorada.

Quadro 3: Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero *Piper* L.

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<i>Piper aduncum</i> e <i>Piper hostmannium</i>	 3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-4-hidroxibenzoato de metila	Moluscicida	DIAZ et al., 1987; ORJALA et al., 1993.

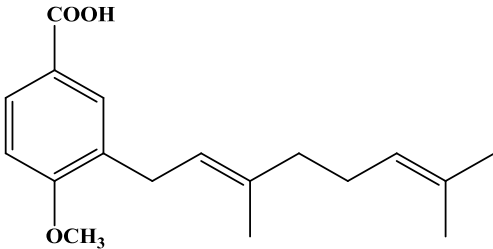
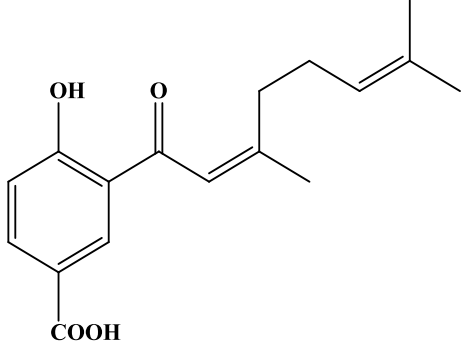
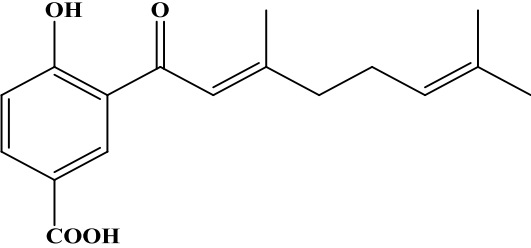
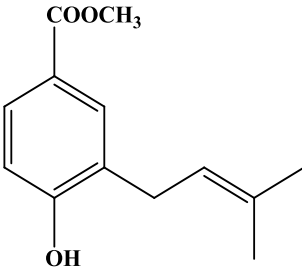
Continua...

Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero *Piper* L.

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<i>Piper saltuum</i>	 <p>ácido 3,4-dihidroxi-2-((2E,6E,10E)-3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico</p>	Anifúngica	MAXWELL; RAMPERSAD, 1989.
<i>Piper aduncum</i>	 <p>3(E)-(6-hidroxi-3,7-dimetil-2,7-octadienil)-4-metoxibenzoato de metila</p>	Moluscicida	ORJALA ,1993.
<i>Piper heterophyllum</i> , <i>Piper aduncum</i> e <i>Piper caldense</i>	 <p>(1) R = H (2) R = OH</p> <p>(1) ácido 3-((2E,6E,10E)-11-carboxi-3,7,15-trimetilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il)-4,5-dihidroxi benzoico</p> <p>(2) ácido 3-((2E,6E,10E)-11-carboxi-13-hidroxi-3,7,15-trimetilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il)-4,5-dihidroxi benzoico</p>	Antiparasitária Antifúngica	ORJALA et al., 1993; FLORES et al., 2009; BALDOQUI et al., 1999; GREEN et al., 1999; LAGO et al., 2004; 2009; KATO, 2009.

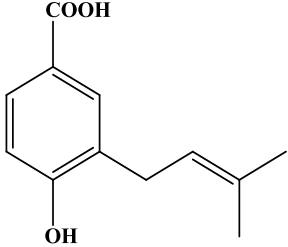
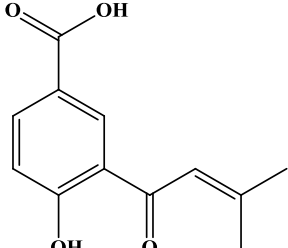
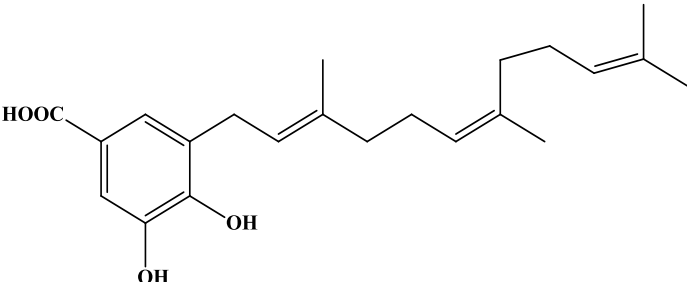
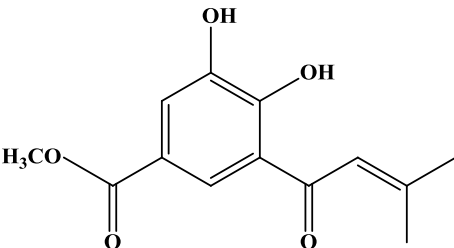
Continua...

Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero *Piper* L.

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<p><i>Piper heterophyllum</i>, <i>Piper aduncum</i> e <i>Piper arieianum</i></p>	 <p>ácido (<i>E</i>)-3-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-4 metoxibenzoico</p>	<p>Antiparasitária Antibacteriana Moluscicida</p>	<p>ORJALA et al., 1993; FLORES et al., 2009; BALDOQUI et al., 1999; GREEN et al., 1999; LAGO et al., 2004; 2009.</p>
<p><i>Piper guadichaudianum</i> e <i>Piper murrayanum</i></p>	 <p>ácido (<i>Z</i>)-3-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-yl)-4 hidroxibenzoico</p>	<p>Antibacteriana</p>	<p>SEERAM et al., 1996; GREEN et al., 1999; PUHL et al., 2011.</p>
<p><i>Piper guadichaudianum</i> e <i>Piper murrayanum</i></p>	 <p>ácido (<i>E</i>)-3-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-yl)-4 hidroxibenzoico</p>	<p>Antibacteriana</p>	<p>SEERAM et al., 1996; GREEN et al., 1999 PUHL et al., 2011.</p>
<p><i>Piper guanacastensis</i></p>	 <p>metil-4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il) benzoato</p>	<p>Antifúngica</p>	<p>MIRANDA, 1997.</p>

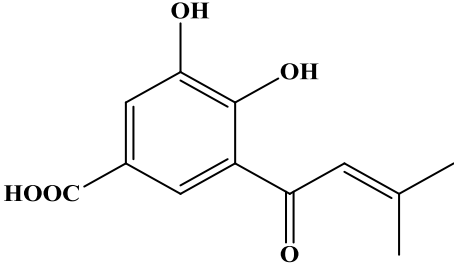
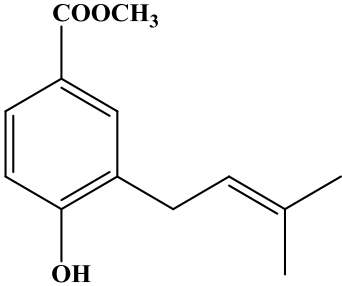
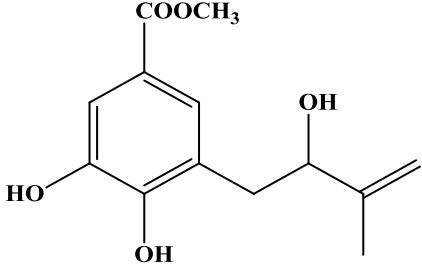
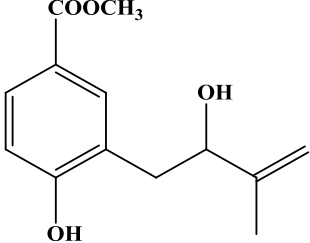
Continua...

Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero *Piper* L.

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<i>Piper guanacastensis</i>		Antifúngica	MIRANDA, 1997.
<i>Piper dilatatum</i>		Antifúngica	TERREAUX, 1998.
<i>Piper aduncum</i> e <i>Piper arieianum</i>		Antiparasitária Antifúngica	BALDOQUI; GREEN, 1999.
<i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> e <i>P. hostmannianum</i>		Antiparasitária Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004, 2009.

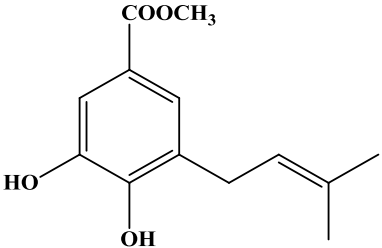
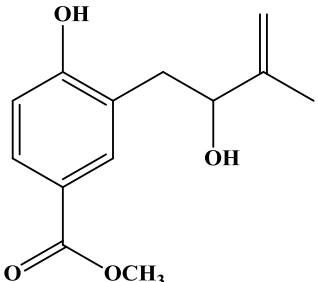
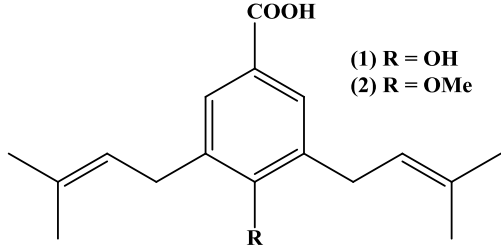
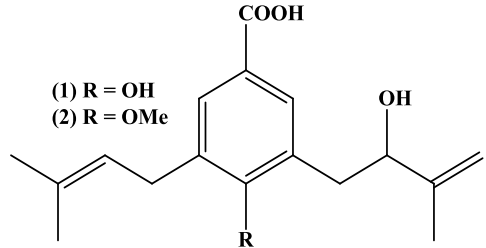
Continua...

Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero *Piper* L.

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i>	 <p data-bbox="480 734 999 763">ácido 4-hidroxi-5-(3-metilbut-2-enoil) isoftálico</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.
<i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i>	 <p data-bbox="472 1146 1007 1176">metil-4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il) benzoato</p>	Antiparasitária Antibacteriana Moluscicida	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.
<i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i>	 <p data-bbox="448 1541 1031 1597">metil-3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metilbut-3-en-1-il) benzoato</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.
<i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i>	 <p data-bbox="416 1944 1062 1973">metil-4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbut-3-en-1-il) benzoato</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.

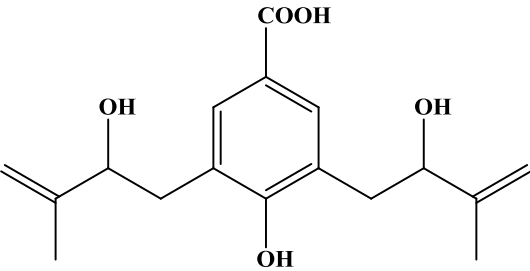
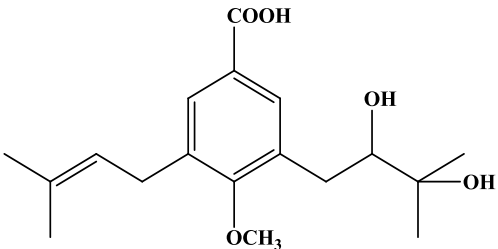
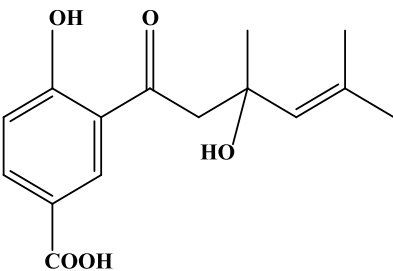
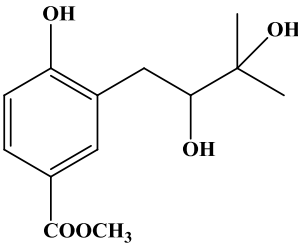
Continua...

Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero *Piper* L.

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<p><i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i></p>	 <p>metil-3,4-dihidroxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il) benzoato</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.
<p><i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i></p>	 <p>metil-3-(2-hidroperoxi-3-oxobutil)-4-hidroxibenzoato</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.
<p><i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i></p>	 <p>(1) R = OH (2) R = OMe</p> <p>(1) ácido 4-hidroxi-3,5-bis (3-metilbut-2-en-1-il) benzoico (2) ácido 4-metoxi-3,5-bis (3-metilbut-2-en-1-il) benzoico</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.
<p><i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i></p>	 <p>(1) R = OH (2) R = OMe</p> <p>(1) ácido 4-hidroxi-3-(2-hidroxibut-3-en-1-il)-5-(3-metilbut-2-en-1-il) benzoico (2) ácido 4-metoxi-3-(2-hidroxibut-3-en-1-il)-5-(3-metilbut-2-en-1-il) benzoico</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.

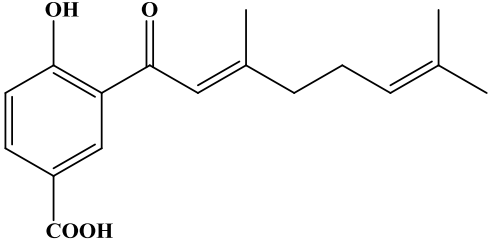
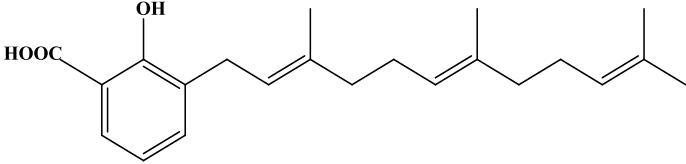
Continua...

Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero *Piper* L.

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<p><i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i></p>	 <p>ácido 4-hidroxi-3,5-bis (2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-benzoico</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.
<p><i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>e</i> <i>P.</i> <i>hostmannianum</i></p>	 <p>ácido 3-(2,3-dihidroxi-3-metilbutil)-4-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il) benzoico</p>	Antifúngica	LOPEZ et al., 2002; LAGO, 2004; 2009.
<p><i>Piper</i> <i>crassinervium</i></p>	 <p>ácido 4-hidroxi-3-(3',7'-dimetil-3'-hidroxi-1'-oxo-6'-octenil) benzoico</p>	Antifúngica	DANELUTTE et al., 2003; LAGO et al., 2004.
<p><i>Piper</i> <i>hostmannianum</i></p>	 <p>metil 3-(2,3-dihidroxi-3-metilbutil)-4-hidroxibenzoato</p>	Antifúngica	LAGO, 2004.

Continua...

Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero *Piper* L.

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<i>Piper crassinervium</i>	 <p>ácido 4-hidroxi-3-(3',7'-dimetil-1'-oxo-octa-2'-E-6'-dienil)-benzoico</p>	Antifúngica	KATO, 2006.
<i>Piper multiplinervium</i>	 <p>ácido 3-farnesil-2-hidroxibenzoico</p>	Antimicrobiana	RÜEG et al., 2006.

Parte Experimental

4. PARTE EXPERIMENTAL

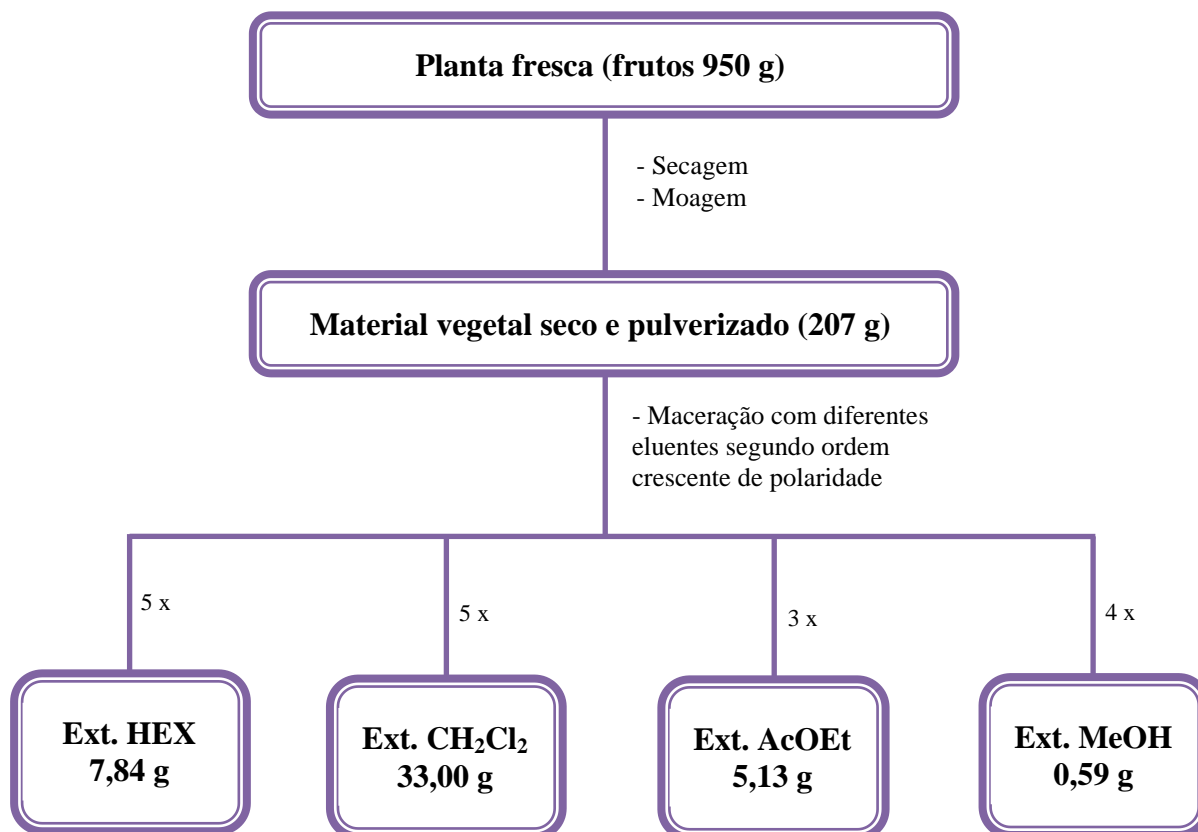
4.1 Coleta e identificação do material botânico

Os frutos e raízes de *Piper caldense* C. DC. (Piperaceae) foram coletadas no município de Santa Rita/PB, numa área pertencente à Usina São João, em vegetação úmida remanescente da Mata Atlântica, próximo ao riacho que abastece a Usina, em junho de 2012. Sua identificação botânica foi realizada pela Prof^a Dr^a Maria de Fátima Agra do PgPNSB/CCS/UFPB. Uma excisata do material encontra-se arquivada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (CCEN/UFPB) sob a numeração Agra 20.311.

4.2 Estudo fitoquímico dos frutos de *Piper caldense* C.DC

4.2.1 Processamento da planta e preparação dos extratos

Os frutos de *Piper caldense* C. DC. foram desidratados em estufa, com ar circulante, à temperatura média de 40°C durante 96 horas, sendo em seguida triturados em moinho mecânico, obtendo-se 207,26 g do pó dos frutos. Este foi macerado em Hexano (Hex), Diclorometano (CH₂Cl₂), Acetato de Etila (AcOEt) e Metanol (MeOH), em ordem crescente de polaridade, durante 4 dias, repetindo-se esse procedimento três a cinco vezes consecutivas para cada solvente empregado, visando obter o máximo de extração. As soluções extrativas foram concentradas com auxílio de evaporador rotativo, a temperatura média de 45°C. Após esse processo de evaporação do solvente, obtiveram-se os extratos: Hexânico, Diclorometânico, Acetato de Etila e Metanólico (Esquema 1, p. 52).



Esquema 1: processo de extração do pó dos frutos de *Piper caldense* C. DC.

4.2.2 Isolamento e Purificação dos constituintes químicos

O isolamento e a purificação dos constituintes químicos de *Piper caldense* C. DC. foram realizados utilizando métodos cromatográficos: Cromatografia em Coluna (CC), Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e Preparativa (CCDP).

Para a cromatografia em coluna a pressão atmosférica utilizou-se como fase estacionária sílica-gel 60 (Merck) (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh), sílica-gel 60 (Merck) (partículas com 0,04-0,063 mm, 230-400 mesh) e Sephadex LH-20 tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas com dimensões variando de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Para a cromatografia em coluna a média pressão utilizou-se o aparelho Buchi Pump Maager C_615 e para fase estacionária sílica gel 60 (Merck) (partículas com 0,04-0,063 mm, 230-400 mesh). Como fase móvel foram utilizados os solventes comerciais e destilados Hexano, Dicloremetano, Acetato de Etila e Metanol isoladamente ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

A CCDA e CCDP foram empregadas para a análise e purificação das frações obtidas por CC. Como suportes foram utilizados placas de vidro com dimensões de 5x20, 10x20 e 20x20 cm, e como fase fixa, uma suspensão de sílica gel PF₂₅₄ 7749 (Merck) em água destilada, seguindo técnica descrita por Matos (1997). As cromatoplasas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 120 °C durante duas horas. Utilizou-se também cromatofolha de alumínio com sílica gel 60 F254 e dimensão de 20x20cm (Merck).

As revelações das substâncias foram executadas pela exposição das cromatoplasas à lâmpada de irradiação ultravioleta em dois comprimentos de onda, 254 e 366 nm, por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58 e impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo.

4.2.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico dos frutos de *Piper caldense* C. DC.

Uma alíquota de 16,0 g do extrato diclorometânico dos frutos de *Piper caldense* C. DC. foi submetido a uma coluna cromatográfica (Coluna 1) utilizando como fase estacionária sílica-gel 60 (Merck) (partículas com 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh) e como eluentes Hexano, Acetato de Etila e Metanol, puros ou em misturas binárias, em diversas proporções, segundo a ordem crescente de polaridade.

Foram recolhidas 39 frações de 250 mL cada, concentradas em evaporador rotativo analisadas em CCDA e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (Rf's) (Quadro 4, p. 54) dentre as quais as frações Fr 6, Fr 10-11, Fr 17-20 e Fr 26 apresentaram significativo grau de pureza e foram analisadas através de RMN ¹H e RMN ¹³C recebendo os seguintes códigos: Pc-1, Pc-2a/Pc-2b, Pc-3/Pc-4 e Pc-5, respectivamente (Esquema 2, p. 57).

Quadro 4: Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano dos frutos de *Piper caldense* C. DC, utilizando como eluentes Hex/AcOEt e MeOH em diversas proporções (Coluna 1).

Fração	Eluente	Proporção	Reunidas
1	Hex	100	
2	Hex:AcOEt	98:2	
3	Hex:AcOEt	96:4	
4	Hex:AcOEt	94:6	
5	Hex:AcOEt	92:8	
6-12	Hex:AcOEt	90:10	6 e 10-11
13-15	Hex:AcOEt	85:15	
16-26	Hex:AcOEt	80:20	17-20 e 26
27	Hex:AcOEt	75:25	
28	Hex:AcOEt	70:30	
29	Hex:AcOEt	60:40	
30	Hex:AcOEt	40:60	
31	Hex:AcOEt	20:80	
32	AcOEt	100	
33	AcOEt: MeOH	95:5	
34	AcOEt: MeOH	90:10	
35	AcOEt: MeOH	80:20	
36-39	AcOEt: MeOH	70:30	

A fração 16 da Coluna 1 foi cromatografada em coluna de média pressão (Coluna 1.1) utilizando o aparelho Buchi Pump Maager C_615 e para fase estacionaria sílica gel 60 (Merck) (partículas com 0,04-0,063 mm, 230-400 mesh) e foi eluída com hexano e acetato de etila puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade., obtendo-se 42 frações (Quadro 5, p. 55) e que após análise em CCDA, reuniu-se as frações de 18 a 27 de acordo com seus fatores de retenção (R_fs).

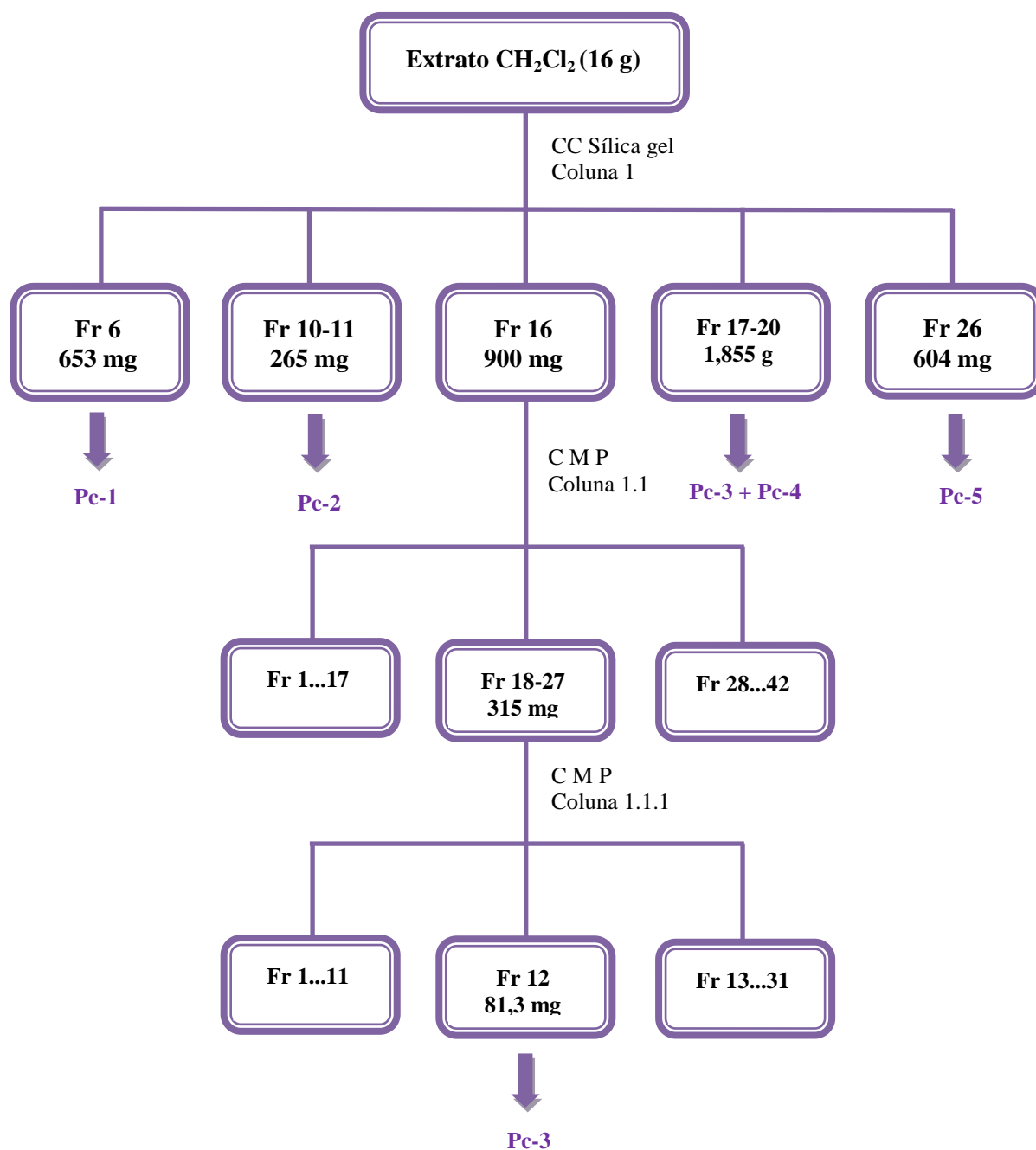
Quadro 5: Fracionamento cromatográfico da Fração 16 da Coluna 1, utilizando como eluentes Hex e AcOEt em diversas proporções (Coluna 1.1).

Fração	Eluente	Proporção	Reunidas
1-2	Hex	100	
3-4	Hex:AcOEt	98:2	
5-6	Hex:AcOEt	96:4	
7-11	Hex:AcOEt	94:6	
12-18	Hex:AcOEt	92:8	18-27
19-20	Hex:AcOEt	9:1	
21-22	Hex:AcOEt	88:12	
23-24	Hex:AcOEt	86:14	
25-26	Hex:AcOEt	84:16	
27-28	Hex:AcOEt	82:18	
29-30	Hex:AcOEt	8:2	
31-32	Hex:AcOEt	7:3	
33-34	Hex:AcOEt	6:4	
35-36	Hex:AcOEt	1:1	
37-38	Hex:AcOEt	4:6	
39-40	Hex:AcOEt	2:8	
41-42	AcOEt	100	

A fração 18-27 da Coluna 1.1 foi cromatografada em coluna de média pressão (Coluna 1.1.1) utilizando o aparelho Buchi Pump Maager C_615 e para fase estacionária utilizou-se sílica gel 60 (Merck) (partículas com 0,04-0,063 mm, 230-400 mesh) e foi eluída com hexano e acetato de etila puros ou em misturas binárias. Foram recolhidas 31 frações (Quadro , p. 56) e analisadas em CCDA. A fração 12 foi que apresentou maior pureza, e, após a realização dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C forneceu Pc-3.

Quadro 6: Fracionamento cromatográfico da Fração 18-27 da Coluna 1.1, utilizando como eluentes Hex e AcOEt em diversas proporções (Coluna 1.1.1).

Fração	Eluente	Proporção
1-2	Hex	100
3-4	Hex:AcOEt	98:2
5-6	Hex:AcOEt	96:4
7-8	Hex:AcOEt	94:6
9-11	Hex:AcOEt	92:8
12-13	Hex:AcOEt	9:1
14-15	Hex:AcOEt	88:12
16-17	Hex:AcOEt	85:15
18-19	Hex:AcOEt	8:2
20-21	Hex:AcOEt	7:3
22-23	Hex:AcOEt	6:4
24-25	Hex:AcOEt	1:1
26-27	Hex:AcOEt	4:6
28-29	Hex:AcOEt	2:8
30-31	AcOEt	100



Esquema 2: Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico dos frutos de *Piper caldense* C. DC.

4.2.2.2 Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila dos frutos de *Piper caldense* C. DC.

Uma alíquota de 5,0 g do extrato acetato de etila dos frutos de *Piper caldense* C.DC foi submetido a uma coluna cromatográfica utilizando Sephadex LH-20 (Merck) e como eluente Diclorometano e Metanol (1:1). Foram recolhidas 25 frações e após análise em

CCDA, reuniu-se as frações de 10 a 12, de acordo com seus fatores de retenção (Rfs) (Quadro , p. 58).

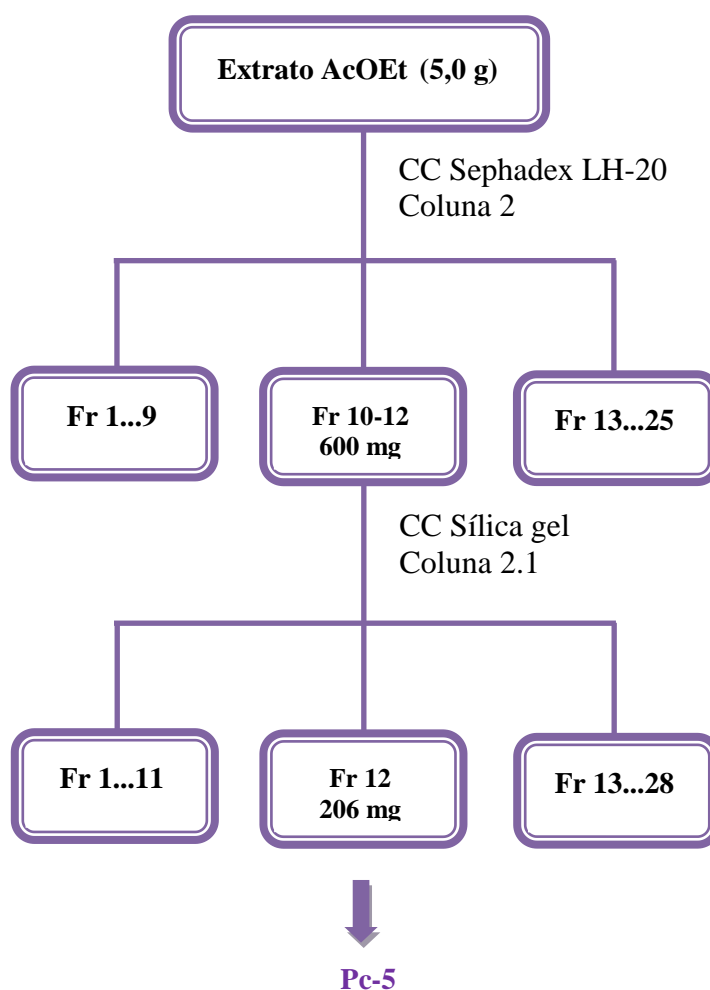
Quadro 7: Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila, utilizando como eluentes CH_2Cl_2 e MeOH na mesma proporção (Coluna 2).

Fração	Eluente	Proporção	Reunidas
1-25	CH_2Cl_2 :MeOH	1:1	10-12

A sub-fração 10-12, foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando como adsorvente sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh) e como eluentes hexano, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade (Esquema 2), obtendo-se 28 frações de 100 mL cada, concentradas em evaporador rotativo e analisadas em CCDA. (Quadro , p. 58). A sub-fração 12, após análise dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C forneceu Pc-5 (Esquema 3, p. 59).

Quadro 8: Fracionamento cromatográfico da Fração 10-12 da Coluna 2, utilizando como eluentes Hex e AcOEt em diversas proporções (Coluna 2.1).

Fração	Eluente	Proporção
1-2	Hex	100
3-4	Hex:AcOEt	95:5
5-6	Hex:AcOEt	9:1
7	Hex:AcOEt	85:15
8-9	Hex:AcOEt	8:2
10-11	Hex:AcOEt	7:3
12-13	Hex:AcOEt	6:4
14	Hex:AcOEt	1:1
15-16	Hex:AcOEt	4:6
17	Hex:AcOEt	2:8
18	AcOEt	100
19	AcOEt: MeOH	98:2
20	AcOEt: MeOH	95:5
21	AcOEt: MeOH	9:1
22	AcOEt: MeOH	8:2
23	AcOEt: MeOH	7:3
24	AcOEt: MeOH	6:4
25	AcOEt: MeOH	1:1
26	AcOEt: MeOH	4:6
27	AcOEt: MeOH	2:8
28	MeOH	100



Esquema 3: Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila dos frutos de *Piper caldense* C. DC.

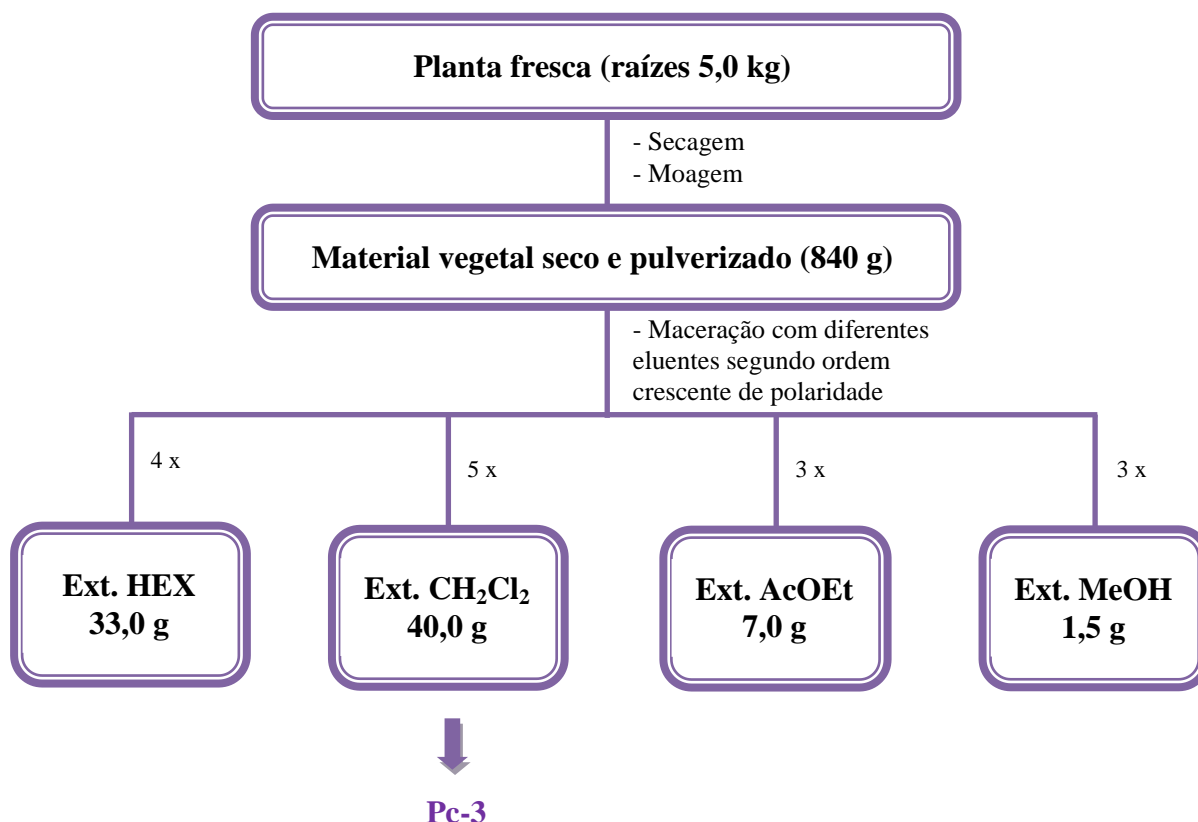
4.3 Estudo Fitoquímico das raízes de *Piper caldense* C. DC.

4.3.2 Processamento da planta e preparação dos extratos

As raízes de *Piper caldense* C. DC. foram desidratados em estufa, com ar circulante, à temperatura média de 40 °C durante 96 horas, sendo em seguida triturados em moinho mecânico, obtendo 840,0 g do pó das raízes. Este foi macerado em Hexano (Hex), Diclorometano (CH_2Cl_2), Acetato de Etila (AcOEt) e Metanol (MeOH), em ordem crescente de polaridade, durante 4 dias, repetindo-se esse procedimento três a cinco vezes consecutivas para cada eluente empregado, visando obter o máximo de extração. As soluções extrativas foram concentradas com auxílio de evaporador rotativo, a temperatura média de 45°C. Após

esse processo de evaporação do solvente, obtiveram-se os extratos: Hexânico, Diclorometânico, Acetato de Etila e Metanólico (Esquema 4, p. 60).

Uma alíquota de 33,0 mg do extrato diclorometânico foi submetida a RMN ^1H e RMN ^{13}C e forneceu Pc-3.



Esquema 4: Processo de extração do pó dos frutos de *Piper caldense* C. DC.

4.2.3 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

A caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de *Piper caldense* C. DC. foi realizada pela análise de espectros obtidos através dos métodos espectroscópicos usuais como Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas, além de comparações com modelos da literatura.

Utilizou-se espectrômetros VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz e VARIAN-NMR-SYSTEM 200 MHz, do Laboratório Multiusuário da Central Analítica (LCMA) da Universidade Federal da Paraíba. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se cerca de 15-30mg das mesmas em solventes deuterados: Clorofórmio (CDCl_3) e Metanol (MeOD).

Os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamentos (J) em Hz foram referenciados para RMN de ^1H pelos sinais característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: clorofórmio ($\delta_{\text{H}} = 7,24$ ppm) e metanol ($\delta_{\text{H}} = 3,3$ ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais do C dos solventes deuterado: clorofórmio ($\delta_{\text{C}} = 77,00$ ppm) e metanol ($\delta_{\text{C}} = 49,00$ ppm).

As multiplicidades dos sinais de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), dl (dubleto largo), t (tripleto) e m (multiplete).

Os espectros de RMN também foram otimizados para as técnicas bidimensionais HMQC, espectro de correlação Heteronuclear, que permite fazer uma correlação entre hidrogênio e seus respectivos carbonos; HMBC que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e carbonos a duas (2j) e três (3j) ligações; COSY estabelece as correlações entre hidrogênios que são responsáveis, entre si, pelo desdobramento do sinal, e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN; e NOESY, técnica homonuclear que mostra correlações espaciais dos hidrogênios da molécula (KAISER, 2000).

