



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA



JÉSSICA BRUNA DE LIMA

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS
FOLHAS DE *Piper callosum* e *Piper corcovadensis* (Piperaceae)**

RECIFE, 2019

JÉSSICA BRUNA DE LIMA

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS
FOLHAS DE *Piper callosum* e *Piper corcovadensis* (Piperaceae)**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Licenciatura Plena em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito necessário à obtenção do grau de licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Clécio Souza Ramos.

RECIFE , 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

L732e Lima, Jéssica Bruna de
Estudo químico e atividade antimicrobiana das folhas de *Piper callosum* e *Piper cocorvadensis* (Piperaceae) / Jéssica Bruna de Lima. – 2019.
58f. : il.

Orientador: Clécio Souza Ramos.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Química, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Química orgânica 2. Produtos naturais 3. Micro-organismos
4. Amida 5. Piperaceae 6. Folha I. Ramos, Clécio Souza, orient.
II. Título

CDD 540

JÉSSICA BRUNA DE LIMA

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS
FOLHAS DE *Piper callosum* e *Piper corcovadensis* (Piperaceae)**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Clécio Souza Ramos – UFRPE (Sede)

Orientador

Prof. Dr. Jucleiton José Rufino de Freitas – UFRPE (UACSA)

Examinador

Prof^a. ME. Aldiceia Luiz de Moura – UFPE (CAA)

Examinador

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram. Especialmente Deus a minha mãe Rosymeri e avó Maria do Carmo por todo apoio prestado durante a vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo fôlego de vida e por ser o meu socorro nas diversas horas de angústia.

A minha avó, Maria do Carmo do Monte, por todo carinho, incentivo, orações e por acreditar nos meus sonhos.

A minha mãe, Rosymeri Maria de Lima por todo apoio, incentivo, paciência, orações e por sempre acreditar nos meus sonhos.

Ao Meu Irmão, Noel Bruno de Lima, por todo apoio e por ir sempre me buscar, após largar das aulas no horário noturno.

Aos demais membros da minha família.

Ao meu orientador Dr. Clécio Souza Ramos pela oportunidade concedida, paciência e orientação. Peça primordial para que neste exato momento eu possa estar escrevendo tais palavras rumo ao fechamento de mais um ciclo.

Ao Doutorando em Química pela UFRPE, Marcílio Wagner Fontes, pela amizade e conhecimentos químicos ensinados. Por sempre me acompanhar para as coletas do material vegetal e apresentação do PIBIC.

A Mestranda em Química pela UFRPE, Raphaela Souza de Jesus, pelo apoio, ajuda, incentivo e palavras de conforto.

A Doutoranda em Química Pela UFRPE, Giselle Barboza Bezerra, pelo conhecimento químico prestado tanto na graduação quanto no IC. Por realizar as atividades Antimicrobianas.

Aos amigos e colegas conquistados durante a graduação, em especial: Rapahela Souza, Rodrigo Silva, Aldicéia Moura, Taciana Silva, Fábio Calado, Gabrielly Simões, Drielly Oliveira, Julyana Cosme, Giselle Barbosa, Marcílio

Fontes, Leonardo Alexandre, Bianca Silva, Eduardo Holanda, Fábila Martins, Rômulo Almeida, Milena Martins e outros que me fogem a memória.

Aos amigos encontrados fora do mundo acadêmico: Joyce Priscila, Aline Montenegro, Lucineide Souza, Paula Goes, Rosineide Gomes, Sandra Reynaux, Monica Reynaux, Délia Silva.

Gostaria de agradecer a todos que fazem da universidade que aprendi a amar o que ela é. Principalmente ao corpo docente, especificamente o do departamento de Química.

As centrais analíticas da UFRPE (CENAPESQ) e UFPE, por fornecer os espectros de RMN ^1H e ^{13}C e CG – EM dos compostos isolados e sintetizados para valorização e conclusão do atual trabalho de pesquisa.

Ao Cnpq pela bolsa concedida ao longo da pesquisa.

“A vida não é um corredor reto e tranqüilo que
Nós percorremos livres e sem empecilhos,
Mas um labirinto de passagens,
Pelas quais nós devemos procurar nosso
Caminho, perdidos e confusos, de vez em quando
Presos em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé,
Uma porta sempre será aberta para nós,
Não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos,
“Mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”

A.J. Cronin

RESUMO

Este trabalho teve como principal objetivo descrever a investigação fitoquímica e atividade antimicrobiana de compostos isolados das folhas de *P. callosum* e *P. cocorvadensis*, pertencente à família Piperaceae. Foram isolados de *Piper callosum* e *P. cocorvadensis* três amidas, incluindo a piperovatina, 4,5 dihidropiperlonguminina e piplartina e o éster (E) – 3,4,5 trimetoxicinamico de metila. Em função da atividade antimicrobiana os extratos e compostos isolados foram submetidos a ensaios frente 06 (seis) micro-organismos. O 1º extrato etanólico, o éster (E)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila e a amida 4,5 dihidropiperlonguminina isolados de *P. callosum* apresentou atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e com CMI de 625 µg/mL. Além disso o 2º extrato etanólico apresenta atividade em uma concentração 312,5 µg/mL contra a *Candida utilis*. Ao analisar os extratos etanólicos da *Piper cocorvadensis*, foi observado atividade frente a *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* com CMI de 19,5 µg/mL e 39,0 µg/mL, respectivamente. Os compostos obtidos foram caracterizados com base em seus respectivos dados espectrais de CG-EM, RMN ¹H e ¹³C.

Palavras-Chave: Atividade Antimicrobiana, Amidas e *Piper*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Alguns compostos isolados e suas respectivas atividades biológicas.	30
TABELA 2	Amidas isoladas de <i>Piper corcovadensis</i> e suas respectivas atividades biológicas	36
TABELA 3	Micro-organismos testes utilizados na atividade antimicrobiana	38
TABELA 4	Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C do Éster (<i>E</i>)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila em 300 MHz, CDCl_3	22
TABELA 5	Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da 4,5 Dihidropiperlonguminina 300MHz, CDCl_3	36
TABELA 6	Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da Piplartina em 300MHz, CDCl_3	42
TABELA 7	Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da Piperovatina em 300MHz, CDCl_3	43
TABELA 8	Concentração Mínima Inibitória –CMI do extrato das folhas e compostos isolado de <i>P. callosum</i>	44
TABELA 9	Concentração Mínima Inibitória –CMI do extrato das folhas de <i>P. corcovadensis</i>	45

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da morfina e quinina	17
FIGURA 2	Metabólitos secundários isolados de <i>Piper</i>	19
FIGURA 3	Espécies do gênero <i>Piper</i>	20
FIGURA 4	<i>Piper callosum</i>	
FIGURA 5	Folhas da espécie de <i>Piper corcovadensis</i>	23
FIGURA 6	Amidas isoladas de <i>Piper cocorvadensis</i>	24
FIGURA 7	Ilustração de uma multiplaca com 96 poços	26
FIGURA 8	Fracionamento a vácuo com celite	28
FIGURA 9	CCD do Extrato bruto das folhas <i>Piper callosum</i>	31
FIGURA 10	CCD dos Extratos brutos das folhas <i>Piper corcovadensis</i>	32
FIGURA 11	Espectro de RMN ¹ H da fração A1	32
FIGURA 12	Espectro de RMN ¹³ C da fração A1	33
FIGURA 13	Espectro de massa do Éster (E)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila	33
FIGURA 14	Espectro de RMN ¹ H da fração A3	34
FIGURA 15	Espectro de RMN ¹³ C da fração A3	35
FIGURA 16	Espectro de massa da 4,5 Dihidropiperlonguminina	35
FIGURA 17	Proposta de fragmentação 4,5 Dihidropiperlonguminina	36
FIGURA 18	Espectro de RMN ¹ H da fração A5	37
FIGURA 19	Espectro de RMN ¹³ C da fração A5	38

FIGURA 20	Espectro de massa da piplartina	39
FIGURA 21	Proposta para a formação dos principais íons fragmentos da Piplartina por CG-MS	39
FIGURA 22	Espectro de RMN ¹ H da fração 23	41
FIGURA 23	Espectro de RMN ¹³ C da Fração 23	42
FIGURA 24	Espectro de massa da Fração 23	42
FIGURA 25	Proposta para as fragmentações apresentadas a amida Piperovatina por CG-MS	42

LISTA DE ABREVIações

CCD Cromatografia em Camada Delgada

AcOEt Acetato de Etila

CDCl₃ Clorofórmio Deuterado

Hex Hexano

RMN¹H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

δ Deslocamento Químico

CG-EM Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CMI Concentração mínima inibitória

CC Cromatografia em coluna

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 <i>Objetivo geral</i>	16
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Química dos Produtos Naturais	17
3.2 Família Piperaceae.....	18
3.3 Gênero <i>Piper</i>	19
3.4 Fitoquímica e atividades biológicas do gênero <i>Piper</i>	21
3.5 <i>Piper Callosum</i>	22
3.6 <i>Piper corcovadensis</i>	23
3.7 Algumas Amidas Isoladas de <i>Piper corcovadensis</i>	24
3.8 Atividades Biológicas de Amidas Isoladas de <i>Piper corcovadensis</i>	24
4. Metodologia	25
4.1 Coleta do Material Vegetal	25
4.2 Obtenção dos extratos brutos	25
4.3 Análise dos constituintes dos extratos brutos por Cromatografia Camada Delgada (CCD)	25
4.4 Atividade Biológica	26
4.4.1 Atividade antimicrobiana	26
4.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CMI	26
4.4.3 Leitura da Microplaca	28
4.5 Fracionamento por métodos cromatográficos	28
4.6.1 Fracionamento por métodos cromatográficos das folhas de <i>Piper callosum</i>	28
4.6.2 Cromatografias em Coluna <i>Piper callosum</i>	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32

5.1	Obtenção do extrato bruto da <i>Piper callosum</i> e <i>Piper corcovadensis</i>	32
5.2	Análise dos constituintes dos extratos brutos por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) das folhas de <i>Piper callosum</i> e <i>Piper corcovadensis</i>	32
5.3	Caracterizações por métodos espectroscópicos.....	33
5.3.1	Elucidação estrutural de compostos isolados de <i>Piper callosum</i>...	33
5.4.1	Elucidação estruturais compostos isolados de <i>Piper corcovadensis</i> 42	
5.5	Atividade biológica	45
5.5.1	Concentração Mínima Inibitória-CMI.....	45
6.	CONCLUSÃO	48
7.	REFERÊNCIAS	49
	APENDICES.....	55

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem uma variedade de substâncias biologicamente ativas, sendo consideradas fontes na descoberta de novas moléculas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (SIMÕES *et al.*, 2001).

Estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Piper* o mais abrangente na família Piperaceae com mais de 2000 espécies, têm revelado classes específicas de metabólitos secundários com atividades biológicas, incluindo alcalóides, amidas, chalconas, cromenos, flavonóides, lignanas, terpenos, esteróides, derivados porfirínicos e derivados do ácido benzóico. (ARAUJO *et al.*, 2018)

Dentre as espécies do gênero *Piper*, encontra-se a *Piper callosum* e *Piper cocorvadensis*, espécies comumente usadas na medicina popular brasileira, principalmente na região norte do País. (Andrade *et al.*,2009; Marques *et al.*,2009). As folhas são utilizadas para o tratamento de reumatismo, dores, gripe e tosse, diarreia, cólica intestinal, diarreia, náusea, dor de dente, dor muscular, picadas de mosquito e gonorréia.

De acordo com Santos e Novales (2012), devido ao surgimento de microorganismos resistentes as terapias empregadas nos tratamentos de diversas doenças, há uma grande preocupação mundial, que tem estimulado a pesquisa de novos agentes antimicrobianos provenientes de plantas (Santos e Novales, 2012).

A partir desses relatos iniciou o estudo químico e biológico dos extratos e compostos isolados de *P. callosum* e *P. corcovadensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

- Obter o perfil químico e avaliar atividade antimicrobiana das folhas de *Piper callosum* e *P. corcovadensis*.

2.2 *Objetivos específicos*

- Obter os extratos etanólicos das folhas de *P. callosum* e *P. corcovadensis* a partir do material seco e triturado;
- Isolar os metabólitos secundários das folhas de *P. callosum* e *P. corcovadensis*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos das folhas de *P. callosum* e *P. corcovadensis*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos isolados e seus derivados;
- Elucidar as estruturas dos compostos isolados e semi-sintetizados por CG-EM, RMN ^1H , ^{13}C .

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Química dos Produtos Naturais

A natureza, de forma geral, tem sido considerada uma fonte de substâncias orgânicas biologicamente ativas que são amplamente usadas para diversos fins pela humanidade, principalmente para fins medicinais. O Reino Vegetal, em particular, de onde é isolada a maioria das moléculas bioativas conhecidas usadas para fins terapêuticos na medicina convencional e alternativa. (PINTO et al. 2002).

A partir do século XIX foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas usadas na medicinal popular, exemplo do alcalóide morfina, isolada em 1806 da planta *Papaver somniferum*. E a Quinina, foi isolada da casca de *Cinchona calisaya*. (Borges et al. 2012 e Silva 2016).

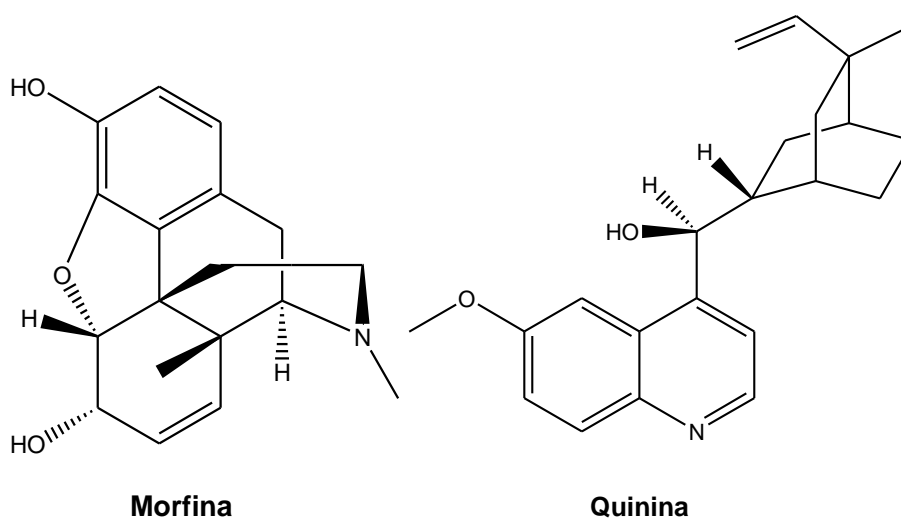


Figura 1. Estrutura química da morfina e quinina

Dessa forma, os produtos naturais possuem um importante papel para a descoberta e planejamento de novos candidatos a fármacos (MISHRA E TIWARI, 2011).

