



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



GRACIELLE ANGELINE TAVARES DA SILVA



JOÃO PESSOA

2013

GRACIELLE ANGELINE TAVARES DA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS E FRUTOS DE
Piper caldense C.DC. (PIPERACEAE)

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

2013

S586e Silva, Gracielle Angeline Tavares da.

*Estudo fitoquímico das folhas e frutos de Piper caldense C.DC.
(Piperaceae) / Gracielle Angeline Tavares da Silva.-- João Pessoa, 2013.*

201f. : il.

Orientadora: Maria Célia de Oliveira Chaves

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

*1. Produtos naturais. 2. Farmacoquímica. 3. Piperaceae. 4.
Derivados porfirínicos. 5. Derivados do ácido benzoico. 6. Atividade
antifúngica.*

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

GRACIELLE ANGELINE TAVARES DA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS E FRUTOS DE
Piper caldense C.DC. (PIPERACEAE)**

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.

Dissertação aprovada em:

João Pessoa, 27 de fevereiro de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a MARIA CÉLIA DE OLIVEIRA CHAVES
Universidade Federal da Paraíba – Orientadora

Prof.^a Dr.^a TELMA LEDA GOMES DE LEMOS
Universidade Federal de Alagoas – Examinadora externa

Prof.^a Dr.^a MARIA DE FÁTIMA VANDERLEI DE SOUZA
Universidade Federal de Paraíba – Examinadora interna

*Aos meus pais Maria das Graças Tavares da
Silva e Walter Antônio da Silva pelo
incondicional apoio, pelo incentivo e suporte
afetivo, a vocês dedico esta obra.*

AGRADECIMENTOS

É difícil expressar os nossos sentimentos quando a gente passa por algumas situações, sejam elas boas, difíceis, de contentamento ou descontentamento. Passamos pelos "quase", tentamos aí desistir de lutar, de seguir em frente com nossos propósitos, pois sempre é mais fácil parar um caminho do que procurar uma nova trilha, uma nova roupagem de instintos para prosseguir. Muitas vezes, durante essa caminhada, nos deparamos com pessoas à primeira vista desconhecidas, e ao mesmo tempo tão intrinsecamente a nós ligadas por uma corda fina, invisível, que quase nunca conseguimos expressar ou até mesmo definir o quão importante essas pessoas são em nossas vidas. Durante todo esse tempo tive a certeza de que estava no lugar certo com as pessoas certas. Meus sinceros agradecimentos a todos vocês que tem feito parte da minha vida mesmo sem saber, tão distante e tão perto. Paradoxos que se aproximam toda vez que o Senhor nosso Deus derrama em nós a Sua graça.

Gostaria de prestar aqui meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me emprestaram um pouquinho de seu tempo e contribuição para a concretização desse trabalho.

A **Deus**, meu suporte de vida e de fé.

À minha mãe **Maria das Graças Tavares da Silva**. Mãe, só tenho a agradecer à senhora por tudo. Pela cumplicidade, pela nossa relação de mãe e filha estar além de paradigmas, por sermos melhores amigas, por ter me dado força quando eu quis desistir, por ter me ajudado a suportar tudo o que passei. Minha vitória e esse sorriso são teus, são para ti. Amo-te, assim como o amor de Maria. Tu, que também és Maria, minha mãezinha.

A meu pai **Walter Antônio da Silva**, a quem faço declarações de laços eternos, enaltecendo tua função tão nobre e ao mesmo tempo tão difícil. Para sempre, pai, é que eu te digo que te amo. O hoje é presente. E o passado? E o futuro? Quem te dirá? Eu digo sim que te amo, mas por tudo que já passamos juntos, e distantes, talvez...Não tivemos muito tempo um ao lado do outro, pois em minha infância sempre estiveste longe, trabalhando para me dar o sustento material, quando eu ainda acreditava em histórias irreais. Imaginava-te meu herói. E ainda o és. Por todo o sempre serás. Ainda que com teu jeito mais arredo, mais arisco, mais silencioso. O amor não se mede em palavras, mas em atos, fatos que jamais irei me esquecer. E sei que tudo o que fizeste foi por mim. Trazes sobre teus ombros o peso do trabalho e as

olheiras da vida. Teu semblante é meu espelho. E juntos, esse espelho é que nos reflete "pai e filha." Nunca te declarei verbalmente coisas assim, desse tipo. É que minha alma é como flores que nunca foram colhidas. O depósito do poeta é a poesia. Sinto mais que todos e de todas as maneiras do sentir. Tu és minha poesia-pai. E eu sou tua poesia-filha. E é por tudo isso que te desejo uma feliz poesia-vida dos pais.