Também foi realizado um levantamento bibliográfico da espécie *Piper caldense* C. DC. durante o decorrer desse estudo. Para a revisão na literatura foram consultados sites de relevância científica, como o Sci Finder, no qual foram colocados como palavras-chaves os seguintes descritivos: “Piperaceae”, referentes aos anos de 2000-2013, sendo possível

encontrar 732 referências contendo o descritivo acima. Usando-se apenas o descritivo “Piper” nos anos de 2012 a 2013 foi possível encontrar 2225 referências. Também foram consultados o descritivo “Piper caldense leaves”, “Piper caldense roots.” “Piper caldense fruits” e “Piper caldense” sendo encontrada apenas uma referência para os dois primeiros descritivos, nenhuma para o terceiro, e duas para o último. Também foram consultados Chemical Abstracts e Biological Abstracts, NAPRALERT (banco de dados sobre plantas do ponto de vista químico e biológico), artigos diversos e revistas científicas, além de anais de eventos nacionais e internacionais.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos de *Piper caldense* C. DC.

5.1.4 Determinação estrutural de Pc-1

O espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz), (Figura 6, p. 66), realizado por meio da técnica APT, apresentou 27 sinais para carbonos, sendo dois atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_{C} : 173,27 e 172,82) (Figura 7, p. 66) sendo estes deslocamentos sugestivos da presença de dois sinais característicos de carbonila de éster na molécula; sete sinais referentes a carbonos metínicos (δ_{C} : 130,17, 129,96, 129,64, 128,19, 128,02, 127,85 e 127,71) (Figura 8, p. 67), dois deslocamentos em δ_{C} 68,86 e δ_{C} 62,05 sugestivo de CH e CH_2 ligados a oxigênio, respectivamente (Figura 9, p. 67); quinze sinais atribuídos a carbonos metilênicos (δ_{C} : 34,15, 33,99, 31,88, 31,49, 29,67, 29,50, 29,46, 29,30, 29,25, 29,09) (Figura 10, p. 68), (δ_{C} : 27,16, 25,59, 24,91, 24,82 e 22,66) (Figura 11, p. 68) e um sinal atribuído a carbono metílico (δ_{C} 14,09) (Figura 12, p. 69). Estes dados em comparação com modelo encontrado na literatura (RAGASA et al., 2012) (Tabela 2, p. 65) tornou possível determinar que Pc-1 trata-se de trilinoleína, que está sendo isolada pela primeira vez na família Piperaceae.

A análise do espectro de massas ESI-MS (Figura 13, p. 69) permitiu confirmar a estrutura proposta para Pc-1 (Figura 5, p. 64) que tem fórmula molecular $\text{C}_{57}\text{H}_{98}\text{O}_6$, ao revelar um pico de íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 880,6 daltons.

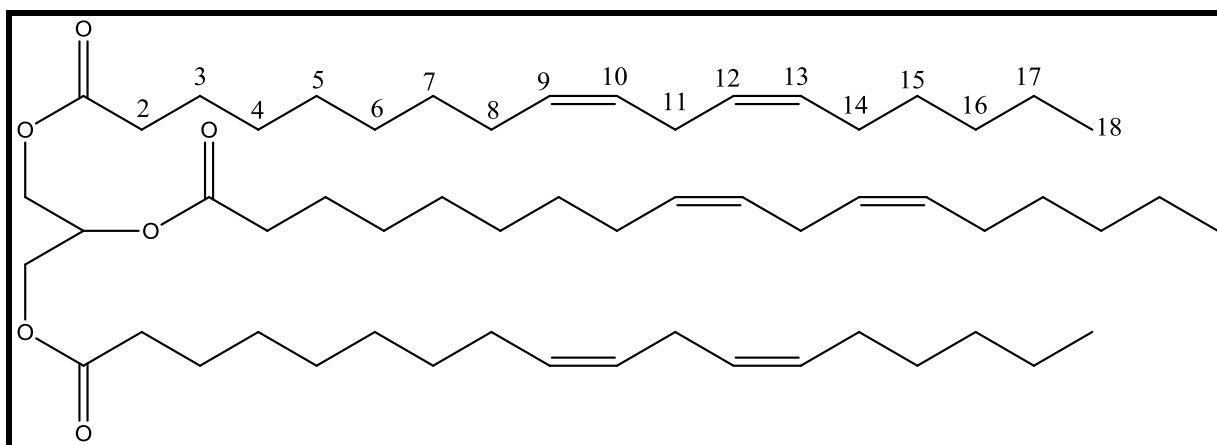


Figura 5: Estrutura química de Pc-1.

Trilinoleína é um triglicerídeo que apresenta efeitos benéficos no sistema cardiovascular, sendo protetor do miocárdio, através de sua propriedade antioxidante (LIU et al., 2004); no tratamento de distúrbios circulatórios (CHAN et al., 2005); inibe a hipertensão induzida pela endotelina-1 (CHEN et al., 2005). Exibe também citotoxicidade moderada contra uma linha de células do carcinoma do cólon humano HCT116 (RAGASA, et al., 2012) e inibe o crescimento de carcinomas de pulmão (CHOU et al., 2011).

Tabela 2: Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1 com modelo encontrado na literatura (RAGASA et al., 2012, CDCl_3 , 150 MHz).

	Pc-1	Literatura
Carbonos	δ_c	δ_c
CH ₂ O	62,05	62,08
CHO	68,83	68,86
C=O α	173,27	173,29
C=O β	172,82	172,84
C-2 α	33,99	34,04
C-2 β	34,15	34,18
C-3 α	24,82	24,83
C-3 β	24,91	24,87
C-4 α	29,09	29,08
C-4 β	29,09	29,04
C-5 α	29,46	29,19
C-5 β	29,50	29,27
C-6 α	29,25	29,11
C-6 β	29,30	29,17
C-7 α	29,67	29,62
C-7 β	29,67	29,65
C-8	29,46	29,19
C-9 α	129,96	130,00
C-9 β	129,64	129,98
C-10 α	128,02	128,05
C-10 β	128,19	128,07
C-11	25,59	25,62
C-12 α	127,85	127,88
C-12 β	127,71	127,87
C-13	130,17	130,22
C-14	27,16	27,19
C-15	31,88	29,36
C-16	31,49	31,52
C-17	22,66	22,57
C-18	14,09	14,07

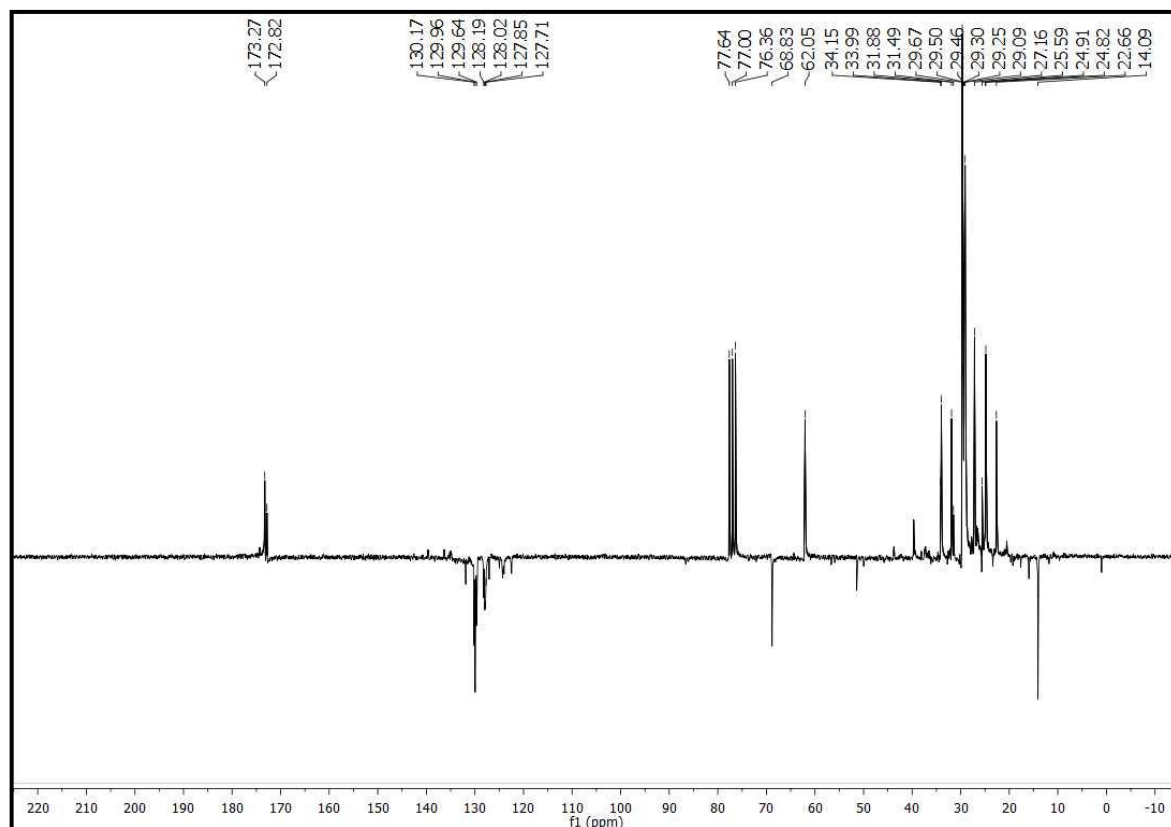


Figura 6: Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1.

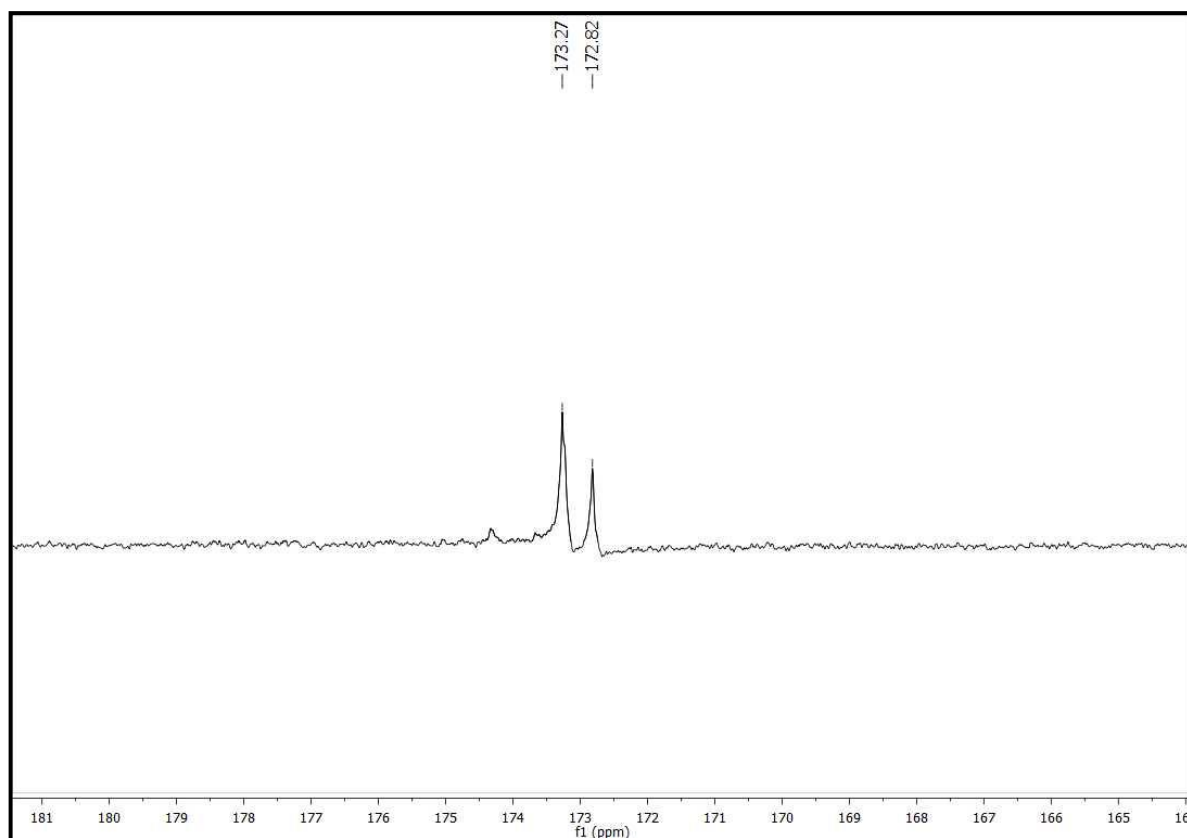


Figura 7: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1 na região de 165,0 a 181,0 ppm.

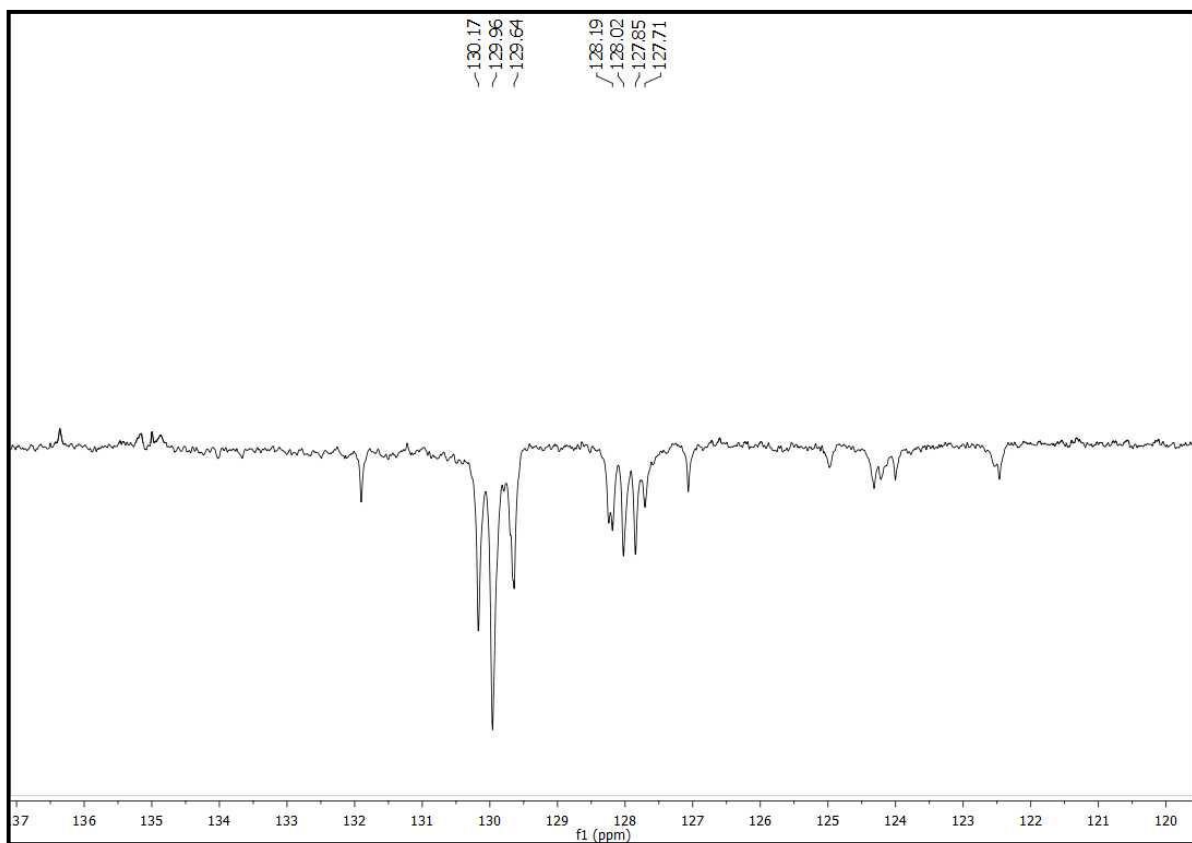


Figura 8: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1 na região de 120,0 a 136,0 ppm.

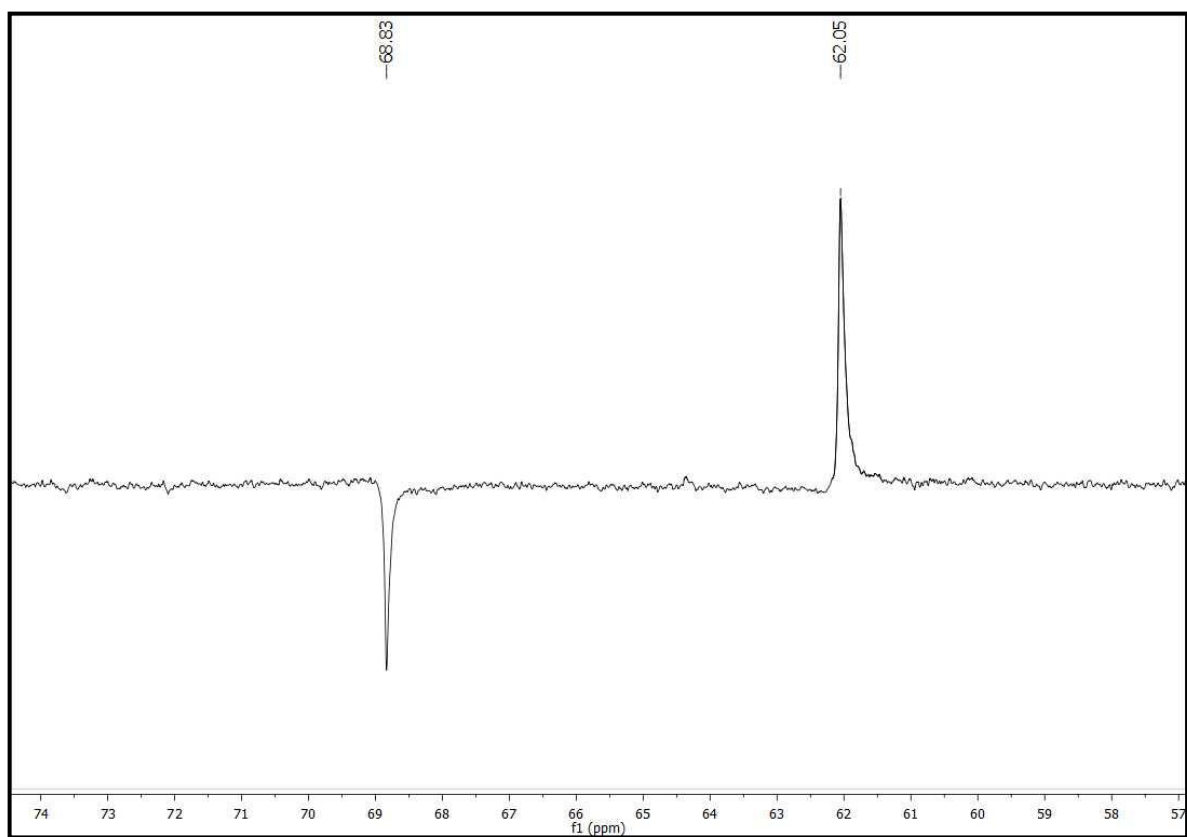


Figura 9: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1 na região de 57,0 a 74,0 ppm.

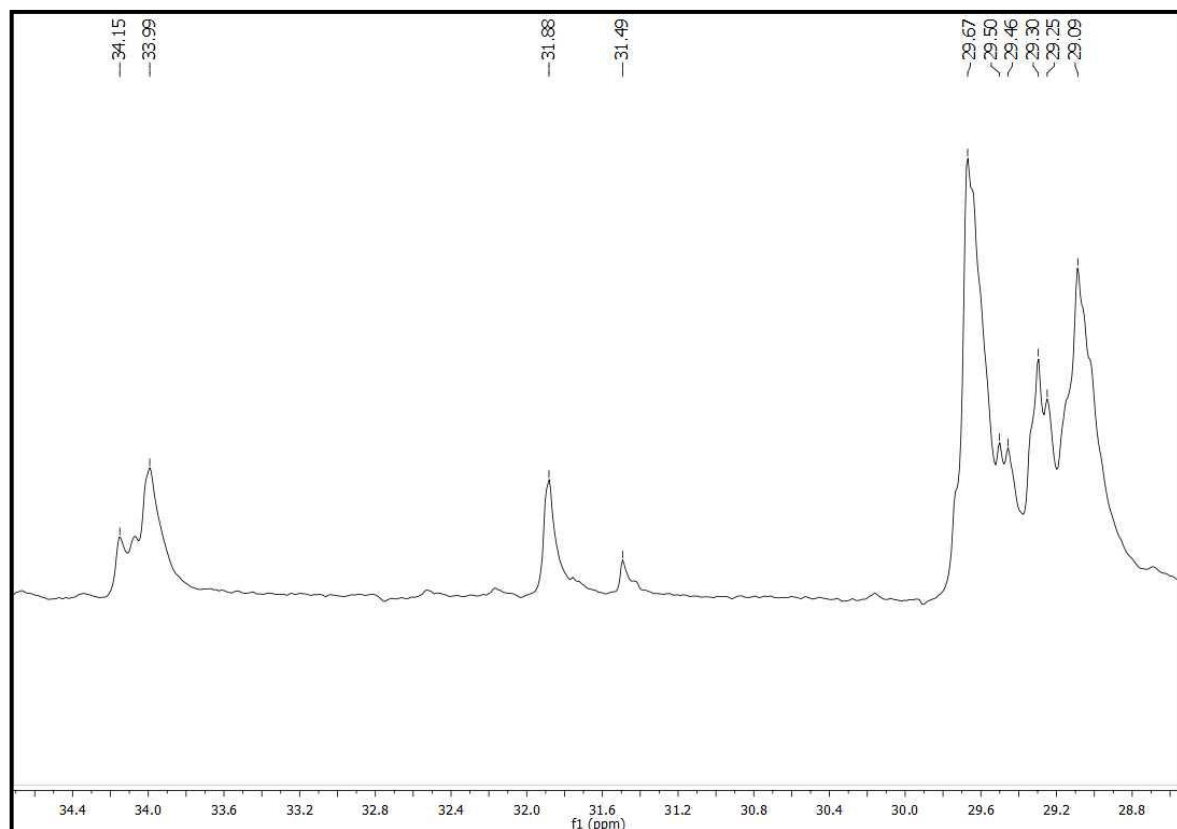


Figura 10: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1 na região de 28,8 a 34,4 ppm.

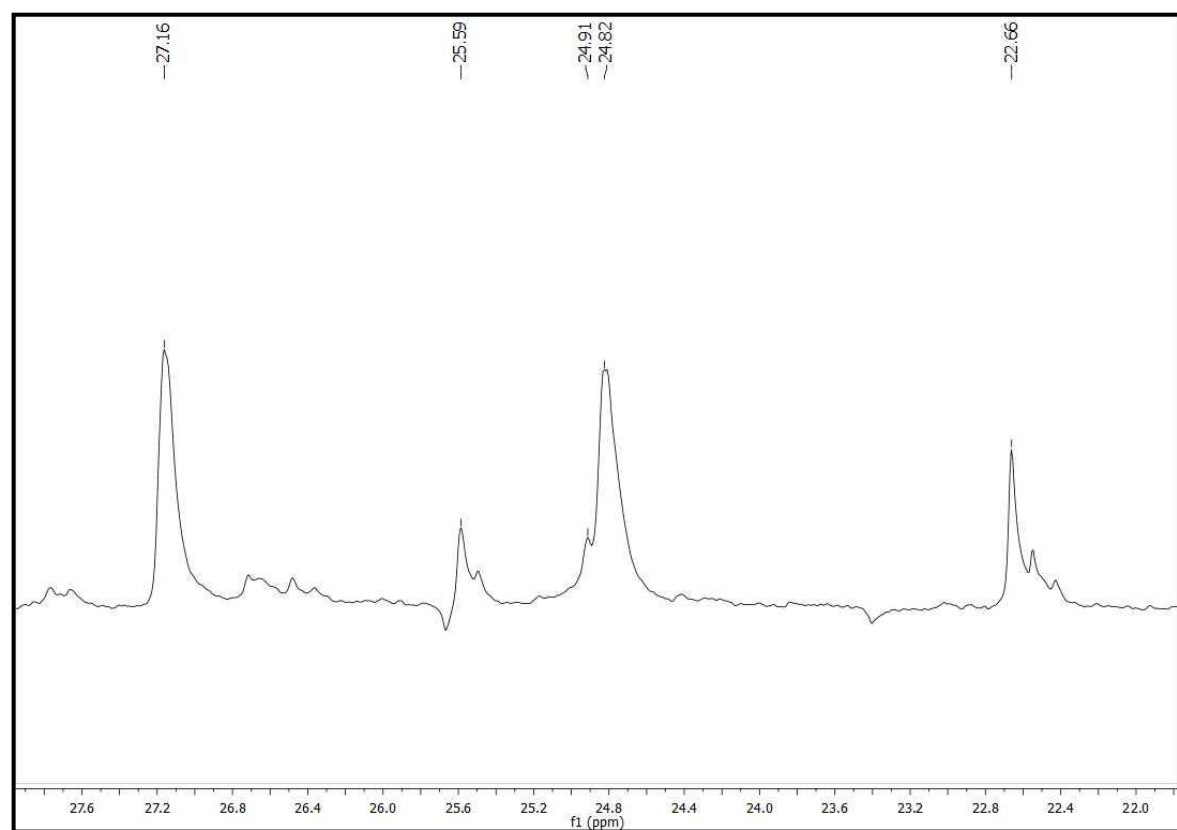


Figura 11: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1 na região de 22,0 a 27,6 ppm.

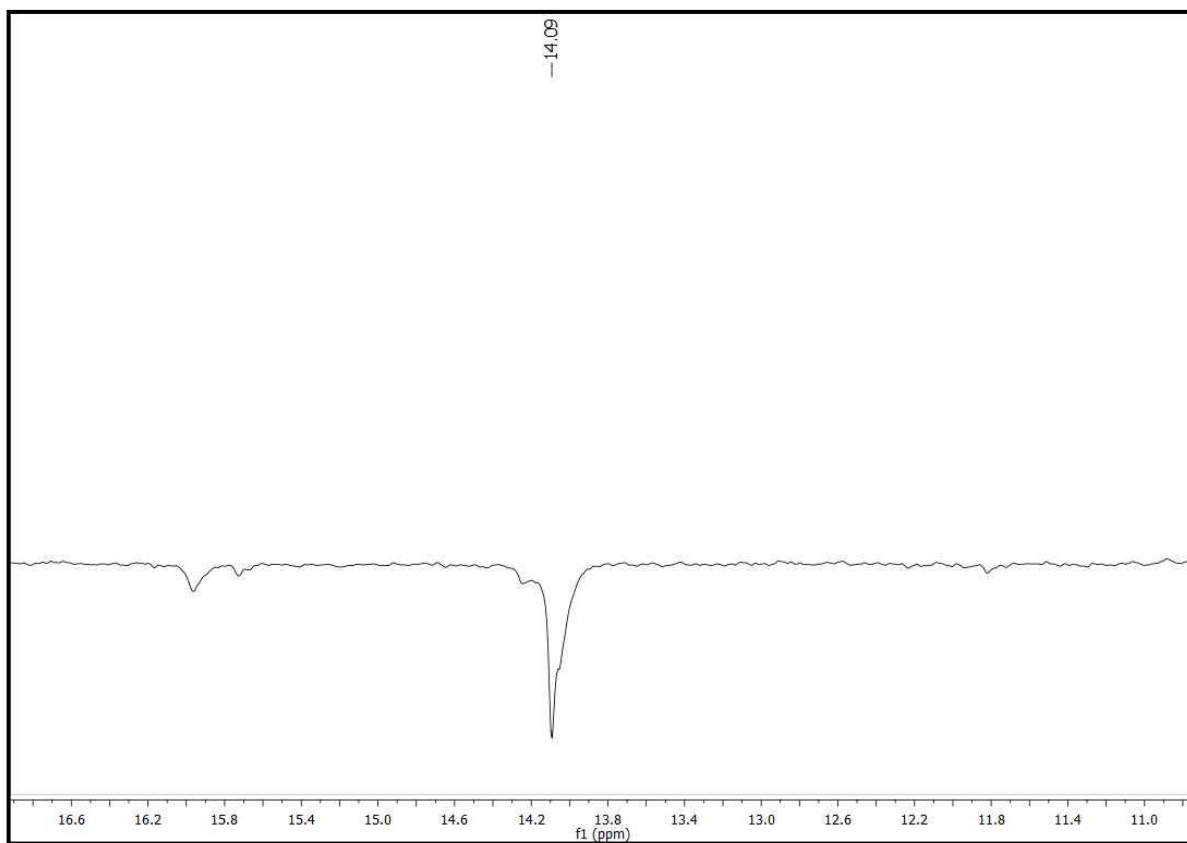


Figura 12: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1 na região de 11,0 a 16,6 ppm.

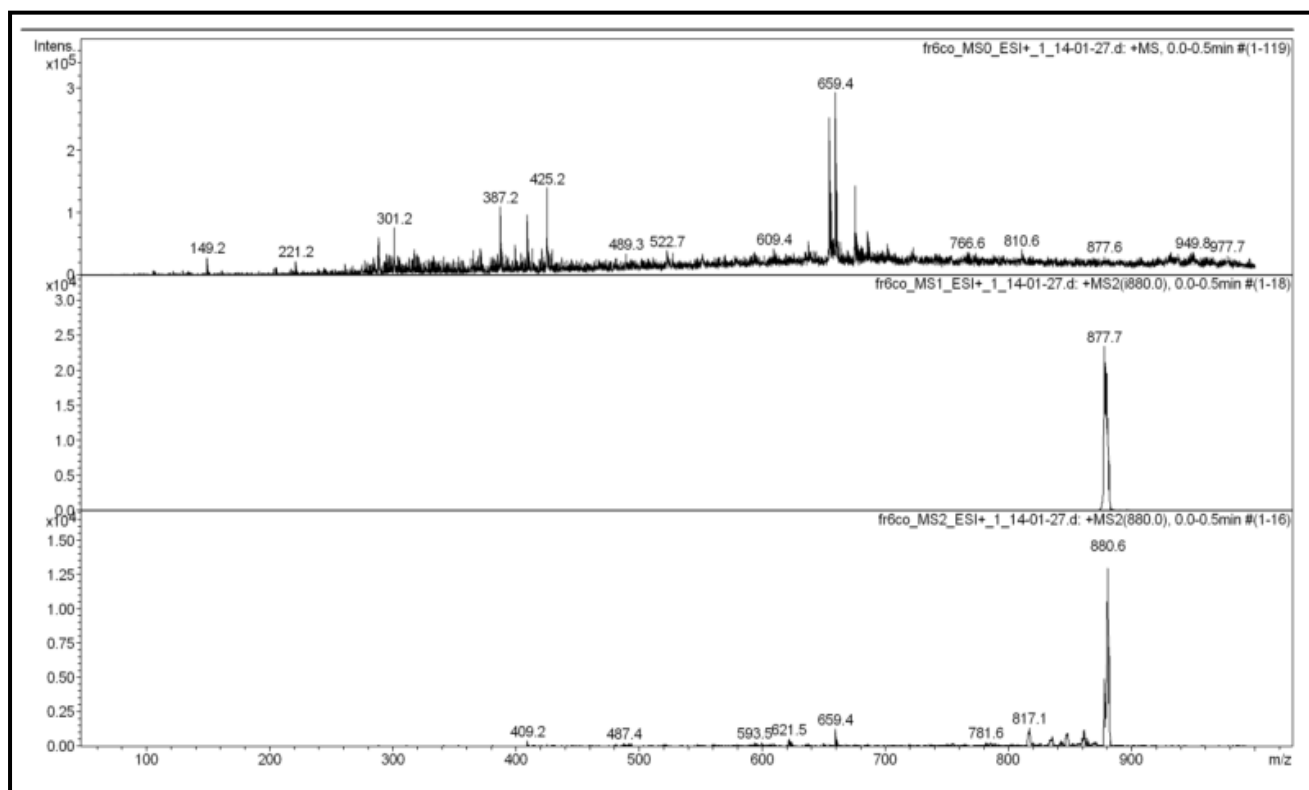


Figura 13: Espectro de massas (ESI-MS) de Pc-1.

5.1.1 Determinação estrutural de Pc-2

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz) (Figura 15, p. 73) e suas expansões exibiram um envelope de absorções simples e múltiplas na região compreendida entre δ_{H} 0,65 e δ_{H} 2,50 ppm (Figura 16, p. 73) características de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos de núcleo triterpênico e/ou esteroidal.

Pela análise do multipeto em δ_{H} 3,50 pôde-se inferir a presença de um hidrogênio oximetínico na posição H-3 de núcleo triterpênico (KOJIMA, 1990) e do dupeto em δ_{H} 5,32 (d, $J=4,0$ Hz) a presença de hidrogênio metínico na posição H-6 de fitoesteróide (AHMED; AHMAD; MALIK, 1992). Esse hidrogênio encontra-se desblindado devido à ligação olefínica. Outras absorções correspondentes a hidrogênios olefínicos foram também detectadas em 5,14 (dd, $J=8,5$ e 15,5 Hz, 1H) e 5,00 (dd, $J=8,5$ e 15,5 Hz, 1H), característicos de hidrogênios H-22 e H-23, respectivamente, e de núcleo estigmastano, possibilitando sugerir a presença do sistema *trans* alílico em Pc-2 (Figura 17, p. 74).

No espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) (Figura 18, p. 74), realizado por meio da técnica APT, alguns sinais permitiram reforçar a hipótese sobre o esqueleto esteroidal e a presença da mistura dada pelo espectro de RMN ^1H , destacando-se a presença de 49 deslocamentos químicos, sendo 5 sinais referentes a carbonos quaternários, 17 sinais a carbonos metínicos, 16 sinais a carbonos metilênicos e 11 sinais a carbonos metílicos. Destes, ressalta-se a presença de um sinal em δ_{C} 71,82, típico de carbono C-3 hidroxilado (Figura 19, p. 75), além de um envelope de sinais em δ_{C} 11,93 e δ_{C} 21,20 (Figura 20, p. 75), referentes às metilas triterpênicas (6 CH_3) na região de campo mais alto do espectro de RMN de ^{13}C e característicos de fitoesteróide (HAM et al., 2010).

Os sinais para carbono sp^2 mono hidrogenado em δ_{C} 121,73 (C-6) e carbono insaturado não hidrogenado em δ_{C} 140,68 (C-5) do β -sitosterol e estigmasterol (Figura 21, p. 76), juntamente com as absorções em δ_{C} 138,31 e δ_{C} 129,22 pertinentes aos carbonos olefínicos (C-22 e C-23) do estigmasterol (KOJIMA, 1990) fortaleceram a proposta de que Pc-2 trata-se de uma mistura de esteroides, codificados como: Pc-2a (β -sitosterol) e Pc-2b (estigmasterol).

A análise espectral de RMN ^1H e ^{13}C de Pc-2a/Pc-2b e comparações realizadas com modelos da literatura (KOJIMA, 1990) (Tabela 3, p. 72) tornaram possível identificar as substâncias como sendo o β -sitosterol (Pc-2a) e o estigmasterol (Pc-2b) (Figura 14, p. 71),

cujas presenças são observadas em diversas espécies vegetais, sendo descritas pela segunda vez nos frutos de *Piper caldense* C. DC.

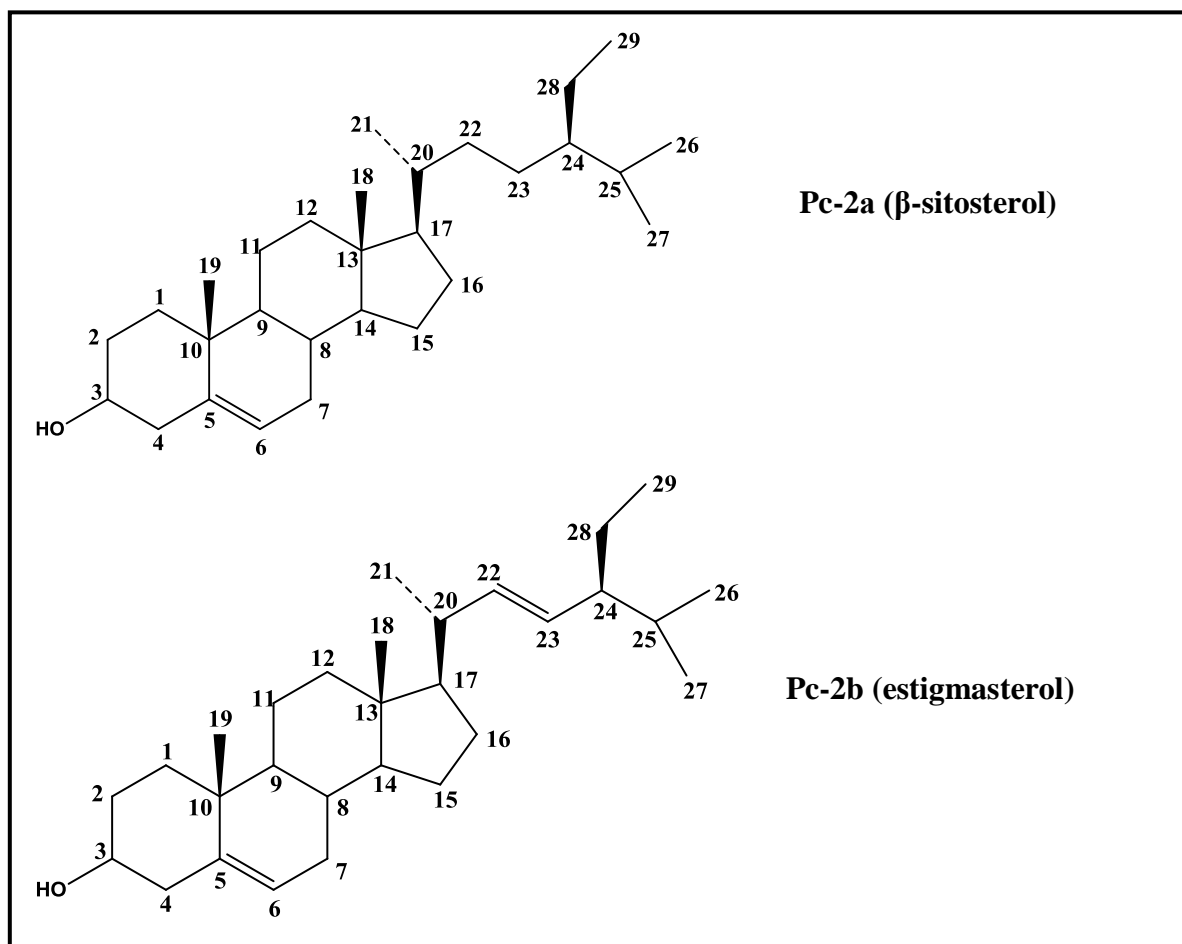


Figura 14: Estruturas químicas de Pc-2a e Pc-2b.

Tabela 3: Comparação dos dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-2a/Pc-2b com dados de RMN ^{13}C dos modelos da literatura (KOJIMA, 1990, CDCl_3 , 25MHz).