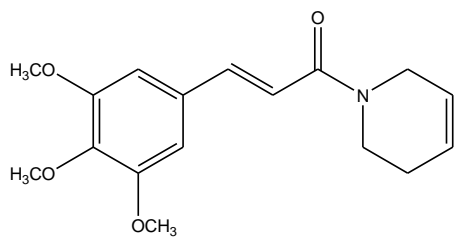
3.2 Família Piperaceae

A família Piperaceae, uma das maiores dentre as angiospermas basais, apresenta distribuição pantropical, com centro de diversidade localizado nas Américas Central e do Sul (Yuncker 1958; Jaramillo & Manos 2001; Medeiros & Guimarães 2007 Silva e Guimarães 2009) com cerca de 3000 espécies identificadas (Quijano - Abril et al. 2006; Wanke et al. 2007 e Silva e Guimarães 2016).

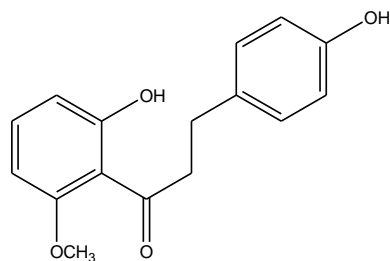
A família Piperaceae possui cerca de 3000 espécies distribuídas em 5 gêneros, incluindo, *Macropiper*, *Zippelia*, *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* (PAZ, GUIMARÃES e RAMOS 2017). Dos cinco gêneros hoje considerados para a família, os três últimos ocorrem no Brasil principalmente nas florestas Atlântica e Amazônica e são também encontrados no Parna do Itatiaia (MONTEIRO & GUIMARÃES, 2008).

Piper e *Peperomia* representam os mais importantes gêneros da família Piperaceae, com 2000 e 1700 espécies respectivamente. (Kloss et al., 2016)

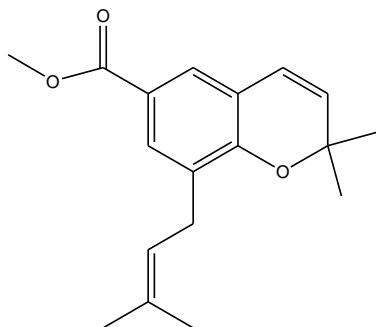
A família Piperaceae conhecida devido a sua importância econômica, biológica e ecológica devido à diversidade de metabólitos secundários biologicamente ativos como terpenos, pironas, lactonas, cromenos, chalconas, lignóides, amidas e alcalóides isolados dos diversos tecidos de suas espécies (Figura 2). (KATO e FURLAN, 2007 e BEZERRA, 2016).



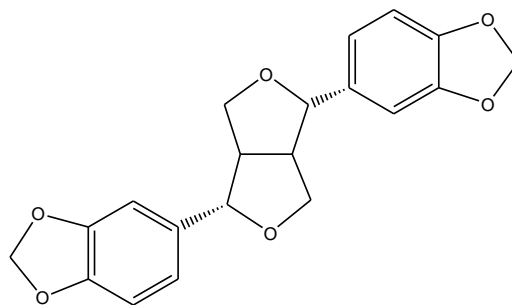
Piplartina (Amida)



Flavokawainc (Chalcona)



Ácido Gaudichaudiano (Cromeno)



Sesamina (Lignana)

Figura 2. Metabolitos secundarios isolados de *Piper*

3.3 Gênero *Piper*

O gênero *Piper*, pertencente à família Piperaceae, teve o primeiro estudo químico da espécie realizado em 1819 com o isolamento da piperamida piperina, um princípio ativo pungente da pimenta-do-reino, *Piper nigrum* (SILVA 2011).

O gênero Piper (Figura 3) possui mais de 2000 espécies espalhadas pelos hemisférios Norte e Sul, sendo o maior gênero da família Piperaceae (SMITH et al., 2008). No Brasil foram identificadas cerca de 1000 espécies. (Nascimento et al. 2012 e Paz, Guimarães e Ramos 2017).

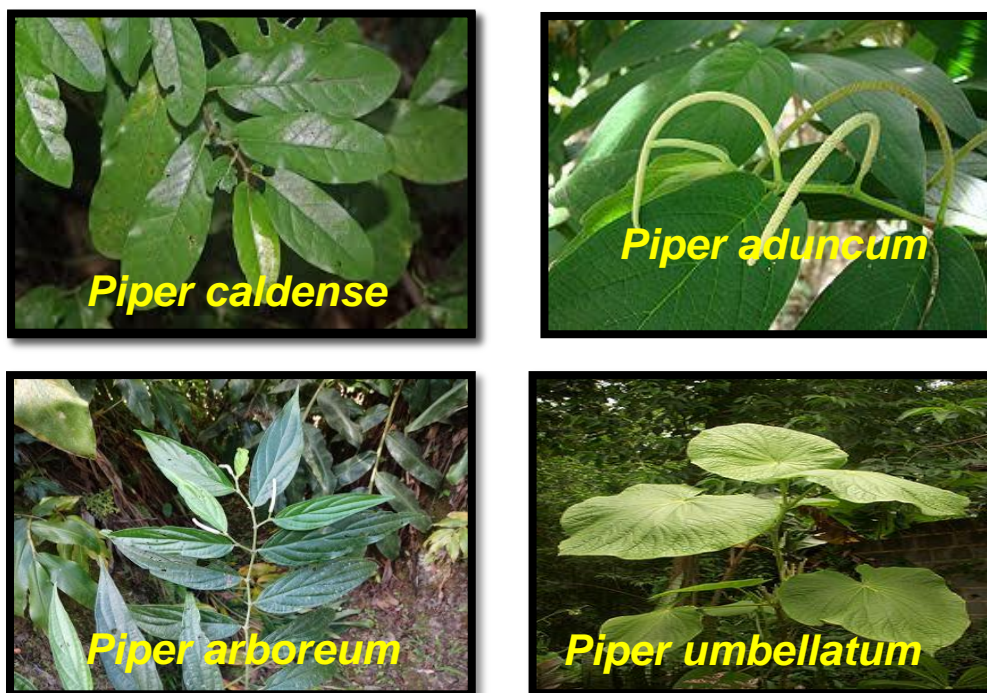


Figura 3. Espécies do gênero *Piper*

Fonte: Google Imagens

Algumas espécies de *Piper* (folhas) são utilizadas na medicina popular para o tratamento de algumas doenças. Como por exemplo, a espécie *Piper umbellata*, conhecida no Brasil como pariparoba, caapeba, capeba e malvisco é uma planta arbustiva, de ocorrência pantropical (usada no tratamento de doenças do fígado, epilepsia e como antimalárica e antiinflamatória (KIJJOA et al 1980; FURLAN et al. 2009; AMORIM et al. 1988; DESMACHELIER et al. 200 e FURLAN et al. 2009).

Há um crescente número de estudos químicos e biológicos com espécies de *Piper* devido à diversidade na classe de compostos secundários isolados e de atividades biológicas como atividade antifúngica, tripanocida, antiparasitária e antioxidante destas espécies (PARMAR et al. 1997; NAVICKIENE et al. 2000; KATO e FURLAN, 2007; REGASINI et al. 2008; COTINGUIBA et al. 2009 e SILVA, 2011)

3.4 Fitoquímica e atividades biológicas do gênero *Piper*

A atividade biológica de espécies de *Piper* é muito diversificada e também muito utilizada na medicina popular para tratamento de inúmeras doenças (Vieira, 1992; Di Stasi, 2000; Lorenzi & Matos, 2002 e Bastos e Silva 2007).

Tabela 1. Alguns compostos isolados e suas respectivas atividades biológicas

Espécie	Atividade	Substância	Referência
<i>P. Ottonia corcovadensis</i>	Antifúngica	Corcovadina	Marques <i>et al.</i> , (2007)
<i>P. aduncum</i>	Anti -helmíntico	1,8-cineol (eucalipto)	Oliveira <i>et al.</i> , 2014
<i>P. guineesen</i>	Efeitos Anti-depressivos	Terpenos	Oyemitan <i>et al.</i> , (2015)
<i>P. alatabaccum</i>	Larvicida	Dilapiol	Santana, H. T., (2012)
<i>P. mikanianum</i>	Acaricida	Fenilpropanóides (dilpiol e safrol)	Ferraz <i>et al.</i> , (2010).
<i>P. auritum</i>	Leishmanicida	Safrol	Monzote <i>et al.</i> , (2010)
<i>P. affinis hispidinervum</i>	Inseticida	Sarisan	Fazolin, M. <i>et al.</i> , (s/d)
<i>P. arboreum</i>	Antimicrobiana	Curcumeno	Nascimento, (2015)
<i>P. tubercutalum</i>	Bactericida	Piperlonguminina	Silva <i>et al.</i> , (2008)
<i>P.nigrum</i>	Inseticida, analgésica e antiinflamatória	Piperina	Pamar <i>et al.</i> , 1997; Scott <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. tubercutalum</i>	Atifúngia contra cladosporioides e <i>C. sphaerospermum</i>	Diidropiplartina	Navickiniene <i>et al.</i> , 200; Silva <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. crassinervium</i>	Antifúngica	Ácido 4-hidroxi-3-(3',7'-dimetil-1'oxo-octa-2'-E-6'-dienil)-benzoico	Kato, 2006
<i>Piper hostmannianum</i>	Antifúngica	Metil 3-(2,3-dihidroxi-3-metilbutil)-4-hidroxibenzoato	LAGO, 2004

3.5 *Piper Callosum*

Dentre as espécies do gênero *Piper*, encontra-se a *Piper callosum* Ruiz & Pav (Figura 4), uma planta popularmente conhecida como "elixir-paregórico", "óleo-elétrico", "ventre-livre", "erva-de-soldado", "panquilé", "matricá" No Brasil (Andrade et al., 2009), é um arbusto nativo da Bolívia, Brasil, Peru e Colômbia.

No Brasil, ocorre no Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Distrito Federal, Mato Grosso, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Paraná (Guimarães et al., 2014). Usada na forma de infusão para tratar diarreia, cólica intestinal, diarreia, náusea, dor de dente, dor muscular, picadas de mosquito e gonorréia, e têm propriedades repelentes, adstringentes, hemostáticas, digestivas, diuréticas e depurativas (Andrade et al., 2009).

Em mercados públicos no norte do Brasil, as partes aéreas de *P. callosum* são vendidas frescas, secas, moídas e raramente em pó ou como ingrediente em preparações artesanais chamadas "garrafadas" para fins medicinais. A planta também é cultivada em quintais e jardins medicinais.

Uma série de fito-constituintes voláteis e fixos foram identificados de *P. callosum*, incluindo alcalóides amidas; terpenos, tais como monoterpenos de hidrocarbonetos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos de hidrocarbonetos, sesquiterpenos oxigenados e esteróides e compostos fenólicos, tais como flavonóides oxigenados e fenilpropanóides (Parmar et al., 1997, Facundo et al., 2004, Andrade et al., 2009).

Os óleos essenciais obtidos das folhas de *P. callosum* apresentaram atividades antifúngicas, inseticidas e larvicidas (Andrade et al., 2009).



Figura 4. *Piper callosum*

3.6 *Piper cocorvadensis*

Outra espécie do gênero *Piper* é a *P. cocorvadensis* (Miq.) C. DC (syn. *Ottonia cocorvadensis*), (Figura 5), também conhecido como jaborandi falso, sendo usada na medicina popular brasileira no alívio da dor de dente. Um estudo revelou que a piperovatina composto majoritário isolado do extrato de folhas e raízes da *P. cocorvadensis* apresenta atividades: bactericidas, tóxicas, inseticidas, piscicidas, antiinflamatórias e anestésicas. (Marques, 2009).



Figura 5. Folhas da espécie de *Piper cocorvadensis*

Os estudos fitoquímicos de *P. cocorvadensis* permitiu o isolamento de amidas a partir do extrato etanólico de suas raízes como as amidas piperovatina e chingchengenamida (FACUNDO *et al.*, 2004a). Em outro estudo, a partir do extrato éter de petróleo das raízes da planta coletada na montanha do CorcovadoRJ, Brasil que apresentou atividade anestésica foram isoladas cinco amidas: piperovatina, piperlonguminina, cocorvadina, isopiperlonguminina e isococorvadina. (Figura 6). A atividade anestésica da planta foi atribuída à presença da amida piperovatina (COSTA & MORS, 1981).