A meus irmãos **Emmanuel e Emmanuele Tavares**, pelo apoio e carinho incondicionais. Emmanuele, que é mais que uma irmã para mim, muitas vezes assumindo a posição de amiga e até mesmo de mãe nos momentos mais cruciais de minha vida. Ela, que sempre me apoiou no exercício constante de construir meus sonhos, nunca permitindo que eu desistisse, todavia me incentivando a ir na fé. Emmanuel, que também é mais que um irmão, se é que há um outro laço mais bonito e forte que a irmandade, agradeço pela sua compreensão desde o início de minha vida e pela sua lição de paciência, mostrando a mim o processo do tempo das esperas da realização das coisas, sob o refúgio divino, pelo seu entendimento humano e sabedoria.

À **Maria Célia de Oliveira Chaves**, que além de ser minha orientadora e mostrar excelência em sua profissão, revelou-me uma pessoa iluminada, sempre disposta a ocupar muitas funções e, a principal delas, a de ser como uma verdadeira mãe para mim, sempre muito dedicada, prestativa e compromissada pela realização máxima de meu desempenho como pesquisadora e como pessoa. A você dedico meu agradecimento incondicional.

À **Mayza Neves, Roseane Ramos, Karlienne, Jéssica Celestino, Élide Batista**, pela disposição constante no exercício de me auxiliar nos experimentos do laboratório sempre que precisava, além do enorme vínculo de amizade que criamos.

A **Jacqueline Vasconcelos**, que para mim foi uma verdadeira amiga, revelando-se uma pessoa prestativa, dedicada e sempre presente no decorrer deste tempo, no qual muitas vezes me faltava conhecimento suficiente para concretizar a parte prática do mestrado e, era a ela a quem eu recorria. Muito obrigada "Jack" pelo suporte incondicional.

A **Ricardo Montes**, meu amigo desde a graduação de Farmácia, companheiro da pesquisa científica, tendo se perpetuado essa amizade até o presente.

À minha amiga-irmã **Jeane Uilma**, cuja amizade só fez se perpetuar desde a época da graduação. Pessoa muito especial e fantástica, que comigo sempre estivera presente, me auxiliando na questão profissional e no quesito vida.

À **Eugênia Abrantes, Tainá Sousa, Camilla Hollanda, Ottenberg Chaves**, meus amigos da graduação e do mestrado, os quais foram essenciais para a concretização desta jornada, sendo muito pacientes e acima de tudo, bastante prestativos comigo.

A **Ataide Matias**, que me revelou mais do que ser um técnico de laboratório é preciso ser humilde. A você meu muito obrigada pelas lições de vida, pela preocupação constante, auxílio, paciência.

A **Raimundo Nonato da Silva Filho**, por ser um excelente profissional, que sempre cumpriu uma função além de seus serviços, de um grande altruísmo, oferecendo-me prestatividade e paciência constantes.

A **Vicente Carlos, Wellington, Tânia Alves, Caroline Mangueira e Sócrates Golzigio**, por serem pessoas com as quais sempre tive o prazer de contar e por suas valiosas contribuições.

A **Alexsandro Fernandes**, com quem criei um vínculo fortíssimo de amizade. Pessoa dotada de caráter e de nobreza raros, que sempre se mostrou disposto a me ajudar todas as vezes que mais precisei, sobretudo os ensinamentos da experiência humana de saber esperar, me dando força para eu ter paciência e saber acolher o tempo da espera para que eu um dia pudesse compreender todos os segmentos dentro da lógica da vida. Meus agradecimentos sinceros a você. Sua contribuição foi fundamental para a finalização deste trabalho.