Pc-2a		Literatura		Pc-2b		Literatura
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
5	140,68	-	140,70	140,68	-	140,70
10	36,48	-	36,50	36,48	-	36,50
13	42,29	-	42,30	42,29	-	42,30
CH						
3	71,82	3,50 (m)	71,80	71,82	3,50 (m)	71,80
6	121,73	5,32 (d)	121,70	121,73	5,32 (d)	121,70
8	31,95	-	31,90	31,95	-	31,90
9	50,12	-	50,10	50,12	-	50,10
14	56,84	-	56,80	56,74	-	56,80
17	56,01	-	56,00	56,92	-	55,90
20	36,15	-	36,10	40,49	-	40,50
22	-	-	-	138,31	5,14 (dd, $J = 8,5$ e $15,5$ Hz, 1H)*	138,30
23	-	-	-	129,22	5,00 (dd, $J = 8,5$ e $15,5$ Hz, 1H)*	129,20
24	45,81	-	45,80	51,23	-	51,20
25	29,19	-	29,10	-	-	-
CH₂						
1	37,24	-	37,20	37,24	-	37,20
2	31,62	-	31,60	31,62	-	31,60
4	42,29	-	42,30	42,29	-	42,30
7	31,95	-	31,90	31,95	-	31,90
11	21,05	-	21,10	21,05	-	21,10
12	39,88	-	39,80	39,67	-	39,70
15	24,24	-	24,30	24,38	-	24,40
16	28,25	-	28,20	28,47	-	28,40
22	34,09	-	33,90	-	-	-
23	26,06	-	26,00	-	-	-
28	23,04	-	23,00	-	-	-
CH₃						
18	11,69	-	11,90	11,78	-	12,00
19	19,40	-	19,40	19,40	-	19,40
21	18,82	-	18,80	21,20	-	21,20
26	19,75	-	19,80	21,05	-	-
27	19,05	-	19,00	18,95	-	-
29	11,96	-	12,00	12,11	-	-

*Estes dados podem estar trocados

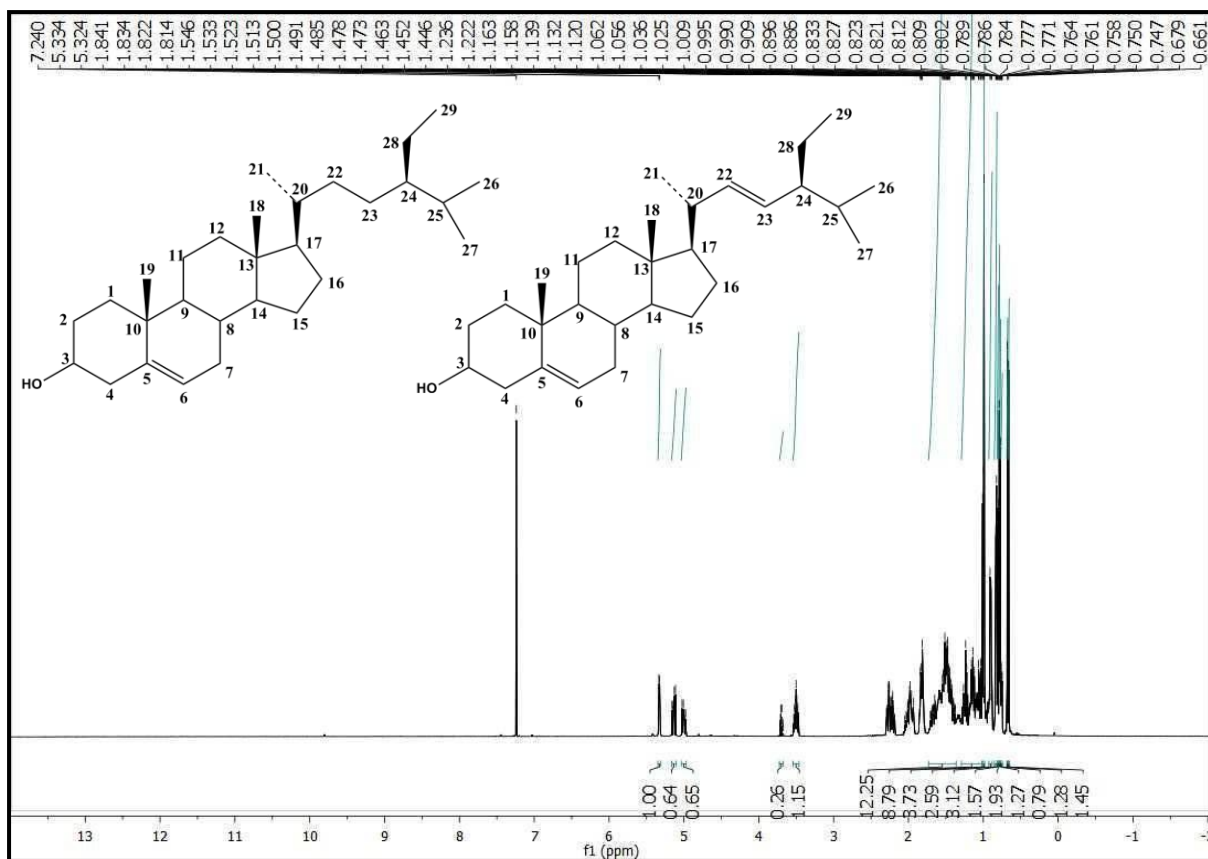


Figura 15: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-2a/Pc-2b.

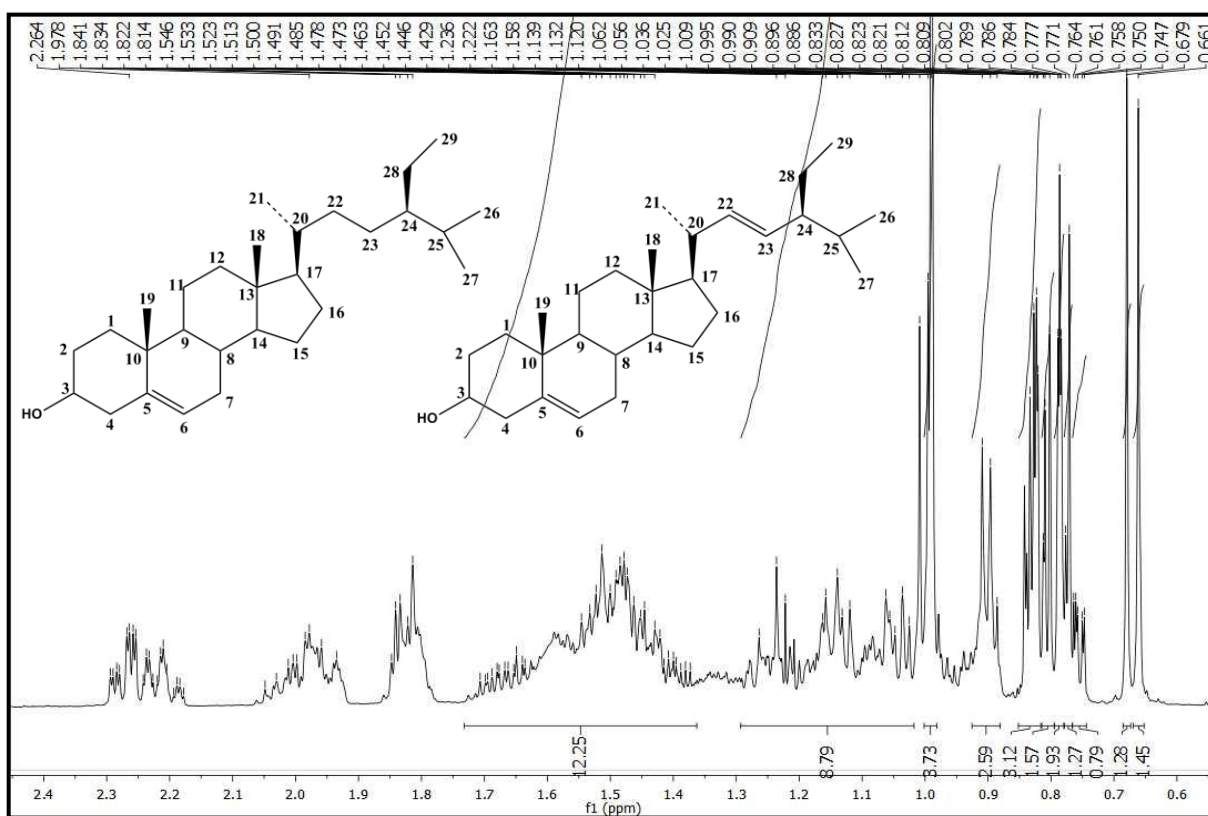


Figura 16: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-2a/Pc-2b na região de 0,65-2,50 ppm.

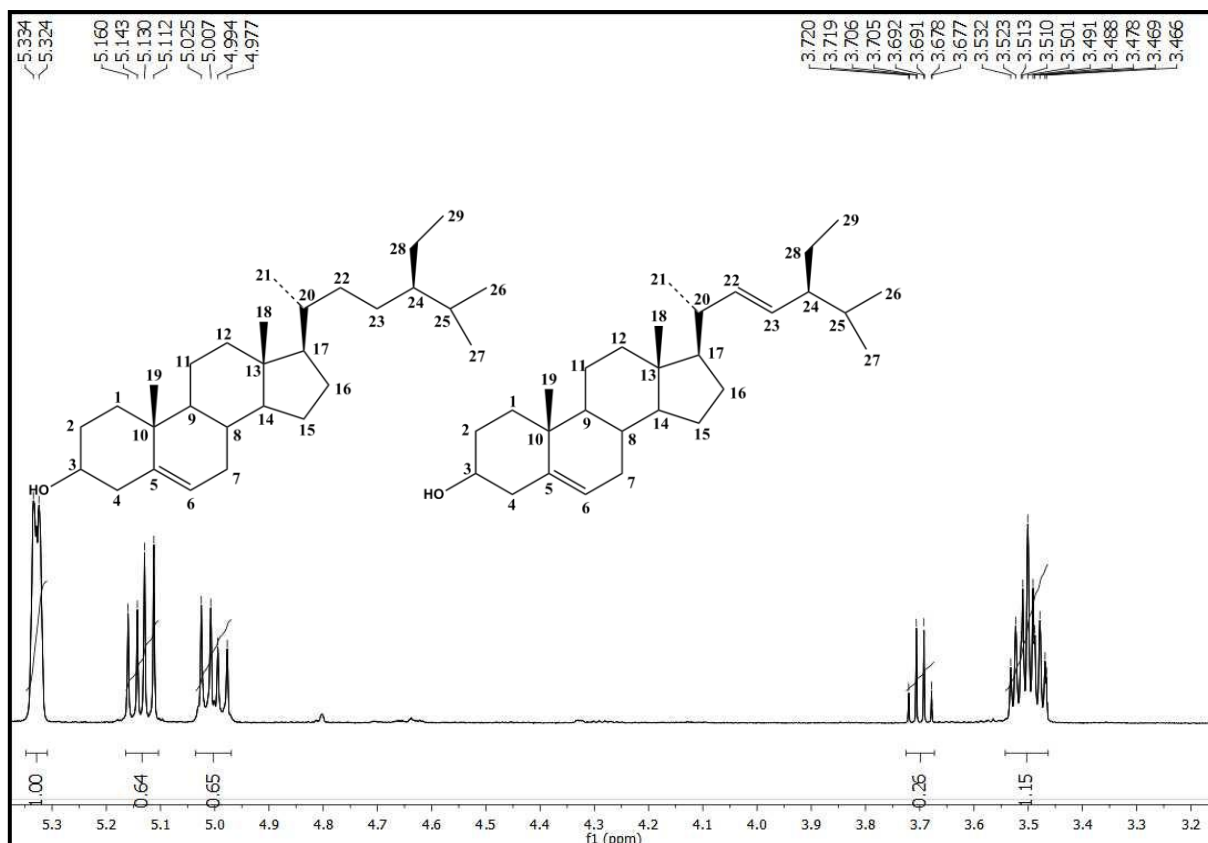


Figura 17: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-2a/Pc-2b na região de 3,20 a 5,50 ppm.

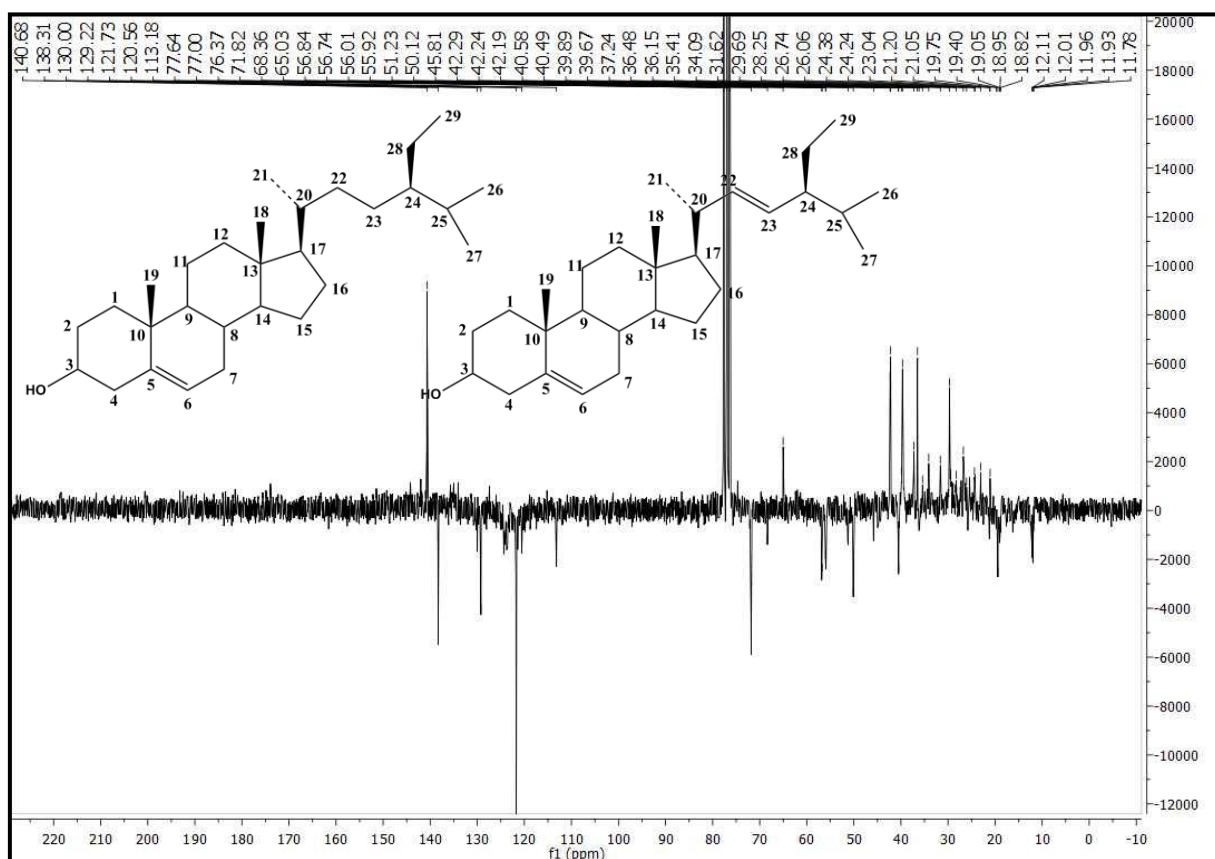


Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-2a/Pc-2b.

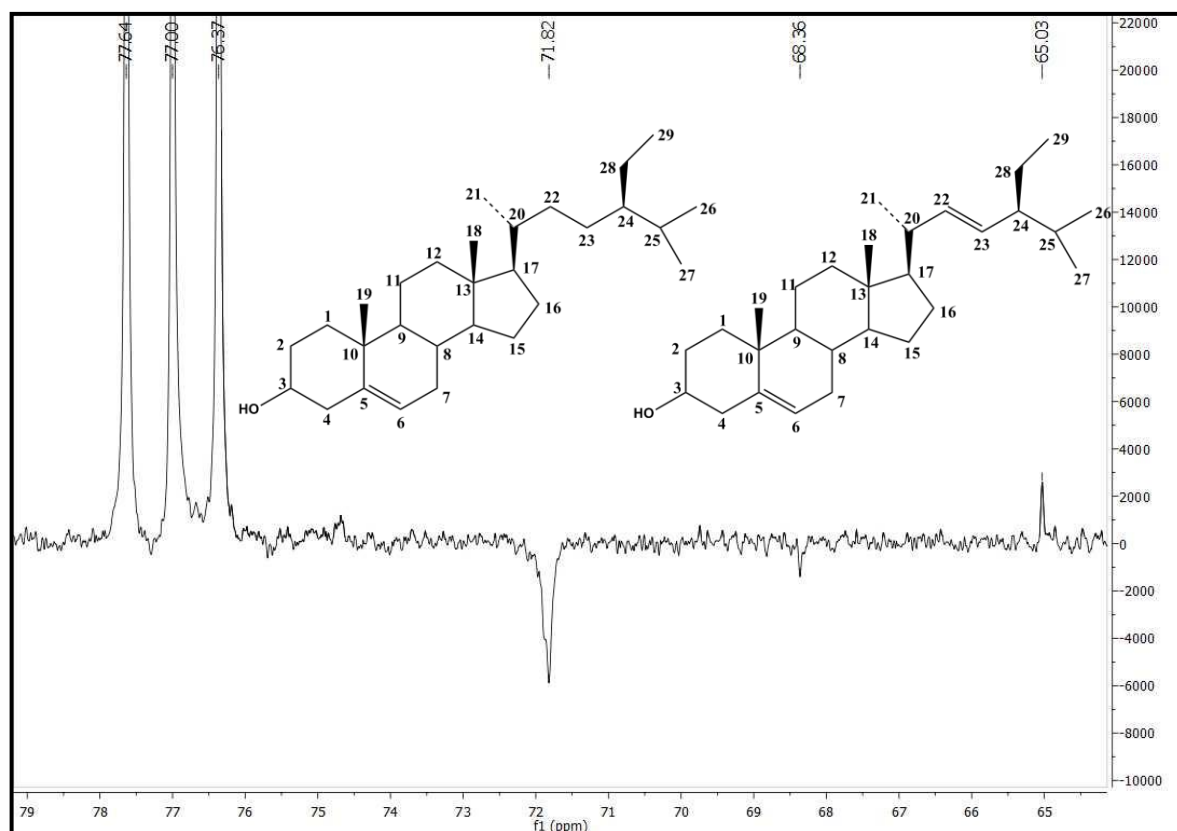


Figura 19: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-1a/Pc-1b na região de 65,0-79,0 ppm.

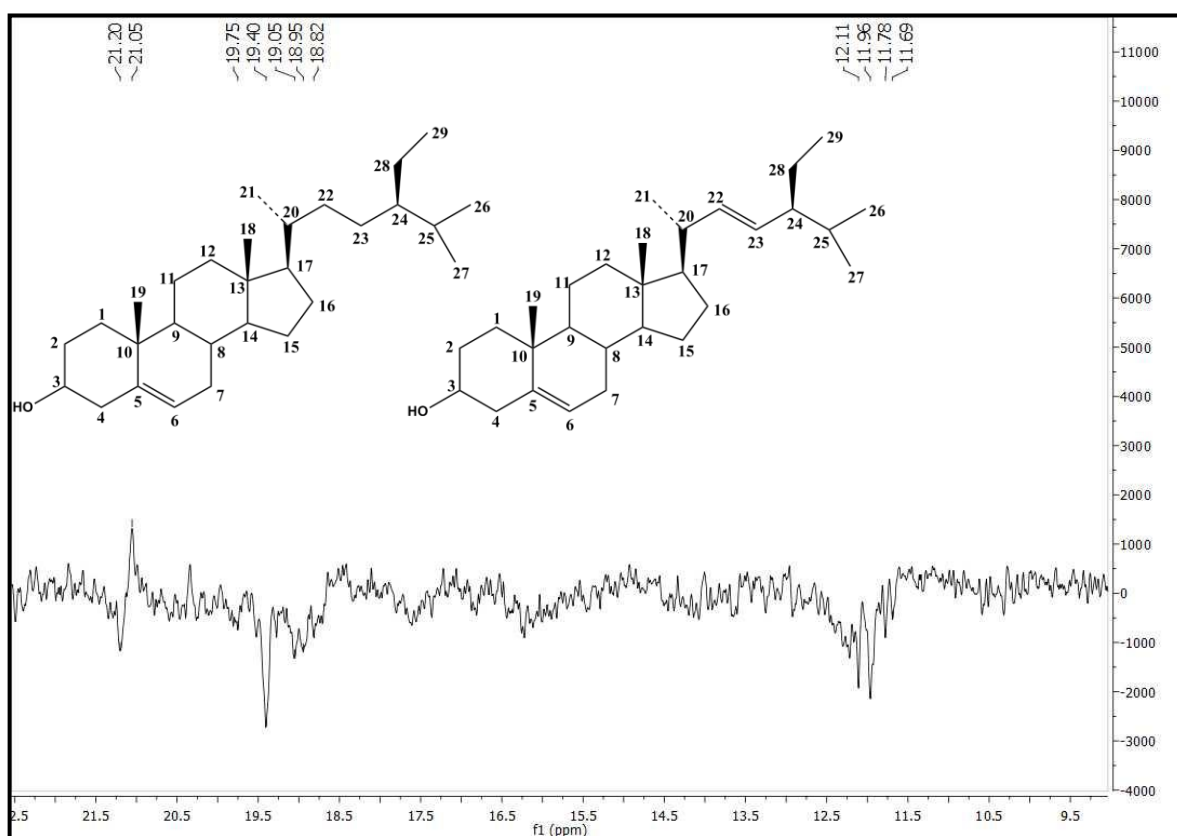


Figura 20: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-2a/Pc-2b na região de 9,0-22,0 ppm.

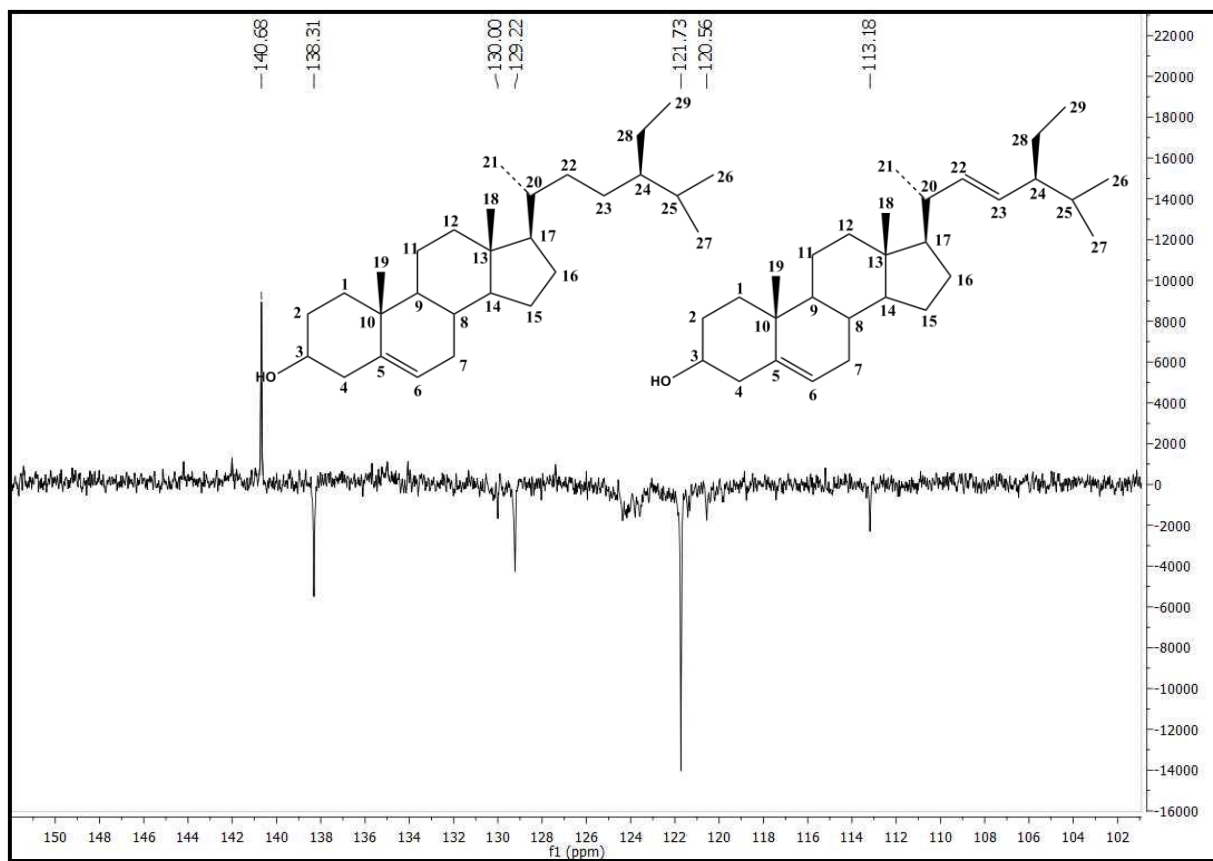


Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-2a/Pc-2b na região de 102,0-150,0 ppm.

5.1.2 Determinação estrutural de Pc-3/Pc-4

Os dados espectrais propõem uma mistura de dois compostos. No espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz), para a substância majoritária codificada como Pc-3 (Figura 27, p.84), foi possível observar na região de hidrogênios aromáticos os sinais em δ_{H} 7,87 (sl, 1H), δ_{H} 7,82 (dl, $J=8,0$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,81 (d, $J=8,5$ Hz) (Figura 28, p. 84), indicando a presença de um anel trissubstituído (Figura 22, p. 77).

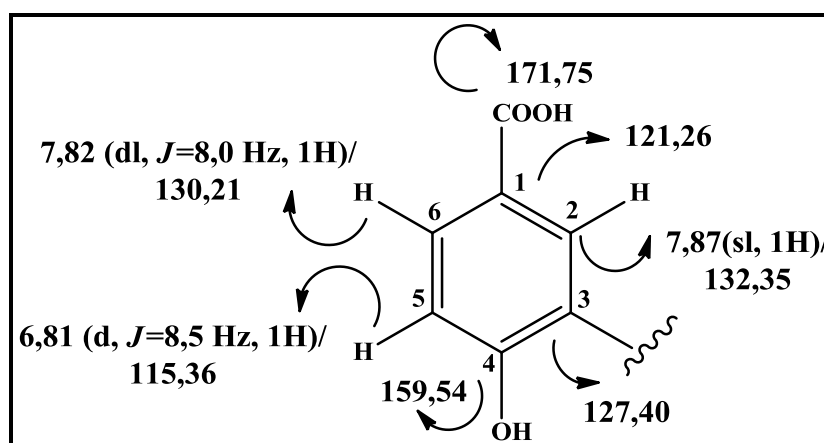


Figura 22: Anel trissubstituído de Pc-3

Os sinais em δ_{H} 5,33 (t, $J=7,0$ Hz, 1H), δ_{H} 5,08 (m, 3H) (Figura 29, p. 85), δ_{H} 3,37 (d, $J=7,0$ Hz, 2H) (Figura 30, p.85), δ_{H} 2,18-2,08 (m, 4H), δ_{H} 2,07-2,00 (m, 4H), δ_{H} 1,98-1,94 (m, 4H) (Figura 31, p. 86), ainda no espectro de RMN ^1H (500 MHz), além de singletos atribuídos a metilas ligadas a carbonos olefínicos: δ_{H} 1,75 (s, 3H), δ_{H} 1,66 (s, 3H), δ_{H} 1,59 (s, 3H), δ_{H} 1,58 (s, 3H), e δ_{H} 1,56 (s, 3H), sugerem a presença do grupo geranyl-geranyl (Figura 23, p. 77).

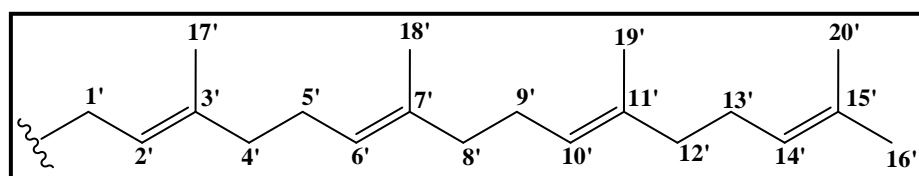


Figura 23: Grupo geranyl-geranyl

O espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) (Figura 27), realizado por meio da técnica APT, apresentou 27 sinais para 27 átomos de carbono atribuídos ao composto majoritário (Pc-3), sendo oito sinais atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_{C} : 171,75, 159,54, 138,48, 135,39, 134,83, 131,14, 127,40 e 121,26) (Figura 34, p. 87), sete sinais referentes a carbonos

metínicos (δ_C : 132,35, 130,21, 124,37, 124,20, 123,73, 121,08 e 115,36) (Figura 35, p. 88), sete sinais atribuídos a carbonos metilênicos (δ_C : 39,68, 39,65, 39,60, 29,01, 26,71, 26,47 e 26,56) (Figura 36, p. 88) e cinco sinais referentes a carbonos metílicos (δ_C : 25,60, 17,60, 16,19, 15,97 e 15,93) (Figura 37, p. 89).

No espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) (Figura 38, p. 89) foram observadas as correlações em δ_H 7,87/ δ_C 132,35, δ_H 7,82/ δ_C 130,21 e δ_H 6,81/ δ_C 115,36 (Figura 39, p. 90) sugestivas para as posições, C-2, C-6 e C-5 do anel aromático, respectivamente. No espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 42, p. 91) foi observada a correlação de δ_H 6,81 (H-5)/ δ_C 121,26 e δ_C 127,40 (Figura 43, p. 92), sugerindo estes sinais de carbono para as posições C-1 e C-3, respectivamente. Através da correlação δ_H 7,82 (H-6)/ δ_C 132,35, δ_C 159,54 e δ_C 171,75 (Figura 44, p. 92) foi possível confirmar o sinal em δ_C 132,35 para a posição C-2 e sugerir δ_C 159,54 para a posição C-4 e δ_C 171,75 para a carbonila ligada a posição C-1. Ainda neste espectro foi identificada a correlação δ_H 7,87/ δ_C 159,54, δ_C 171,75, δ_C 130,21 (Figura 44, p. 92) e δ_C 29,01 corroborando com as atribuições do δ_C 159,54, δ_C 171,75, δ_C 130,21 para as posições C-4, C=O, C-6 e sugerir o δ_C 29,01 para C-1'. As correlações em δ_H 3,37/ δ_C 159,54, δ_C 138,48, δ_C 132,35, δ_C 127,40 e δ_C 121,03 (Figura 45, p. 93) confirmam os sinais em δ_C 159,54, 127,40 e δ_C 132,35 para as posições C-4, C-3 e C-2, respectivamente, e sugere δ_C 121,08 para C-2' e δ_C 138,48 para C-3'.

No espectro de HMQC visualizou-se a correlação δ_H 1,75/ δ_C 16,19 (Figura 41, p. 91) e no espectro de HMBC este mesmo sinal mostrou correlação com δ_C 121,03, δ_C 138,48 (Figura 46, p. 93) e δ_C 39,68 (Figura 48, p. 94) que permite inferir que esta metila está ligada ao C-3' e sugerir o sinal em δ_C 39,68 para a posição C-4'. Ainda no HMQC, δ_H 1,59/ δ_C 17,60 e δ_H 1,66/ δ_C 25,60 (Figura 41, p. 91) aliado às correlações a longa distância de δ_H 1,59/ δ_C 131,14, δ_C 124,20 (Figura 46, p. 93) e δ_C 25,60 (Figura 47, p. 94), e δ_H 1,66/ δ_C 131,14, δ_C 124,20 (Figura 46, p. 93) e δ_C 17,60 (Figura 48, p. 94) possibilitou assinalar os sinais em δ_C 124,20, δ_C 131,14, δ_C 17,60 e δ_C 25,60 para as posições 14', 15', 16' e 20', respectivamente.

As correlações observadas no HMQC δ_H 1,58/ δ_C 15,97 e δ_H 1,56/ δ_C 15,93 (Figura 41, p. 91), juntamente com as correlações a longa distância δ_H 1,58/ δ_C 135,39, δ_C 39,65, δ_C 123,73 e δ_H 1,56/ δ_C 134,83, δ_C 124,37 e δ_C 39,60 permitiram atribuir para as posições C-6', C-7', C-

8', C-10', C-11', C-12', respectivamente, os sinais em δ_C 123,73, δ_C 135,39, δ_C 39,65, δ_C 124,37, δ_C 134,83 e δ_C 39,60.

Restando apenas os carbonos C-5', C-9' e C-13', que foram atribuídos pelas correlações δ_H 1,98-1,94/ δ_C 134,83, δ_C 124,20 (Figura 49, p. 95) e δ_C 15,93 o que permite atribuir δ_C 134,83, δ_C 124,20 e δ_C 15,9 as posições C-11', C-14' e C-19', respectivamente, e propor o sinal δ_H 1,98-1,94 (m, 2H) para os hidrogênios da posição H-12'.

As correlações δ_H 2,07-2,00/ δ_C 131,14, δ_C 124,20, δ_C 134,83, δ_C 121,03 (Figura 47, p. 94) e δ_C 16,19 (Figura 49, p. 95) permitem atribuir δ_H 2,07-2,00 (m, 4H) para os hidrogênios das posições H-4' e H-13', deste modo reafirmar δ_C 16,19 e δ_C 121,03 para as posições C-17' e C-2', respectivamente.

As correlações no HMBC δ_H 2,18-2,08 com δ_C 135,39 e δ_C 123,73 (Figura 47, p. 94) permitem atribuir o multiplete δ_H 2,18-2,08 aos hidrogênios metilênicos H-8' e H-9' e, conseqüentemente, confirmar os carbonos C-7' e C-6'. As correlações vistas no HMQC de δ_H 2,18-2,08/ δ_C 39,65 δ_C 26,56 e δ_C 26,47 (Figura 41, p. 91) permitem atribuir o sinal δ_H 2,18-2,08 também para os hidrogênios da posição H-5' e os sinais de carbono δ_C 39,65, δ_C 26,56 e δ_C 26,47 para as posições C-8', C-9' e C-5', respectivamente.

A compilação dos dados espectrais uni e bidimensionais (RMN¹H, RMN¹³C, ¹H x ¹³C-HMQC e ¹H x ¹³C-HMBC) aliada a comparações com dados da literatura (MAXELL & RAMPERSAD *et al.*, 1989) (Tabela 4 e Tabela 5, p. 80 e 81) nos permitiu propor que a substância majoritária codificada como Pc-3 tratava-se de um derivado prenilado do ácido benzóico, denominado de ácido 4-hidroxi-3-((2E,6E,10E)-3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico (Figura 24, p. 79), que está sendo isolado pela quinta vez no gênero *Piper* e pela terceira vez em *Piper caldense* C. DC.

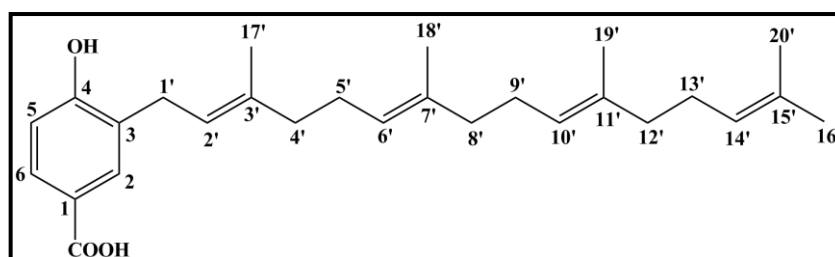


Figura 24: Estrutura química de Pc-3.

Tabela 4: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz), ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e correlações entre sinais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) e $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Pc-3.

Posição	HMQC		HMBC		COSY
	δ_{H}	δ_{C}	2j	3j	
1	-	121,26			
2	7,87 (sl, 1H)	132,35	C-1'	C-4, C=6 e C=O	
3	-	127,40			
4	-	159,54			
5	6,81 (d, $J=8,5$ Hz, 1H)	115,36		C-1, C-3	H-6
6	7,82 (dl, $J=8,0$ Hz, 1H)	130,21			H-5
1'	3,37 (d, $J=7,0$ Hz, 2H)	29,01	C-2' e C-3	C-2, C-4 e C-3'	H-2'
2'	5,33 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	121,03			H-1'
3'	-	138,48			
4'	2,07-2,00 (m, 2H)	39,68		C-2', C-17'	
5'	2,18-2,08 (m, 2H)	26,47	C-6'	C-7'	
6'	5,08 (m, 1H)	123,73			
7'	-	135,39			
8'	2,18-2,08 (m, 2H)	39,65			
9'	2,18-2,08 (m, 2H)	26,56			
10'	5,08 (m, 1H)	124,37			
11'	-	134,83			
12'	1,98-1,94 (m, 1H)	39,60		C-14'	
13'	2,07-2,00 (m, 2H)	26,71	C-14'	C-15' e C-11'	
14'	5,08 (m, 1H)	124,20			
15'	-	131,14			
16'	1,59 (s, 3H)	17,60	C-15'	C-14' e C-20'	
17'	1,75 (s, 3H)	16,19	C-3'	C-2' e C-4'	
18'	1,58 (s, 3H)	15,97			
19'	1,56 (s, 3H)	15,93			
20'	1,66 (s, 3H)	25,60			
C=O	-	171,75			

Tabela 5: Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de Pc-3 (CDCl_3 , 500/125MHz) com modelo encontrado na literatura (MAXWELL & RAMPERSAD et al., 1989, CDCl_3 , 500/125MHz).

Posição	Pc-3		Literatura	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	121,26	-	122,5
2	7,87 (sl, 1H)	132,35	7,93 (br s)	133,6
3	-	127,40	-	128,3
4	-	159,54	-	160,8
5	6,81 (d, $J=8,5$ Hz, 1H)	115,36	6,85 (d, $J_{5,6} = 9$ Hz)	116,3
6	7,82 (dl, $J=8,0$ Hz, 1H)	130,21	7,86 (d, $J_{6,5} = 9$ Hz)	131,3
1'	3,37 (d, $J=7,0$ Hz, 2H)	29,01	3,40 (d, $J_{1',2'} = 7$ Hz)	29,5
2'	5,33 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	121,03	5,36 (t, $J_{2',1'} = 7$ Hz)	122,0
3'	-	138,48	-	140,0
4'	2,07-2,00 (m, 2H)	39,68	2,06 (m)	40,1
5'	2,18-2,08 (m, 2H)	26,47	2,06 (m)	26,9
6'	5,08 (m, 1H)	123,73	5,12 (m)	124,9
7'	-	135,39	-	136,8
8'	2,18-2,08 (m, 2H)	39,65	2,06 (m)	40,1
9'	2,18-2,08 (m, 2H)	26,56	2,06 (m)	27,0
10'	5,08 (m, 1H)	124,37	5,12 (m)	125,4
11'	-	134,83	-	135,9
12'	1,98-1,94 (m, 1H)	39,60	2,06 (m)	40,1
13'	2,07-2,00 (m, 2H)	26,71	2,06 (m)	27,2
14'	5,08 (m, 1H)	124,20	5,12 (m)	125,5
15'	-	131,14	-	132,2
16'	1,59 (s, 3H)	17,60	1,68 (br s)	25,4
17'	1,75 (s, 3H)	16,19	1,86 (br s)	16,4
18'	1,58 (s, 3H)	15,97	1,60 (br s)	16,2
19'	1,56 (s, 3H)	15,93	1,60 (br s)	16,2
20'	1,66 (s, 3H)	25,60	1,60 (br s)	17,9
COOH	-	171,75	-	173,1

O espectro de RMN ^1H (Figura 27, p. 84) mostrou ainda os seguintes sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 6,75 (d, $J=8,5$ Hz) e δ_{H} 7,56 (d, $J=8,0$ Hz) (Figura 28, p. 84) que apontam a presença de um anel aromático tetrassubstituído, além de outros em δ_{H} 5,25 (d, $J=2,0$ Hz) (Figura 29, p. 85), δ_{H} 3,87 (d, $J=6,5$ Hz) (Figura 30, p. 85) e δ_{H} 1,80 (s) (Figura 32, p. 86), atribuídos a substância minoritária codificada como Pc-4.

O espectro de RMN ^{13}C , além dos sinais atribuídos a Pc-3, apresenta os seguintes: δ_{C} 172,20, δ_{C} 148,48, δ_{C} 142,79, δ_{C} 137,64, δ_{C} 135,35, δ_{C} 134,86, δ_{C} 130,85 (Figura 34, p. 87), δ_{C} 120,74, δ_{C} 125,39 (Figura 35, p. 88), δ_{C} 123,78, δ_{C} 112, 20 (Figura 34, p. 87) e δ_{C} 16,23

(Figura 37, p. 89), os oito primeiros vistos no experimento APT como carbonos quaternários e os quatro últimos como carbonos metínicos e metílicos.

Comparação dos dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C com os da literatura (SILVA, 2013) permite definir as posições dos substituintes do anel aromático (Figura 25, p. 82).

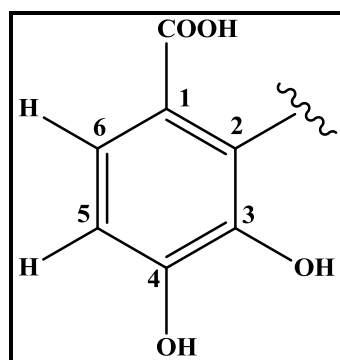


Figura 25: Anel aromático tetrassubstituído de Pc-4.