3.7 Algumas Amidas Isoladas de *Piper corcovadensis*

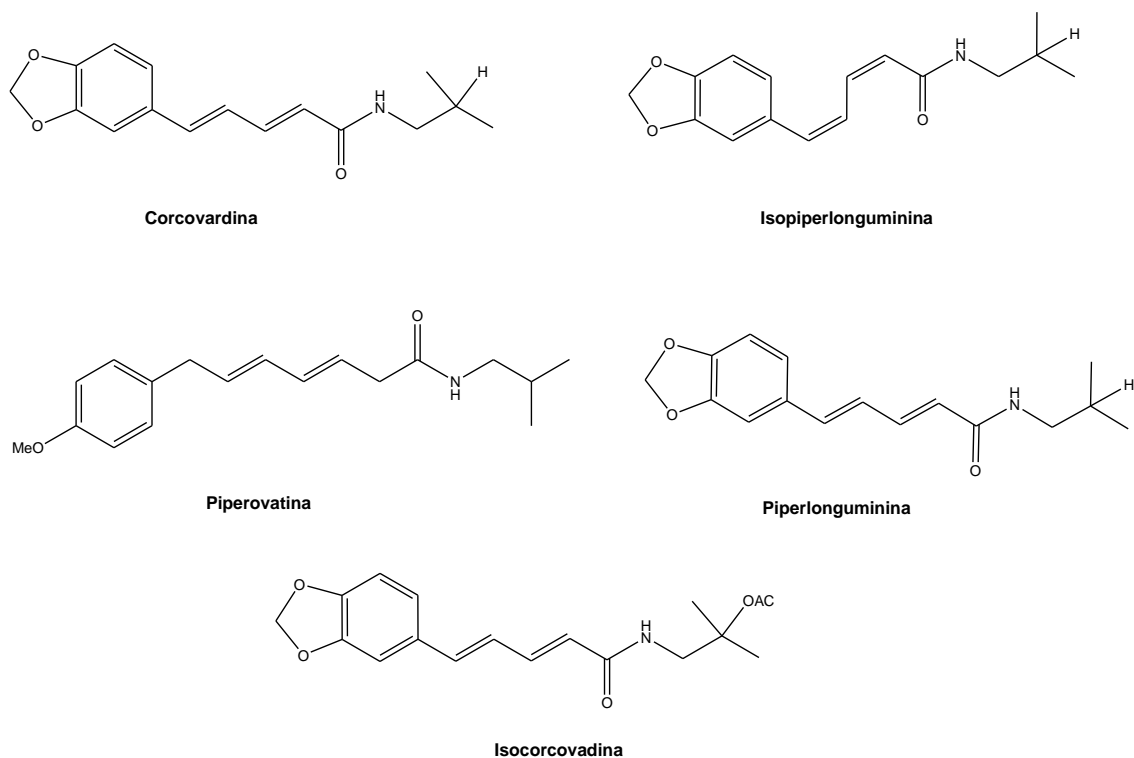


Figura 6. Amidas isoladas de *Piper corcovadensis*

3.8 Atividades Biológicas de Amidas Isoladas de *Piper corcovadensis*

Tabela 2. Amidas isoladas de *Piper corcovadensis* e suas respectivas atividades biológicas

Substância	Atividade	Espécies	Referência
Corcovardina	Antifúngica		Marques <i>et al.</i> , (2007)
Piperovatina	Inseticida		
Piperlonguminina			
Isopiperlonguminina			
Isocorcovardina			

4. Metodologia

4.1 Coleta do Material Vegetal

As espécies de *Piper callosum* e *Piper corcovadensis* Mata Atlântica do estado do Amapá e no Jardim botânico do Recife, respectivamente.

4.2 Obtenção dos extratos brutos

Foram utilizados 718,2g de folhas de *piper callosum* e 201,9 g de folhas de *piper corcovadensis* que foram secas em estufa por 48h a 40°C e em seguida foram maceradas separadamente em um moinho de facas para obtenção dos seus respectivos extratos brutos. Cada material vegetal seco e macerado foi submetido à extração exaustiva com os respectivos sistemas: EtOH, EtOH/H₂O e Butanol (3x de 400 mL), pelo método de maceração a frio por 48h. Todo material vegetal foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (40°C, ± 80rpm) obtendo-se 15g de extrato bruto da *piper callosum* e para a *piper corcovadensis* foi obtido 4g no sistema etanólico e 5g no sistema etanol/água. Com base no peso do material seco utilizado e a massa de extrato obtido, calculou-se o rendimento.

4.3 Análise dos constituintes dos extratos brutos por Cromatografia Camada Delgada (CCD)

Os extratos brutos das folhas foram inicialmente analisados por cromatografia camada delgada (CCD), (Figura 9 e 10) usando mistura binária Hex:AcOEt 7:3 para obtenção do preliminar dos perfis cromatográficos dos extratos brutos.

4.4 Atividade Biológica

4.4.1 Atividade antimicrobiana

Para avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antimicrobiana das folhas de *P. callosum* e *Piper corcovadensis* foram utilizados 06 (seis) micro-organismos provenientes da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 3). A suspensão dos microrganismos foi padronizada pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em água destilada, correspondente a uma concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL para bactérias e 10⁷ UFC/mL para fungos.

Tabela 3. Micro-organismos testes utilizados na atividade antimicrobiana

Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas	Fungos Filamentosos
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02	<i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224	<i>Candida albicans</i> UFPEDA (1007)
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 86	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416	<i>Candida utilis</i> UFPEDA (1009)

4.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CMI

O teste de CMI foi realizado através da técnica de microdiluição, utilizando multiplacas com 96 poços, conforme o Clinicaland Laboratory Standards Institute– 2010. Cada multiplaca foi padronizada conforme mostrado na (Figura 7).

		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
A	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	2500
B	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1250
C	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	625
D	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	312.5
E	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	156.2
F	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	78.1
G	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	39.0
H	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	19.5
	M	S	MI	P		A1				A2			

M= Meio, S= Solvente+Meio, MI= Microrganismo+Meio, P= Padrão+Meio, Amostra 1, Amostra 2.

Figura 7. Ilustração de Multiplaca com 96 poços.

Foram utilizados meios de cultura líquidos Saubouraud (Sab) para Fungos Filamentosos e meio líquido Mueller Hinton (MH) para Bactérias Gram Positivas e Gram Negativas. Nos poços da solução teste, (Linha A, Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12), Foram distribuídos 175 μL de meio líquido e adicionado 25 μL da solução estoque (Amostra), totalizando nesta primeira linha 200 μL . Nas demais linhas (B, C, D, E, F, G e H, Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12), colocou-se 100 μL de meio. Na coluna 2 - Solvente (S), além dos 75 μL de meio, foi acrescentado 25 μL de solvente. Na coluna 3 - Microrganismo (MI) foram distribuídos 100 μL de meio e acrescentado 10 μL dos inóculos microbianos padronizados. Por final, na coluna 4 – Padrão (P) foram colocados 97,5 μL de meio e acrescentados 2,5 μL da solução Padrão.

Terminado a etapa anterior iniciou-se o processo de microdiluição seriada, que foram retiradas com uma micropipeta 100 μL da Linha A - Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12, e depositados na Linha B (Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12), sendo misturados e retirados novamente 100 μL , seguindo este processo sucessivamente até a Linha H, obtendo-se concentrações decrescentes que variam de 2500 até 19.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Após a diluição das amostras, se adicionará 10 μL dos inóculos microbianos padronizados, exceto nos poços da Coluna 1 - Meio (M), Coluna 2 - Solvente (S) e Coluna 4 – Padrão (P). As microplacas

foram cultivadas em estufas distintas: a 37°C por 18 a 24 hrs para as bactérias, e 30°C por 48 a 72 hrs para Fungos Filamentosos.

4.4.3 Leitura da Microplaca

Após o período de cultivo, as microplacas foram reveladas com a adição de 10µL da solução de risazurina a 0,01% e incubadas por 1-3 horas para que ocorresse a mudança de coloração nos poços. Segundo Lima, (2013) a resazurina é um corante azul indicador de óxido-redução, onde a manutenção da cor azul nos poços é interpretada como inibição de crescimento, enquanto o desenvolvimento da cor rosa, ocorrência de crescimento. A CMI foi definida como a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do micro-organismo.

4.5 Fracionamento por métodos cromatográficos

4.6.1 Fracionamento por métodos cromatográficos das folhas de *Piper callosum*

O extrato bruto etanólico das folhas de *P. callosum* foi inicialmente fracionado em uma cromatografia a vácuo usando como fase estacionaria celite 545 (Dinâmica) usando um funil de Büchner acoplado a um kitassato. A amostra do extrato bruto foi dissolvida em EtOH/H₂O 7:3 e eluída em gradiente de polaridade Hex:AcOEt. O fracionamento resultou em 12 frações (Fração A - L), conforme o fluxograma na Figura 8. A Fração A foi fracionada utilizando cromatografia em coluna (CC) com sílica gel (230-400 mesh, Merck), o que resultou em 58 frações.

4.6.2 Cromatografias em Coluna *Piper callosum*

A fração A obtida através do fracionamento em cromatografia a vácuo com celite 545, do extrato bruto etanólico das folhas de *Piper callosum* foi submetida a cromatografia em coluna (CC), onde utilizou-se 30g de sílica gel

60 para cromatografia em coluna (0,063-0,2mm/70-230 mesh ASTM), utilizando o sistema Hex:AcOEt 7:3 em decrescimento de 10%.

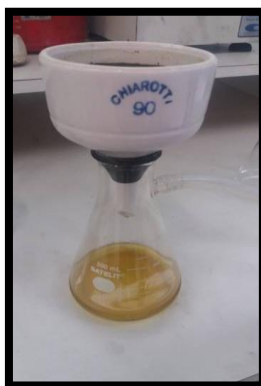
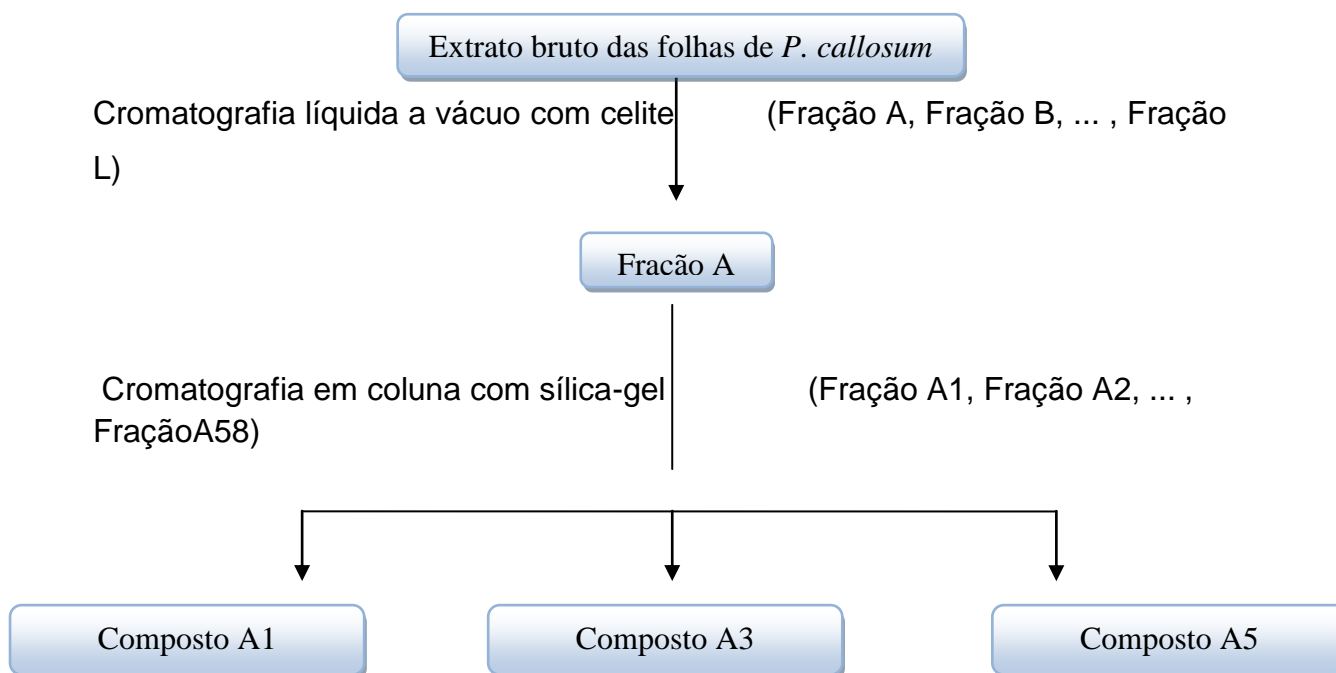


Figura 8. Fracionamento a vácuo com celite



Fluxograma 1. Etapas do fracionamento do extrato bruto das folhas de *P. callosum*

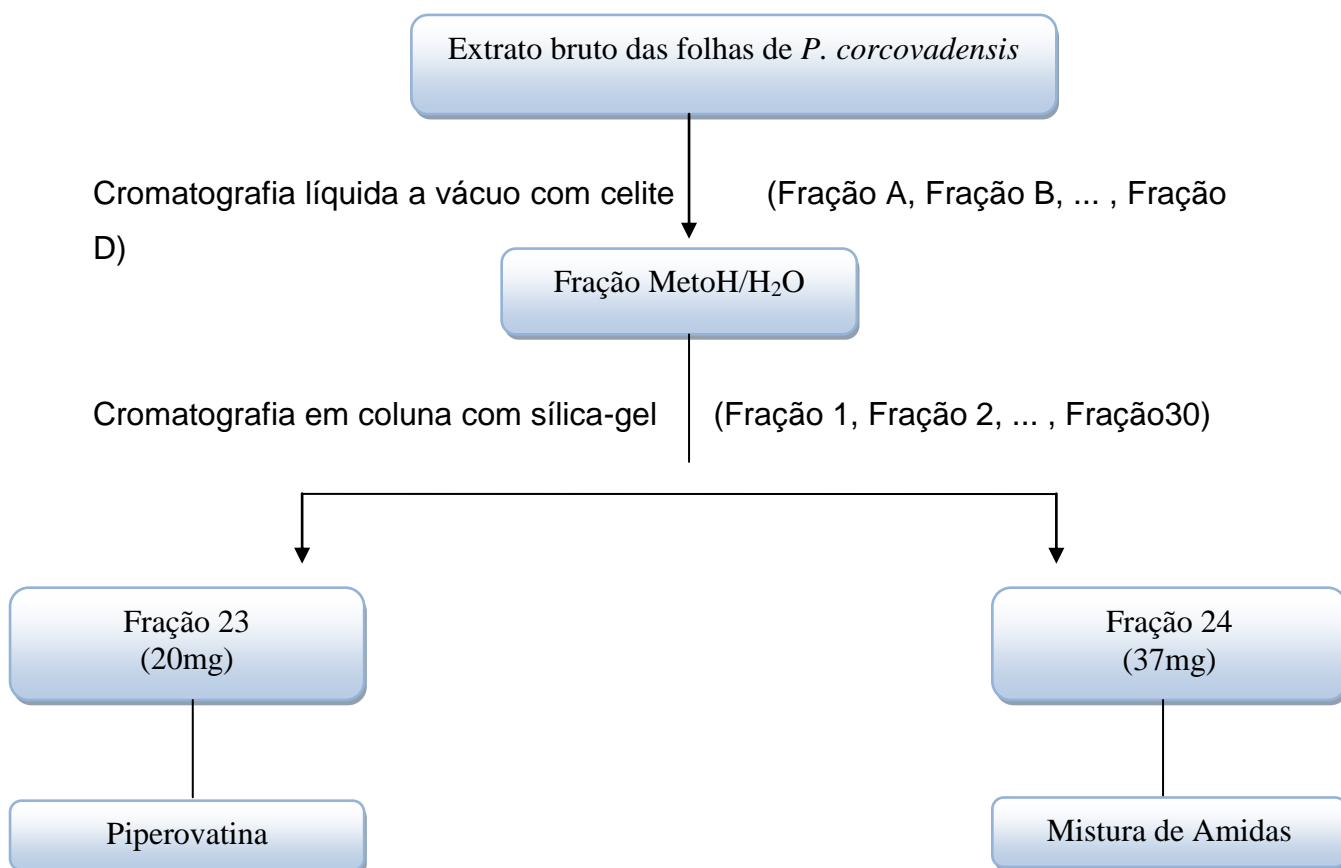
4.6.2 Fracionamento por métodos cromatográficos das folhas de *Piper corcovadensis*

O extrato bruto etanólico das folhas de *P. corcovadensis* foi inicialmente fracionado em uma filtração a vácuo usando como fase estacionária celite 545 (Dinâmica). A amostra do extrato bruto foi dissolvida em uma mistura

binária de 7:1 Metanol/H₂O e eluída consecutivamente com os solventes, 100% Hexano, 1:1 Hex/AcOEt e 100% AcOEt. O fracionamento resultou em 4 frações (Fração A-D), conforme o fluxograma 1. A Fração A foi fracionada utilizando cromatografia em coluna (CC) com sílica gel (230-400 mesh, Merck), o que resultou em 30 frações.