Aos demais **técnicos do laboratório, funcionários desta instituição de ensino e LTF**, pelo solidariedade, competência e apoio, fundamentais para a concretização dessa pesquisa.

À **Maria de Fátima Agra**, que tem se revelado uma excelente coordenadora de pesquisa, de pós-graduação, mostrando um excelente desempenho e compromisso profissionais.

À **Maria de Fátima Vanderlei de Souza**, a quem eu sempre recorria quando estava com alguma dúvida, questões essas que perpassam pelo aspecto profissional e se estendem até as

questões da vida. Uma excelente profissional, com a qual eu tive o prazer de conviver, desde o período da graduação de farmácia, e, a posteriori, na pós-graduação, até a vida pós-acadêmica. Uma pessoa que sempre admirei pela sua postura racional e experiente de encarar a vida, a pesquisa, as pessoas. Meus agradecimentos sinceros a você por tudo isso.

A todos os meus **professores da graduação e pós-graduação**, pela contribuição indispensável na minha formação acadêmica.

À **UFPB, Capes e CNPQ**, pelo apoio financeiro e confiança em me patrocinar no campo da pesquisa científica.

A meu amigo **Pedro Valentim**, que é mais que um amigo, senão irmão, por toda cumplicidade e apoio a mim oferecidos desde a época da escola até os dias de hoje. O poeta já dizia "Sem amor eu nada seria". Reitero a canção em sua verdade bíblica. Ele tinha razão, ainda o tem, e acrescento mais: sem amigos eu nada seria. Amigos são essas pessoas que estão sempre por perto quando a gente não espera, quando a gente se encontra necessitado dessa forte presença astral que é o outro de quem a gente está próximo ou mesmo distante pelos limites físicos da sensata geografia mundial. São parentes que podem até habitar outros ares, outras casas, outras famílias, mas que algo muito mais sublime os une. Meus agradecimentos hoje aqui são para você, protagonista ativo desse cenário chamado "vida", espectador do futuro, diretor do presente, artista do universo em seu dinamismo mórfico e sentido, Pedro, meu amigo. Mais uma vez, meu muito obrigado um tanto quanto poético a VOCÊ!

À **Thais Figueiredo**, minha amiga-irmã, que conheci há alguns anos na dança, estando sempre presente em minha vida. Muito obrigada pelos momentos de lazer, quando eu mais necessitei de tua companhia.

A **Erickle Lucena**, uma pessoa que entrou em minha vida de forma bem inesperada e, durante o pouco tempo que nos conhecemos nos tornamos grandes parceiros de cumplicidade e amizade mútuas.

Aos **meus amigos e professores da dança**, pelos prazerosos momentos de lazer, pelas saídas, pelas apresentações, pelo mundo que construímos enquanto artistas, pelas amizades, pelas

honrosas alegrias, pelas comemorações, por ser minha grande família, mais que companheiros da arte, senão verdadeiros irmãos em quem aprendi a me viciar. Meus sinceros agradecimentos a todos vocês. Amigos de algum tempo já que estão comigo durante essa jornada, excelentes profissionais e lutadores de suas causas. Obrigada pela grande lição de vida de quando se tem um sonho e se consegue realizar. Vocês são grandes exemplos que levarei por minha vida inteira. Obrigada por fazerem parte comigo.

À minha professora de balé **Joelma Ferreira**, por me permitir a realização de um grande sonho na dança clássica, da ponta dos pés e nos pés das pontas, ensinando-me que a disciplina e persistência são a chave para a finalização de cada passo que a gente estende na vida. De um impulso eu pude ver a longínqua amplitude de todos os esforços repentinos. E que a cada dia o desejo de ser melhor só crescia, porque, como dizia a Isadora Duncan “Uma bailarina tem que melhorar sempre”. Assim o é também nos estudos e em todos os demais afazeres que tomamos conosco. A dança é a vida. E se eu danço é porque ainda não atingi a compreensão do significado real das coisas, e nem quero, não preciso. Dançar, salvação e perdição de minha vida!

Muito obrigada a todos vocês por serem meus amigos sublimes, ou, em outra concepção, verdadeiros “parentes espirituais”.