Enquanto a comparação com a cadeia geranyl-geranyl mostrou diferenças em alguns sinais, tanto no espectro de RMN ^1H como no de RMN ^{13}C . O sinal correspondente ao H-2' de Pc-4 em δ_{H} 5,25 (d, $J=2,0$ Hz) difere do sinal δ_{H} 5,26 (t, $J=6,5$ Hz) do composto modelo (SILVA, 2013). Por outro lado, o espectro de RMN ^{13}C mostrou o deslocamento químico do C-3' em δ_{C} 137,64 diferindo do valor do correspondente modelo (δ_{C} 139,25).

Tais dados permitem sugerir que H-2' e a metila em C-3' de Pc-4 encontram-se no mesmo lado da molécula e, portanto, a cadeia geranyl-geranyl pode ser caracterizada como 2'Z, 6'E, 10'E (Figura 26, p. 82), diferentemente do modelo da literatura. Foi possível identificar Pc-4 como ácido 3,4-dihidroxi-2-((2Z,6E,10E)-3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico (Figura 26, p. 82), que está sendo isolado pela primeira vez na família Piperaceae.

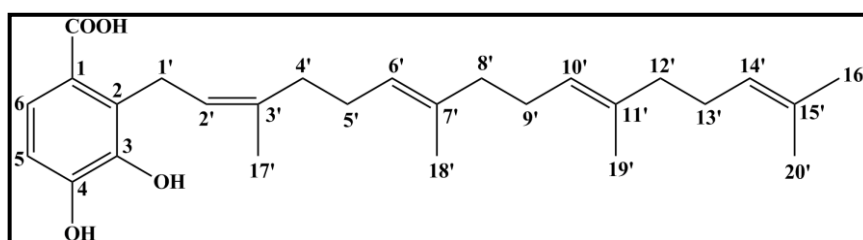


Figura 26: Estrutura química de Pc-4.

Tabela 6: Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 500/125MHz) de Pc-4 com modelo encontrado na literatura (SILVA, 2013, CDCl_3 , 500/125MHz).

Posição	PC-4		Literatura	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	120,74	-	120,55
2	-	130,85	-	130,46
3	-	142,79	-	142,62
4	-	148,48	-	148,91
5	6,75 (d, $J=8,5$ Hz, 1H)	112,20	6,80 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	112,46
6	7,56 (d, $J=8,0$ Hz, 1H)	125,39	7,63 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	125,97
1'	3,87 (d, $J=6,5$ Hz, 1H)	26,15	3,91 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H)	26,49
2'	5,25 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	121,97	5,26 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H)	121,55
3'	-	137,64	-	139,25
4'	2,00-2,07 (m, 2H)	39,68	2,07-2,12 (m, 2H)	39,65
5'	2,08-2,18 (m, 2H)	26,47	2,07-2,12 (m, 2H)	26,31
6'	5,08 (m, 1H)	123,78	5,07 (m, 1H)	123,49
7'	-	135,35	-	135,82
8'	2,08-2,18 (m, 2H)	39,65	1,92-1,97 (m, 2H)	39,66
9'	2,08-2,18 (m, 2H)	26,71	1,92-1,97 (m, 2H)	26,76
10'	5,08 (m, 1H)	124,37	5,07 (m, 1H)	124,12
11'	-	134,86	-	135,02
12'	1,94-1,98 (m, 2H)	39,60	2,01-2,06 (m, 2H)	39,69
13'	2,00-2,07 (m, 2H)	26,56	2,01-2,06 (m, 2H)	26,57
14'	5,08 (m, 1H)	124,20	5,07 (m, 1H)	124,39
15'	-	131,14	-	131,23
16'	1,66 (s, 3H)	25,60	1,66 (s,3H)	25,65
17'	1,80 (s, 3H)	16,23	1,83 (s,3H)	16,27
18'	1,58 (s, 3H)	16,19	1,58 (s,3H)	16,07
19'	1,56 (s, 3H)	15,97	1,58 (s,3H)	15,97
20'	1,66 (s, 3H)	15,93	1,56 (s,3H)	17,65
COOH	-	172,70	-	172,84

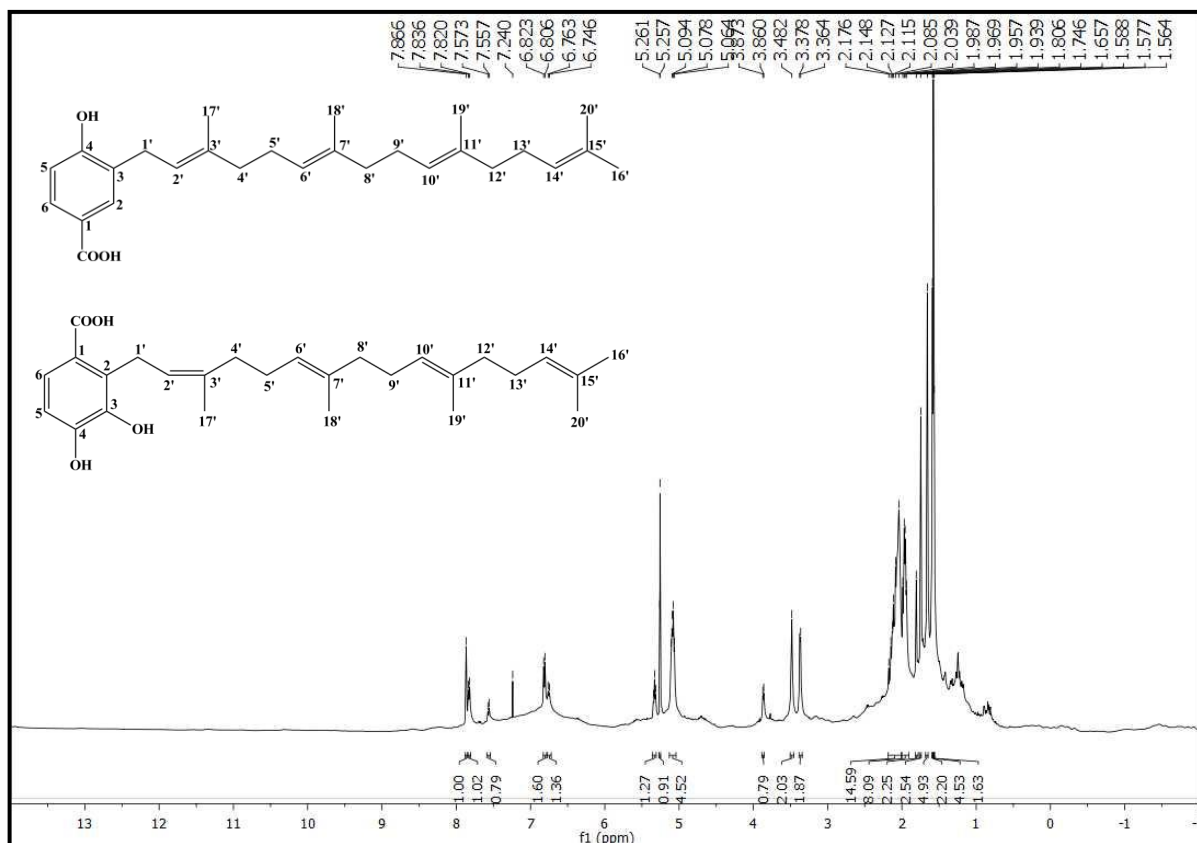


Figura 27: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500MHz) de Pc-3/Pc-4.

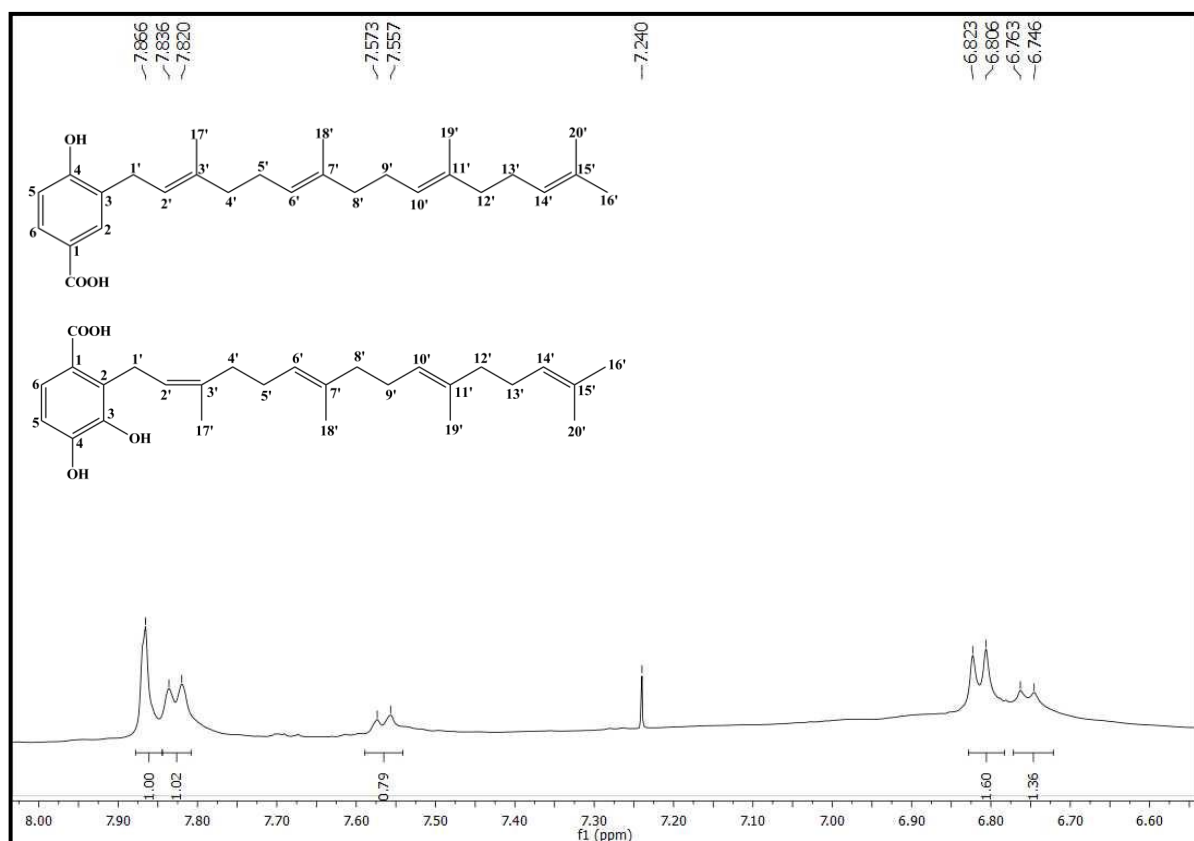


Figura 28: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 6,60-8,0 ppm.

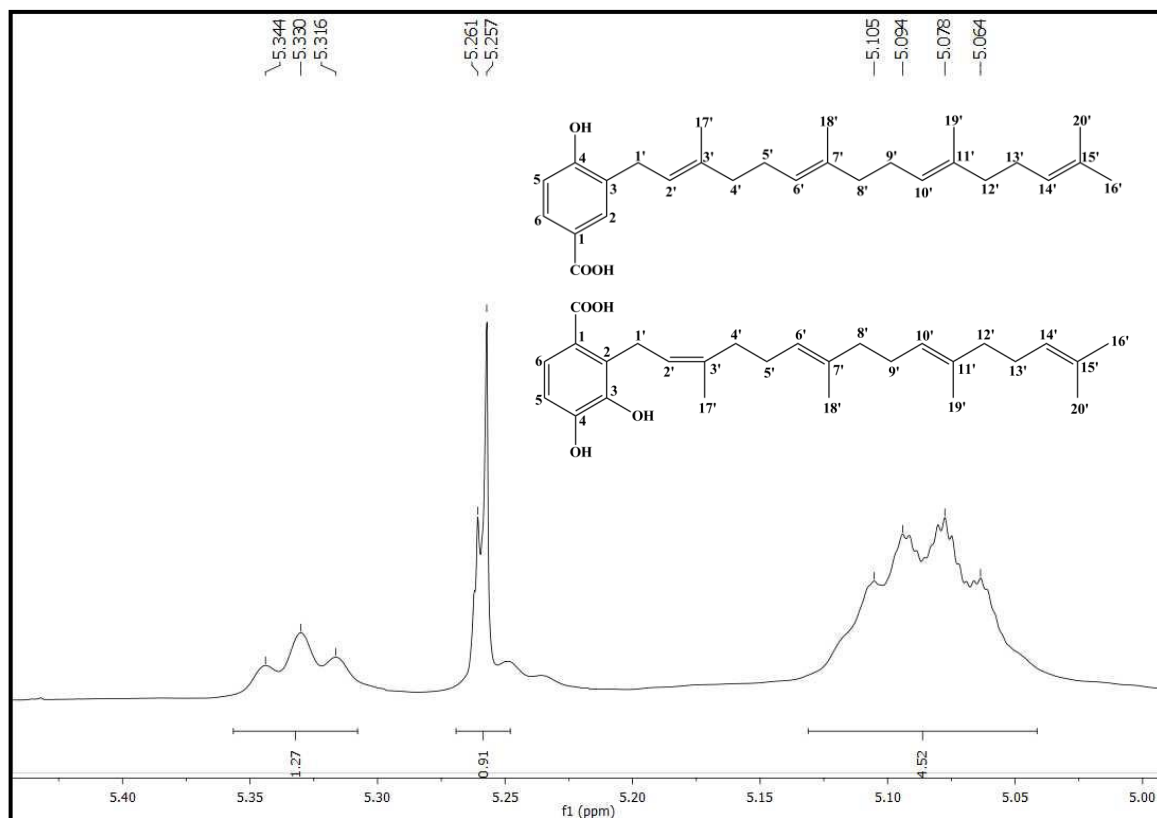


Figura 29: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 5,0-5,4 ppm.

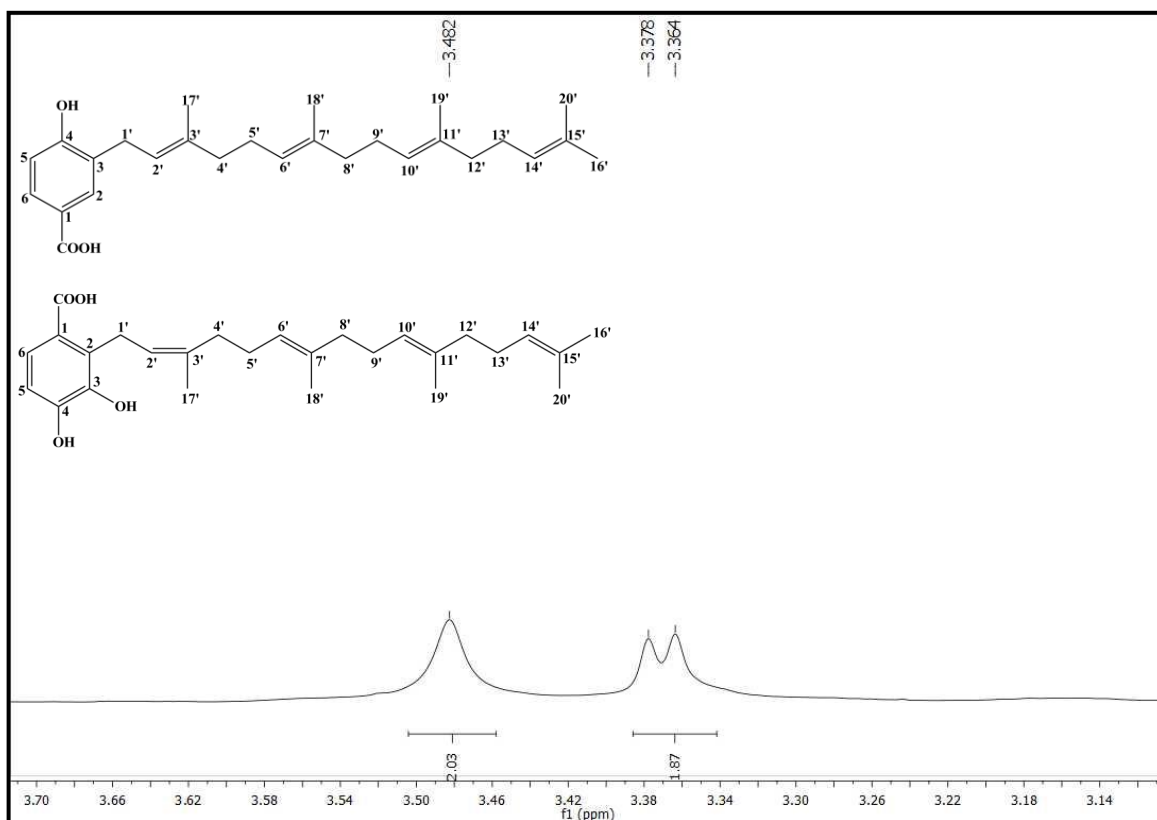


Figura 30: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 3,14-3,70 ppm.

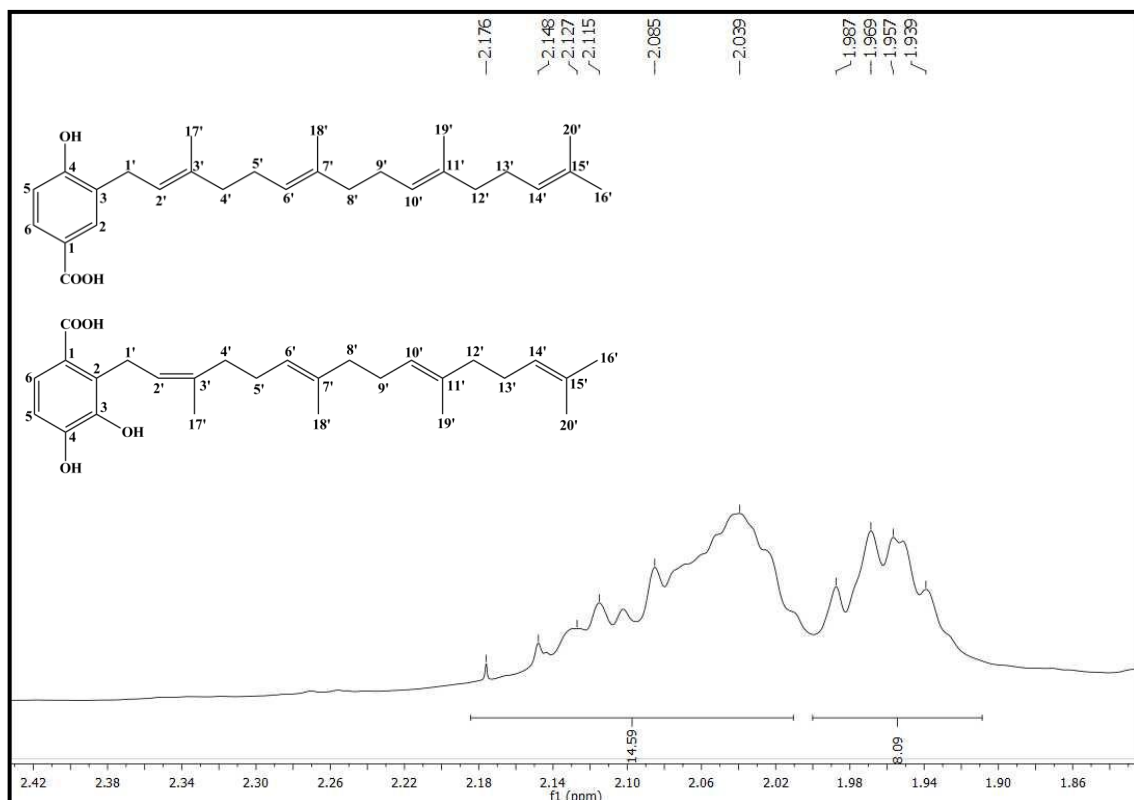


Figura 31: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,86-2,42 ppm.

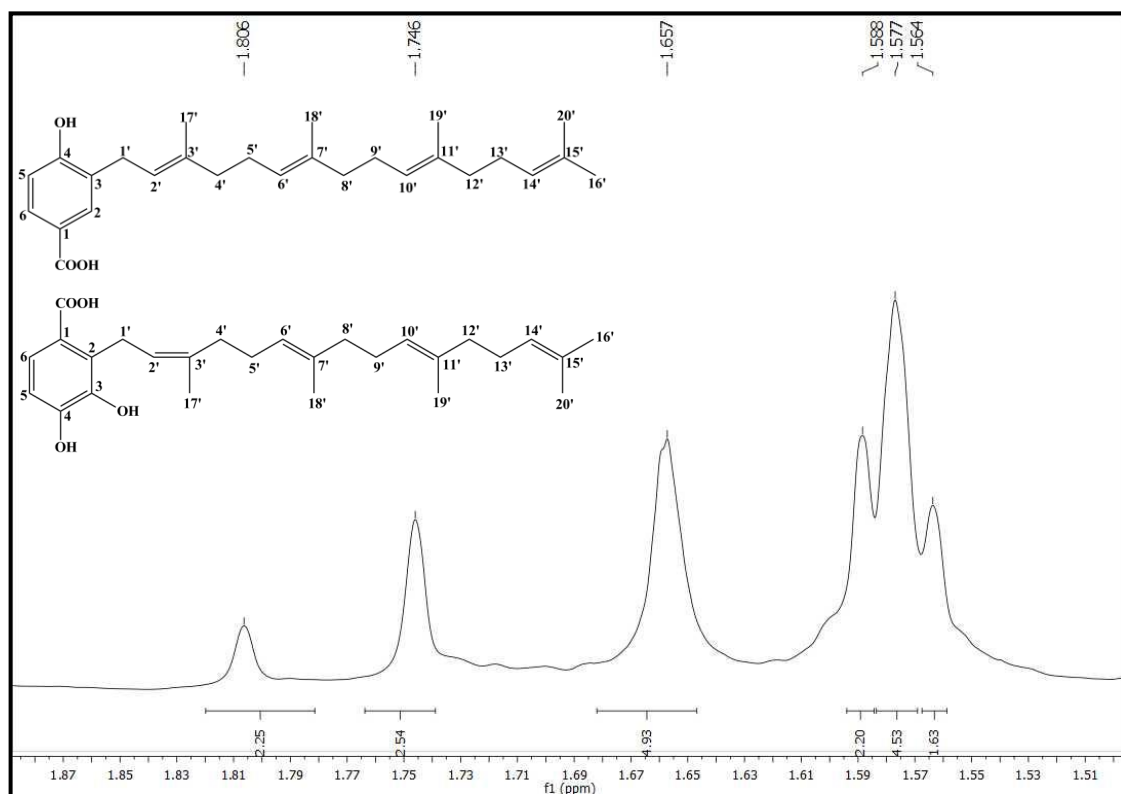


Figura 32: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,51-1,87 ppm.

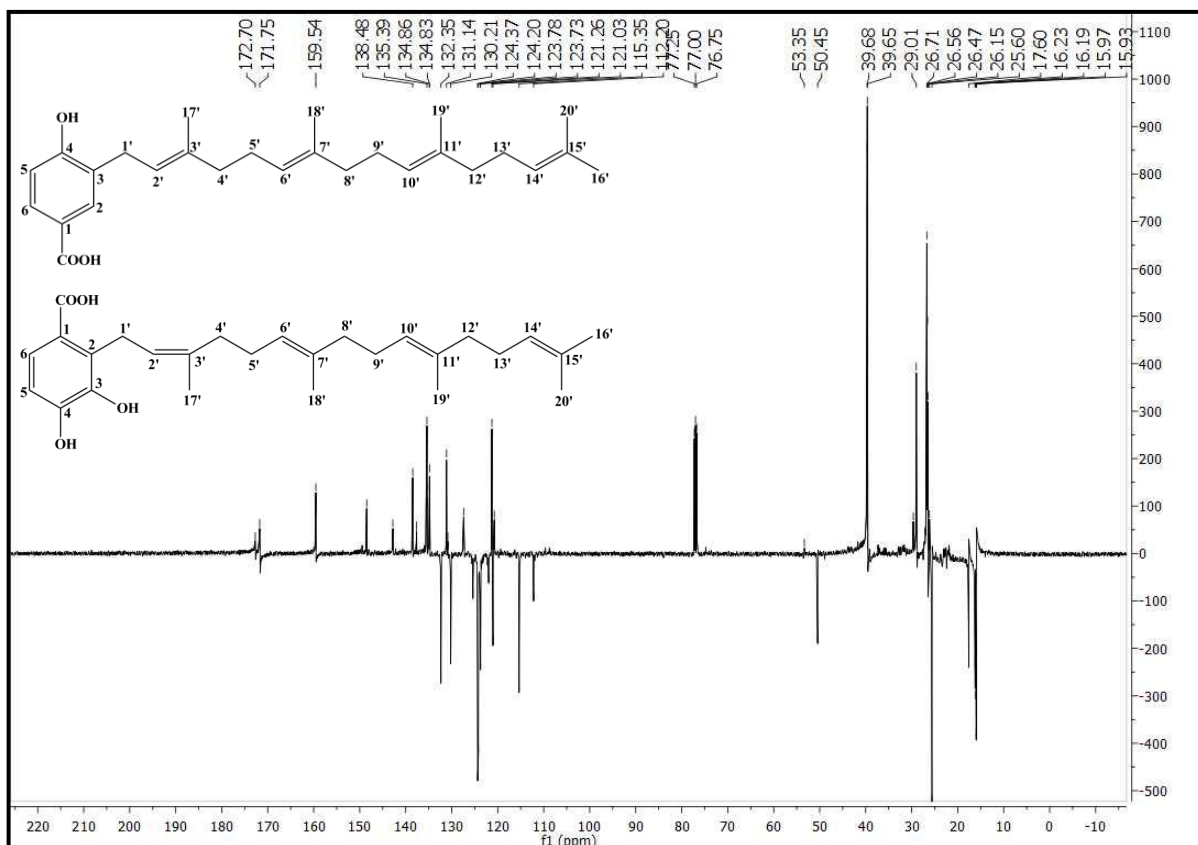


Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4.

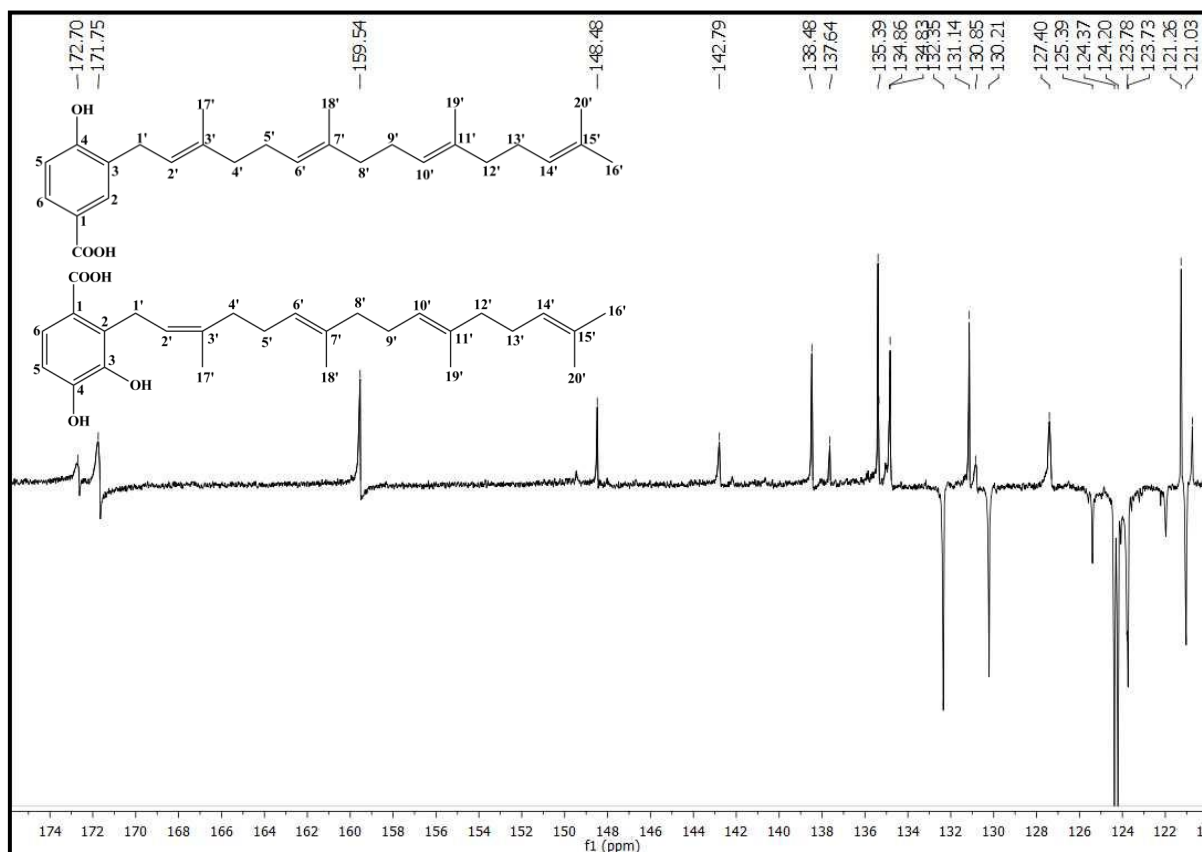


Figura 34: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região 122,0-174,0 ppm.



Figura 35: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região 115,0-133,0 ppm.

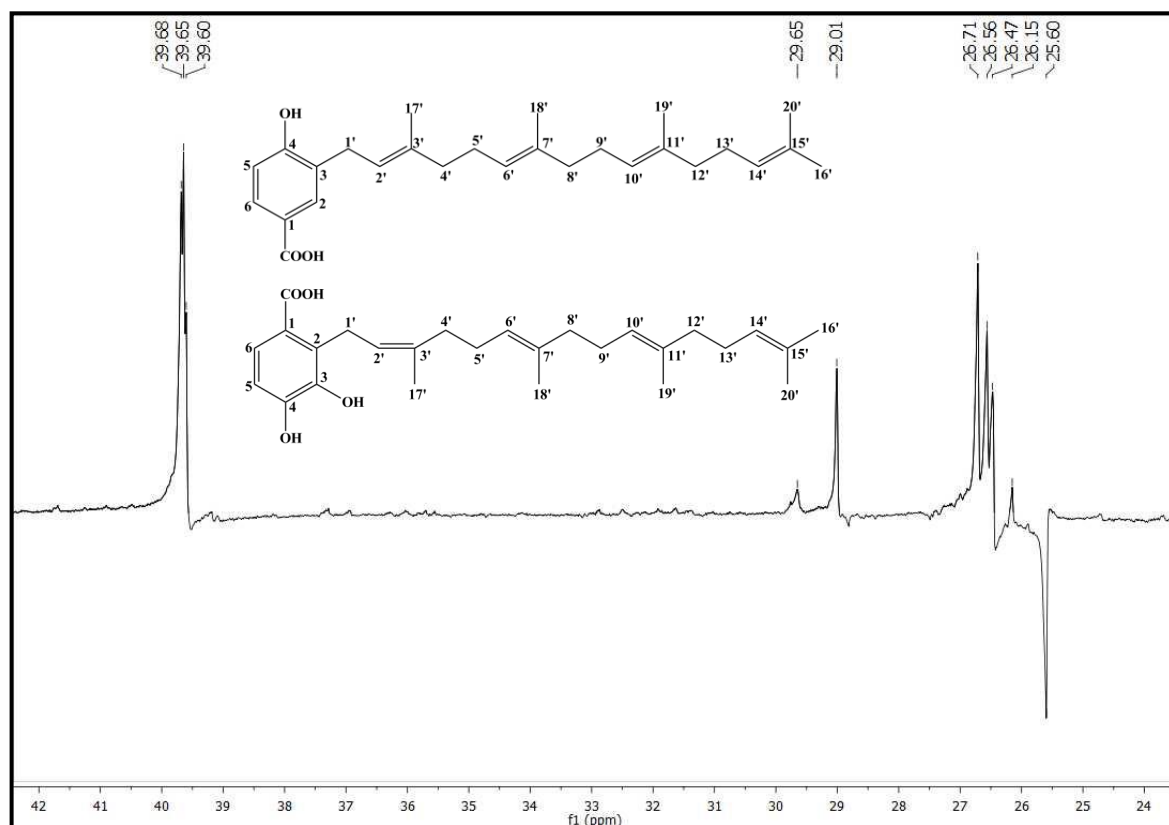


Figura 36: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região 24,0-42,0 ppm.

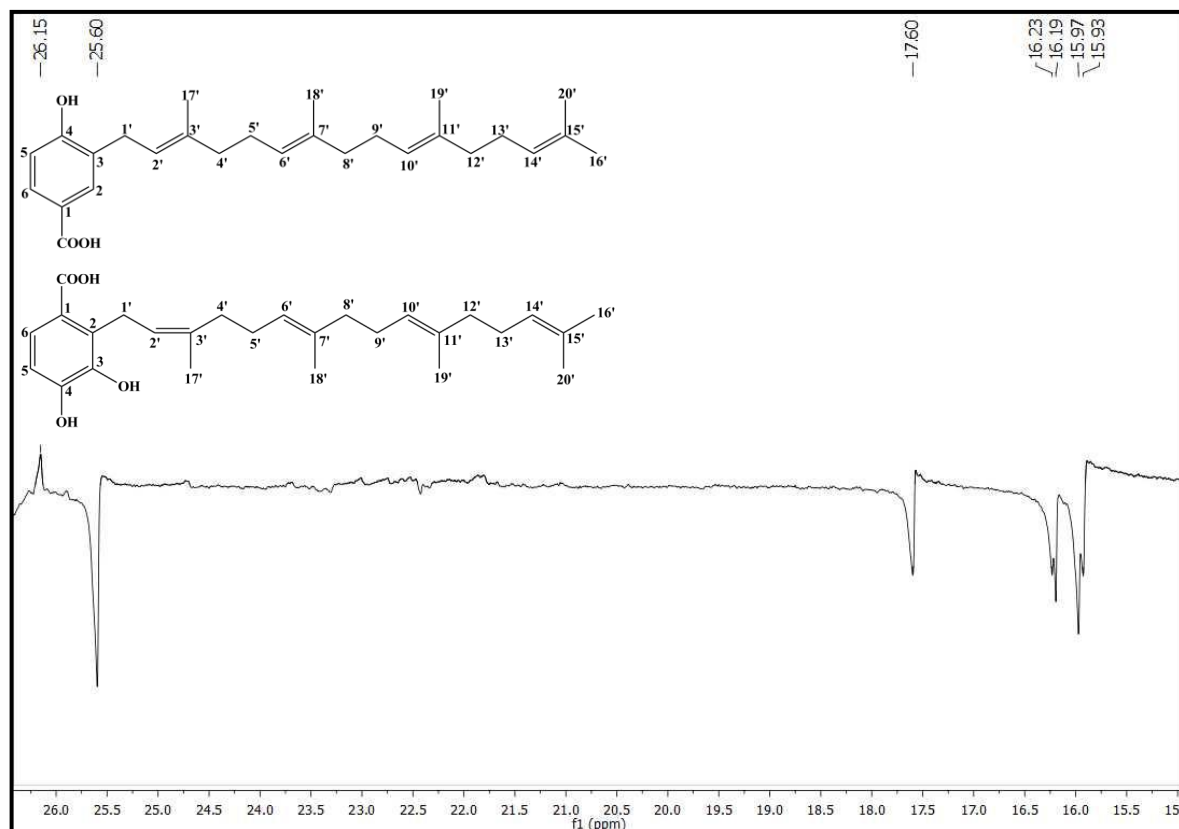


Figura 37: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região 15,0-26,0 ppm.

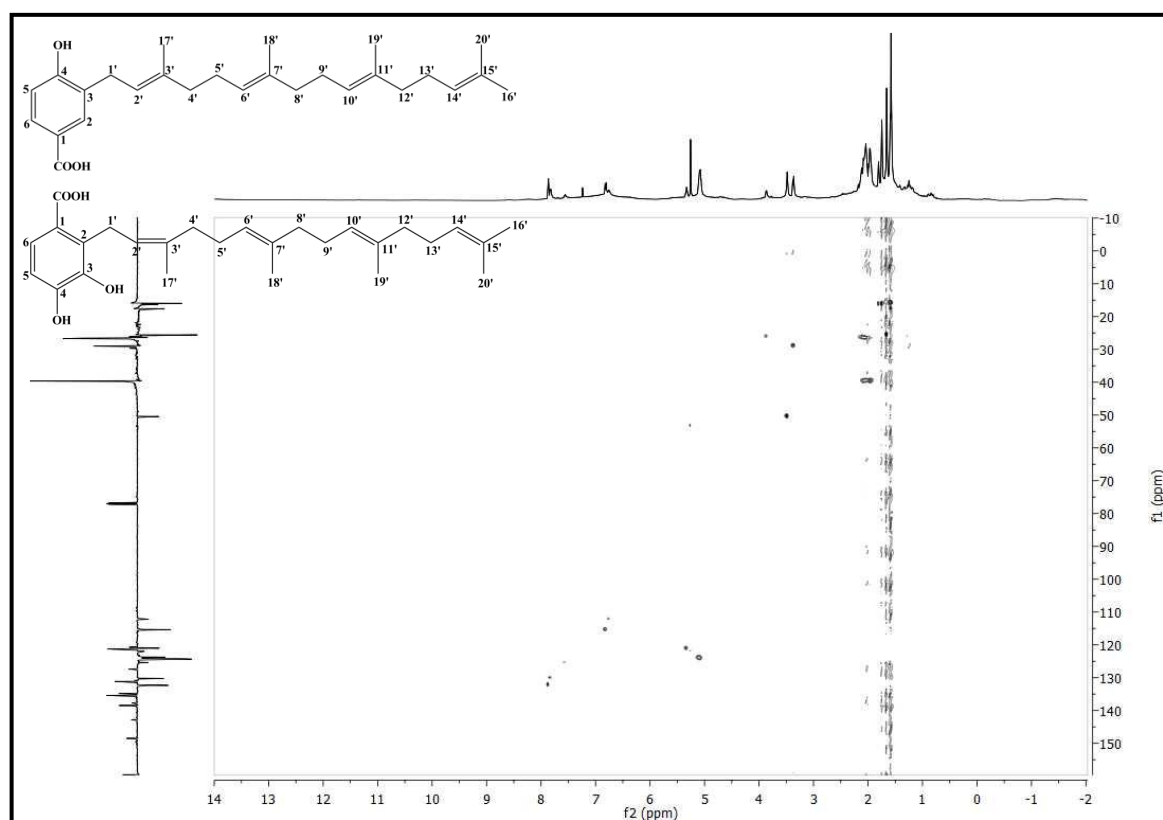


Figura 38: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4.