4.6.3 Cromatografias em Coluna *Piper corcovadensis*

A fração A obtida através do fracionamento em cromatografia líquida a vácuo com celite 545, do extrato bruto EtOH/H₂O das folhas de *Piper corcovadensis*, foi submetida a cromatografia em coluna (CC), onde utilizou-se sílica gel 60 para cromatografia em coluna (0,063-0,2mm/70-230 mesh ASTM), utilizando o sistema Hex:AcOEt 7:3 em decrescimento de 10%.



Fluxograma 2. Etapas do fracionamento do extrato bruto das folhas de *P. corcovadensis*

4.6 Caracterização por métodos Espectroscópios

As estruturas dos compostos isolados das espécies de *Piper* foram determinadas com base nas interpretações das análises dos dados, CG-EM, RMN ^1H e ^{13}C .

Análises de RMN foram realizadas em equipamento de Varian – Unitty Plus 300 MHz para RMN ^1H e 75 MHz para RMN ^{13}C , sendo as amostras dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato bruto da *Piper callosum* e *Piper corcovadensis*

A partir da extração de 718,2g de folhas de *P. callosum* foram obtidos 15,05g de extrato bruto, com rendimento de 2,095%, enquanto , na extração de 201,9g de folhas de *P. corcovadensis* foram obtidos 4,0 e 5,0g de extrato bruto etanólico e etanol/água (1:1), obtendo 2,47% e 1,91% de rendimento respectivamente.

5.2 Análise dos constituintes dos extratos brutos por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) das folhas de *Piper callosum* e *Piper corcovadensis*

Os extratos brutos etanólicos das folhas de *P. callosum* e *P. corcovadensis* foram inicialmente analisada por cromatografia camada delgada (CCD), como pode ser observado na figura 9 e 10.



Figura 9. CCD do Extrato bruto das folhas *Piper callosum* eluída com Hex:AcOEt 7:3

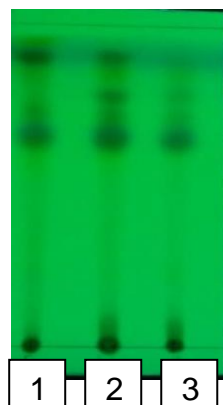


Figura 10. CCD do Extrato bruto das folhas *Piper callosum* eluída com Hex:AcOEt 7:3

5.3 Caracterizações por métodos espectroscópicos

5.3.1 Elucidação estrutural de compostos isolados de *Piper callosum*

O espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto A1 (Figura 11), mostrou dois pares de dubletos em δ 7,63 (1 H, $J = 15,0$ Hz) e δ 6,37 (1 H, $J = 18,0$ Hz), de hidrogênios ligados a dupla ligação *E*. Um singlete em δ 6,74 para dois hidrogênios aromáticos. Mostrou sinais de metoxila de éter aromático, sendo um sinal em δ 3,89 integrado para 6 hidrogênios H-1 e 3,88 integrado para 3 hidrogênios H-1' no anel trimetoxifenil e um sinal em δ 3,81 integrado para 3 hidrogênios na posição H-5.

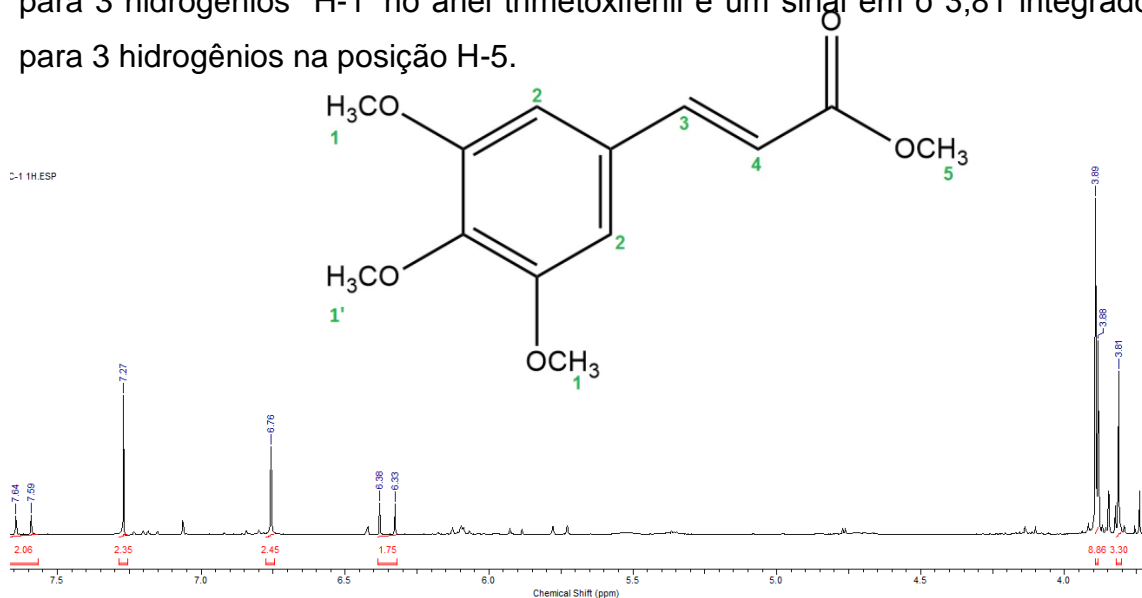


Figura 11. Espectro de RMN ^1H do composto A1(300 MHz, CDCl_3)

O espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) do composto A1 (Figura12) exibiu dois sinais em δ 56,1(C11 C12) e δ 60,9 (C13) referentes as metoxilas do anel benzênico. A presença dos sinais em δ 105,2(C2 C6); δ 153,2 (C3

C5); δ 140,1 (**C4**) e δ 128,1(**C1**) são atribuídos aos carbonos do anel aromático. Os sinais em δ 144,8 (**C7**) e δ 117,0 (**C8**) referentes a dois carbonos com configuração *E* e dois sinais em δ 167,3 (C9) e δ 51,7 ppm (**C10**). A interpretação dos dados espectrais e comparação com os dados da literatura confirmando o composto como o Éster (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila.

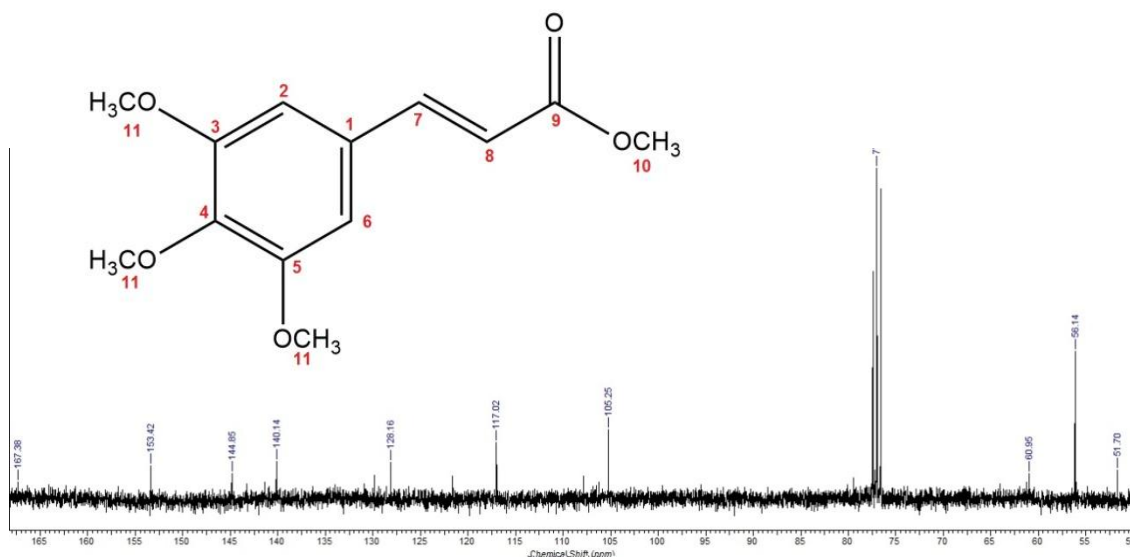


Figura 12.Espectro de RMN ^{13}C do composto A1(75 MHz, CDCl_3)

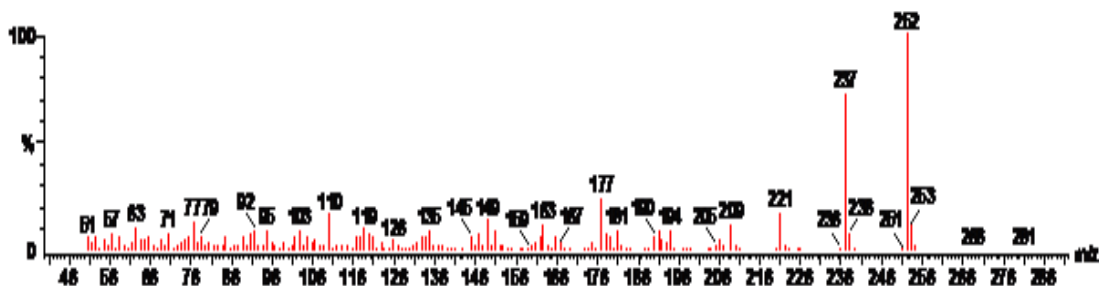


Figura 13. Espectro de massa do Éster (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_6$, $M=252$).

Tabela 4. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C do Éster (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila em 75 MHz, CDCl_3

C	Fração A1	3,4,5 - trimetoxicinamato de
---	-----------	------------------------------

Posição			metila*	
	$\delta^1\text{H}$, (J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$, (J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	--	128,1	--	130,4
2	--	105,2	--	105,8
3	--	153,2	--	153,9
4	--	140,1	--	140,72
5	--	153,2	--	153,9
6	--	105,2	--	105,8
7	7,63 (1 H, d, J =15,0Hz),	144,8	7,60 (1 H, d,J=16,0Hz),	146,3
8	6,37(1 H, d, J = 6,0Hz)	117,0	6,30 (1 H, d, J 16,0Hz)	177,5
9	--	167,3	--	167,8
10	3,81(s)	51,7	3,79(s)	52,12
11	3,89	56,1	3,86	56,65
12	3,89(s)	56,1	3,86	56,65
13	3,89	60,0	3,87	61,4

O espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto A3 (Figura 14), exibiu dois simpletos em δ 0,96 referentes as metilas na posição H-12 e um simpleto em δ 5,91 referente ao grupo metilenodioxí (2H-2). Um multiplete (1H, J = 6Hz) em δ 1,75 na posição H-11. Um triplete em δ 2,45 (2H J=15Hz) na posição H-10. Um duplete em δ 5,79 (1H J=15Hz) hidrogênio na posição H-8. Um duplo duplete em δ 6,86 (1H J =15) referente ao hidrogênio na posição H-7 que acopla no H-6. Um multiplete em δ 6,73(2H J=15Hz) referente na posição H-6, um triplete em δ 3,16 (1H J=6Hz) na posição H-5.

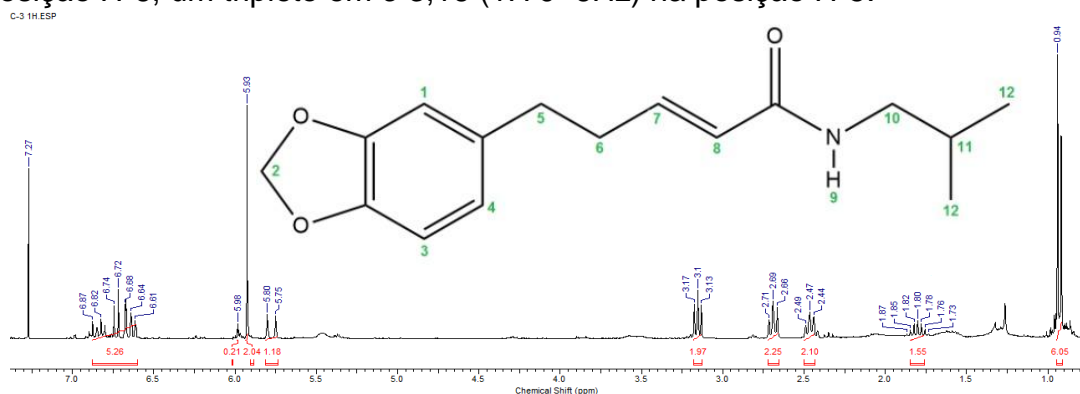


Figura 14. Espectro de RMN ^1H do composto A3 (300MHz, CDCl_3)

No espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) do composto A3 (Figura 15), A presença do sinal em δ 100,7 (**C4**) referente ao carbono metilenodioxí. A presença dos sinais δ 145,7 e 148,9 (**C3 C5**); δ 108,1(**C2**); δ 110,0 (**C6**); δ 134,3 (**C1**); δ 124,2 (**C7**) são referentes aos carbonos do anel benzênico. Os sinais em δ 34,0 e δ 35,3 correspondem aos carbonos **C-8** e **C-9**. O sinal 165,7 referente à carbonila de amidas. Os sinais em δ 46,8; δ 28,5; δ 20,1 correspondem aos carbonos **C-13**, **C14** e **C15**.