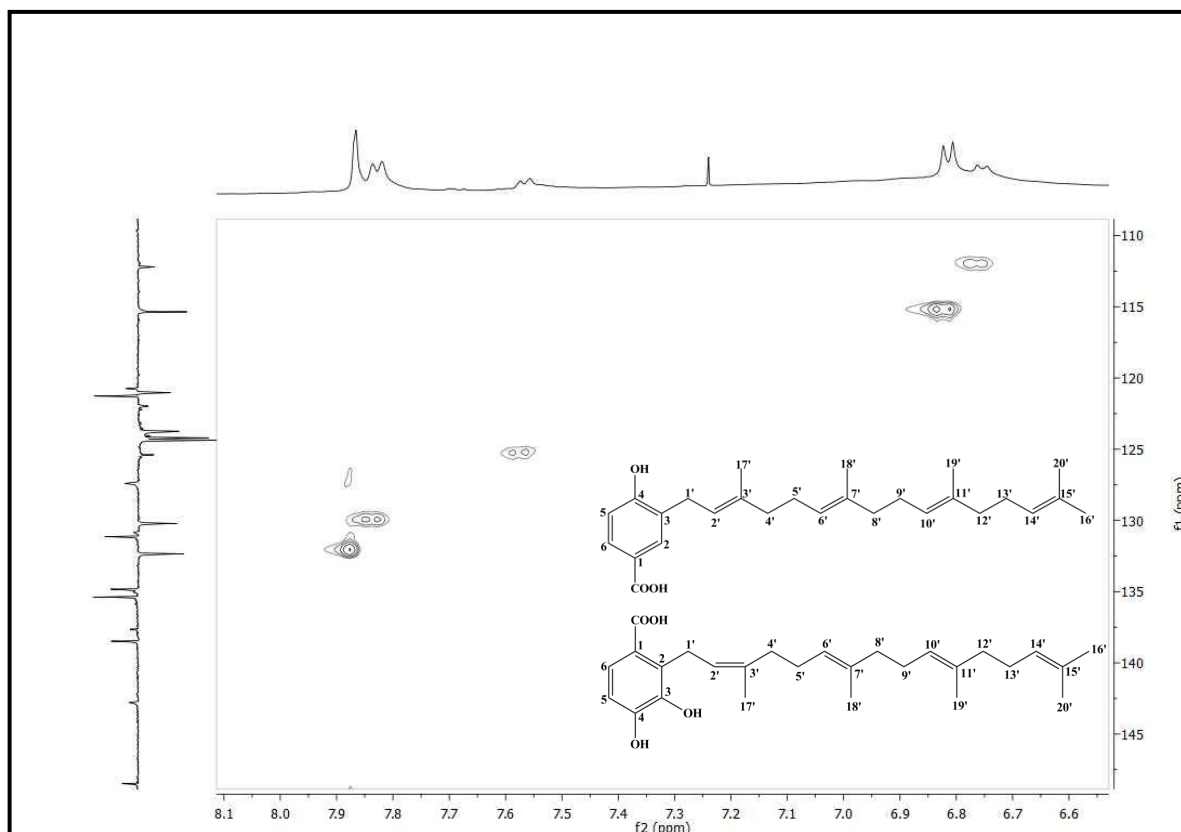


Figura 39: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 6,6-8,1 e 110,0- 145,0 ppm.

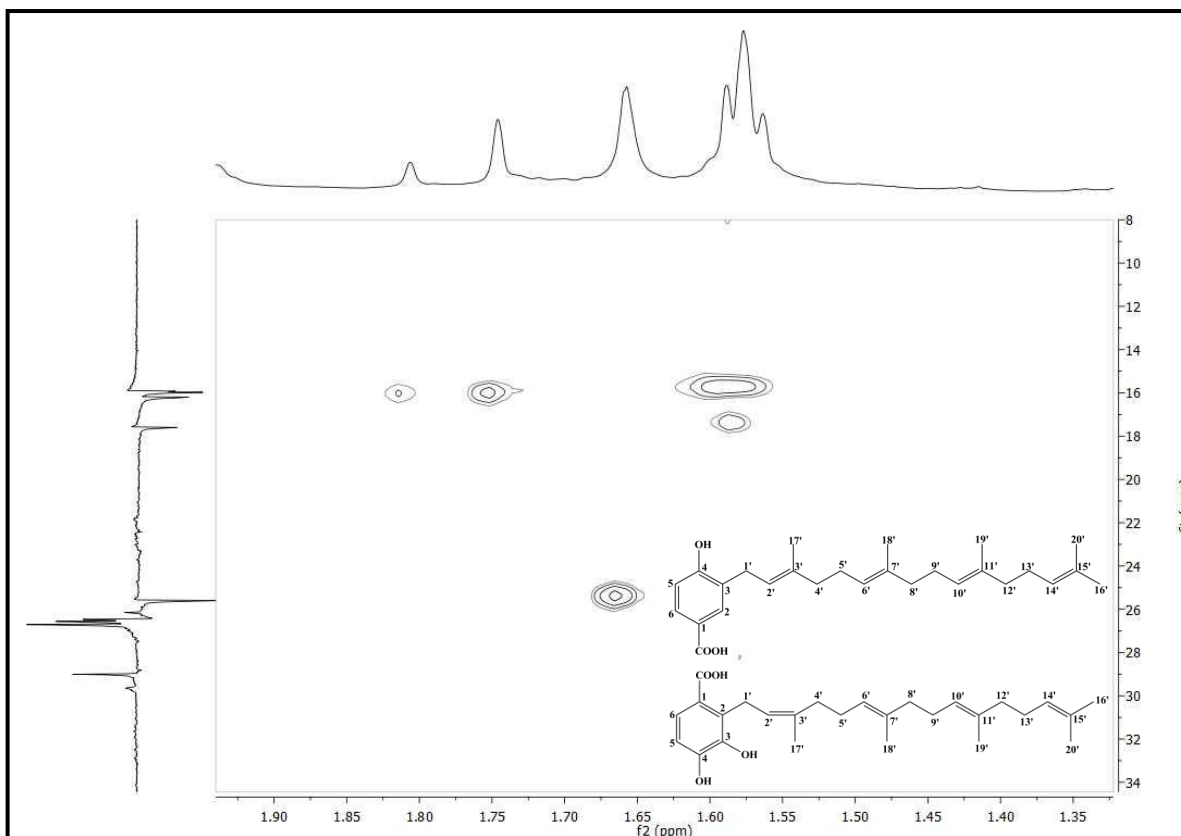


Figura 40: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,35 -1,90 e 8,0-34,0 ppm.

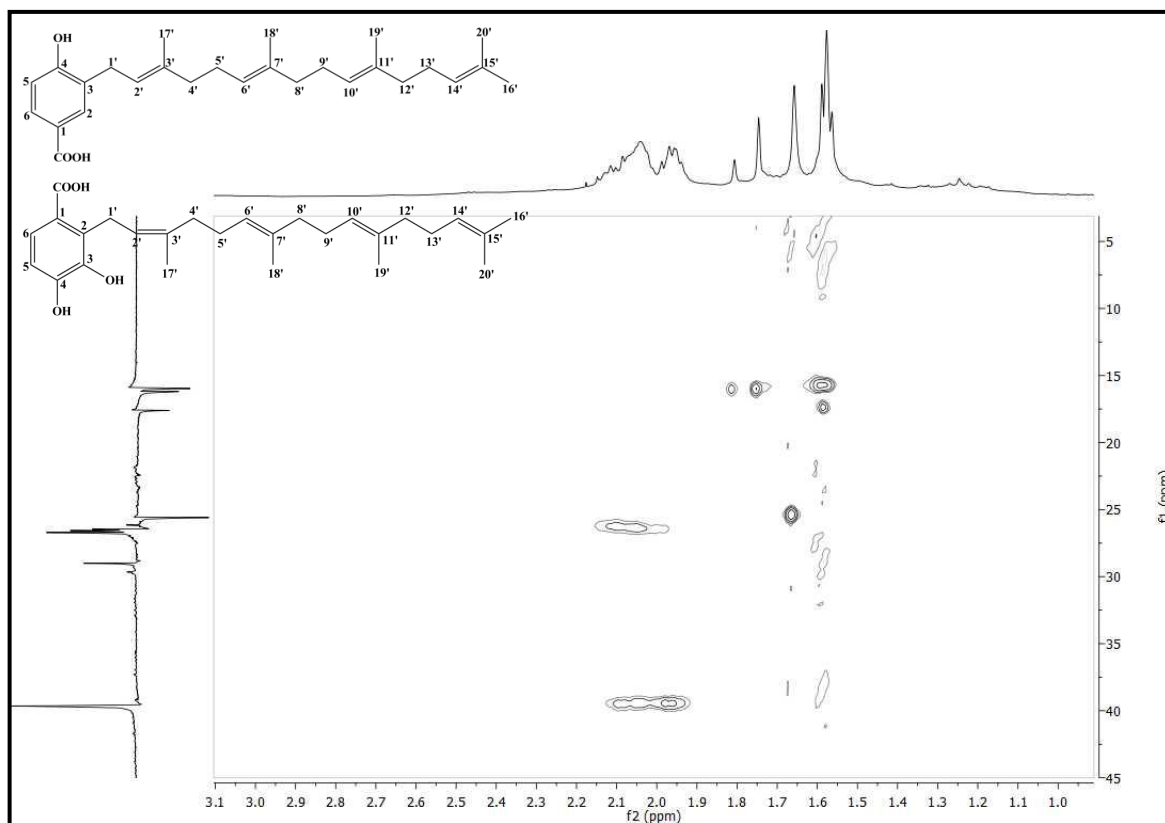


Figura 41: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,0- 3,1 e 5,0-45,0 ppm.

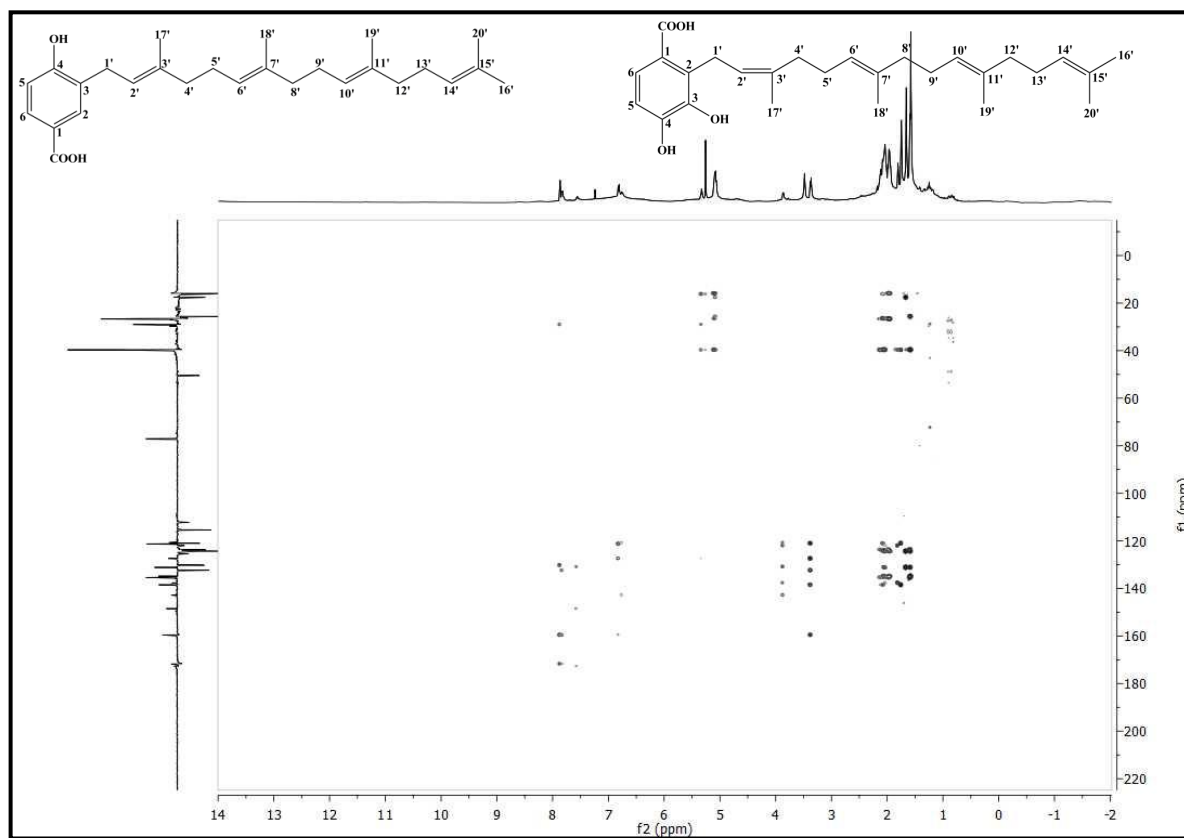


Figura 42: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4.

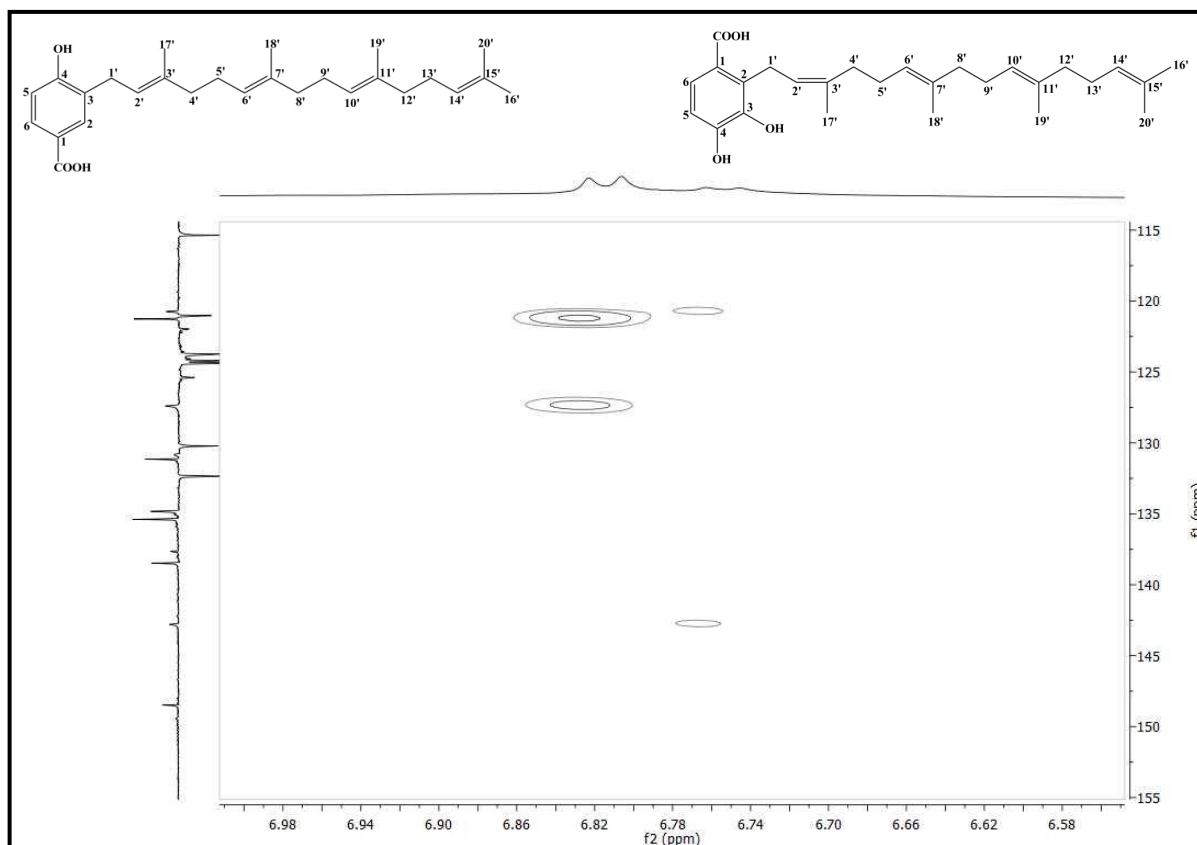


Figura 43: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 6,58-6,98 e 115,0-155,0 ppm.

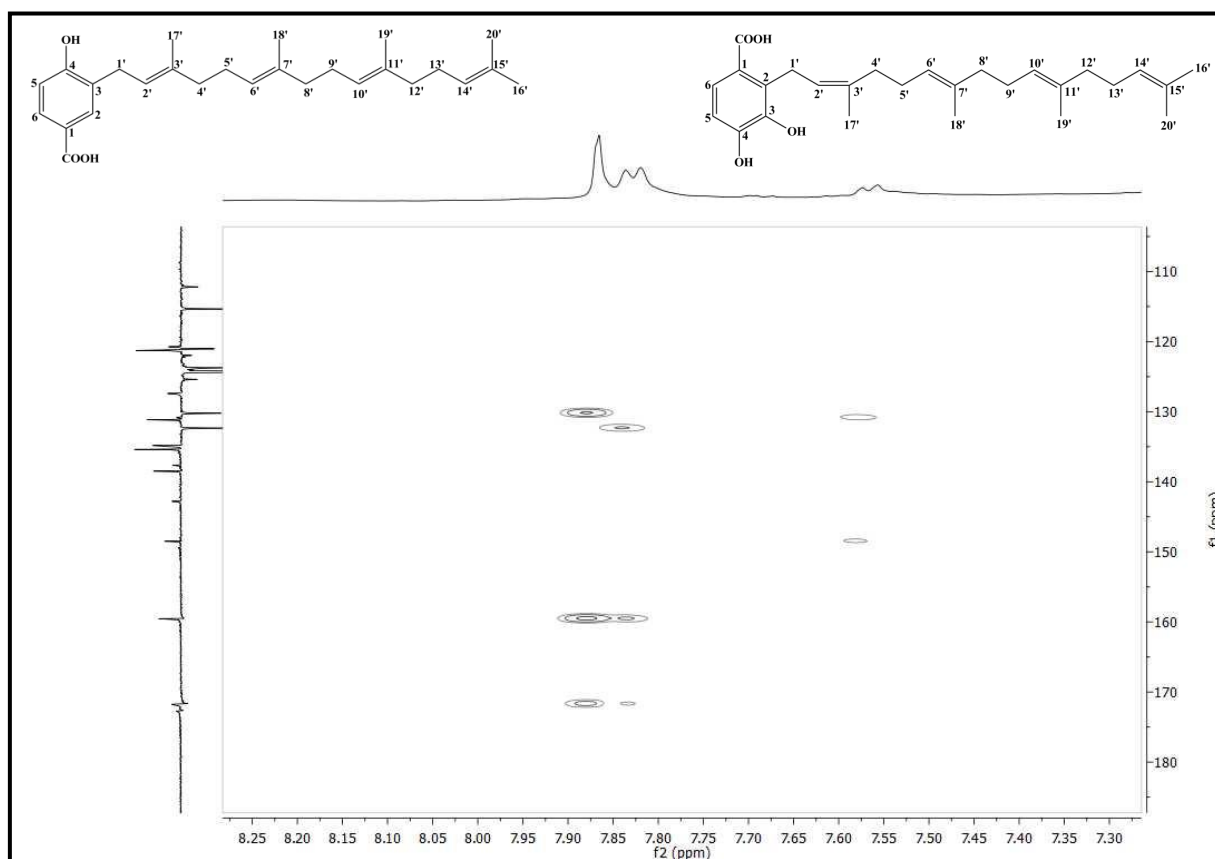


Figura 44: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 7,30-8,25 e 110,0-180,0 ppm.

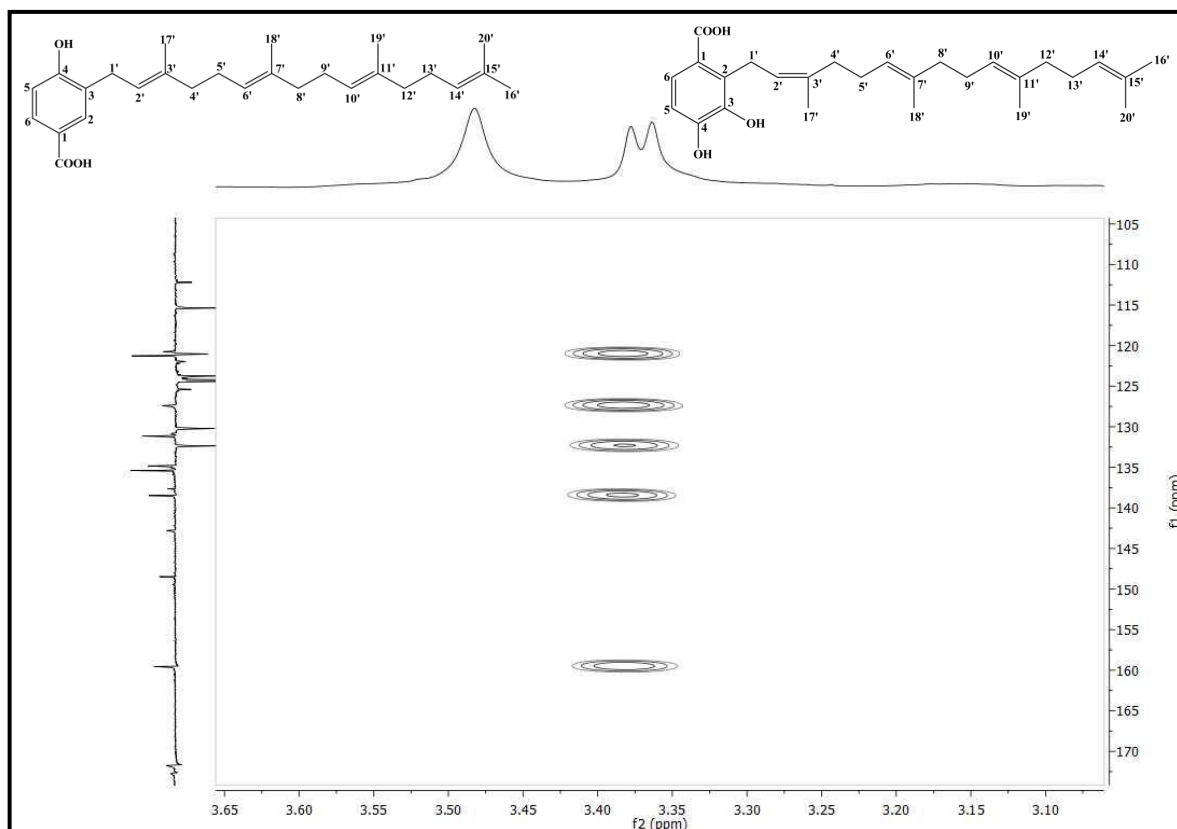


Figura 45: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 3,10-3,65 e 105,0-170,0 ppm.

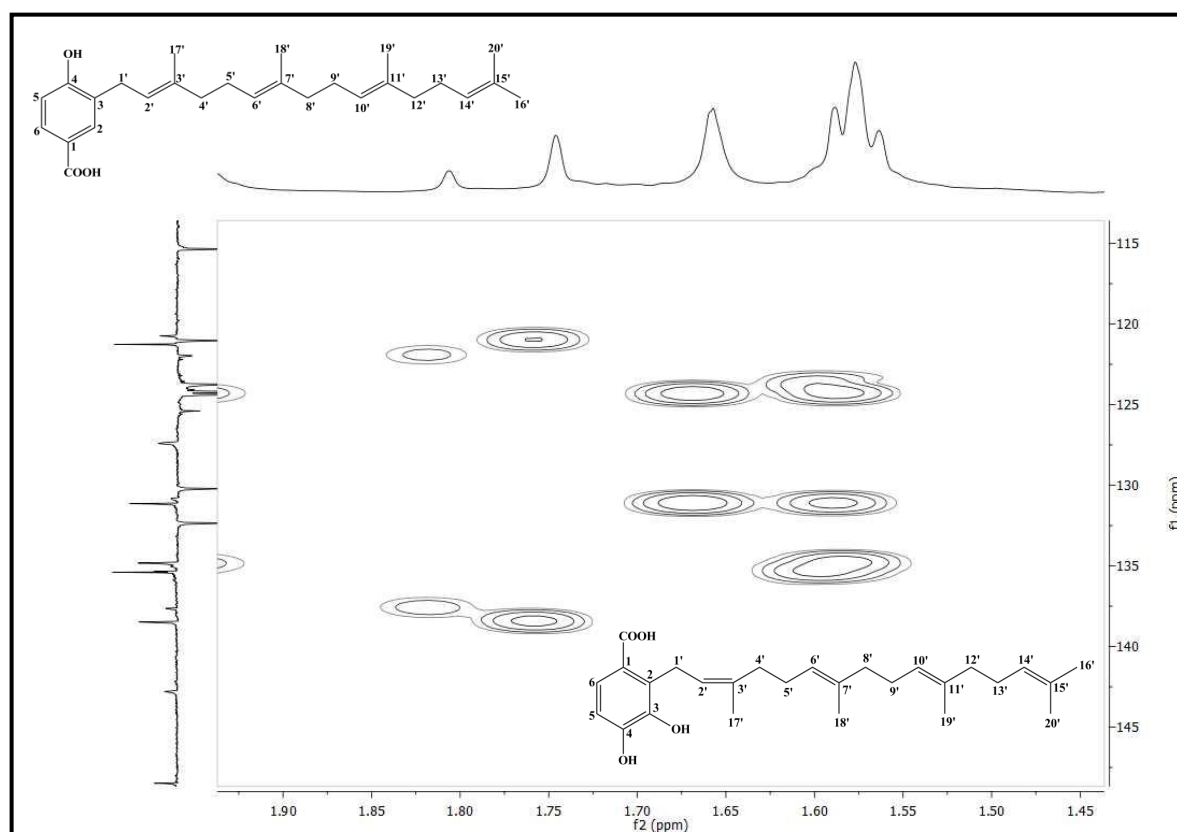


Figura 46: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,45-1,90-e 115,0-145,0 ppm.

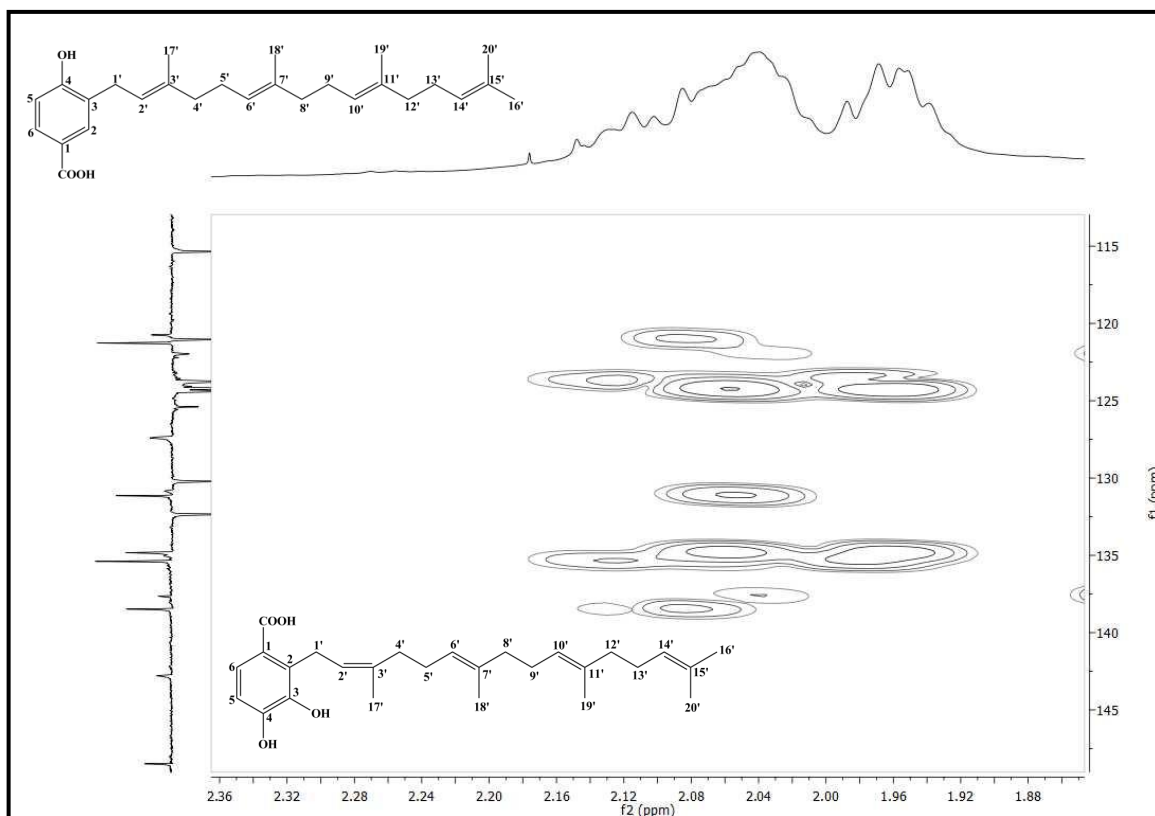


Figura 47: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,88-2,36 e 115,0-145,0 ppm.

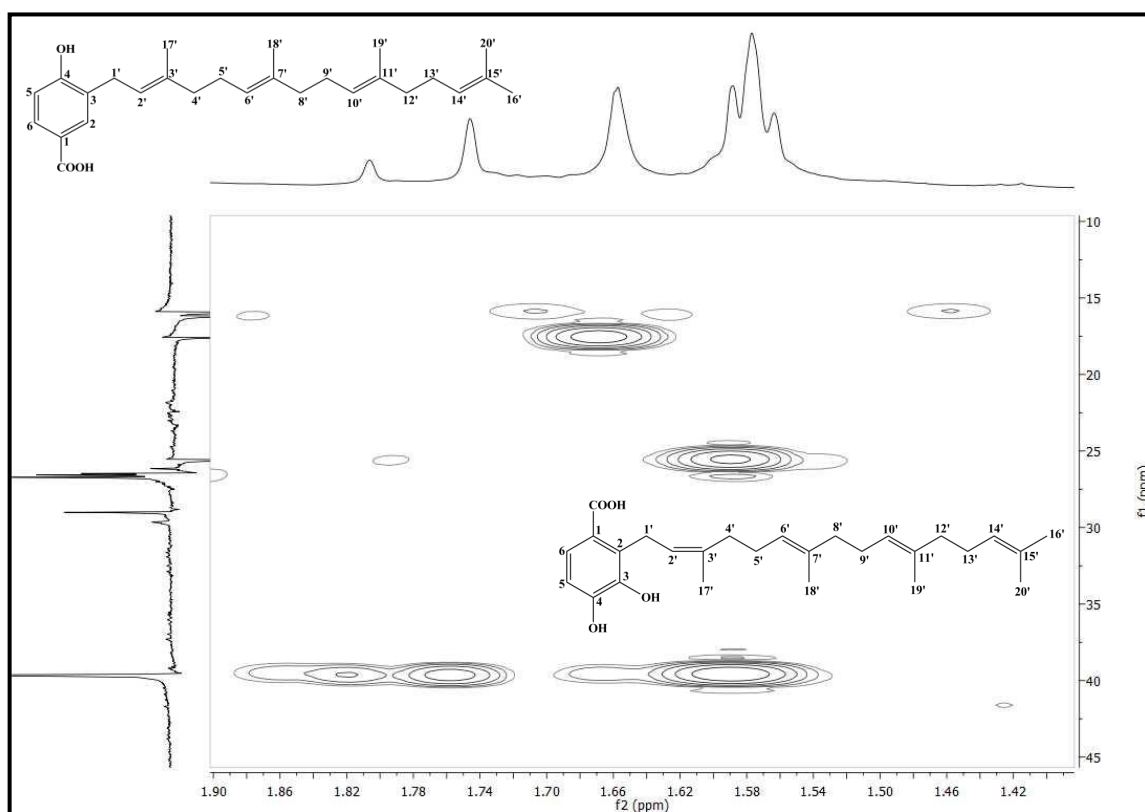


Figura 48: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,42-1,90 e 10,0-45,0 ppm.

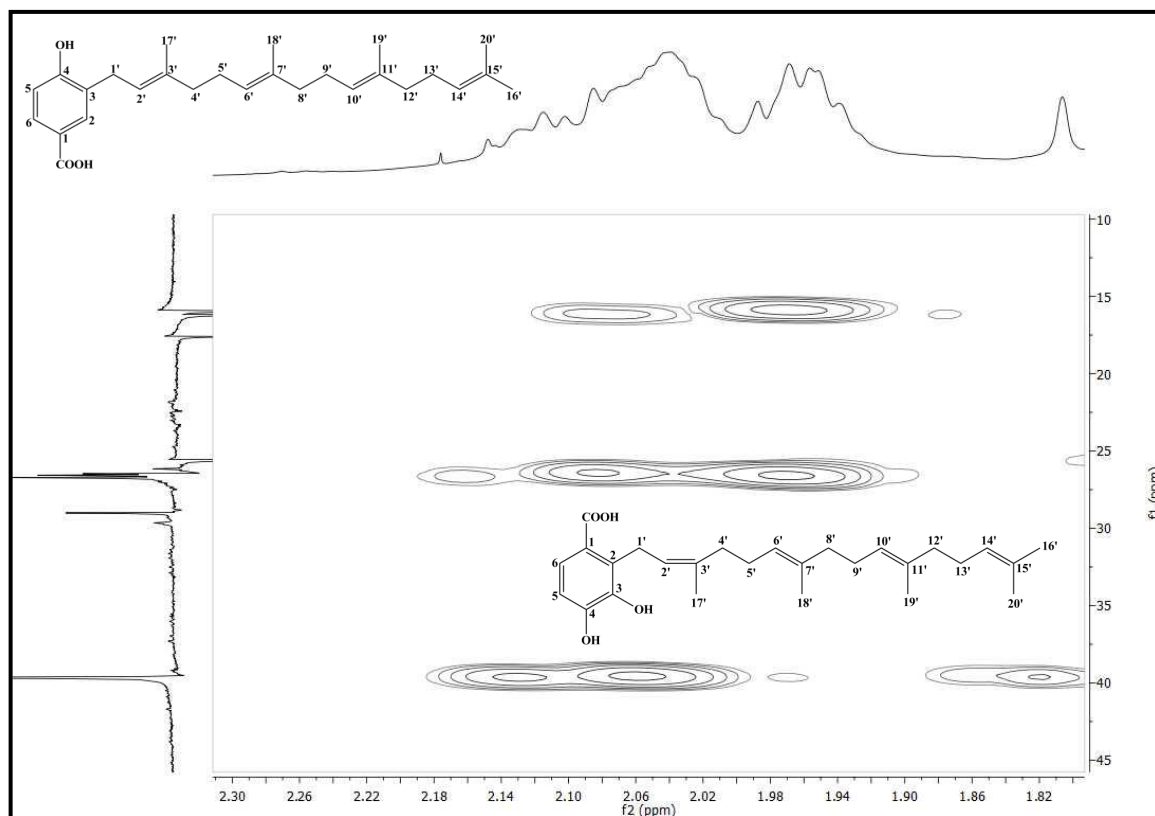


Figura 49: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-3/Pc-4 na região de 1,82-2,30 e 10,0-45,0 ppm.

5.1.4 Determinação estrutural de Pc-5

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) (Figura 52, p. 102) demonstrou dois dubletos em δ_{H} 7,44 ($J=1,5$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,41 ($J=1,5$ Hz, 1H) (Figura 53, p. 102), sugerindo um anel aromático tetrassubstituído (Figura 50, p. 96), como também quatro singletos em δ_{H} 1,55 (3H), δ_{H} 1,56 (3H), δ_{H} 1,64 (3H), δ_{H} 1,69 (3H) (Figura 54, p. 103), assinalados para metilas ligadas a carbono sp^2 . Estes sinais, ao lado de outros em: δ_{H} 5,09 (m, 2H), δ_{H} 5,30 (t, $J=7,0$ Hz, 1H) (Figura 55, p. 103) e 6,83 (t, $J=7,3$ Hz, 1H) (Figura 56, p. 104), sugerem um substituinte geranyl-geranyl na estrutura.

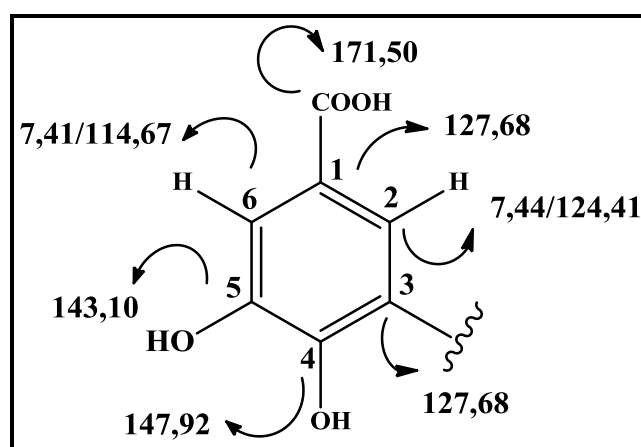


Figura 50: Anel tetrassubstituído de Pc-5.

No espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3 , 125 MHz) (Figura 57, p. 104) foi possível observar a presença de 27 sinais para carbonos, sendo nove atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_{C} : 172,85, 171,50, 147,92, 143,10, 137,06, 133,78, 132,27, 131,12 e 127,68) (Figura 58, p. 105) sendo os deslocamento em δ_{C} 172,85 e δ_{C} 171,50 sugestivos da presença de dois grupos carboxílicos na molécula, seis sinais referentes a carbonos metínicos (δ_{C} : 145,50, 125,07, 123,63, 124,41, 121,75, e 114,67) (Figura 59, p. 105), sete deslocamentos atribuídos a carbonos metilênicos (δ_{C} : 39,49, 38,28, 28,40, 27,61, 27,17, 26,77 e 26,08) (Figura 60, p. 106) e quatro sinais referentes a carbonos metílicos (δ_{C} : 25,67, 17,63, 16,04 e 15,90) (Figura 60, p. 106).

No espectro HMQC (

Figura 61, p. 106) foi possível observar a correlação do hidrogênio em δ_{H} 7,41 (H-2) com o sinal em δ_{C} 114,67 (Figura 62, p.107) e a longa distancia (HMBC) (Figura 69, p. 110) com os sinais em δ_{C} 147,92, δ_{C} 124,41 e δ_{C} 171,50 (Figura 70, p. 111), sendo possível atribuir o sinal em δ_{C} 171,50 para carbonila e sugerir os sinais em δ_{C} 147,92, δ_{C} 124,41 e δ_{C} 114,67

para as posições C-4, C-2 e C-6. Ainda no espectro HMQC observou-se a correlação δ_H 7,44 (H-6)/ δ_C 124,41 (Figura 62, p. 107) e no HMBC δ_H 7,44/ δ_C 147,92, δ_C 114,67 (Figura 70, p. 111) e δ_C 28,40 (Figura 71, p. 111) fortalecendo a proposta dos sinais em δ_C 147,92, δ_C 124,41 e δ_C 114,67 para as posições C-4, C-2 e C-6 e o sinal em δ_C 28,40 foi atribuído a posição C-1', δ_C 143,10 foi sugerido para C-5 por ser característico de carbono oxigenado. Este anel aromático é semelhante ao anel do ácido piperóico (AMPOFO et al.,1987).

No espectro de HMQC quando observada a correlação δ_H 3,33/ δ_C 28,40 (Figura 63, p. 107) aliado às correlações observadas no HMBC, deste mesmo hidrogênio com os sinais de carbono em δ_C 147,92, δ_C 124,41, δ_C 127,68, δ_C 121,79 e δ_C 137,06 (Figura 73, p. 112), foi possível atribuir o dubleto δ_H 3,33 para H-1' e os sinais de carbono δ_C 127,68, δ_C 121,79 e δ_C 137,06 para C-1, C-2' e C-3', respectivamente, assim com também confirmar δ_C 147,92 para C-4 e δ_C 124,41 para C-5.

Ao observar as correlações no espectro de HMQC: δ_H 1,69/ δ_C 16,04 (Figura 64, p. 108) e δ_H 5,30/ δ_C 121,75 (Figura 67, p. 109) e no espectro de HMBC δ_H 1,69/ δ_C 39,49 (Figura 75, p. 113), δ_C 121,79 e δ_C 137,06 (Figura 74, p. 113) e δ_H 5,30/ δ_C 16,04, δ_C 39,49 (Figura 76, p. 114) e δ_C 121,75 (Figura 67, p. 109) podemos inferir os hidrogênios δ_H 1,69 e δ_H 5,30 para as posições H-17' e H-2' e confirmar os carbonos δ_C 137,06, δ_C 121,79 para C-3' e C-2' e inferir δ_C 39,49 e δ_C 16,04 para C-4' e C-17'.

Analisando as correlações no HMQC das metilas δ_H 1,64/ δ_C 25,67, δ_H 1,56/ δ_C 15,90 e δ_H 1,55/ δ_C 17,63 (Figura 64, p. 108) e no HMBC δ_H 1,64/ δ_C 17,63 (Figura 75, p. 113), δ_C 132,27 e δ_C 123,69 (Figura 74, p. 113) e δ_H 1,56/ δ_C 133,78, δ_C 125,07 (Figura 77, p. 114) e δ_C 38,28 (Figura 78, p. 115) e δ_H 1,55/ δ_C 132,27, δ_C 123,69 (Figura 77, p. 114) e δ_C 25,67 (Figura 78, p. 115), podemos sugerir os hidrogênios δ_H 1,64, δ_H 1,56 e δ_H 1,55 para H-16', H-18' e H-20', respectivamente e os sinais de carbono δ_C 25,67, δ_C 15,90, δ_C 17,63, δ_C 132,27, δ_C 123,69, δ_C 133,78, δ_C 125,07 e δ_C 38,28 para as posições C-16', C-18', C-20', C-15', C-14', C-7', C-6' e C-8', respectivamente. E ainda quando observados correlações no HMQC: δ_H 2,15-2,00/ δ_C 39,49 e δ_C 38,28 (Figura 65, p. 108) e δ_H 5,09/ δ_C 125,07 e δ_C 123,69 (Figura 66, p. 109), podemos assinalar os hidrogênios δ_H 2,15-2,00 para H-4' e H-8' e δ_H 5,09 para H-6' e H-14'.

O sinal de hidrogênio em δ_H 6,83 apresenta correlação direta com o sinal de carbono em δ_C 145,50 (Figura 67, p. 109) e a longa distância com os sinais de carbono em δ_C 172,50 (Figura 72, p. 112), δ_C 26,77 e δ_C 38,28 (Figura 71, p. 111) permitindo definir δ_C 145,50, δ_C

172,50, e δ_C 38,28 para as posições C-10', C-19' e C-8' e sugerir δ_C 26,77 para C-9', assim como definir δ_H 6,83 para H-10'.

O multipletto δ_H 2,35-2,20 apresenta correlação no HMQC com os carbonos δ_C 26,77 e δ_C 27,17 (Figura 68, p. 110) e no HMBC com os carbonos δ_C 145,50, δ_C 133,78, δ_C 131,12 e δ_C 123,63 (Figura 79, p. 116) permitindo assinalar δ_H 2,35-2,20 para H-9' e H-12' e, portanto, os δ_C 26,77 e δ_C 27,17 para estas posições.

Ainda no espectro HMQC observou as correlações δ_H 2,00-2,15/ δ_C 39,49, δ_C 38,28, δ_C 27,61 e δ_C 26,09 (Figura 68, p. 110) e no HMBC δ_H 2,00-2,15/ δ_C 145,50, δ_C 131,12, δ_C 125,07, δ_C 123,63 (Figura 79, p. 116) e δ_C 26,08 sendo possível atribuir o multipletto δ_H 2,15-2,00 para os H-4', H-5', H-8' e H-13' e definir os δ_C 39,49, δ_C 38,28, δ_C 27,61 e δ_C 26,09 para as posições C-4', C-8', C-13' e C-5'.

A compilação dos dados espectrais uni e bidimensionais (RMN 1H , RMN ^{13}C , $^1H \times ^{13}C$ -HMQC e $^1H \times ^{13}C$ -HMBC) (Tabela 7, p. 99) de Pc-5 aliado a comparações com dados da literatura (KATO, et al., 2009, CHAVES & ALVES, 2010) (Tabela 7 e 9, p. 99 e 100) nos permitiu propor que a substância codificada como Pc-5 trata-se de um derivado prenilado do ácido benzoico, denominado de ácido 4,5-dihidroxi-3-((2E,6E,10E)-11-carboxi-3',7',15'-trimetilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico, conhecido na literatura como ácido caldensínico (Figura 51, p. 98), que está sendo isolado pela primeira vez nos frutos de *Piper caldense* C. DC, tendo sido isolado nesta espécie nas folhas (KATO, 2009) o qual apresentou intensa atividade contra as espécies fúngicas patogênicas *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (KATO et al., 2009) e nas partes aéreas de *Piper carniconectivum* (CHAVES, et al., 2010).

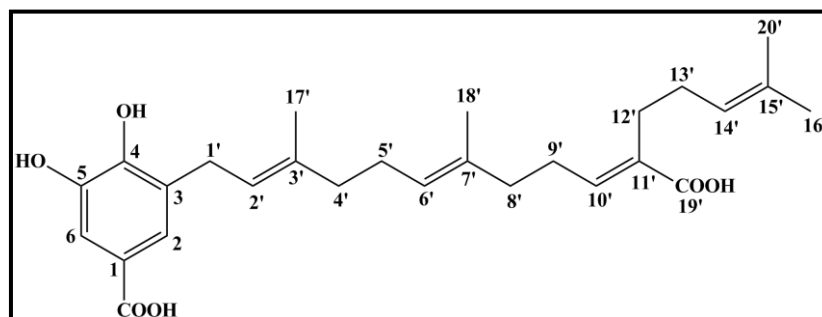


Figura 51: Estrutura química de Pc-5.

Tabela 7: Dados espectrais de HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5.

Posição	HMQC		HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}	^2j	^3j
1	-	127,68	-	-
2	7,44 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	124,41	-	C-4, C-6 e C-1'
3	-	127,68	-	-
4	-	147,92	-	-
5	-	143,10	-	-
6	7,41 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	114,67	-	C-2, C-4 e C=O
1'	3,33 (d, $J=6,5$ Hz, 2H)	28,40	C-3 e C-2'	C-2, C-4 e C-3'
2'	5,30 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	121,75	-	C-4' e C-17'
3'	-	137,06	-	-
4'	2,00-2,15 (m, 2H)	39,49	C-5'	C-6'
5'	2,00-2,15 (m, 2H)	26,09	-	-
6'	5,09 (m, 1H)	125,07	-	C-8' e C-18'
7'	-	133,78	-	-
8'	2,00-2,15 (m, 2H)	38,28	-	C-6' e C-10'
9'	2,20-2,25 (m, 2H)	26,77	C-10'	C-7', C-11'
10'	6,83 (t, $J=7,3$ Hz, 1H)	145,50	C-9'	C-8' e C-19'
11'	-	131,12	-	-
12'	2,20-2,35 (m, 2H)	27,17	-	C-10' e C-14'
13'	2,00-2,15 (m, 2H)	27,61	C-14'	C-11' e C-15'
14'	5,09 (m, 1H)	123,63	-	C-16' e C-20'
15'	-	132,27	-	-
16'	1,64 (s, 3H)	25,67	C-15'	C-14', C-20'
17'	1,69 (s, 3H)	16,04	C-3'	C-2', C-4'
18'	1,56 (s, 3H)	15,90	-	-
19'	-	172,85	-	-
20'	1,55 (s, 3H)	17,63	C-15'	C-14' e C-16'
COOH	-	171,50	-	-

Tabela 8: Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 500/150 MHz) de Pc-5 com modelo encontrado na literatura (KATO, et al., 2009, CD_3OD , 500/150 MHz).

Posição	Pc-5		Literatura	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	127,68	-	122,40
2	7,44 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	124,41	7,35 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	124,30
3	-	127,68	-	129,20
4	-	147,92	-	149,50
5	-	143,10	-	146,60
6	7,41 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	114,67	7,31 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	115,20
1'	3,33 (d, $J=6,5$ Hz, 2H)	28,40	3,32 (d, $J=7,5$ Hz, 2H)	29,10
2'	5,30 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	121,75	5,33 (t, $J=7,5$ Hz, 1H)	123,90
3'	-	137,06	-	137,10
4'	2,00-2,15 (m, 2H)	39,49	2,04-2,08 (m, 2H)	40,90
5'	2,00-2,15 (m, 2H)	26,09	2,12-2,15 (m, 2H)	27,70
6'	5,09 (m, 1H)	125,07	5,17 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	126,40
7'	-	133,78	-	135,30
8'	2,00-2,15 (m, 2H)	38,28	2,04-2,08 (m, 2H)	39,80
9'	2,20-2,25 (m, 2H)	26,77	2,21-2,28 (m, 2H)	28,00
10'	6,83 (t, $J=7,3$, 1H)	145,50	6,73 (t, $J=7,5$ Hz, 1H)	144,30
11'	-	131,12	-	133,30
12'	2,20-2,35 (m, 2H)	27,17	2,21-2,28 (m, 2H)	28,60
13'	2,00-2,15 (m, 2H)	27,61	2,04-2,08 (m, 2H)	28,90
14'	5,09 (m, 1H)	123,69	5,10 (t, $J=7,5$ Hz, 1H)	125,10
15'	-	132,27	-	131,30
16'	1,64 (s, 3H)	25,67	1,65 (s, 3H)	26,10
17'	1,69 (s, 3H)	16,04	1,72 (s, 3H)	16,30
18'	1,56 (s, 3H)	15,90	1,61 (s, 3H)	16,40
19'	-	172,85	-	171,80
20'	1,55 (s, 3H)	17,63	1,57 (s, 3H)	17,90
COOH	-	171,50	-	170,90

Tabela 9: Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 500/150 MHz) de Pc-5 com modelo encontrado na literatura (CHAVES, et al., 2010, piridina d5, 500/150 MHz).

Posição	Pc-5		Literatura	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	127,68	-	123,30
2	7,44 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	124,41	8,19 (d, $J=1,7$ Hz, 1H)	124,10
3	-	127,68	-	129,40
4	-	147,92	-	150,30
5	-	143,10	-	146,60
6	7,41 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	114,67	8,23 (d, $J=1,7$ Hz, 1H)	115,90
1'	3,33 (d, $J=6,5$ Hz, 2H)	28,40	3,85 (d, $J=7,2$ Hz, 2H)	29,50
2'	5,30 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	121,75	5,81 (t, $J=7,2$ Hz, 1H)	123,80
3'	-	137,06	-	136,40
4'	2,00-2,15 (m, 2H)	39,49	2,15 (m, 2H)	40,40
5'	2,00-2,15 (m, 2H)	26,09	2,20 (m, 4H)	27,40
6'	5,09 (m, 1H)	125,07	5,34 (brq, $J=5,5$ Hz, 2H)	125,80
7'	-	133,78	-	134,80
8'	2,00-2,15 (m, 2H)	38,28	2,20 (m, 4H)	39,40
9'	2,20-2,25 (m, 2H)	26,77	2,44-2,40 (m, 4H)	28,80
10'	6,83 (t, $J=7,3$, 1H)	145,50	7,21 (t, $J=7,3$ Hz, 1H)	142,40
11'	-	131,12	-	133,80
12'	2,20-2,35 (m, 2H)	27,17	2,67 (brt, $J=7,7$ Hz, 2H)	28,10
13'	2,00-2,15 (m, 2H)	27,61	2,44-2,40 (m, 4H)	28,10
14'	5,09 (m, 1H)	123,69	5,34 (brq, $J=5,5$ Hz, 2H)	125,10
15'	-	132,27	-	132,30
16'	1,64 (s, 3H)	25,67	1,69 (s, 3H)	26,20
17'	1,69 (s, 3H)	16,04	1,84 (s, 3H)	16,70
18'	1,56 (s, 3H)	15,90	1,65 (s, 6H)	16,40
19'	-	172,85	-	170,70
20'	1,55 (s, 3H)	17,63	1,65 (s, 6H)	18,10
COOH	-	171,50	-	169,90

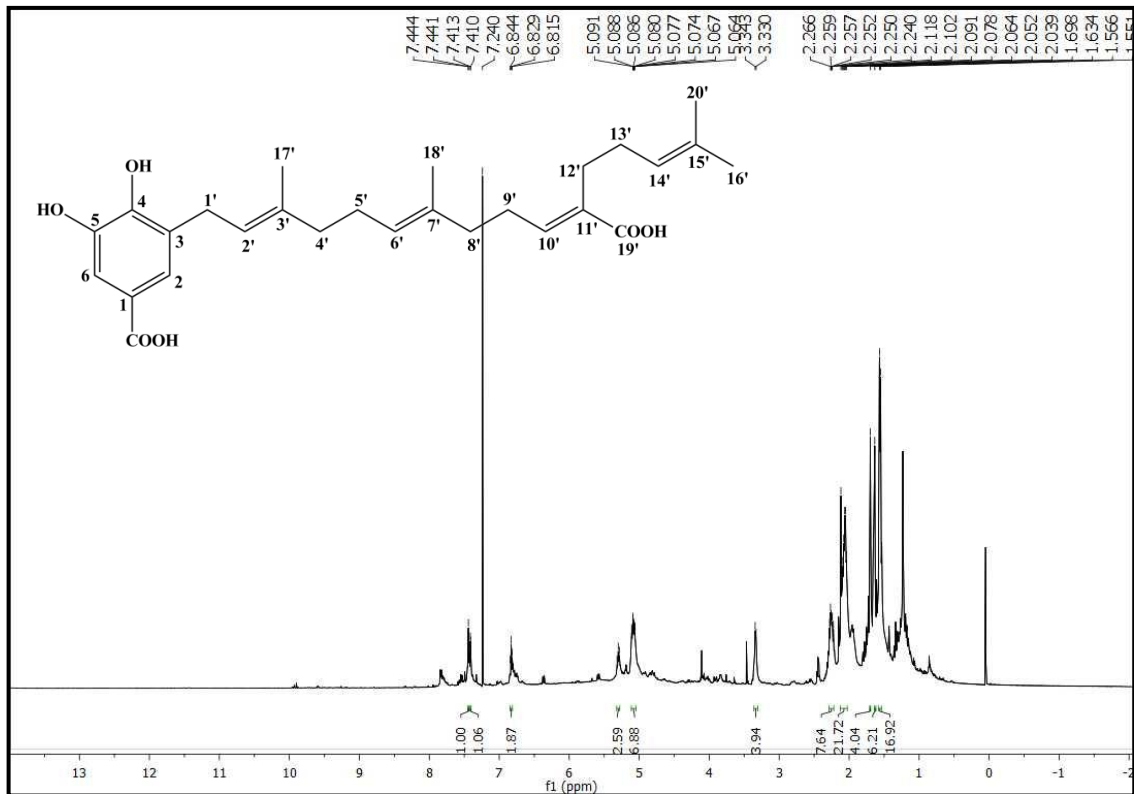


Figura 52: Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5.

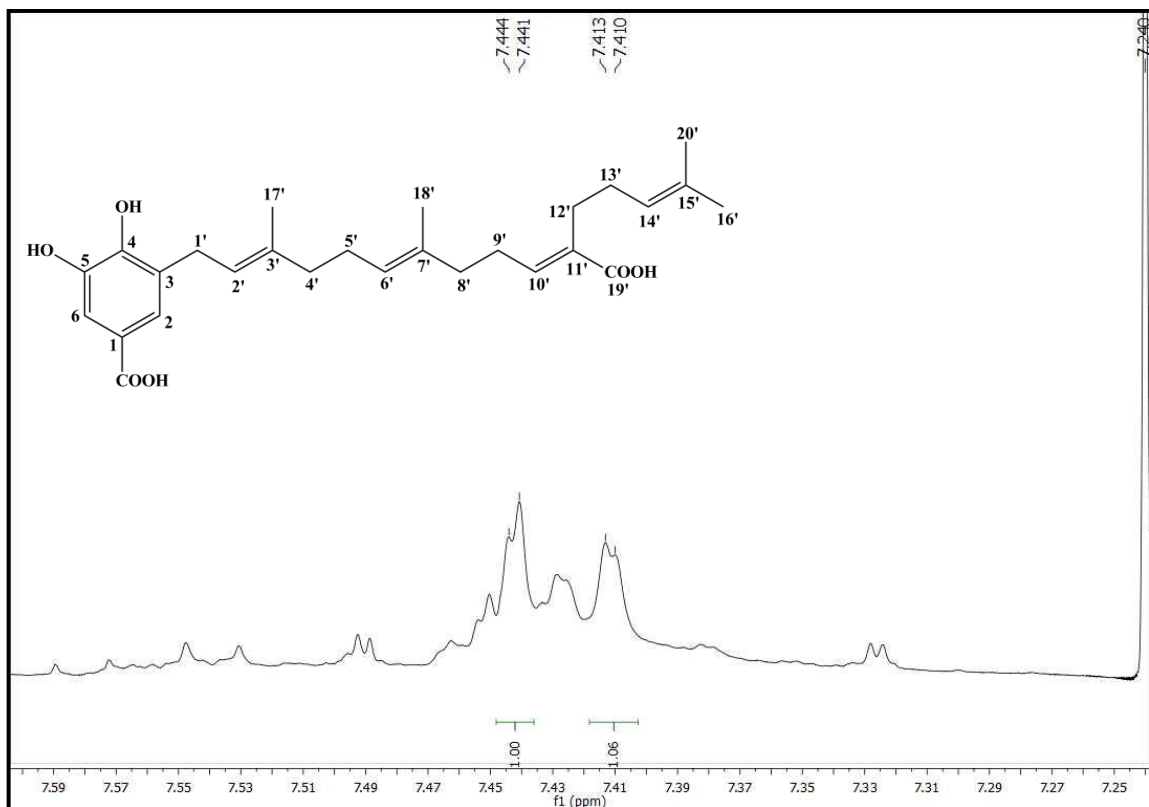


Figura 53: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5 na região de 7,25-8,00 ppm.

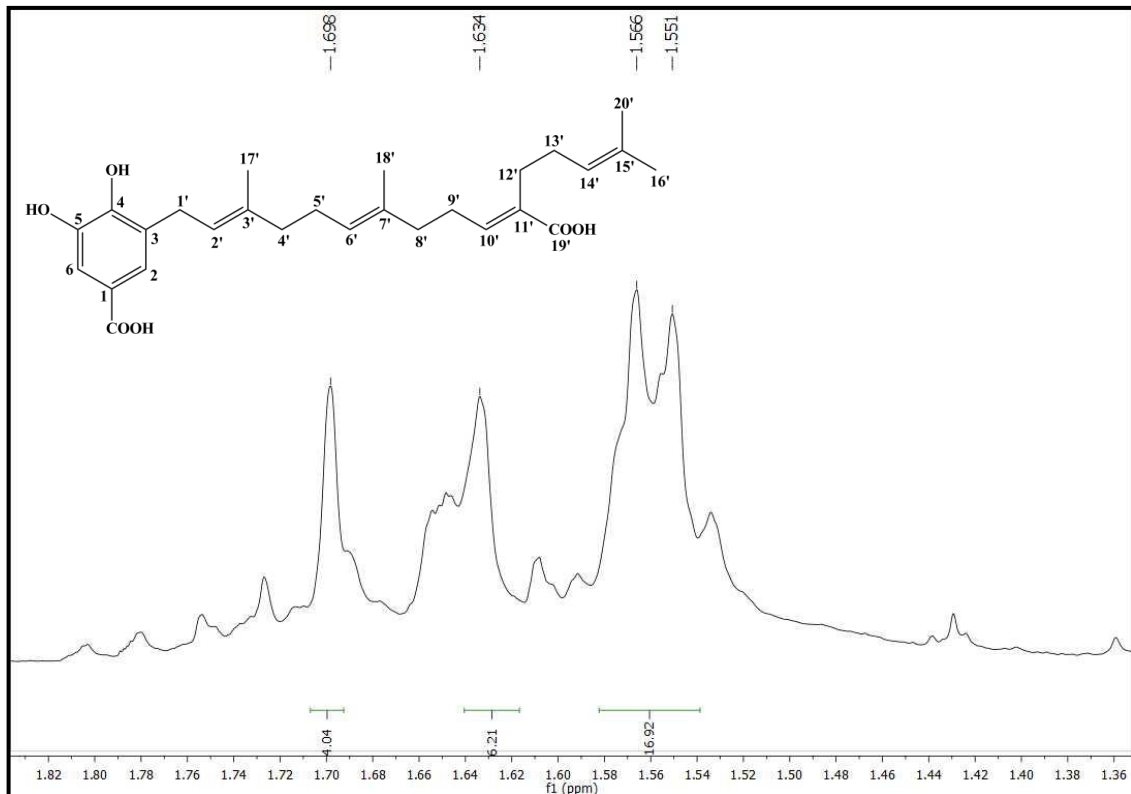


Figura 54: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5 na região de 1,36-1,82 ppm.

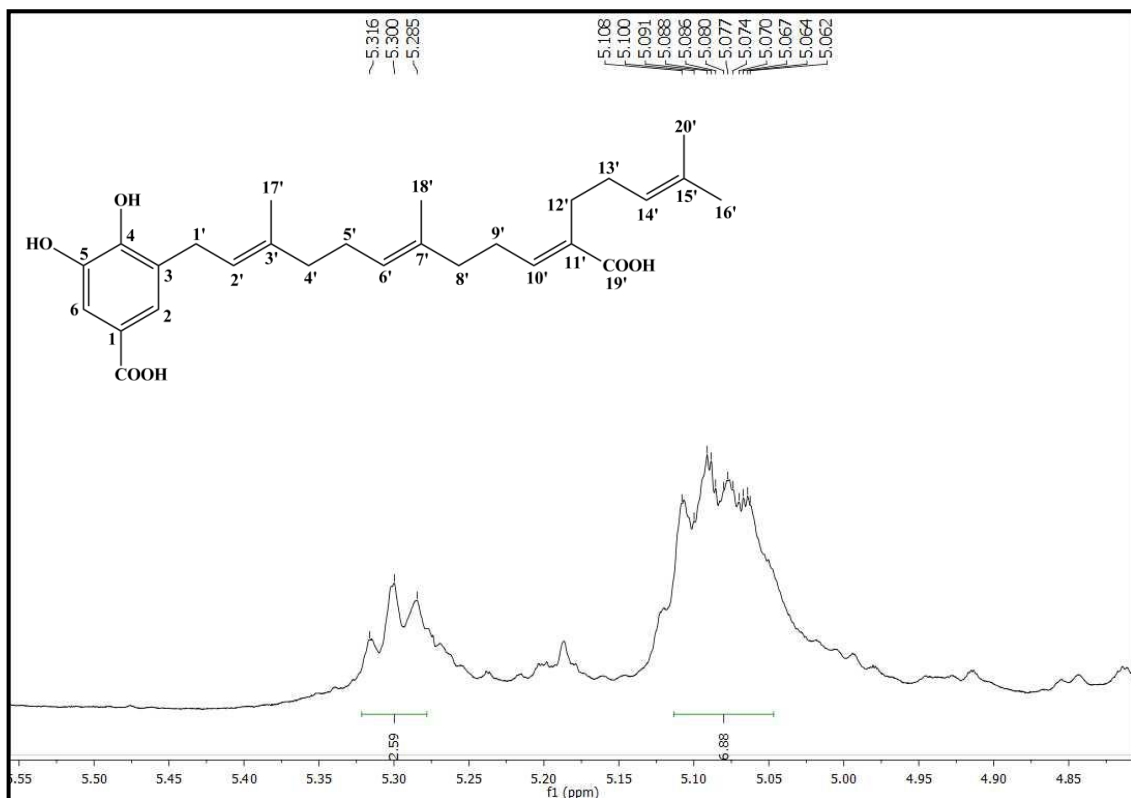


Figura 55: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5 na região de 4,85-5,50 ppm.

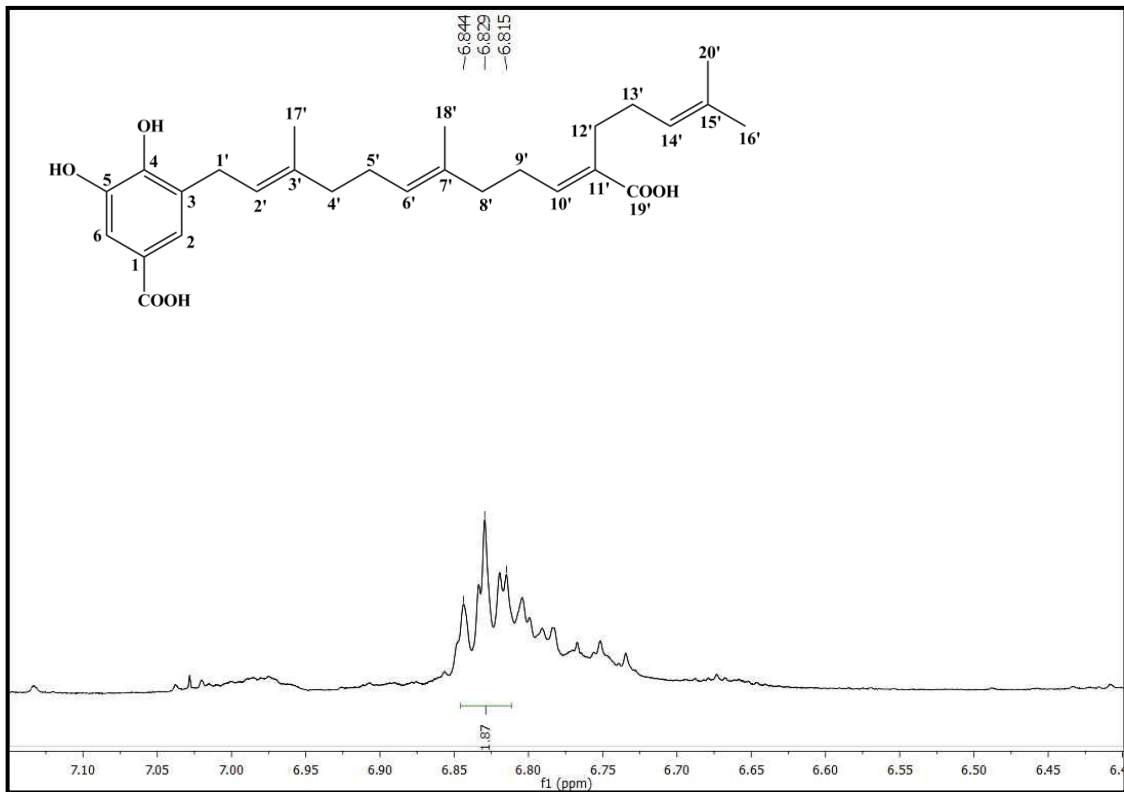


Figura 56: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pc-5 na região de 7,80-6,55 ppm.

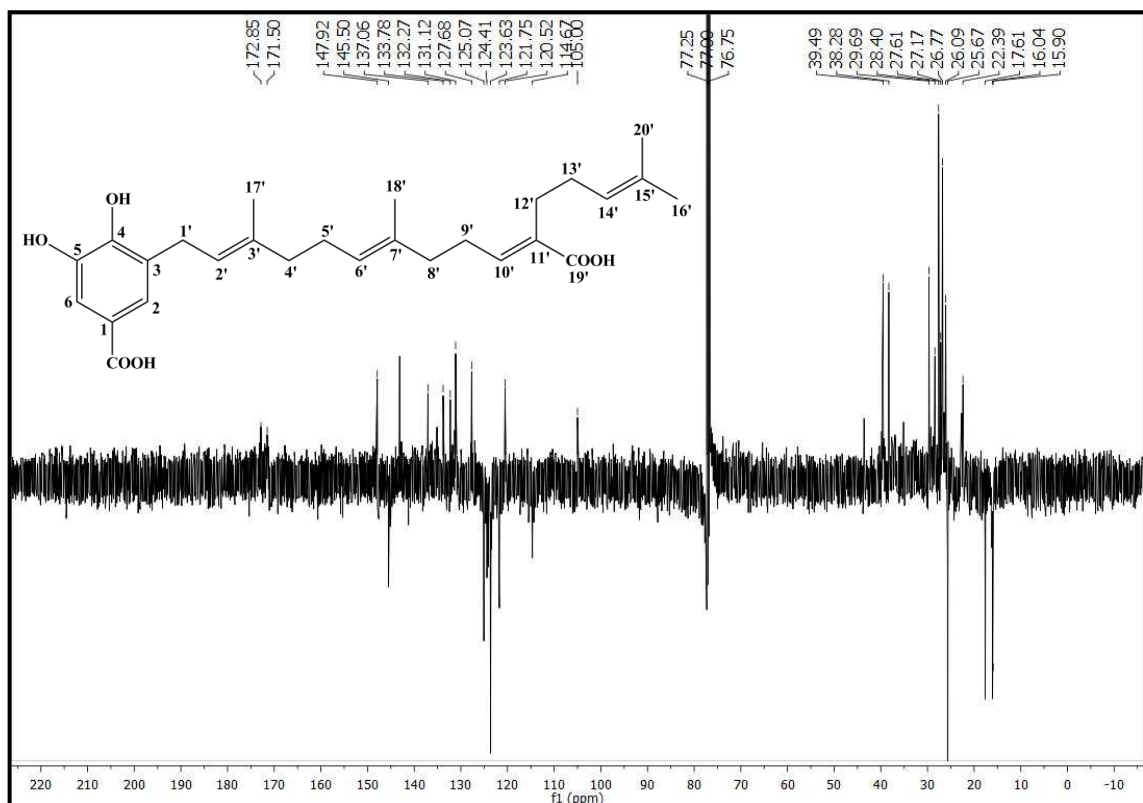


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-5.

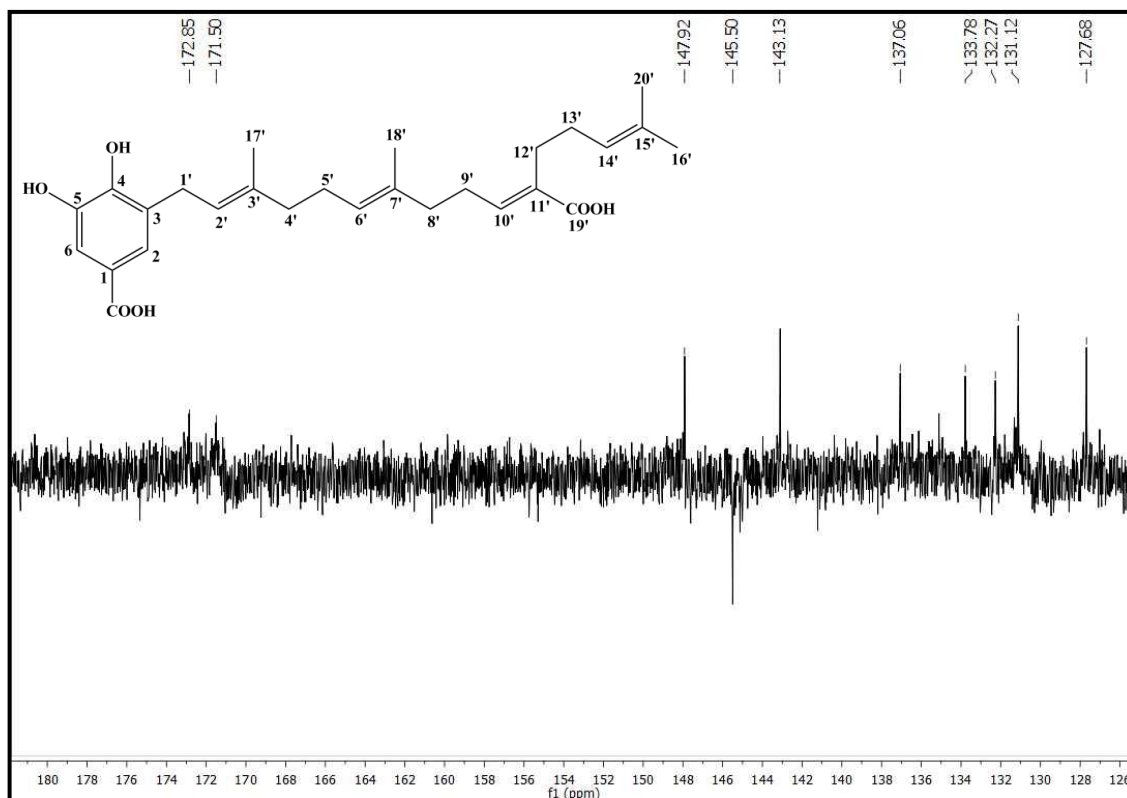


Figura 58: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-5 na região de 126,0-180,0 ppm.

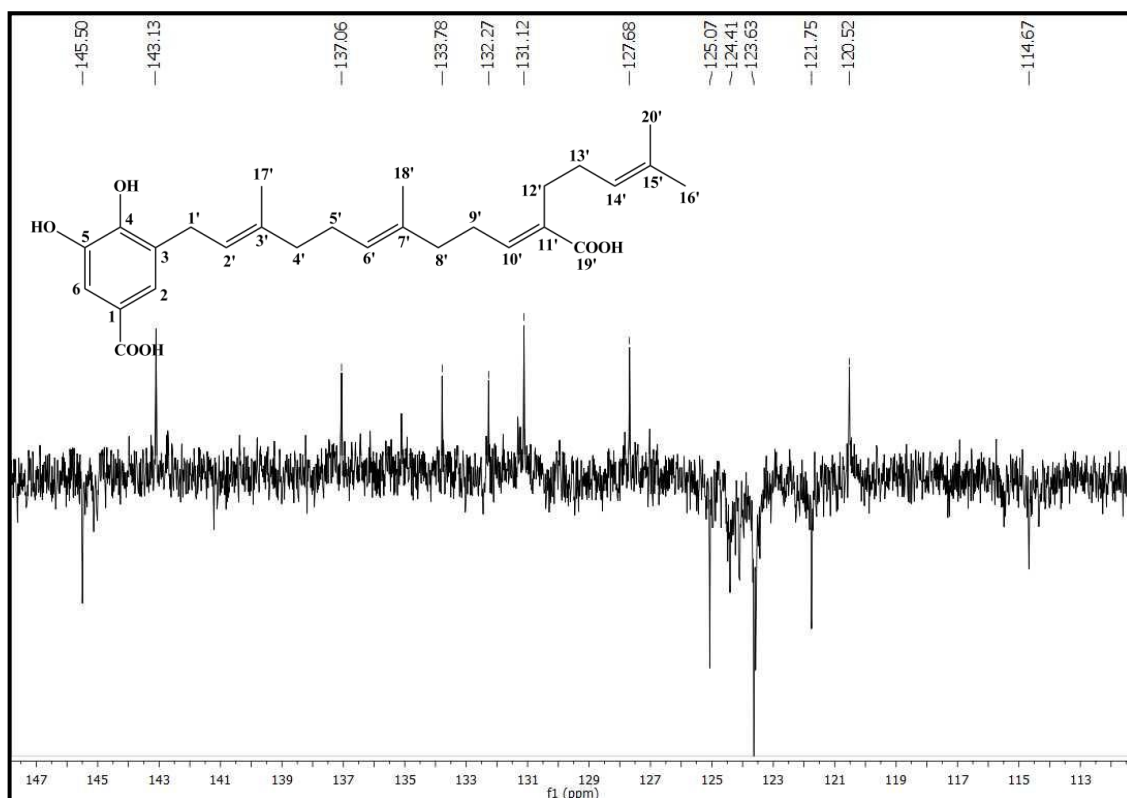


Figura 59: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-5 na região de 113,0-147,0 ppm.

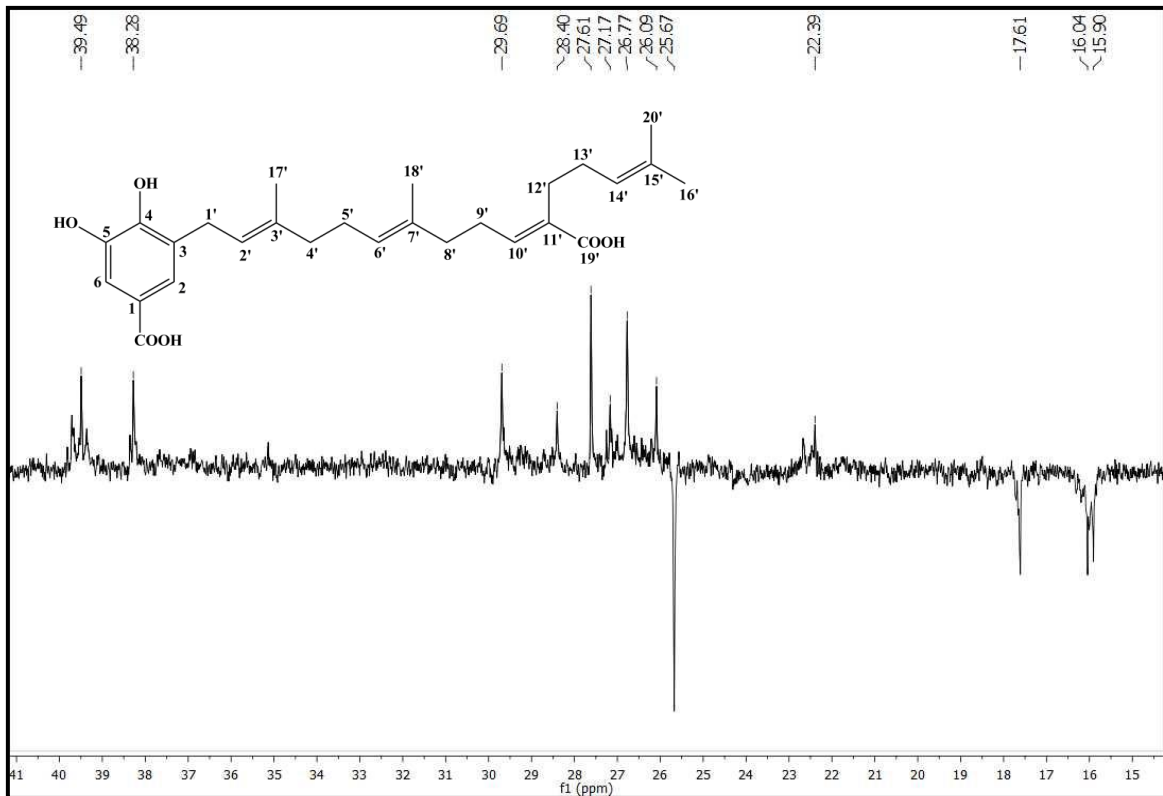


Figura 60: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pc-5 na região de 15,0-40,0 ppm.

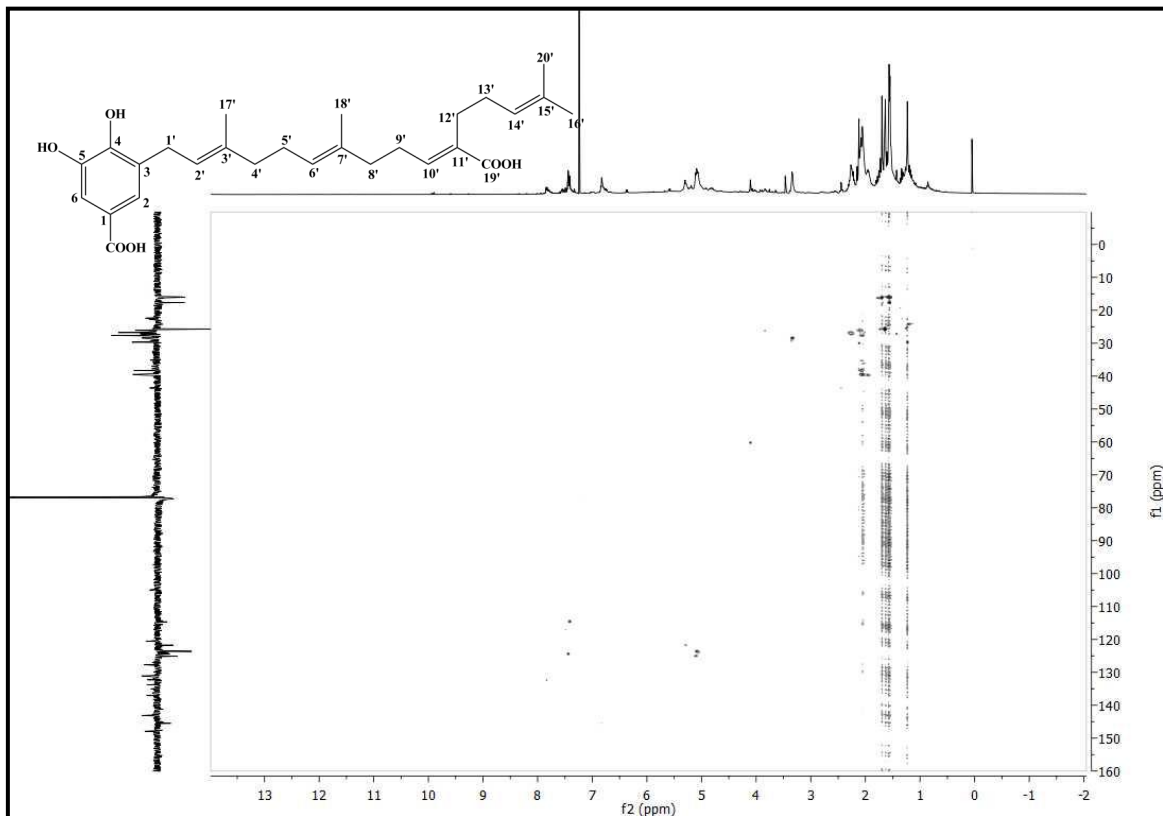


Figura 61: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de Pc-5.