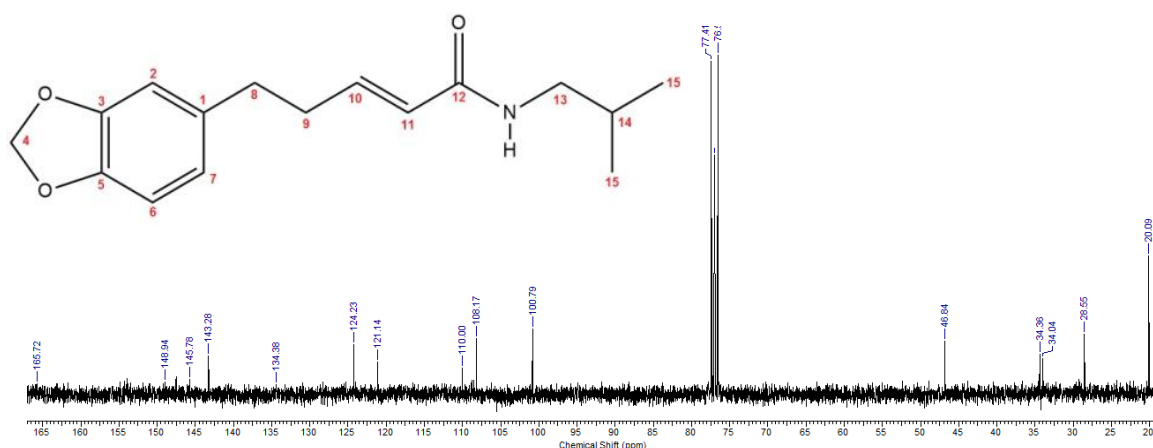


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C do composto A3 (75 MHz, CDCl_3)

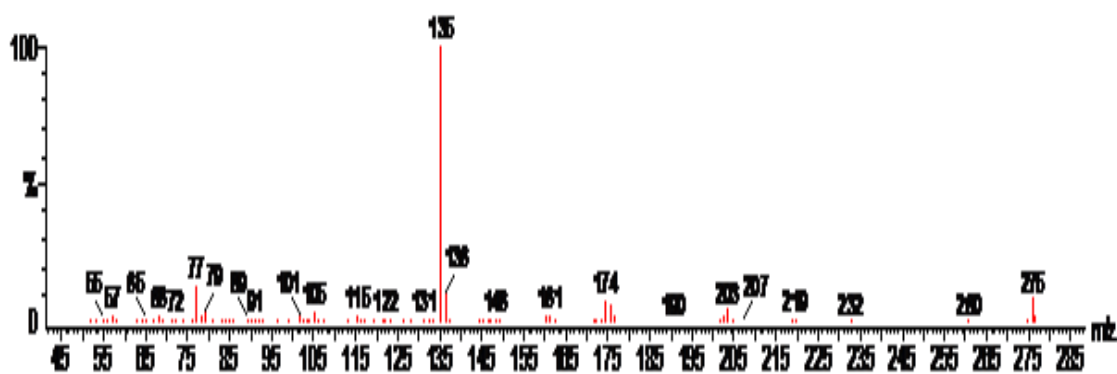


Figura 16. Espectro de massa da 4,5 Dihidropiperlonguminina ($\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}$, $M = 275$)

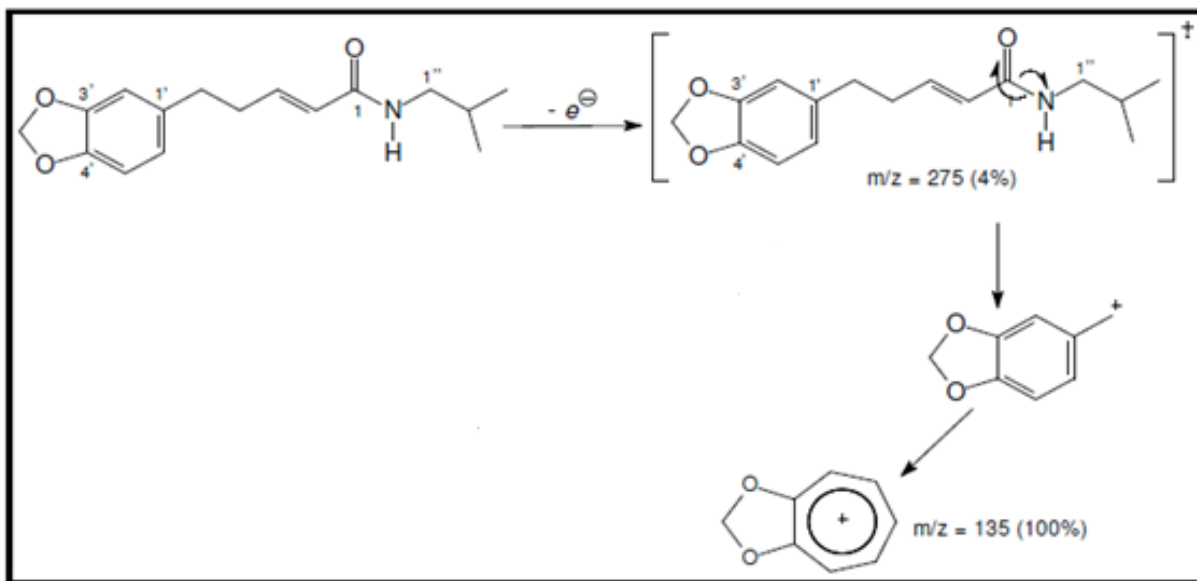


Figura 17. Proposta de fragmentação 4,5 Dihidropiperlonguminina por CG-EM DWUMABADU *et al.* (1976).

Tabela 5. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C do da amida 4,5 Dihidropiperlonguminina em 300MHz, CDCl_3

C	Fração A3	Piplartina*
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	134,38	134,8
2	108,17	108,1
3	145,78	145,7
4	100,79	100,6
5	146,94	147,5
6	110,0	108,4
7	124,23	124,3
8	34,1	34,3

9	34,04	34,0
10	143,28	143,0
11	121,14	120,9
12	165,72	165,9
13	46,84	46,8
14	28,55	28,4
15	20,0	20,0

*Navickiene *et al.*, 2000.

O espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto A5 (Figura 18), apresentou hidrogênios metilênicos, metoxílicos, aromáticos e vinílicos. Os singletos em δ 6,80 (2H aromáticos), δ 3,88 (6H metoxílicos) e em δ 3,87 (3H metoxílicos) correspondem aos sinais do hidrogênio trimetoxifenílico. Os sinais em δ 7,44(dt,1H) e δ 7,64(d,1H) correspondem aos hidrogênios vinílicos das posições 5 e 6. Dupletos de tripleto em δ 6,03 H-1(dt, $J_{1,2}$ e $J_{2,1} = 9,6$ e $1,5$ Hz) e 6,95 H-2 (dt, $J_{2,1}$ e $J_{2,3} = 9,6$ e $4,1$ Hz) que é caracterizada da dupla ligação em Z, correspondem aos hidrogênios das posições 1 e 2. O hidrogênio em δ 2,46 corresponde a um multipletto na posição H-3. O sinal do hidrogênio H-4 em 4,03 é desblindado pelo átomo de nitrogênio vicinal.

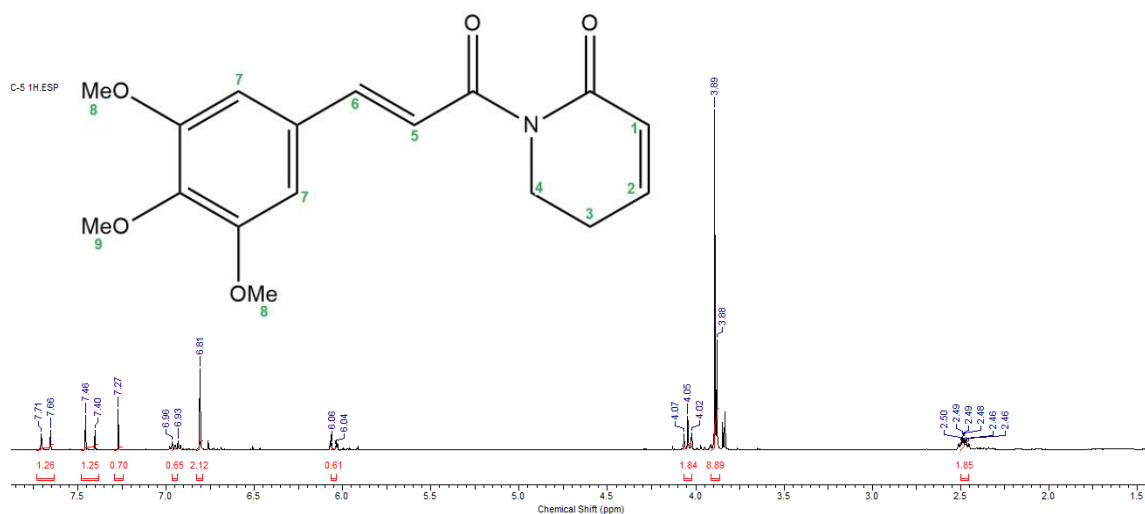


Figura 18. Espectro de RMN ^1H do composto A5 (300 MHz, CDCl_3)

O espectro de RMN ^{13}C do composto A5 (300 MHz, CDCl_3) da fração A5, (figura 19), exibiu dois sinais em δ 165,8 (**C2**) e δ 168,8 (**C7**) confirmando a presença dos grupos carbonílicos. Dois sinais em δ 125,8 (**C3**) e δ 145,4 (**C4**) referentes aos carbonos sp^2 do anel dihidropiridona, e os sinais δ 24,7 (**C5**) e δ 41,6 (**C6**) pertencentes aos carbonos sp^3 vicinais aos carbonos da insaturação e ao nitrogênio. Devido a um plano de simetria no anel aromático, e por isso os sinais em δ 105,5; δ 153,3 e δ 56,1 são atribuídos cada um a dois carbonos magneticamente equivalentes. Dois sinais em δ 56,1 e δ 60,9 são atribuídos aos carbonos metoxilados ligados ao anel benzênico e os sinais em δ 121,0 (**C8**) e δ 143,9 (**C9**) referentes a dois carbonos com configuração trans. A interpretação dos dados espectrais e comparação com os dados da literatura (JUNIOR, 2013) permitiu a sua caracterização como sendo a amida piplartina (Figura 19).

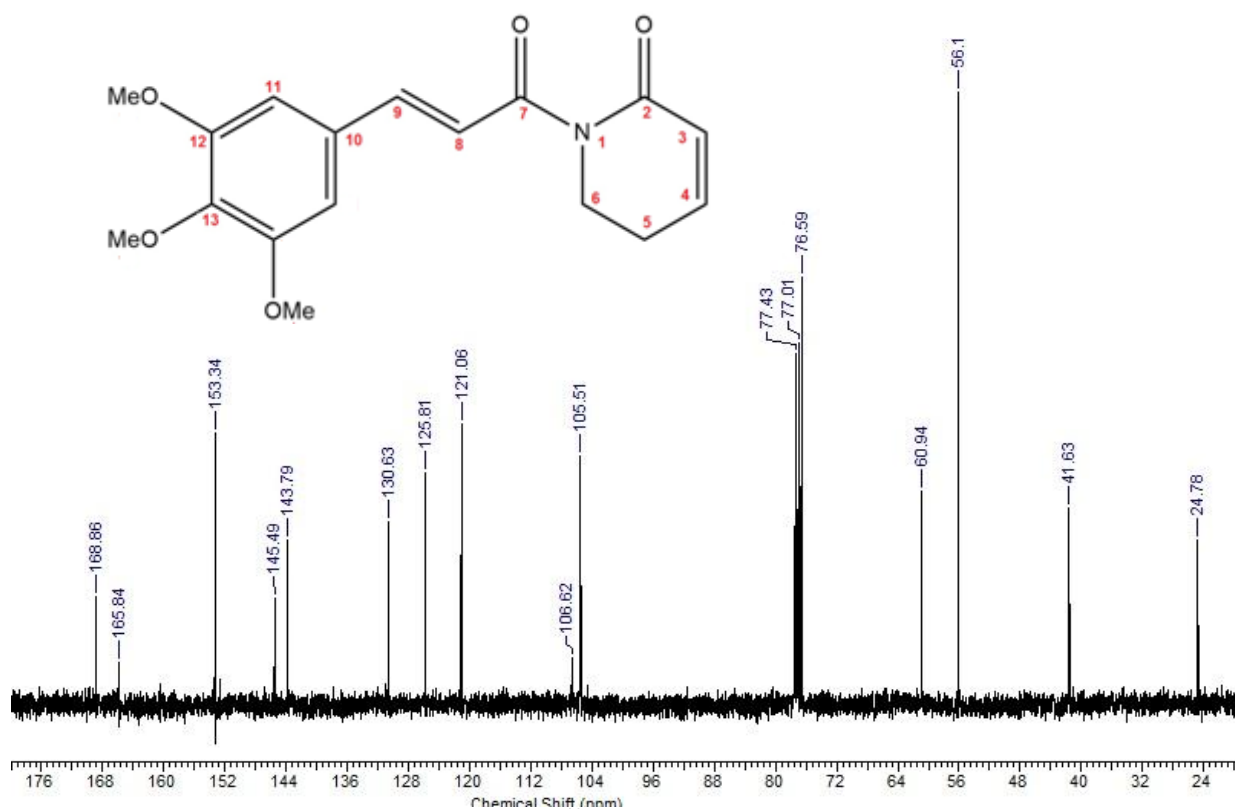


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C do composto A5 (75 MHz, CDCl_3)