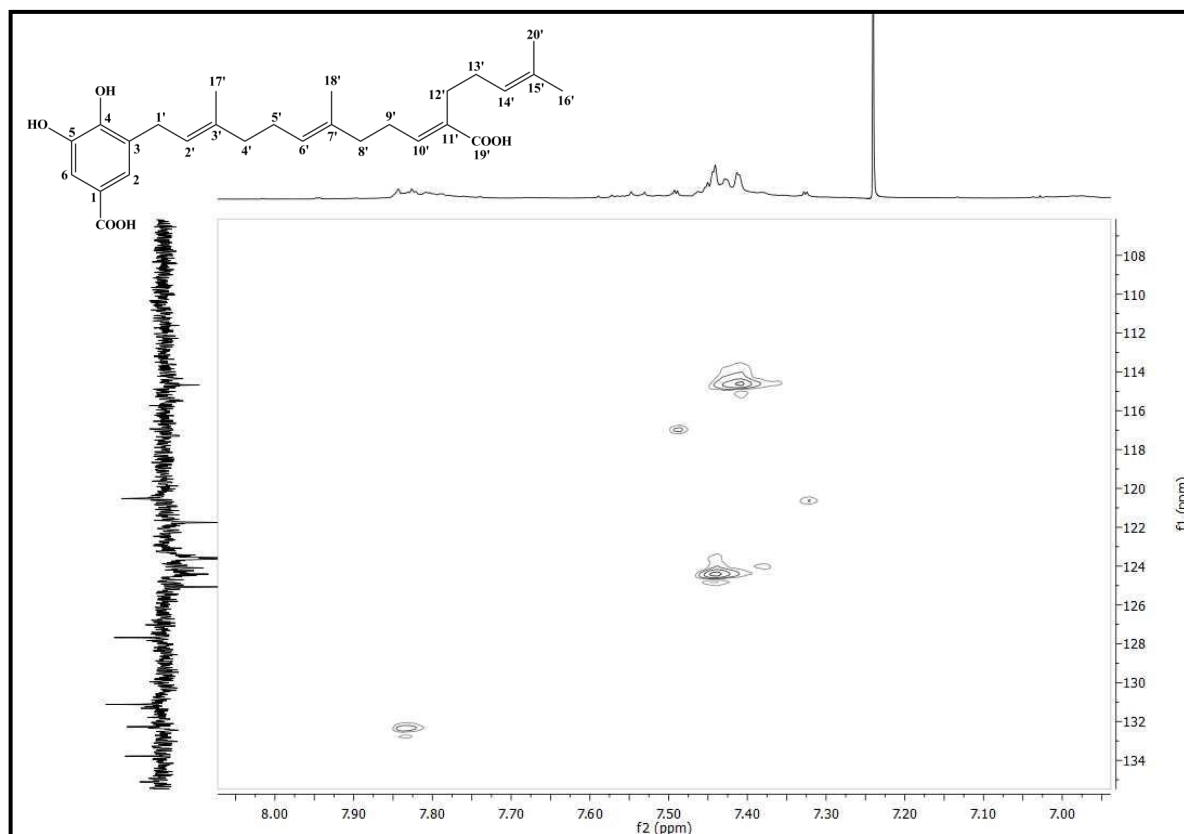


Figura 62: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 8,0-7,0 e 134,0-108,0 ppm.

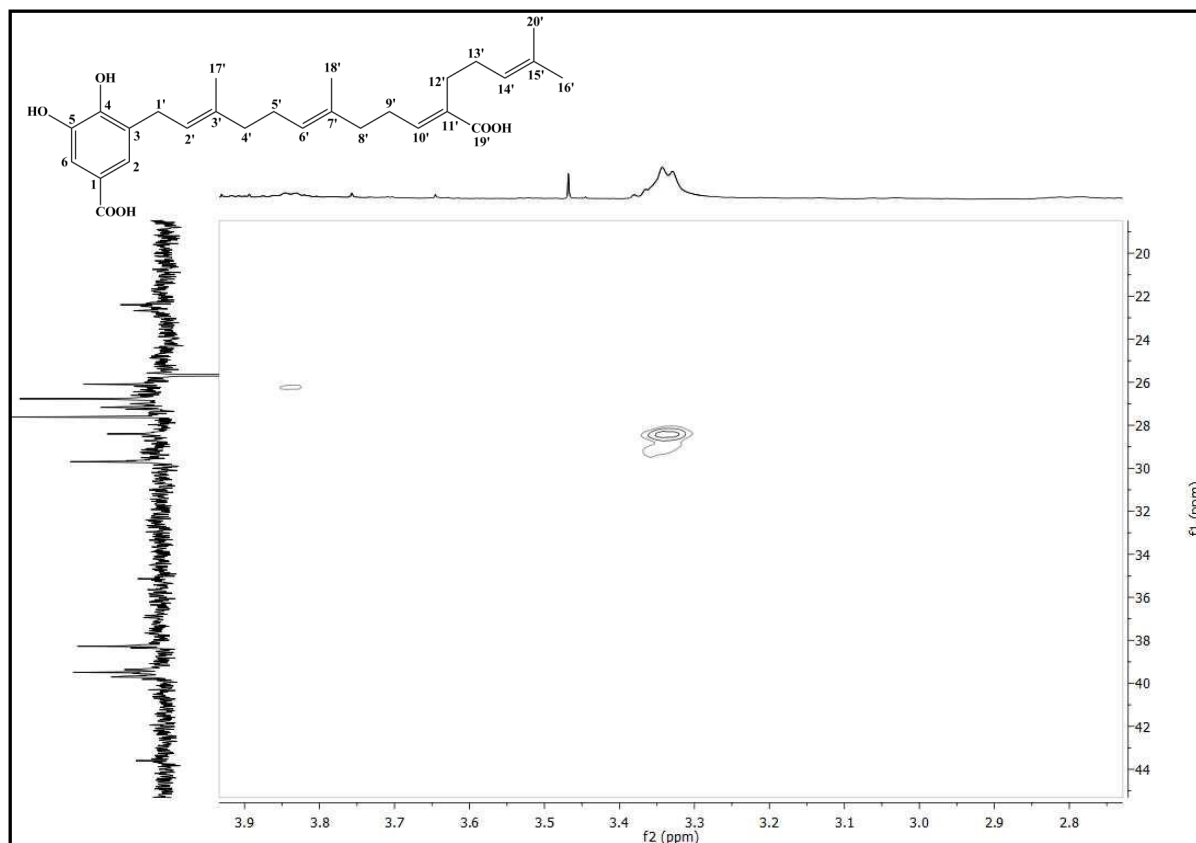


Figura 63: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 3,9-2,8 e 44,0-20,0 ppm.

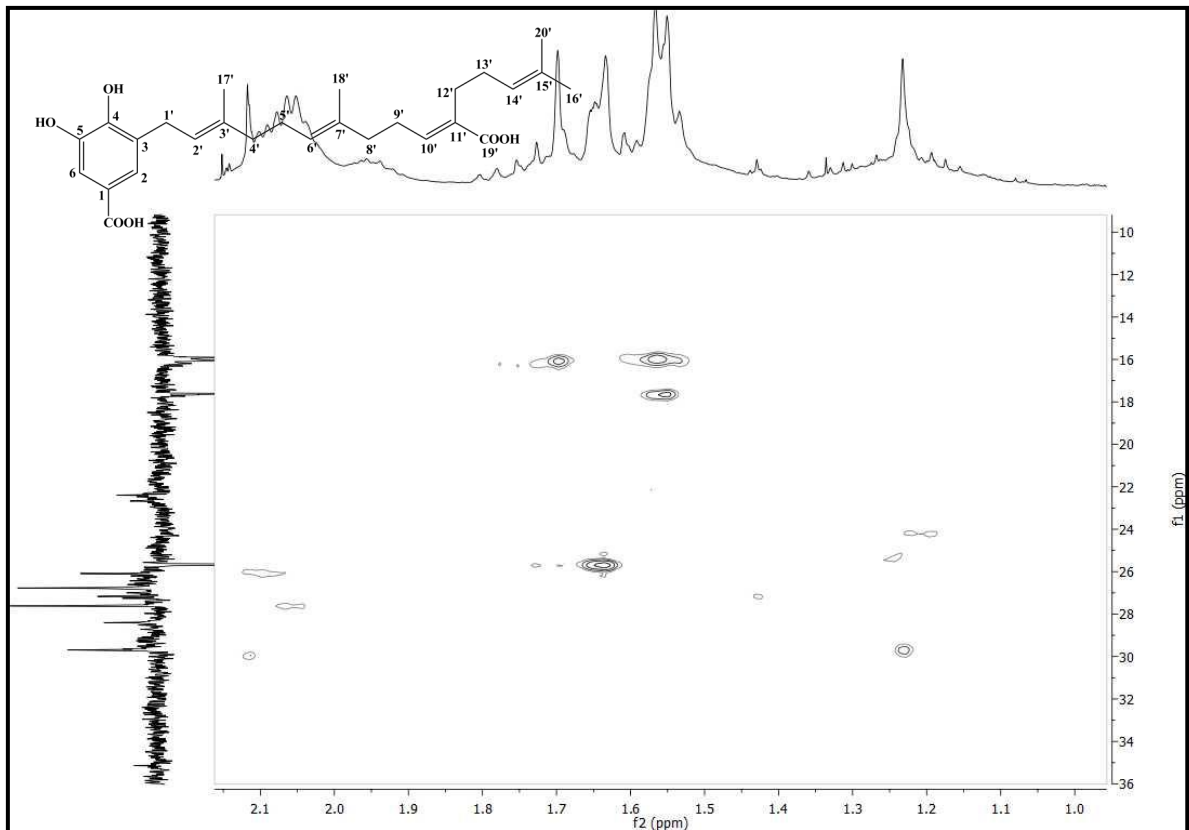


Figura 64: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 2,1-1,0 e 36,0-10,0 ppm.

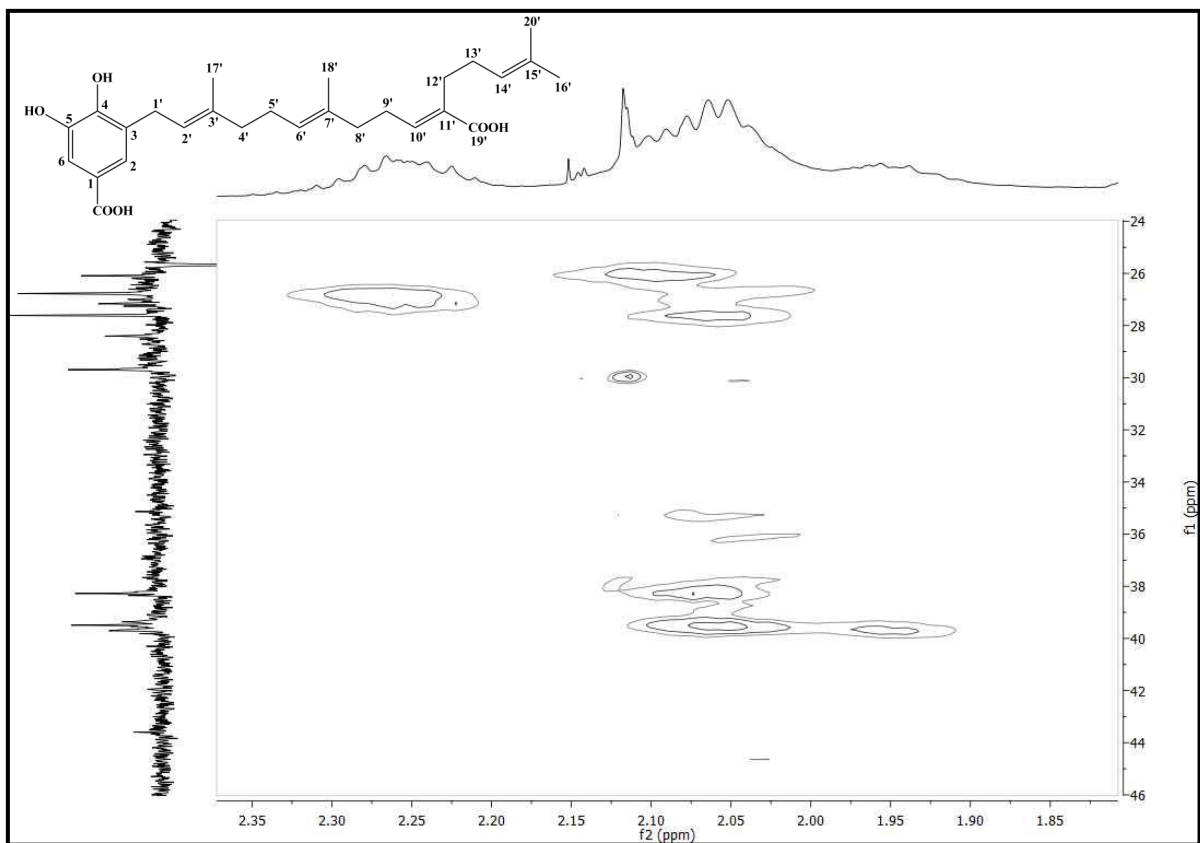


Figura 65: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 2,35-1,85 e 46,0-24,0 ppm.

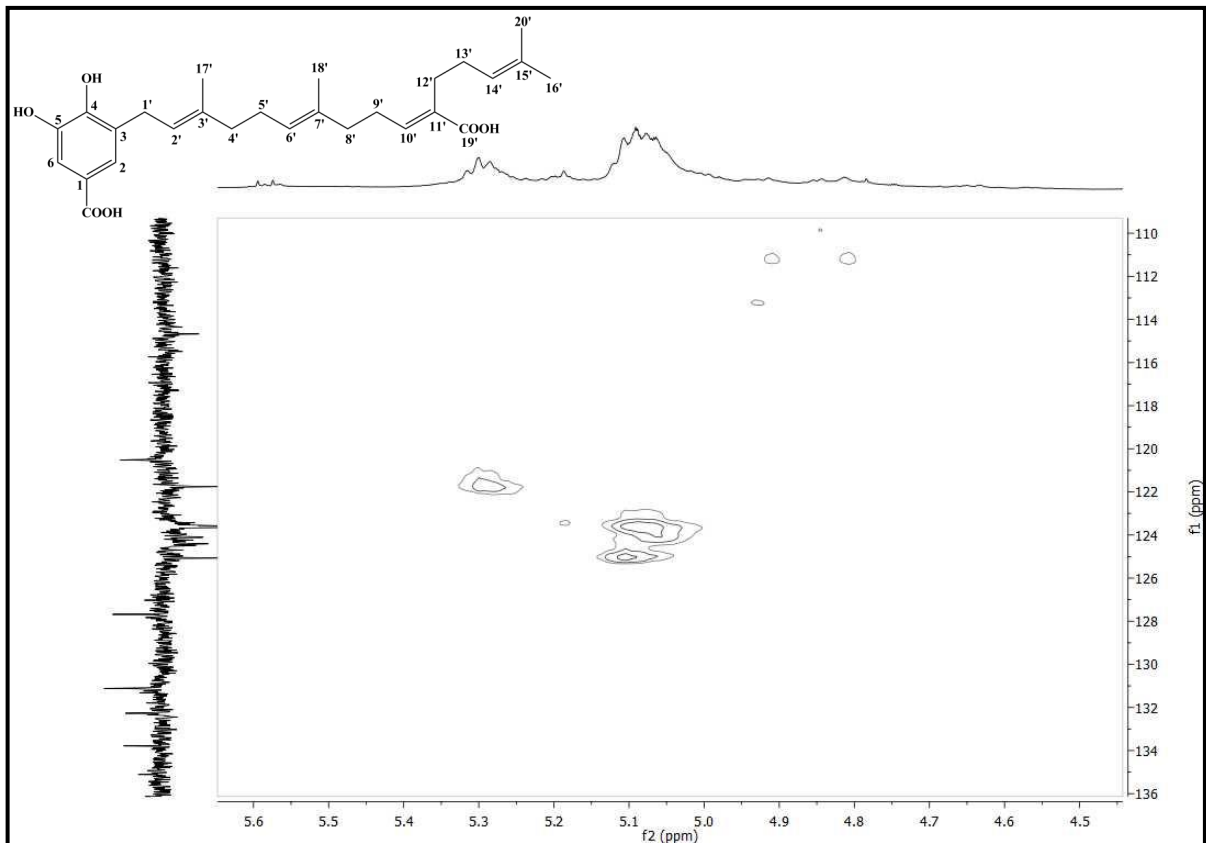


Figura 66: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 5,6-4,5 e 136,0-110,0 ppm.

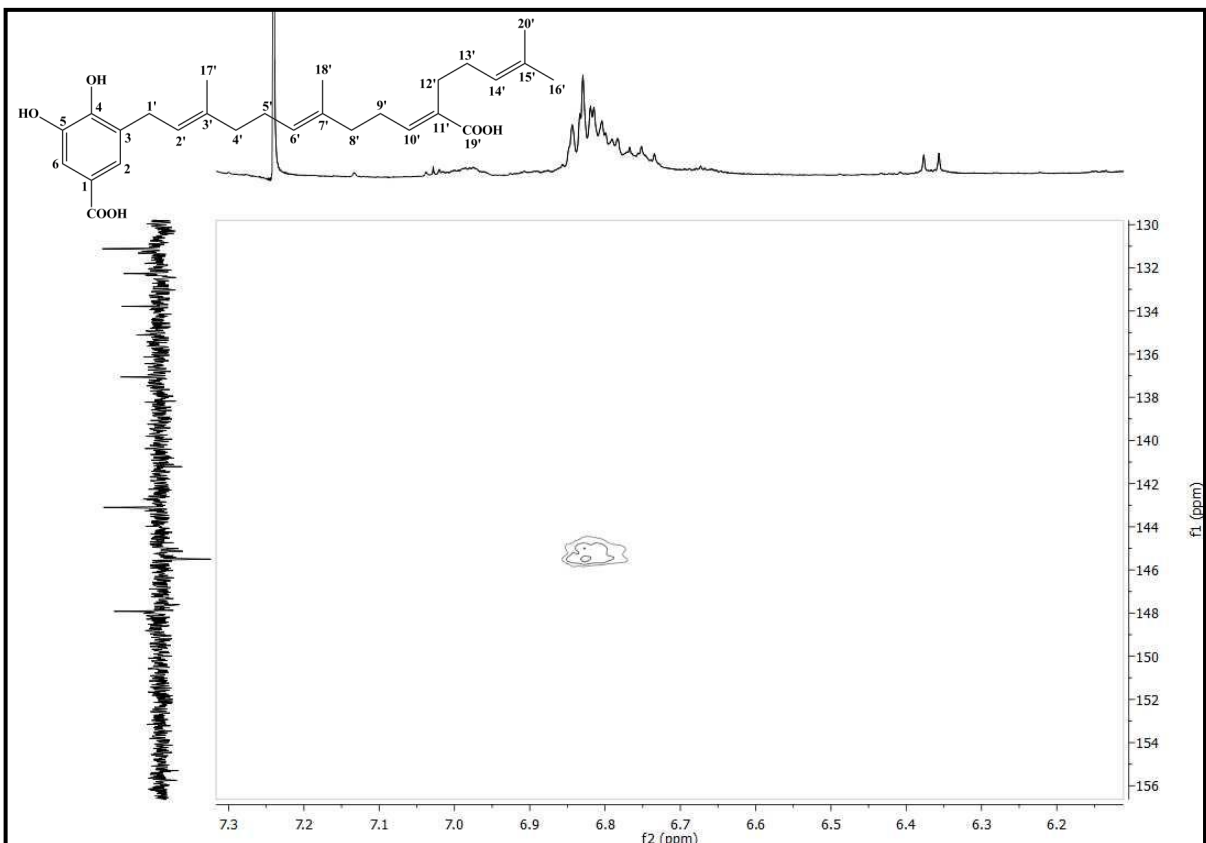


Figura 67: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 7,3-6,2 e 156,0-130,0 ppm.

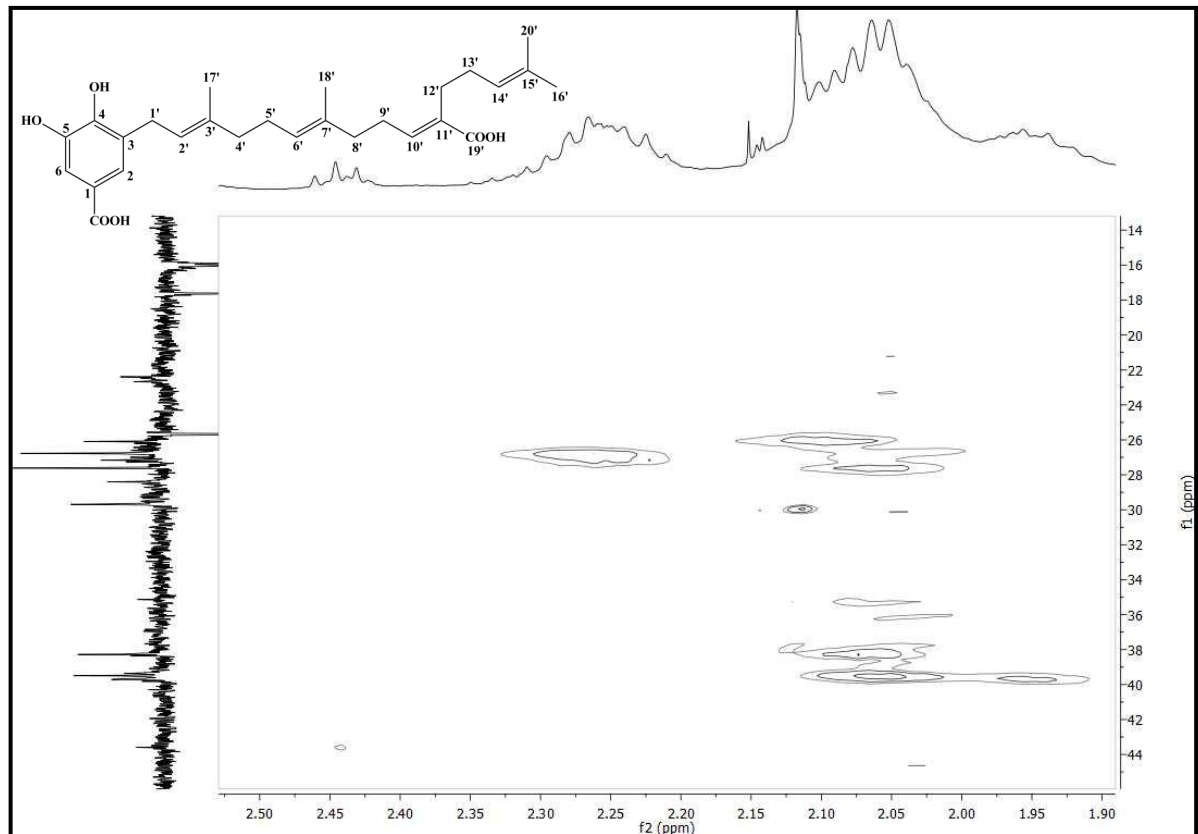


Figura 68: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 2,5-1,9 e 44,0-14,0 ppm.

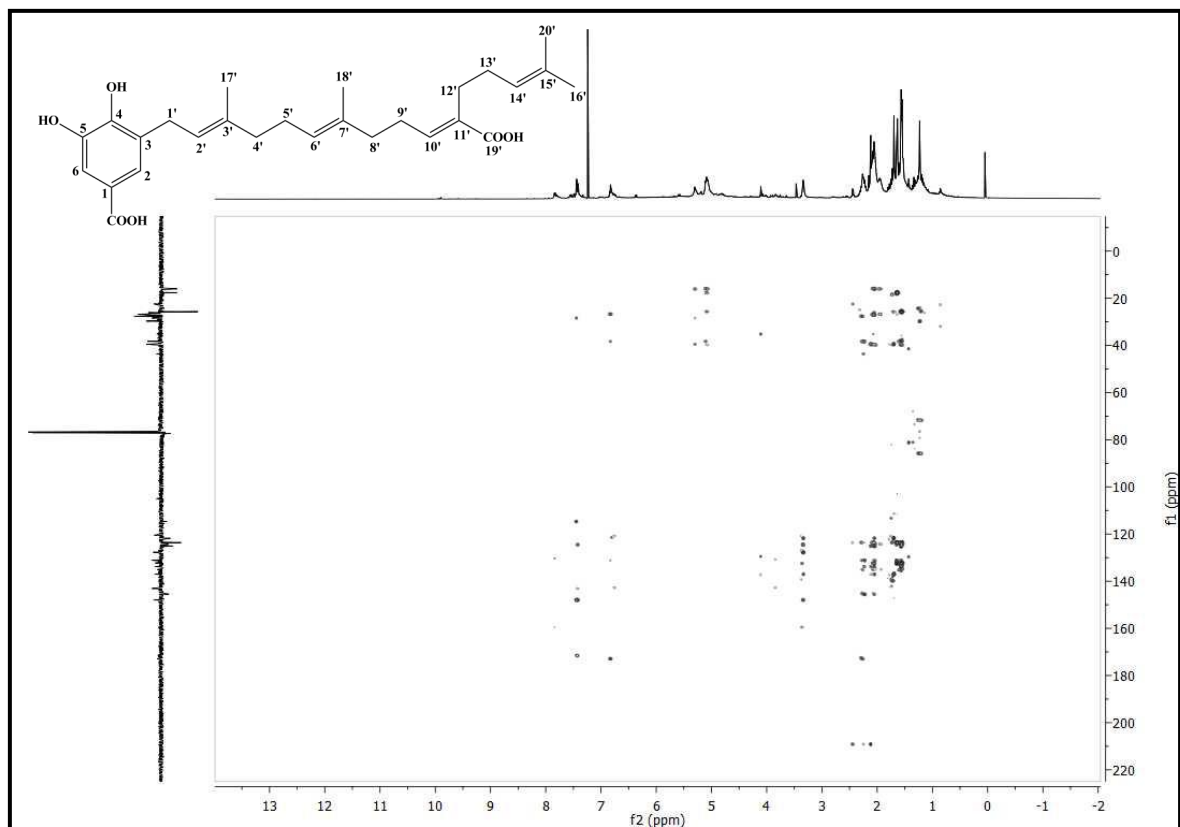


Figura 69: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5.

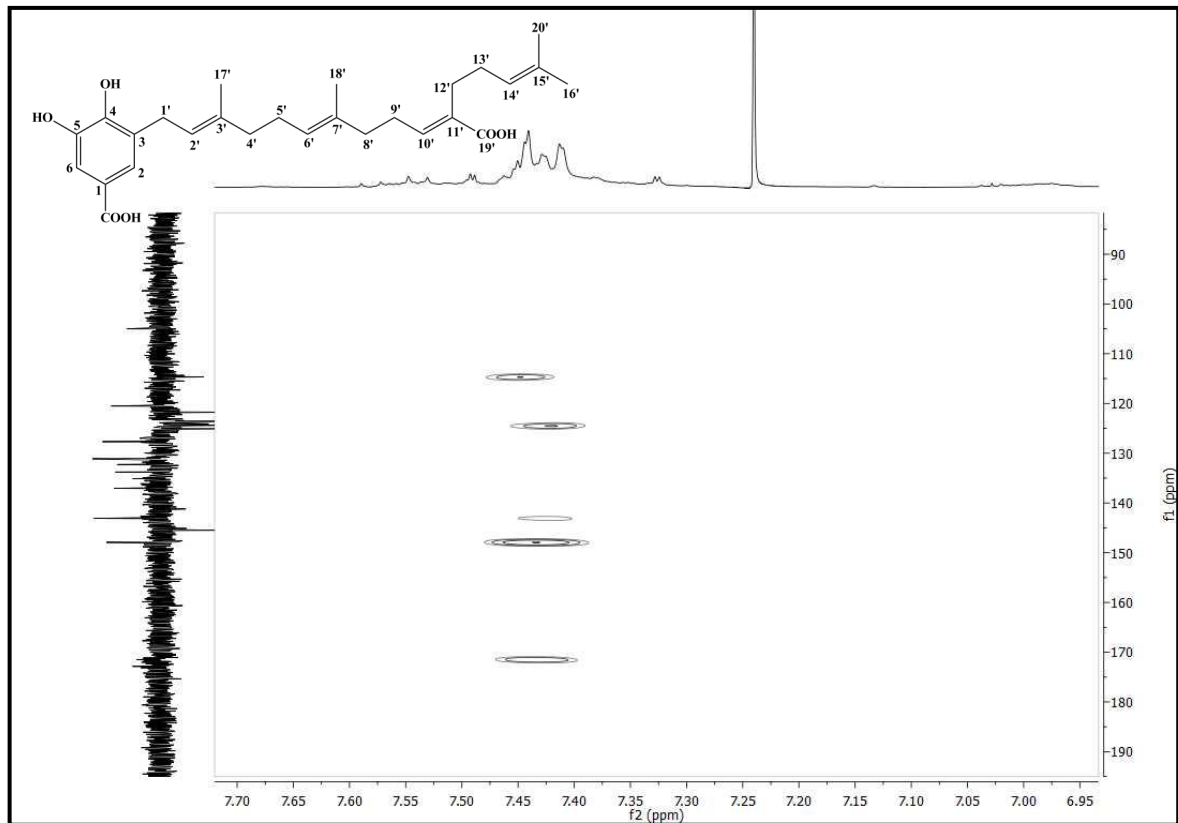


Figura 70: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 7,70-6,95 e 190,0-90,0 ppm.

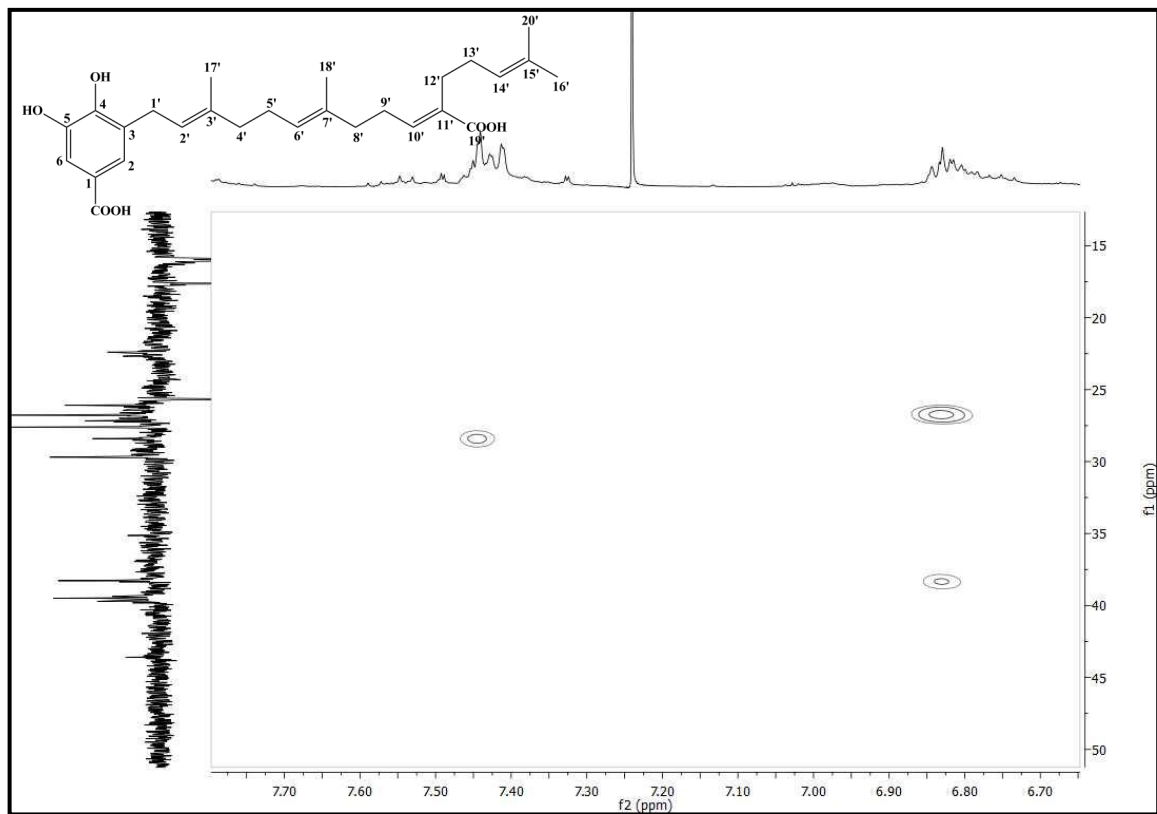


Figura 71: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 7,70-6,70 e 50,0-15,0 ppm.

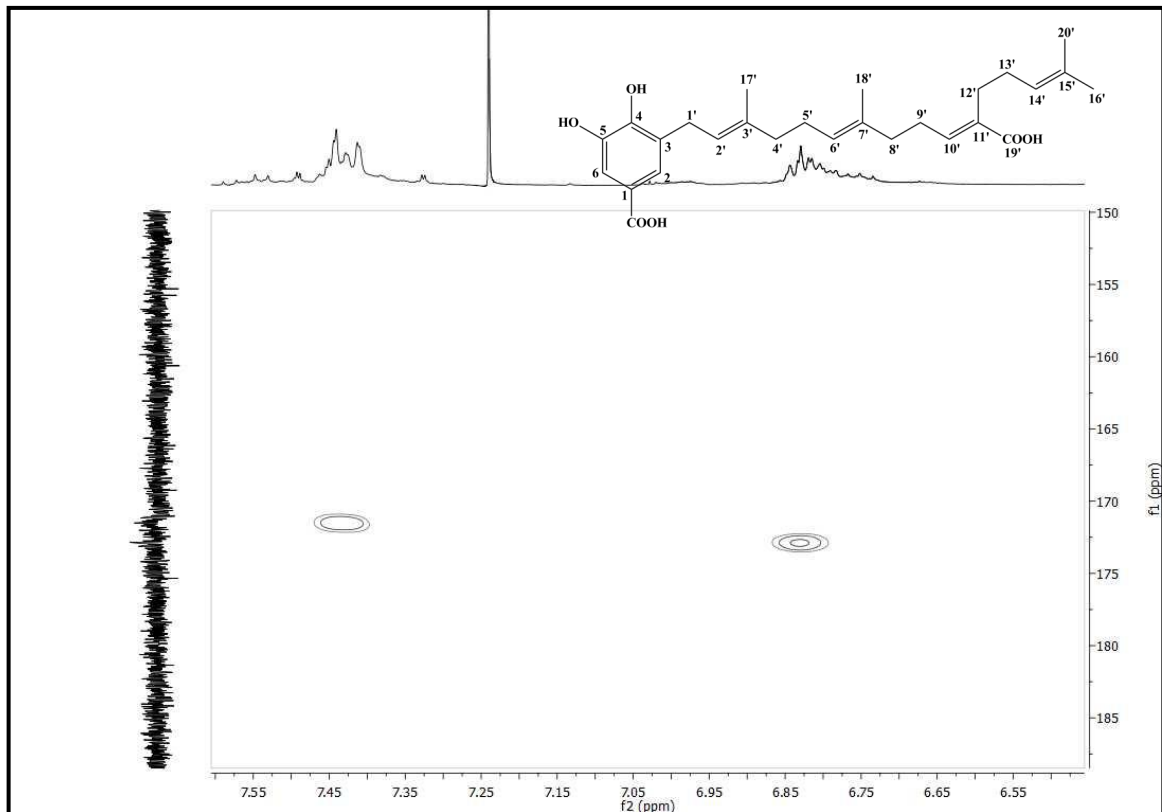


Figura 72: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 7,55-6,55 e 185,0-150,0 ppm.

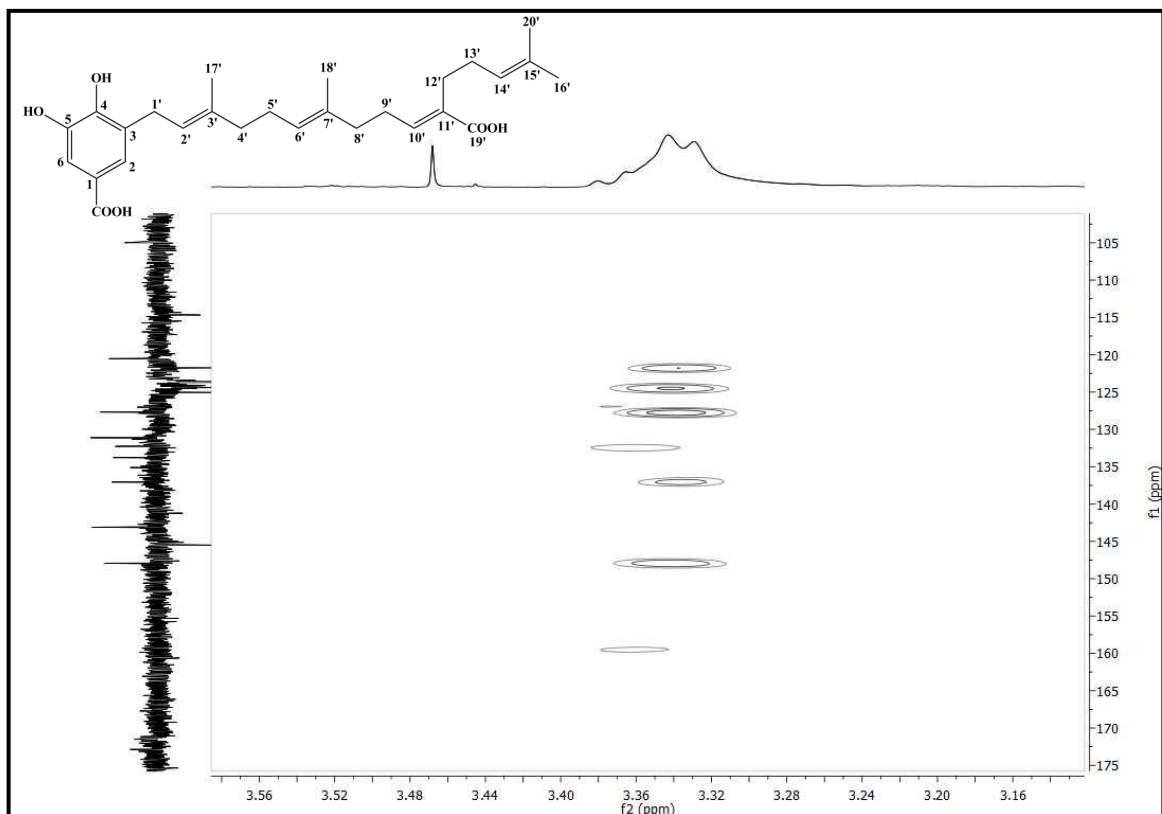


Figura 73: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 3,56-3,16 e 175,0-105,0 ppm.

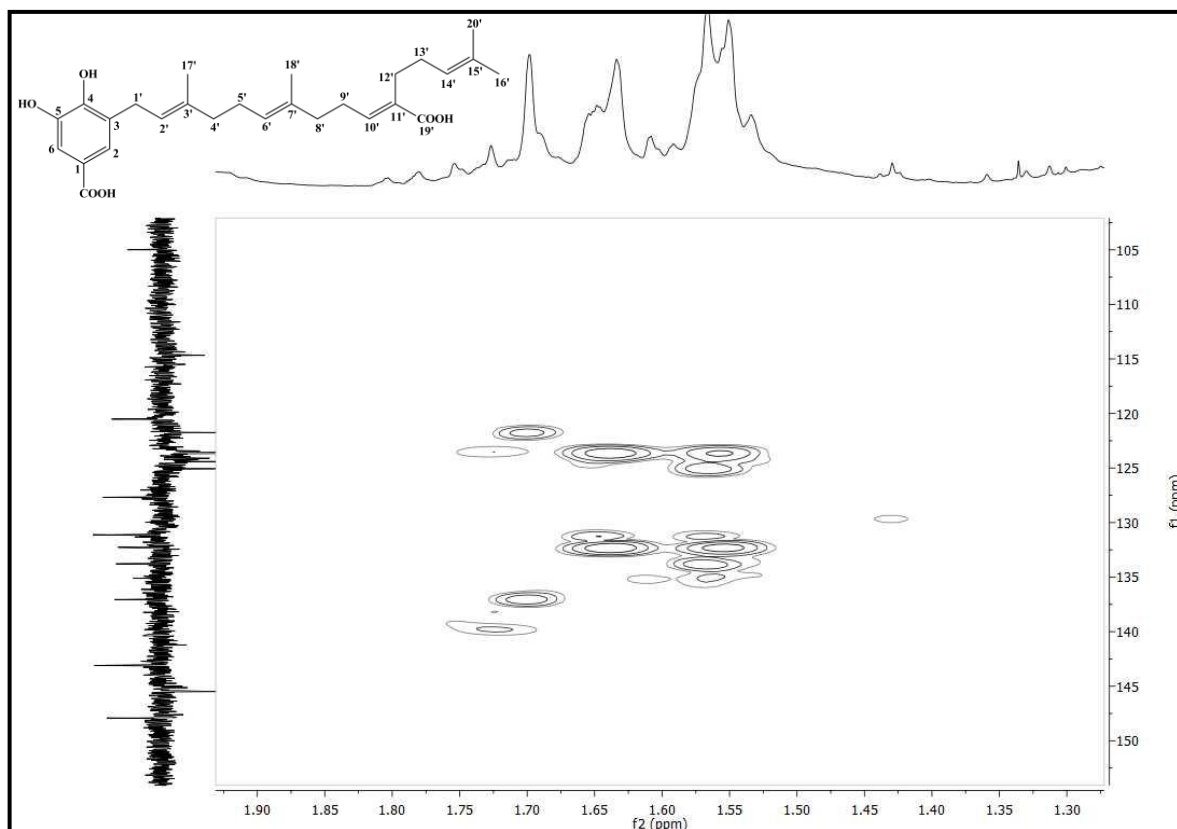


Figura 74: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 1,90-1,30 e 150,0-105,0 ppm.

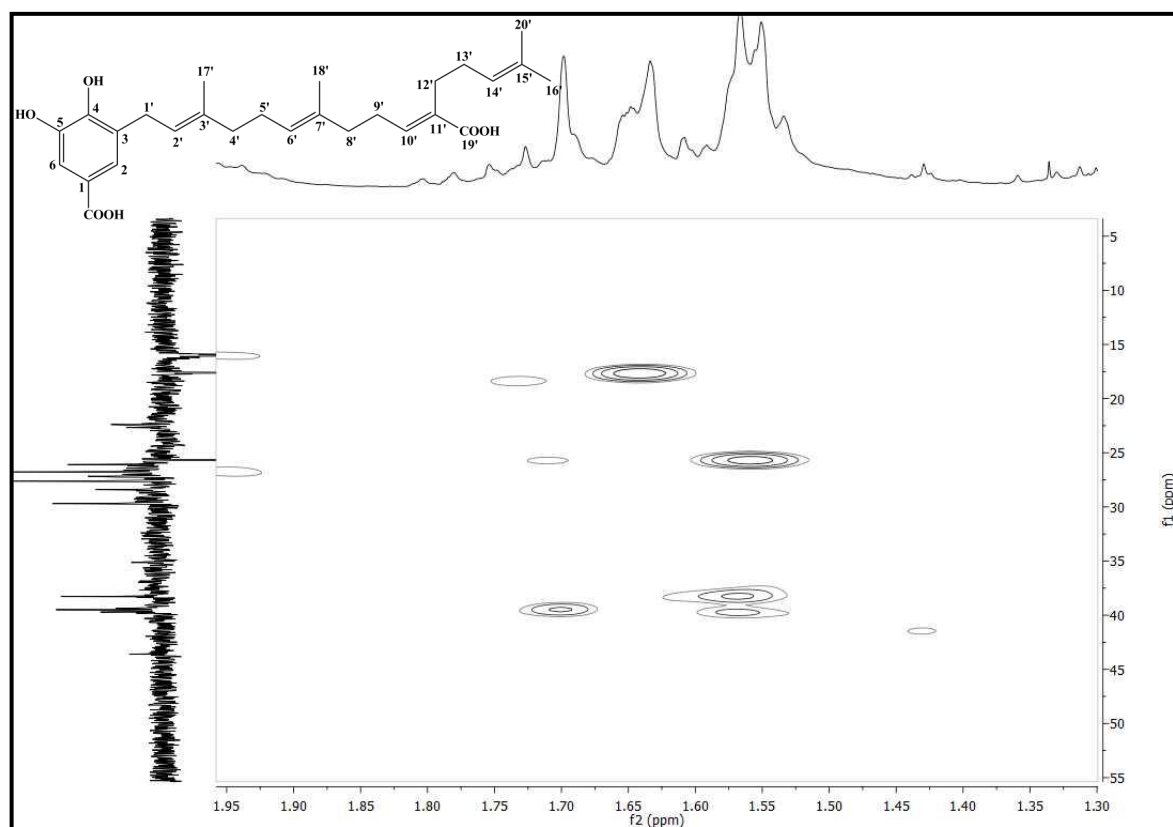


Figura 75: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 1,95-1,30 e 55,0-5,0 ppm.

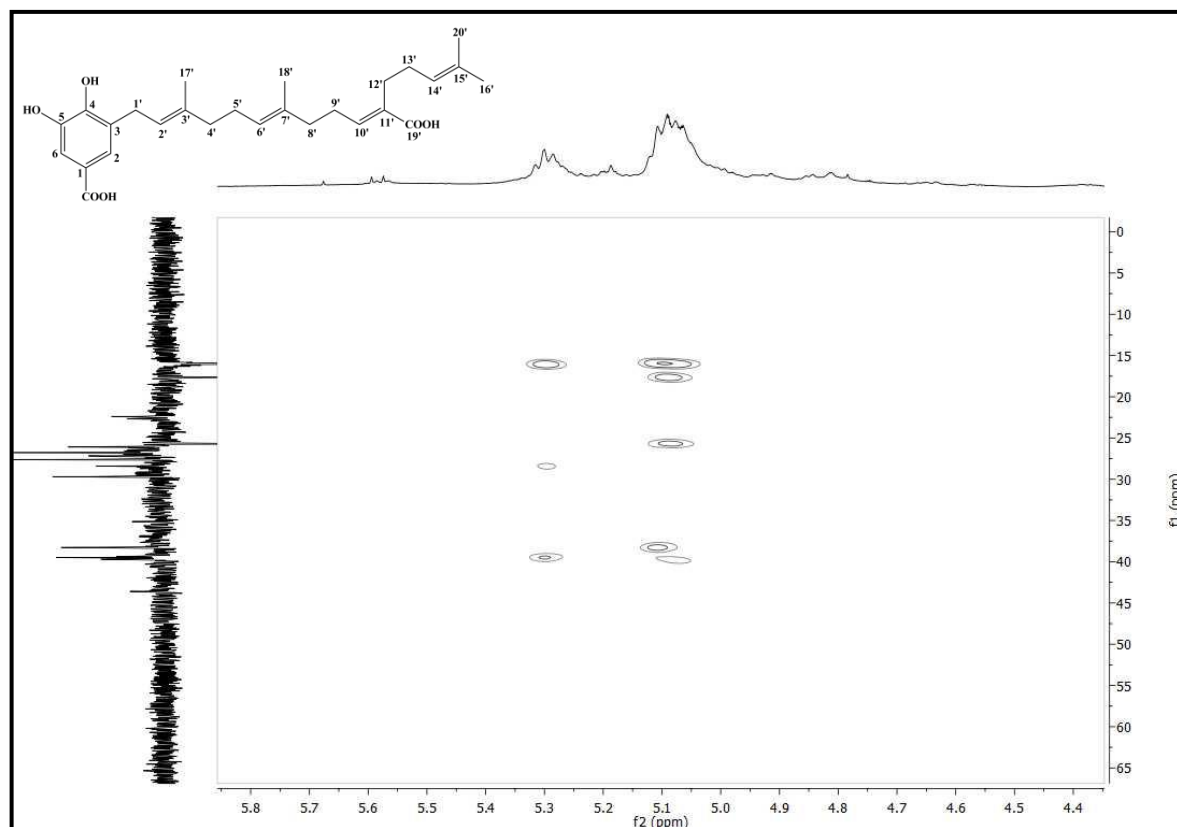


Figura 76: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 5,8-4,4 e 65,0-5,0 ppm.

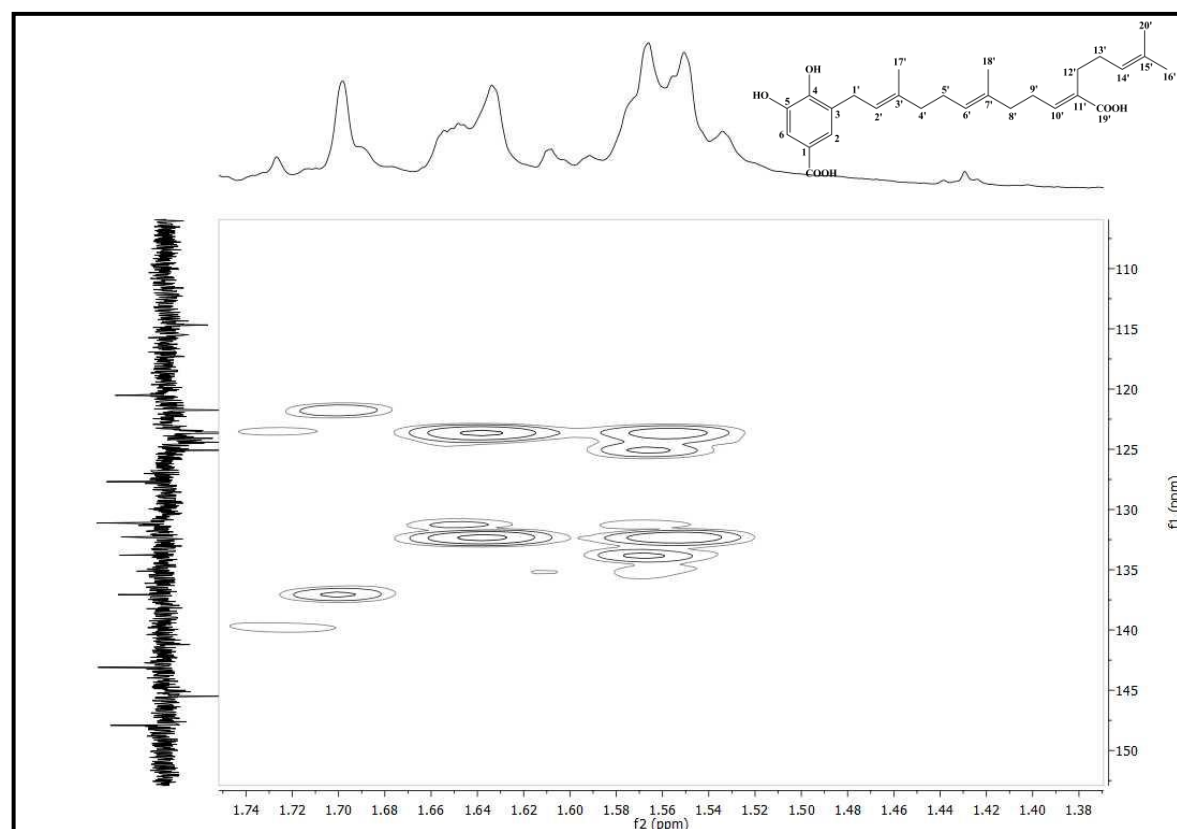


Figura 77: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 1,74-1,38 e 150,0-110,0 ppm.

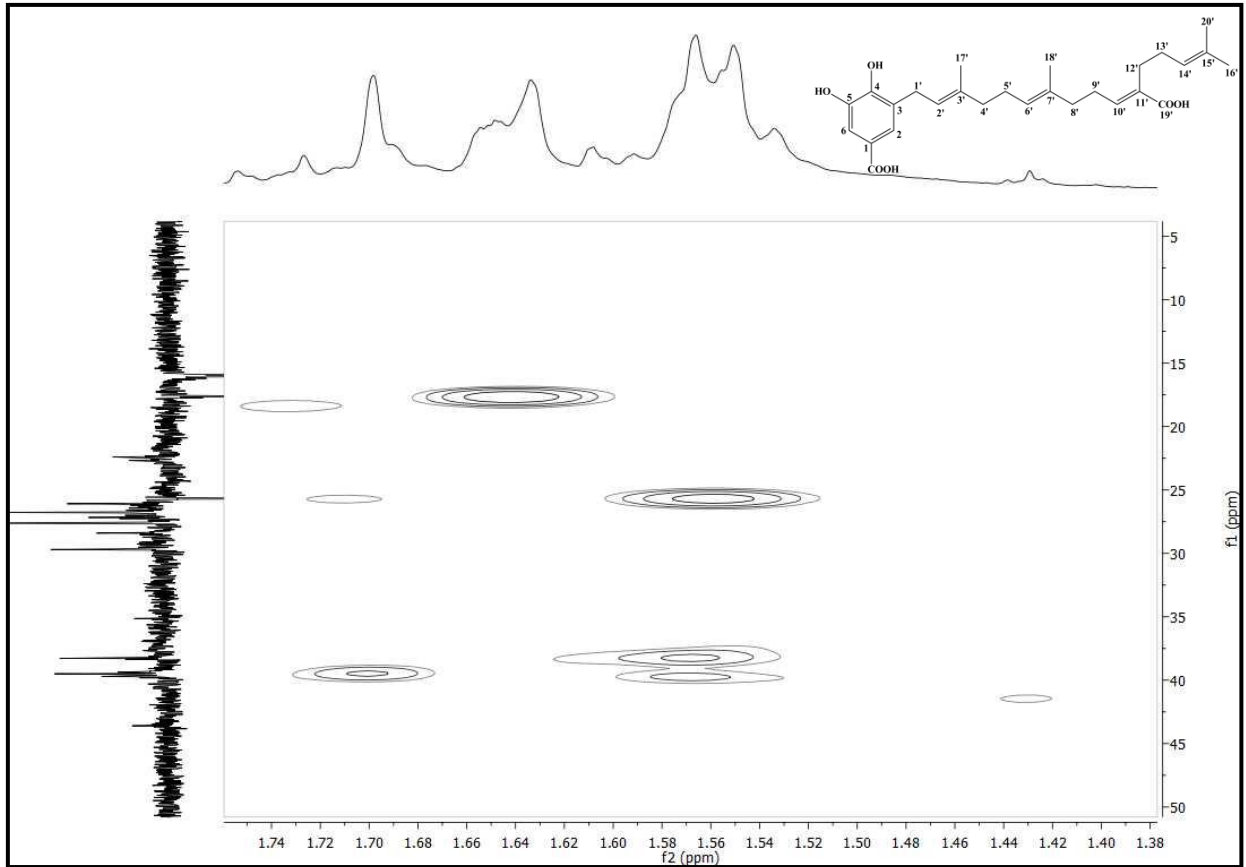


Figura 78: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 1,74-1,38 e 50,0-5,0 ppm.

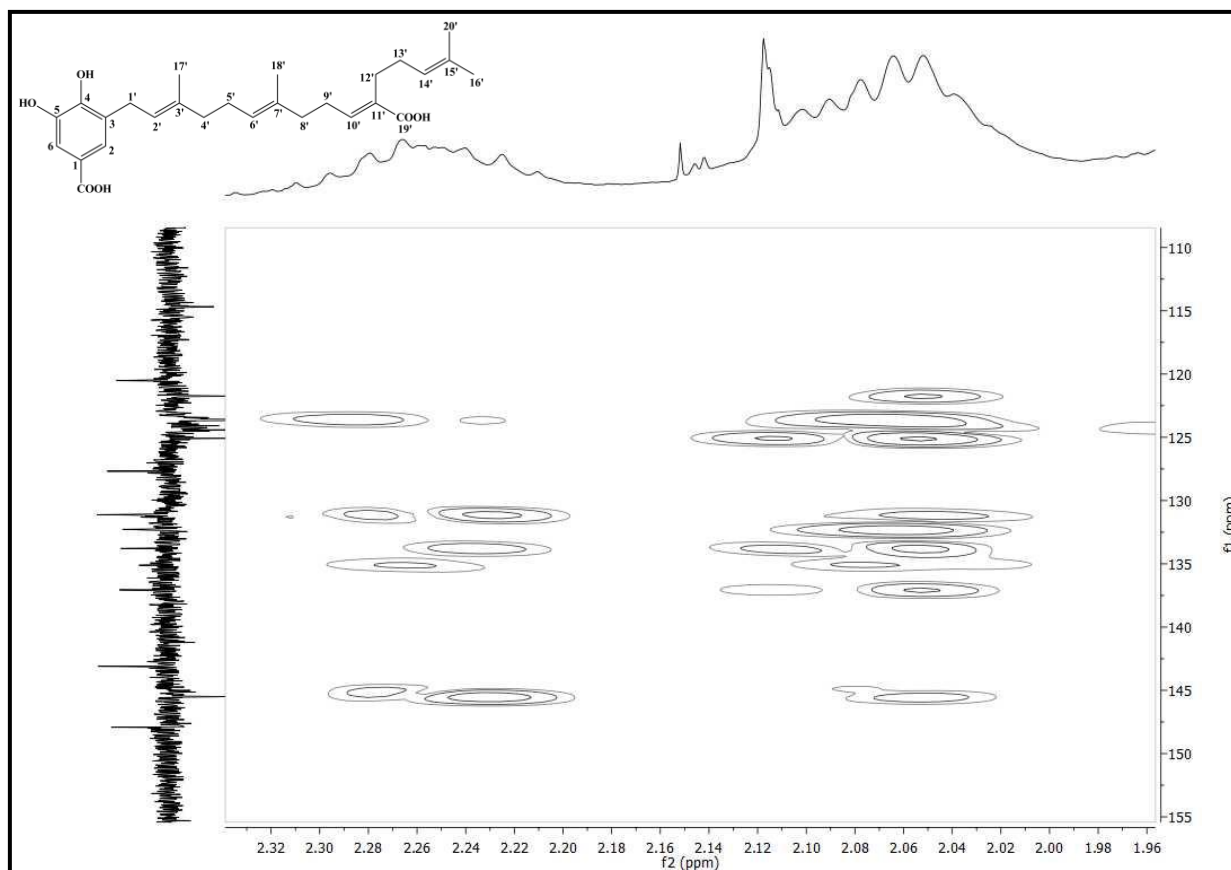


Figura 79: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/125 MHz) de Pc-5 na região de 2,32-1,96 e 155,0-110,0 ppm.

Estudo Microbiológico

6. ESTUDO MICROBIOLÓGICO

Os compostos Pc-3, Pc-4 e Pc-5 oriundos dos extratos diclorometânico e acetato de etila dos frutos e do extrato diclorometânico das raízes de *Piper caldense* C. DC. foram selecionados para avaliação da atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. As amostras foram testadas no Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia do DBM/CCEN/UFPB contando com a colaboração da Professora Hilzeth de Luna Freire Pessoa.

6.1 Material e métodos

6.1.1 Linhagens bacterianas

Para os testes de atividade antibacteriana foram utilizadas linhagens Gram positivas e Gram-negativas oriundas de coleções de referência (ATCC – American Type Culture Collection):

- ✓ *Escherichia coli* ATCC 2536;
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 8539;
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027;
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23242;
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25619;
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25925.

6.1.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos frente a bactérias de importância clínica

A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição descrita por Eloff (1998). A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição utilizando-se placas de 96 orifícios e fundo em “U” para cada uma das cepas avaliadas. Para tanto, diluições a metade de uma solução do produto teste (512 – 4 µg) foram adicionadas a uma suspensão (1×10^2 UFC/mL) das diferentes linhagens bacterianas em meio Luria Bertani – LB (extrato de

levedura (DIFCO) 10 g, triptona (DIFCO) 5 g, NaCl (VETEC) 10 g para 1 L). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. O crescimento bacteriano foi confirmado após a adição de resazurina 0,1 % (SIGMA) e incubação a 37 °C por 30 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata e foi considerada como CIM a menor concentração do produto teste que inibiu completamente o crescimento bacteriano (Devienne, 2002).

6.2 Resultados e discussão

Os compostos testados inibiram o crescimento de todas as linhagens Gram positivas e Gram negativas testadas apresentando diferentes valores de CIM (Tabela 10, p. 119).

Tabela 10: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos Pc-3, Pc-4 e Pc-5 sobre as linhagens bacterianas

Linhagem bacteriana	Concentração Inibitória Mínima (CIM)		
	µg/mL		
	Pc-3	Pc-4	Pc-5
<i>E. coli</i> ATCC 2536	256	256	256
<i>E. coli</i> ATCC 8539	256	128	128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 8027	512	256	256
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 23242	256	256	256
<i>S. aureus</i> ATCC 25619	256	256	256
<i>S. aureus</i> ATCC 25925	256	256	256

ATCC = American Typing Culture Colection

Não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável para os produtos naturais quando comparados com antibióticos que são utilizados na clínica médica, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos dos antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles que inibem o crescimento bacteriano em concentrações elevadas. Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM que considera como: inibição forte – CIM até 500 µg/mL, inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e inibição fraca – CIM acima de 1600 µg/mL.

Os compostos testados apresentaram forte efeito antibacteriano frente as linhagens Gram positivas e Gram negativas testadas com concentração inibitória mínima que variou entre 128 µg e 512 µg. Este resultado é relevante uma vez que bactérias Gram positivas são normalmente mais sensíveis a antibióticos do que as bactérias Gram negativas (MADIGAN; 2004). Isso se deve ao fato de que a membrana externa das bactérias Gram negativas é uma barreira que dificulta a entrada de várias moléculas de antibióticos e o espaço periplasmático contém enzimas que são capazes de degradar moléculas vindas de fora da célula (HOLETZ *et al.*, 2002). Além disso, o antibiótico que atua sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, denominados de amplo espectro, têm uma maior aplicação médica do que aqueles que atuam apenas sobre um grupo de microrganismos.

Conclusões e Perspectivas

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo fitoquímico dos frutos e raízes de *Piper caldense* C. DC. (Piperaceae) realizado por meio de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais permitiu isolar e identificar seis substâncias, sendo elas um triglicerídeo: trilinoleína (Pc-1), dois esteroides: β -sitosterol (Pc-2a), estigmasterol (Pc-2b) e três derivados do ácido benzoico: ácido 4-hidroxi-3-((2E,6E,10E)-3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico (Pc-3), ácido 3,4-dihidroxi-2-((2Z,6E,10E)-3',7',11',15'-tetrametilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico (Pc-4) e ácido 4,5-dihidroxi-3-((2E,6E,10E)-11-carboxi-3',7',15'-trimetilhexadeca-2',6',10',14'-tetraen-1-il) benzoico (Pc-5), contribuindo, dessa forma, para o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Piper* L. e da espécie botânica investigada, uma vez que há poucos relatos de estudos referentes a *Piper caldense* C. DC.

Os compostos codificados como Pc-1 e Pc-4, estão sendo isolados pela primeira vez na família Piperaceae.

Os compostos codificados como Pc-3, Pc-4 e Pc-5 apresentaram forte atividade antibacteriana frente a linhagens Gram positivas de *S. aureus* e Gram negativas de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Considerando os resultados obtidos, pretende-se dar continuidade aos estudos com a espécie *Piper caldense* C. DC., visando o isolamento de novos compostos bioativos, bem como a integração de outros estudos biológicos dos compostos isolados e dos extratos da raiz.

Referências

8. REFERÊNCIAS

- AHMED, W.; AHMAD, Z.; MALIK, A. Stigmasteryl galactoside from *Rhynchosia minima*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 4038-4039, 1992.
- ALBIERO, A.L.M. **Morfoanatomia dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Piper crassinervium* H. B. & K. e *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae)**. 2005. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)–Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.
- ALEMANY, L. B. Using simple ^{13}C NMR linewidth and relaxation measurements to make detailed chemical shift assignments in triacylglycerols and related compounds. **Chemistry and Physics of Lipids**, 120(1–2): 33–44, 2002
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.4168-4170, 2001.
- ALVES, H. S. **Novos flavonóides monoterpênicos e outros constituintes químicos isolados de espécies de *Piper* (Piperaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- ALVES, H. S.; OLIVEIRA, G.E.; ZOGHBI, M. G.; CHAVES, M. C. O. Flavonoides de *Piper carniconnectivum* C. DC., Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Impresso), v. 20, p. 160-164, 2010.
- ALVES, H. S.; SOUSA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O. Three New Compounds from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Impresso), v. 22, p. 1610-1615, 2011.
- AMPOFO, S.A., ROUSSIS, V., WIEMER, D.F. New prenylated phenolics from *Piper auritum*. **Phytochemistry**, 26, 2367–2370, 1987.
- ANGELO, P. M. JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão**. Rev Inst Adolfo Lutz, 66, 1, 232-240, 2007.
- ARAÚJO, M. S., MIGUEL, J. R., JASCONE, C. E. S. **O Gênero *Piper* L. (Piperaceae) no Parque Natural Municipal da Taquara, Duque de Caxias, RJ, Brasil**. Universidade do Grande Rio, 2012.

- BALDOQUI, D. C. et al. A chromene an prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 899-902, 1999.
- BALDOQUI, D. C.; BOLZANI V. S., FURLAN, M.; KATO, M. J., MARQUES, M. O. M. Flavonas, Lignanas e Terpenos de *Piper umbellatum* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 32(5), p. 1107-1109, 2009.
- BATISTA-JÚNIOR, J. M. et al. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 538-540, 2008.
- BAUMGARRT, A. M. K. **Avaliação da atividade das espécies *Piper mollicomum* e *hedyosmum brasiliense* frente às espécies de *Candida* spp.** 2007. Trabalho de Conclusão de (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2007.
- BENGHEZAL, M.; ADAM, E.; LUCAS, A.; BURN, C.; ORCHARD, M.G.; DEUSCHEL, C.; VALENTINO, E.; BRAILLARD, S.; PACCAUD, J.P.; COSSON, P.. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 1336-1342, 2007.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: The Iowa State University Press, 1976.
- BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M. N. D.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* grow inhibition of sarcoma 180 by piperlangumine, an alkaloid amide from the *Piper* species. **Journal of Applied toxicology**, v. 28, p. 599-607, 2008.
- BODIWALA, H. S.; Singh, G.; Dey, C. S.; SRAMA, S. S.; BHUTANI, K. K.; SINGH, I. P. 2007. Antileishmanial amids and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicine**, v. 61, p. 418, 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P. Química e Farmacologia de Quimioterápicos derivados de plantas. **Química Nova**, 33(6), 1359-1369, 2010.

CALDERARI, M. T. **Estudo dos óleos essenciais de Piperaceae do Vale do Itajaí em Santa Catarina**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, 33:179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, vol.55 n. 3, São Paulo, jul/set, 2003.

CARVALHO-OKANO, R. M. A.; MEURELLES, S. A. Piperaceae C. Agardh da Estação Experimental Mata do Paraíso, Viçosa, MG. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n. 3, suppl. 1, p. 497-513, 1999.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, M. O. et al (Eds) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Florianópolis, SC: Editora da UFSC, 2001. 833.

CHAN, P.; PAI-FENG-KAO, P.; TOMLINSON, B. Cardiovascular effects of trilinolein, a natural trygliceride isolated from the herb sanchi (*Panax notoginseng*). **Acta Cardiologica Sinica**, Peking, v. 21, n. 1, p. 71-76, 2005.

CHAVES, M. C. O. & SANTOS, B. V. O. (E,E)-N-Isobutyl-2,4-octadienamida from *Piper marginatum*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 27(1), p.113-114, 1999.

CHAVES, M. C. O., & DA CUNHA, E. V. L. Two amides from *Piper tuberculatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 72, p. 197-199, 2001.

CHAVES, M. C. O. & SANTOS, B. V. O. Constituintes from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 73(6), p. 547-549, 2002.

- CHAVES, M. C. O.; CARDOZO JÚNIOR, E. L. Caldensin, a New Natural N-Methyl Aristolactam From *Piper caldense* C. DC. **Pharmaceutical Biology**, Estados Unidos, v. 41, n.3, p. 216-218, 2002.
- CHAVES, M. C. O.; SANTOS, B. V. O.; DE OLIVEIRA, A. 1-Cinnamoyl piperolidide from *Piper marginatum*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 31, p.1213-1214, 2003.
- CHAVES, M. C. O.; De OLIVEIRA, A. H., SANTOS, B. V. O. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 34, p. 75-77, 2006.
- CHEN, J. J.; HUANG, Y. C.; CHEN, Y. C.; HUANG, Y. T.; WANG, Y. T.; PENG, C. Y.; TENG, C. M.; CHEN, I. S. Cytotoxic Amides from *Piper sintenense*. **Planta Medica**. v. 68, p. 980-985, 2002.
- CHEN, J. J.; DUH, C.Y.; HUANG, H. Y.; CHEN, I. S. Cytotoxic Constituents of *Piper sintenense*. **Helvetica Chemica Acta**, v. 86, p. 2058-2064, 2003.
- CHEN, Y. C.; CHEN, J. J.; CHANG, Y. L.; TENG, C. M.; LIN, W. Y.; WU, C. C.; CHEN, I. S. A New Aristolactam Alkaloid and Anti-Platelet Aggregation constituents from *Piper taiwanense*. **Planta Medica**, v. 70, p. 174-177, 2004.
- CHEN, S. C.; CHENG, J. J.; HSIEH, M. H.; CHU, Y. L.; KAO, P. F.; CHENG, T. H.; CHAN, P. Molecular mechanism of the inhibitory effect of trilinolein on endothelin-I-induced hypertension. **Planta Medica**, 71: 525-529, 2005.
- CHEN, Y. C.; LIAO, C. H.; CHEN, I. S. Lignans, amid and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2101, 2007.
- CHUC, N. T. et al. Improving private pharmacy practice: a multi-intervention experiment in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 55, p. 1148-1155, 2002.
- COTINGUIBA, F. et al. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, p. 703-711, 2009.
- CORDOVA, S. M. et al. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42(4): 241-244, 2010.

- COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.
- CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Fundação Calouste Gulbenkian. A. Coelho Dias, S. A., novembro, 2005.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. ARALES – Piperales. In: **The families of the monocotyledons – Structure, Evolution and Taxonomy**. Springer-Verlag, 1985. p. 39-42.
- DANELUTTE, A. P. et al. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 64, p. 555-559, 2003.
- DA SILVA, R. V. et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 21-527, 2002.
- D' ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità Journal**, v. 43, n.4, p.348-361, 2007.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 166-168, 2002.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.
- DYER, L. A. & PALMER, A. D. N. *Piper*: A model genus for studies os phytochemistry, ecologt and evolution. **Boston: Kluwer Academic Publishers**, 2004.
- ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p. 711-713.
- FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v.33 n.1, 2010.

- FLORES, N. et al. Antiparasitic Activity of Prenylated Benzoic Acid Derivatives from Piper Species. **Phytochemistry**, v. 70, p. 621-627, 2009.
- GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. Organic chemistry of secondary plant metabolism. **San Francisco: Freeman, Cooper**, p. 92-181, 1969.
- GERMAN-CASTELLI, P. Diversidade Biocultural: Direitos de Propriedade Intelectual Versus Direitos dos Recursos Tradicionais. **Seropédica**, Rio de Janeiro: UFRRJ, 2004.
- GREEN, T. P.; TREADWELL, E. M.; WIEMER, D. F. Arieianal, a Prenylated Benzoic Acid from *Piper arieianum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 367-368, 1999.
- GUERRINI, A. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 39-48, 2009.
- GUIMARÃES, E. F. Notas em Piperaceae II. Considerações sobre o gênero *Ottonia* Sprengel no Brasil. **Boletim do Museu Botânico Kuhlmann**, v. 7, n. 3, p. 61-84, 1984.
- GUIMARÃES, E. F. & VALENTE, M. C. **Piperáceas** – Piper. In: A. Reis (ed.). Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, pp. 1-51. 2001
- HAM, Y. M. et al. Chemical constituents from *Sargassum micracantum* and antioxidant activity. **Internacional Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 147-151, 2010.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97, 1027-1031, 2002.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- JACOBSON, M.; CROSBY, D. G. **Naturally Occurring Insecticides** (Marcel Dekker), 44,226, 1971.
- JUDD, W.S. et al. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sunderland, **Massachusetts: Sinauer Associates**, 2002.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; SENGUL, M.; ADIGÜZEL A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.2837, p. 1-5, 2003.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, São Paulo Mar./Apr., 2000.

KOJIMA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

LAGO, J. H. G. et al. Benzoic Acid Derivatives from Piper Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1783-1788, 2004.

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

LAGO, J. H. & KATO, J. M. 3 α , 4 α -Epoxy-2-piperidone, a new minor derivative from leaves of *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae). **Natural Products Reports**. v. 21(10), p.910-914, 2007.

LEMOS, C. O. T. et al. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de extratos de Pariparoba**. VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Maringá, 2011.

LIU, J. C.; CHENG, T. H.; LEE, H. M.; LEE, W. S.; SHIH, N. L.; CHEN, Y. L.; CHEN, J. J.; CHAN, P. Inhibitory effect of trilinolein on angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. **European Journal Pharmacology**, 484: 1-8, 2004.

LOPES, A. A. ***In vitro* activity of isolated compounds from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi***. Nat. Prod. Res., v. 22, p. 1040-1046, 2008.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. The Bacteria. In: **Brock – Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prantice Hall. 718-814, 2004.

- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, 79:727-747, 2004.
- MANNINA, et al. Concentration dependence of ¹³C NMR spectra of triglycerides: implications for the NMR analysis of olive oils. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 38: 886–890, 2000.
- MARTINS, R. C. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.
- MARQUES, J. V. Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 2036-2039, 2007.
- MATA, R. et al. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1961-1968, 2004.
- MAXWELL, A.; RAMPERSAD, D. Novel Prenylated Hydroxybenzoic acid Derivatives from *Piper Saltuum*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 3, p. 614-618, 1989.
- MIRANDA, R. P. Methyl 4-Hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoate, Major Insecticidal Principle from *Piper guanacastensis*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 282-284, 1997.
- MONTANARI JUNIOR, I. Aspectos do cultivo comercial de plantas medicinais exóticas. **Agroecologia Hoje**, v. 11, 2001.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Periodo 1981-2002. **Journal Natural Products**, 66, 1022-1037, 2003.
- NUNES, J. D. et al. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 1049-1052, 2007.
- OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.10, p.189-197, 2008.

- OLIVEIRA, J. H. G.; SOUZA, L. A.; CARVALHO, M. Estruturas de Reprodução de *Peperomia parnassifolia* Miq. (Piperaceae) Iwazaki. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2008.
- ORJALA, J. et al. Five New Prenylated p-Hydroxybenzoic Acid Derivatives with Antimicrobial and Molluscidal Activity from *Piper aduncum* Leaves. **Planta Medica**, v. 59, p. 546-551, 1993a.
- PALMERIM, J. M.; GORCHOY, D. L.; STOLESON, S. Trophic structure of a neotropical frugivore community: is there competition between birds and bats? **Oecologia**, v. 79, p. 403-411, 1989.
- PARMAR, V.S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, New York, v.46, n. 4, p. 597-673, out. 1997.
- PINÕL, M. T. ; PALAZÓN, J. Metabolismo secundário. In: Bioeto-Azcon, J; TALON, M. **Fisiologia y Bioquímica Vegetal**. Madri: McGrawHill, 1996, P. 273-283.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, P. N.; EPIFANIO, R. A.; Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectiva. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, 45-61, 2002, p. 45-61, 2002.
- PLETSCHI, M. Compostos Naturais Biologicamente Ativos. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, 4: 12 – 15, Brasília – DF, 1998.
- RAFAEL, M. S. et al. Potencial control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 772-781, 2008.
- RAGASA CONSOLACION Y, et al.: Chemical constituents of *Aglaia loheri*. **Pharmacognosy Journal**, Nov–Dec 2012, v. 4, Issue 32, 2012.
- RORIG, L. et al. Investigación fitoquímica en espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.72, n.1, p.15-17; 1991.
- RODRIGUES, R. M. W.; REALI, K. M. Uso de plantas medicinais em domicílios de Guarapuava. UNICENTRO - **Revista Eletrônica Lato Sensu**. ed. 5, 2008.

- RUEGG, T. et al. 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a New Anti-*Helicobacter pylori* Compound from *Piper multiplinervium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 461-467, n. 2006.
- SCOTT, I.M.; PUNIANI, E.; JENSEN, H.; LIVESEY, J.F.; POVEDA, L.; VINDAS, P.S.; DURST, T.; ARNASON, J.T. Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from Piper spp extracts. **Journal Agricola Food Chemistry**, 53, 1907–1913, 2005.
- SCOTT, I. et al. A review of *Piper* spp (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 65-75, 2008.
- SEERAM, N. P. et al. Prenylated hydroxybenzoic acid derivatives from *Piper murrayanum*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 863-865, 1996.
- SIMÕES, C.M.O. et al (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFSC, 2003.p.403-434.
- SIDDIQUI, B. et al. A new natural product and insecticidal amides from seeds of *Piper nigrum* Linn. **Natural Product Research**, v. 22, p. 1107-1111, 2008.
- SILVA, D. A. et al. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1250-1256, 2006.
- SILVA, G. A. T. **Estudo fitoquímico das folhas e frutos de Piper caldense C. DC. (Piperaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- SRINIVASAN, K. Black peper and its Pugent Principle Piperine: A review Diverse Physiological Effects. *Crit. Rev. Journal of Nutrition & Food Sciences*, v. 47, p. 735, 2007.
- SOUSA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Plantarum**, Nova Odessa, 2005.
- SOUTO, R. N. P. **Avaliação das atividades repelente e inseticida de óleos essenciais de Piper da Amazônia em Anopheles marajoara, Stegomyia aegypti e Solenopsis saevissima.**

Tese de doutorado: Curso de Pós- Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém, Pará, 2006.

SHU, Y. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

TERREAUX, C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 461-464, p. 1998.

YUNES R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Editora Univali, 2007, 303p.

YUNCKER, T.G. **The Piperaceae of Brazil III: Peperomia– taxa of uncertain status**. Hoehnea, São Paulo, v. 4, p. 71-413, 1974.

VELOSO, C. P.; CARINA, R. R.. **Biodiversidade Brasileira como Fonte de Medicamentos Fitoterápicos**, Pontifícia - Universidade Católica de Goiás.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.308-313, 2008.

VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 45-61, São Paulo Mar./ Apr. 2006.

VILEGAS, W. & CARDOSO, C. A. L. 2007. **Controle Químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais**. In: Yunes, R. A. & Cechinel-Filho, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 1ª ed. Itajaí: UNIVALI, p 157-182.

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

WHITTON, P. A. et al. Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v. 64, p. 673-679, 2003.

XUAN, T. D., FUKUTA, M., WEI, A. C., ELZAAWELLEY, A. A., KHANH, T. D., TAWATA, S. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum*) roots. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 188–194, 2008.

YAMAGUCHI, L. F. et al. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1838-1843, 2006.