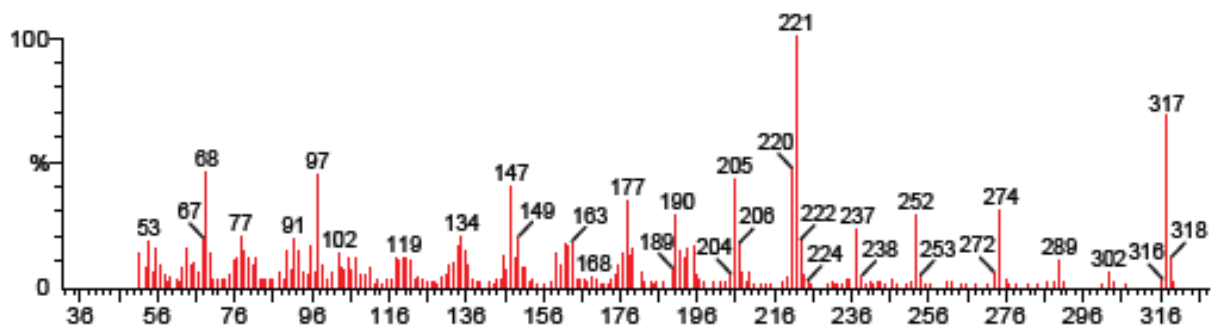


Figura 20. Espectro de massa da piplartina ($C_{18}H_{19}O_5 N$ $M=317$)

O espectro de massas da piplartina apresenta o íon molecular de m/z 317, os principais íons fragmentados de m/z 302, m/z 289 e m/z 274 sendo o pico base em 221. (Figura 21)

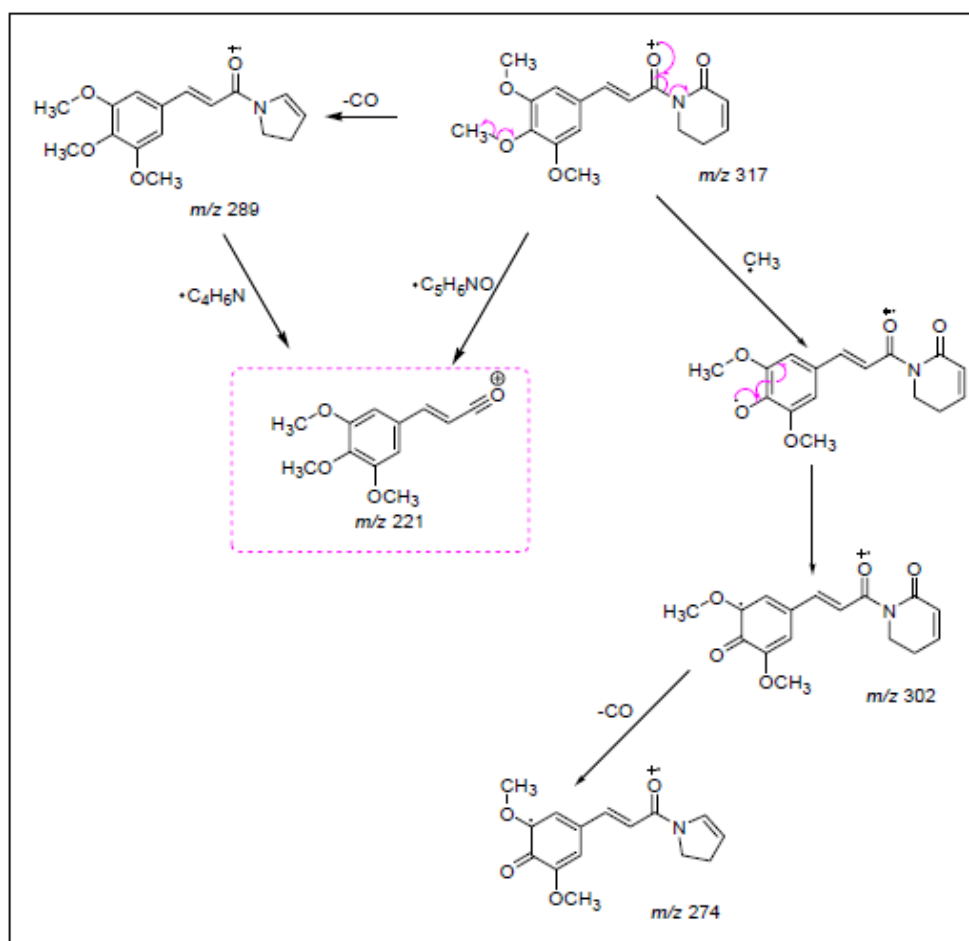


Figura 21. Proposta para a formação dos principais íons fragmentos da Piplartina por CG-MS., (Schaab.E.H, 2008)

Tabela 6. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da Piplartina (fração A5) em 300MHz, CDCl_3

C	Fração A5		Piplartina*	
	$\delta^1\text{H}$, (J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$, (J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
2	--	165,8	--	165,9
3	6,03(1H, dt, J= 9,6)	125,8	6,03(1H,dt,9,7;1,6)	126,0
4	6,95(1H, d, J=1,5)	145,4	6,95(1H,dt,9,6;1,8)	145,6
5	2,46(2H, m, J=4,1)	24,7	2,47(2H;m)	24,9
6	--	41,6	4,03(2H,t,J=6,4)	41,8
7	--	168,8	--	169,0
8	7,64(1H, d, J=9,7)	121,0	7,41(1H,d,15,6)	121,2
9	δ 7,44(1H,dt,J=15)	143,9	7,66(1H,d,15,6)	143,9
10	--	130,6	--	130,8
11	--	105,5	6,79(1H;s)	105,7
12	--	153,5	--	153,5
13	--	145,4	--	140,2
OCH_3	3,88s	56,1	3,88s	56,3
OCH_3	3,87s	60,9	3,86s	61,1

* JUNIOR, E.A.S., 2013

5.4.1 Elucidação estruturais compostos isolados de *Piper cocorvadensis*

O espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 23 (Figura 22), apresentou um duplete em δ 0,93 correspondentes a duas metilas ($J=6$, 6H), um multiplete em δ 1,80 (m, 1H) e em δ 3,15 com (t, $J=6$, 2H), referente aos hidrogênios metilênicos. Os hidrogênios do anel aromático apresentam δ dois dupletos em δ 7,06(d, $J=9$, 2H) e em δ 6,83(d, $J=9$, 2H). Apresenta um sinpleto em 3,79 (s, 2H), característico de um grupamento metoxila. Os sinais em δ 3,41(d, $J=6$, 2H). Um duplete em δ 5,77 (d, $J=15$, 1H), um duplo duplete em δ 7,17(dd, $J=15$; 6, 1H) e dois multipletos em δ 6,07 – 6,22 (m ,2H) referentes aos H4 e H5.

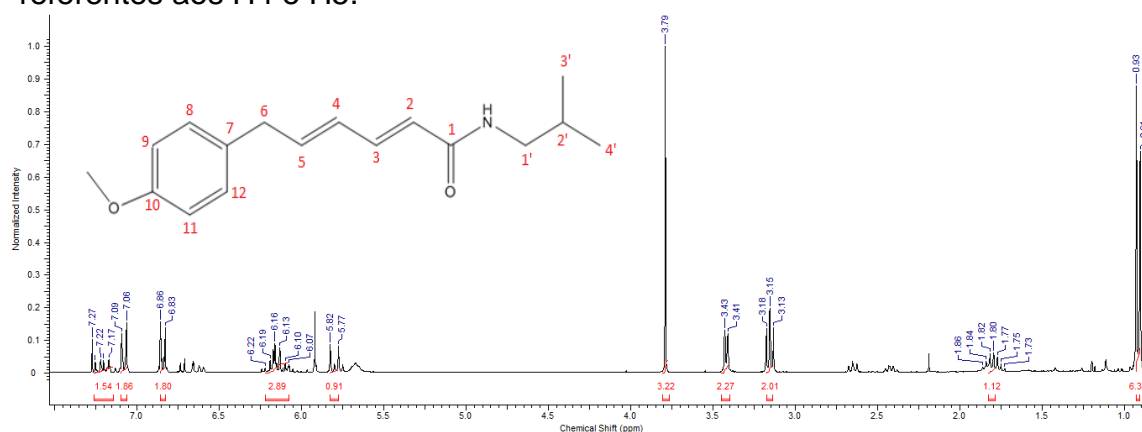


Figura 22. Espectro de RMN ^1H do composto 23 (300 MHz, CDCl_3)

No espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 23 (Figura 23), exibiu um sinal em δ 55,22 referente ao grupo metoxila e um sinal em δ 20,6 (**C3'** **C4'**) referente ao grupo metila. A presença dos sinais em δ 129,5 (**C8**, **C12**); δ 113,92 (**C9** **C11**); δ 158,12 (**C10**) e δ 129,5 (**C7**) são atribuídos aos carbonos das insaturações do anel aromático. Os sinais em δ 122,7 (**C2**); δ 140,62 (**C3**); δ 129,01 (**C4**) e δ 140,98 (**C5**) referentes aos carbonos com configuração trans. Esses dados e os de RMN de ^1H (Figura 22) obtidos foram comparados com os dados obtidos na literatura confirmando o composto como a Piperovatina. (Rendón et al., 1998) (Tabela 7).

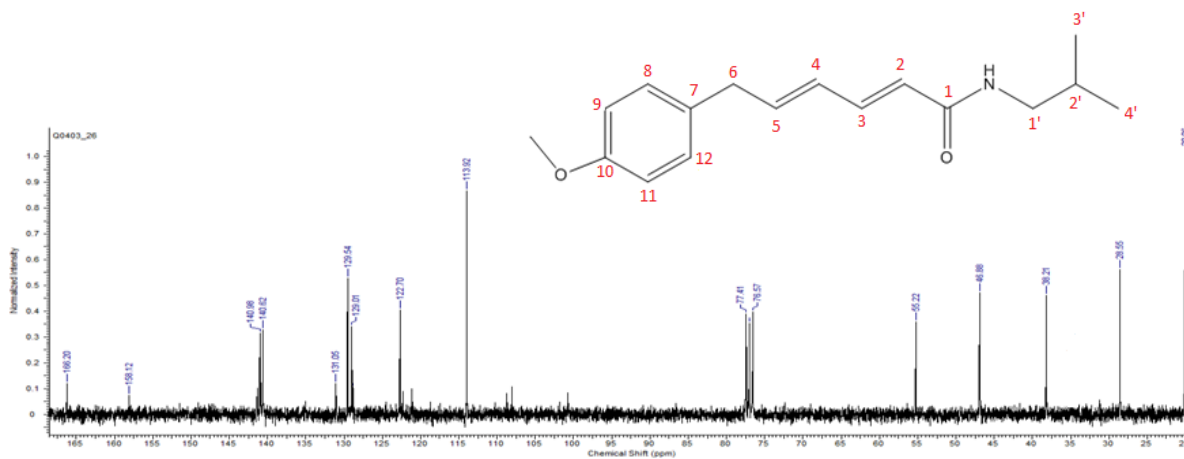


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C do composto 23 (75 MHz, CDCl_3)

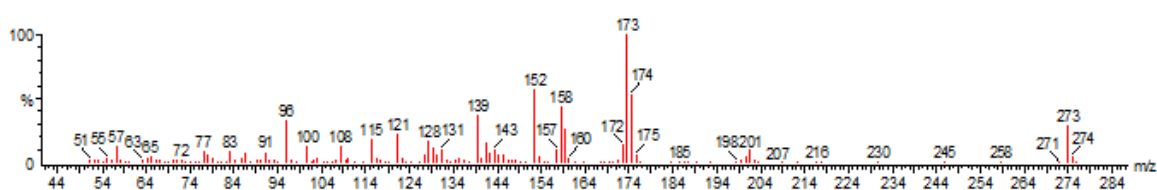


Figura 24. Espectro de massa do composto 23 ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_2$, $M=273$).

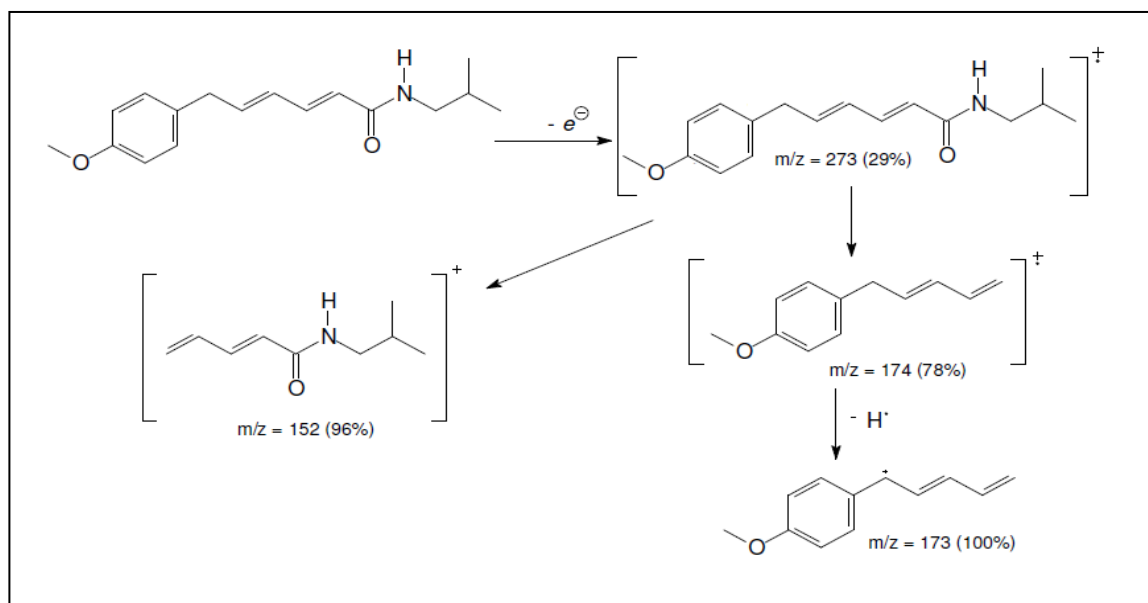


Figura 25. Proposta para as fragmentação apresentadas a amida Piperovatina por CG-MS. (Rendón et al., 1998).

Tabela 7. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C [300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ C e H(ppm), J (Hz)] da Piperovatina.

C	Fração 22		Piperovatina*	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	--	166,20	--	166,2
2	5,77 d (15)	122,70	5,78 d (14,9)	122,7
3	7,17 dd (15;6)	140,62	7,21 dd (14,9; 10,0)	140,6
4	6,07 – 6,22 m	129,01	6,12 dd (15,2; 10,0)	129,0
5	6,07 – 6,22 m	148,98	6,20 dt (15,2; 6,6)	140,9
6	3,41 d (6)	38,21	3,42 d (6,6)	38,2
7	--	131,06	--	131,1
8	7,06 d (9)	129,54	7,08 d (8,3)	129,5
9	6,83d (9)	113,92	6,84 d (8,3)	113,9
10	--	158,12	--	158,1
11	6,83 d (9)	113,92	6,84 d (8,3)	113,9
12	7,06 d (9)	129,54	7,07 d (8,3)	129,5
1'	3,15 t (6)	46,88	3,16 dd (6,7; 6,1)	46,9
2'	1,80 m	28,55	1,79 noneto (6,7)	28,6
3' e 4'	0,93 d (6)	20,06	0,92 d (6,7)	20,1
OCH_3	3,79 s	55,22	3,90 s	55,2
NH	--	--	5,49 sl	--

*RENDÓN et AL 1998, adquirido em 300 e 75 MHz em CDCl_3 .

5.5 Atividade biológica

5.5.1 Concentração Mínima Inibitória-CMI

5.5.1.1 Piper Callosum

O teste de CMI trata de um teste quantitativo, os micro-organismos foram utilizados e os seus respectivos valores de concentração mínima inibitória estão presentes na tabela 8.

Tabela 8: Concentração Mínima Inibitória –CMI do extrato das folhas e compostos isolado de *P. callosum*

Gram-Positivas				
	Extrato Etanólico	Fração A1	Fração A3	Fração A3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1250 µg/mL	2500 µg/mL	1250 µg/mL	1250 µg/mL
<i>Bacillus subtilis</i> (86)	1250 µg/mL	625 µg/mL	1250 µg/mL	625 µg/mL
Gram-Negativas				
<i>Escherichia coli</i> (224)	625 µg/mL	625 µg/mL	625 µg/mL	<2500 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (396)	625 µg/mL	625 µg/mL	625 µg/mL	<2500 µg/mL
Fungos				
<i>Candida krusei</i> (1002)	625 µg/mL			
<i>Candida utilis</i> (1009)	312,5 µg/mL			

A partir da tabela 8, pode-se inferir que o extrato das folhas de *P. callosum* apresentou menores concentrações capazes de inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas e fungos. Segundo trabalho realizado por Aligiannis *et al.*, (2001) com material vegetal, valores de concentrações ≤ 500 $\mu\text{g/mL}$ são considerados ativos para inibição de micro-organismos; e valores de 600 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ são considerados moderados.

Em geral, o extrato apresentou melhor atividade antimicrobiana para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (224) e *Pseudomonas aeruginosa* (416) com valores de CMI 625 $\mu\text{g/mL}$. Para o fungo *Candida utilis* (1009) apresentou valor significativo de 312,5 $\mu\text{g/mL}$.

5.5.1.2 Piper Cocorvadensis

No teste de CMI, que se trata de um teste quantitativo, os micro-organismos utilizados e os seus respectivos valores de inibição estão presentes na tabela 9.

Tabela 9: Concentração Mínima Inibitória –CMI do extrato das folhas de *P. cocorvadensis*

Bactérias	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)			
	Extrato Etanólico	Extrato Etanol/Água(1:1)	Extrato Butanólico	Composto Isolado
Gram-positivas				
<i>Enterococcus faecalis</i> (138)	19,5 $\mu\text{g/mL}$	625 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$
<i>Bacillus subtilis</i> (86)	39,0 $\mu\text{g/mL}$	625 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$
Gram-negativas				
<i>Escherichia coli</i> (224)	2500 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (396)	625 $\mu\text{g/mL}$	1250 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$	<2500 $\mu\text{g/mL}$
Fungos				

<i>Candida krusei</i> (1002)	19,5µg/mL	19,5µg/mL		
<i>Candida utilis</i> (1009)	625µg/mL	625µg/mL		

A partir da tabela 9, pode-se inferir que o extrato das folhas de *P. corcovadensis* apresentou menores concentrações capazes de inibir o crescimento das bactérias Gram-positivas e fungos. Segundo trabalho realizado por Aligiannis *et al.*, (2001) com material vegetal, valores de concentrações ≤ 500 µg/mL são considerados ativos para inibição de micro-organismos; e valores de 600 a 1500µg/mL são considerados moderados. Para ambos os extratos os valores de CMI variaram de 19,5 µg/mL a 2500 µg/mL. O extrato etanólico apresentou valor significativo para o micro-organismo *Bacillus subtilis* (86) -39,0µg/mL e *Enterococcus faecalis* (138) - 19, 0µg/mL, bem como para o *Klebsiella pneumoniae* (396)- 625µg/mL. Para o fungo *Candida krusei* (1002) tanto o extrato etanólico quanto o extrato etanol/água(1:1) apresentaram CMI de 19,5µg/mL. Em geral os extratos apresentaram melhor atividade antimicrobiana para o fungo levedura *Candida krusei* (1002) com CMI de 19,5µg/mL.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu para o conhecimento químico e biológico dos compostos isolados presentes nas folhas de *Piper callosum* e *Piper corcovadensis*. Outras contribuições foram o estudo da atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *P. callosum* e *P. corcovadensis*.

O estudo com os extratos etanólicos e etanol/água das folhas de *P. corcovadensis*, apresentaram atividade significativa frente ao fungo *Candida krusei* (1002) com CMI de 19,5µg/mL. Para as bactérias gram-positiva *Bacillus subtilis* (86) o extrato etanólico apresentou CMI 39,0µg/mL, bem como para o *Klebsiella pneumoniae* (396) 625µg/mL.

Referente à atividade antimicrobiana do extrato bruto de compostos isolados de *piper callosum*, o extrato bruto apresentou valor de CMI 312,5 frente ao microorganismo *Candida utilis*. E para bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* valor de CMI 625 µg/mL. Tão compostos isolados quanto o extrato bruto.

Em relação ao fracionamento cromatográfico, do extrato etanólico da *Piper corcovadensis* foi possível o isolamento de um composto caracterizado como a Piperovatina. Para fracionamento cromatográfico da *Piper callosum* foi isolados três compostos caracterizados, como éster (E)-3,4,5-trimetoxicinâmico de metila e as amidas 4,5 Dihidropiperlonguminina e a Piplartina, com base nos seus respectivos Os compostos obtidos foram caracterizados com base em seus respectivos dados espectrais CG-EM, RMN ¹H e ¹³C.

7. REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; JAMIL, S.; READ, R. W. Isobutylamides from *Piper ridleyi*. **Phytochemistry**, v.40, n.4, p.1163-1165, 1995.
- Amorim, C. Z.; Flores, C. A.; Gomes, B. E.; Marques, A. D.; Cordeiro, R. S. B.; J. Ethnopharmacol. 1988, 24, 101.
- Andrade, H.E.A., Guimarães, E.F., Maia, J.G.S., 2009. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia**. FEC/UFPA, Belém.
- Baldoqui, D. C., Bolzani, V. D. S., Furlan, M., Kato, M. J., & Marques, M. O. (2009). Flavones, lignans and terpene from *Piper umbellata* (piperaceae). *Química Nova*, 32(5), 1107-1109.
- BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v.52, n.2, p.339-343, 1999.
- MAXWELL, A.; DABIDEEN, D.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Neolignans from *Piper aequale*. **Phytochemistry**, v.50, n.3, p.499-504, 1999.
- BEZERRA, D. P. (2005). POTENCIAL ANTICÂNCER DA PIPLARTINA E DA PIPERINA, AMIDAS ISOLADAS DE PLANTAS DO GÊNERO PIPER.
- BEZERRA, G.B. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPLEXO DE VANÁDIO E FERRO, TENDO COMO LIGANTES PRODUTOS NATURAIS**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco (2016).
- Bornstein, A. J.; *J. Arn. Arbor.* **1989**, 70,1.
- CLSI – **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI, 2010.

CLSI – **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi. Approved standard: M27-A3 e M38-A2. Wayne (PA): CLSI, 2008.

Desmachelier, C.; Slowing, K.; Ciccina, G.; *Fitoterapia* 2000, 71, 556.

DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A., SOUZA-BRITO, A.R.M., MARIOT, A. & SANTOS, C.M. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª. Ed. São Paulo SP. Editora UNESP. 2002.

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

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

HERMOSO, A.; JIMENEZ, I. A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI, I. L.; PINERO, J. E.; RAVELO, A. G.; VALLADARES, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, n.18, p.3975–3980, 2003.

J.V. Marques. **Atividade Biológica de Amidas e Análogos de Espécies de Piper e Estudos Biossintéticos** (Tese de Doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo (2009).

JARAMILLO, M.A., MANOS, P.S., ZIMMER, E.A. 2004. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. *International Journal of Plant Sciences* 165: 403-416.

KAPLAN, M. A. C.; GUIMARAES, E. F. & MOREIRA, D. de L. A. 1998. **Chromene From Piper aduncum. *Phytochemistry***, 48: (6) 1075-1077.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, 79, 529-538; 2007. LOPEZ, S. N. et al. Geranylation

of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). *Bioresource Technology*, v. 101, n. 12, p. 4251-4260, June 2010.

Kijjoa, A.; Giesbrecht, A. M.; Akiesue, M. K.; Gottlieb, O. R.; Gottlieb, H. E.; *Planta Med.* 1980, 39, 85.

KOROISHI, A. M.; FOSS, S. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, n.2, p.270–277, 2008

LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. D.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARAES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, vol 67: 1783–1788; 2004.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa SP. Instituto Plantarum. 2002.

MARTINS, R. C. C.; LATORRE, L. R.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, vol. 55: 843–846. 2000.

Medeiros, E.S. & Gimarães, E.F. 2007. **Piperaceae do Parque Estadual do Ibitipoca**, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 25: 227-252.

Montanari, C. A., & Bolzani, V. D. S. (2001). Drug design based on natural products. *Química Nova*, 24(1), 105-111.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. FLORA DO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA – BRASIL: *Peperomia* (PIPERACEAE). *Rodriguésia*, v.59, n.1, p.161-195, 2008.

MOREIRA, D. L.; GUIMARAES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Chromene from *P. aduncum* L., *Phytochemistry*, v.48, n.6, p.1075-1077, 1998.

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

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; GUPTA, S.; TALWAR, S.; RAJWANSHI, V. K.; KUMAR, R.; AZIM, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JAIN, R.; SHARMA, N. K.; TYAGI, O.D.; LAWRIE, S. J.; ERRINGTON, W.; HOWARTH, O. W.; OLSEN, C. E.; SINGH, S. K.; WENGEL, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry*, v.49, n.4, p.1069-1078, 1998.

Paz, R.F.; Guimarães, E.F.; Ramos, C.S. The occurrence of phenylpropanoids in the saps of six *Piper* species (Piperaceae) from Brazil. *Gayana Bot.* **2017**, *74*, 236–239.

Phillpson, J. D.; Anderson, L. A.; J. Ethnopharmacol. 1898, 25, 61

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

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolism of (-)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. *Phytochemistry*, vol. 69: 2157–2161; 2008.

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Sequestration of prenylated benzoic acid and chromenes by *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae) feeding on *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). *Chemoecology*, vol. 19: 73–80; 2009.

SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. *Phytochemistry*, v.66, n.5, p.573-579, 2005.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H. R.; PHILOGENE, B. J. R.; ARNASON, J. T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode

of action. *Phytochemistry Reviews*, v.7, n.1, p.65-75, 2008. DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, v.64, n.2, p.555-559, 2003.

SILVA, C.F. **INVESTIGAÇÃO BIOSSINTÉTICA, TRANSCRIPTOMICA E PROTEOMICA EM ESPECIES DE PIPERACEAE**. (Tese de Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara. São Paulo (2011).

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. (eds). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. Porto alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 467p.

Vanhaelen, M.; *J. Pharm. Belg.* 1989, 44, 242.

VIEIRA, L.S. *Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Medicinais*. 2ª. Ed. São Paulo SP. Editora Ceres. 1992.

WANKE, S. et al. From forgotten táxon to a missing link? The position of the genus *Verhuellia* (Piperaceae) revealed by molecules ***Annal of Botany***, v. 99, n.6, p. 1231-1238, June 2007.

Wheelwright, E. G.: ***Medicinal Plants and their History***; Dover Publications; New York, NY, 1974.

XUAN, T. D.; ELZAAWELY, A. A.; FUKUTA, M.; TAWATA, S. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.54, n.3, p.720-725, 2006.

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

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

QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for neotropical *Piper* species (Piperaceae). **J.Biogeogr**, v. 33, n. 7, p. 1266–1278, 2006.

Kloss, L. C., Albino, A. M., Souza, R. G., & Lima, R. A. (2016). Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L.(PIPERACEAE). *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, 3(2).

Santos FS, Novales MGM (2012) Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:136141.

APENDICES

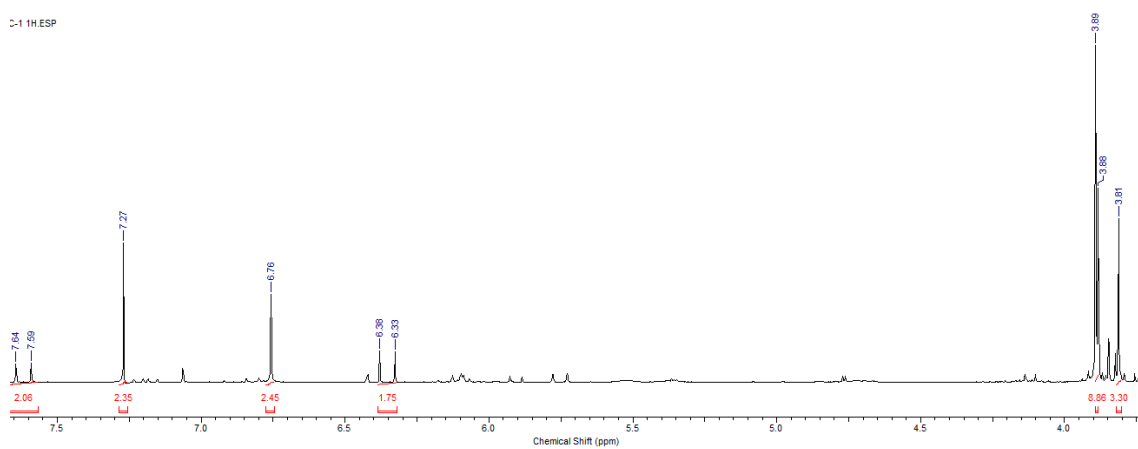


Figura 26. Espectro de RMN ^1H da fração A1 (300 MHz, CDCl_3)

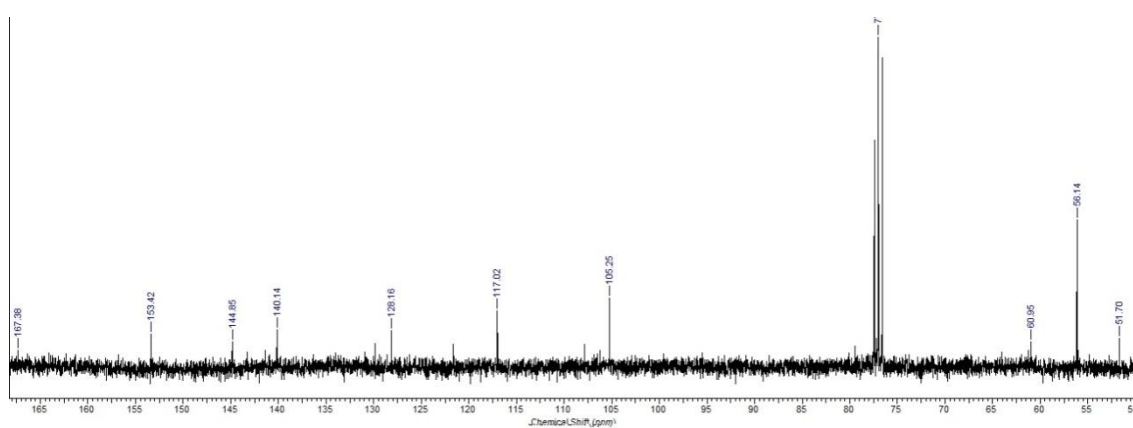


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C da fração A1 (300 MHz, CDCl_3)



Figura 28. Espectro de RMN ^{13}H da fração A3 (300 MHz, CDCl_3)

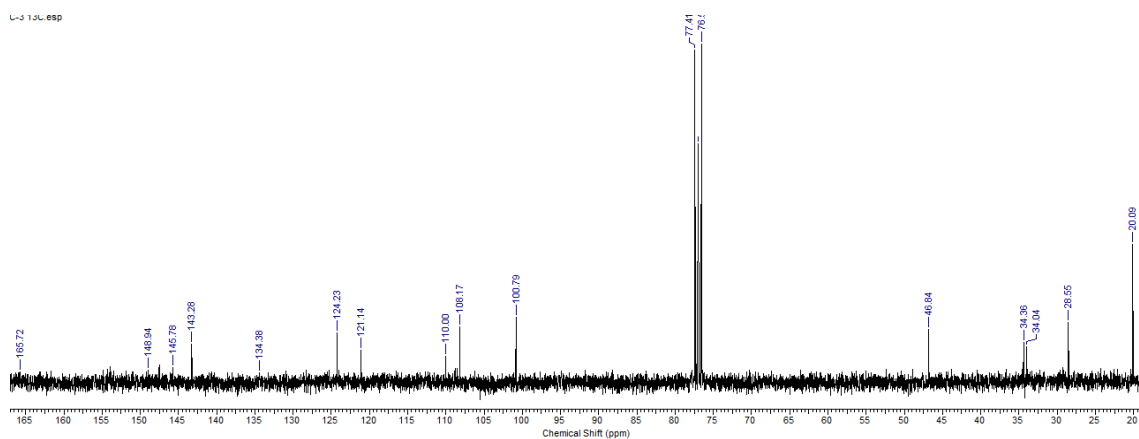


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C da fração A3 (300 MHz, CDCl_3)

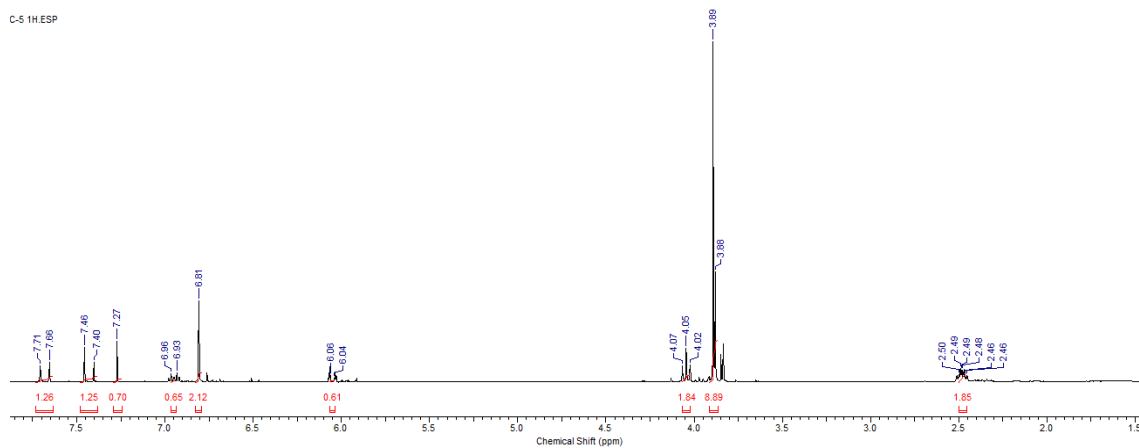


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C da fração A5 (300 MHz, CDCl_3)

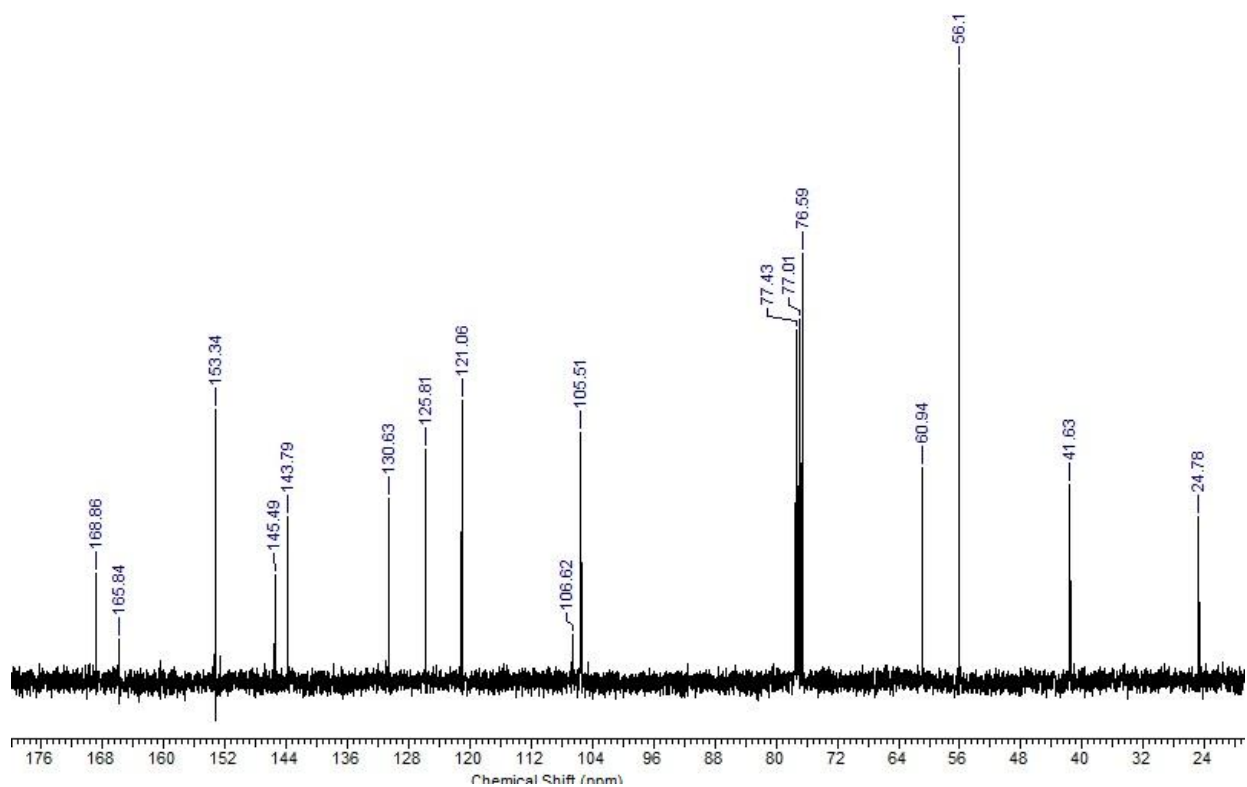


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C da fração A3 (300 MHz, CDCl_3)

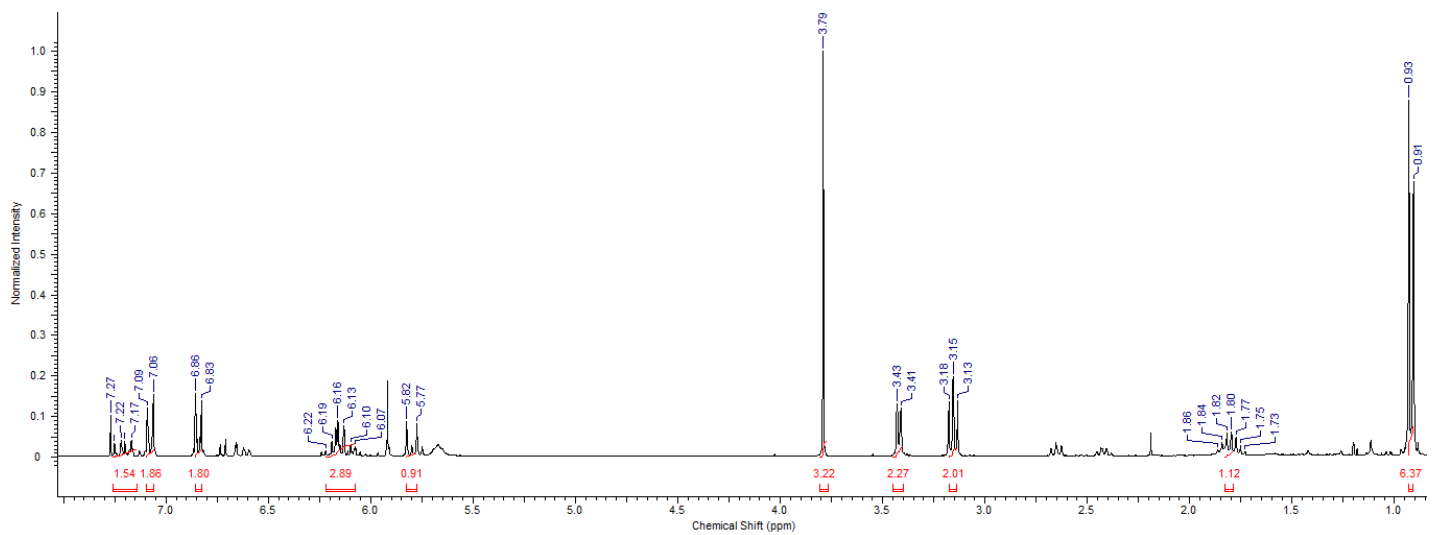


Figura 32.Espectro de RMN ^1H da fração A3 (300 MHz, CDCl_3)

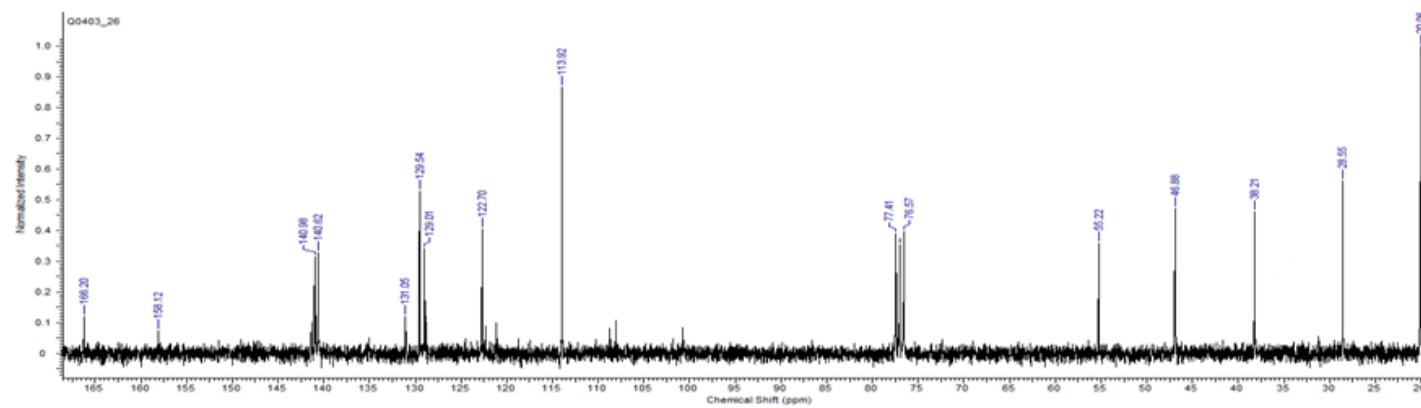


Figura 33.Espectro de RMN ^{13}C da fração 23 (300 MHz, CDCl_3)