*“Nem sempre o produto final é o mais importante.
Por vezes a riqueza se esconde é no processo das descobertas”*

(Pe Fábio de Melo)

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 medicinais, econômicas, químicas e culturais (anti-inflamatória, antibacteriana, anestésia 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 e 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 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 das folhas de *Piper caldense* C. DC., uma mistura de esteroides, o β -sitosterol e o estigmasterol, e duas substâncias porfirínicas, a 15-hidroxi-porfirionolactona A e a feofitina **a**, e, do extrato hexânico dos frutos, três derivados do ácido benzoico, compreendendo ao total sete substâncias, descritas pela primeira vez em *Piper caldense* C. DC. Os extratos hexânico e diclorometânico dos frutos e suas substâncias isoladas foram submetidos a ensaios microbiológicos, apresentando atividade antifúngica frente a leveduras do gênero *Candida*. Este ensaio está sendo feito pela primeira vez nos frutos da espécie estudada.

Palavras-chave: Piperaceae. *Piper caldense* C. DC. Esteroides. Derivados porfirínicos. Derivados do ácido benzoico. Atividade antifúngica. Leveduras. *Candida*.

ABSTRACT

The Piper L. genus 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 medical, economical, chemical and cultural properties, such as anti-inflammatory, antibacterial and fungicide actions. Piper genus species 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, terpenes, cyclopentanediones, 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. leaves and fruits. Through usual chromatographic methods and spectroscopic techniques such as IR and one and two-dimensional ¹H and ¹³CNMR techniques and comparison with literature data it was possible to isolate and identify a mixture of the β -sitosterol and sitgmasterol steroids, besides porphyrin substances: 15-hydroxy-A-porphyrinlactone and “a” phaeophytin. Those fractions were obtained from crude ethanolic extract of *P. caldense* C. DC. leaves. Three benzoic acid derivatives were isolated from the hexane extract of *P. caldense* C. DC. fruits. From its leaves and fruits it was possible to obtain seven compounds commonly found in many vegetal species, but for the first time stated from *P. caldense* C. DC. The hexane and dichloromethane fruit extracts and isolated substances were submitted to microbiological assay and antifungal activities were detected concerning *Candida* genus yeast. This test is being done for the first time in the fruits of the studied species.

Keywords: Piperaceae. *Piper caldense* C. DC. Steroids. Porphyrinics derivatives. Benzoic acid derivatives. Antifungal activities. Yeasts. *Candida*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

APT	Attached Proton Test
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CIM	Concentração inibitória mínima
COSY	Correlation Spectroscopy
D	Dupleto
Dd	Duplo dupleto
Ddd	Duplo dupleto dobrado
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dl	Dupleto largo
EEB	Extrato etanólico bruto
EDFPc	Extrato diclorometânico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC
EHFPc	Extrato hexânico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC
ESI - MS	Espectrometria de massas com ionização por spray de elétrons
EtOH	Etanol
Pheo	feofitina
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMG-CoA	hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
m	Multipleto
MHz	Megahertz
nm	Nanômetro
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Pc	<i>Piper caldense</i>
P.N.	Produtos naturais
ppm	Partes por milhão
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Simpleto

sl	Simpleto largo
t	Tripleto
u.m.a.	Unidade de Massa Atômica
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento Químico

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Obtenção de frações e cromatografia líquida sob pressão reduzida do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	74
Esquema 2: Processamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (1:1) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	76
Esquema 3: Processamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	77
Esquema 4: Purificação por CCDP da sub-fração 40-49 proveniente da coluna 2 da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC., utilizando como sistema de eluição Hex/AcoEt (85:15) com posterior fracionamento cromatográfico (Col 2.1).	80
Esquema 5: Purificação por fracionamento cromatográfico da sub-fração 30-39 proveniente da coluna 2 da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC., utilizando como sistema de eluição Hex/AcoEt e MeOH em diferentes proporções (Col. 2.2).	82
Esquema 6: Processo de extração do pó dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC.	83
Esquema 7: Purificação por fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC., utilizando como eluentes Hex/AcoEt e MeOH em diversas proporções (Coluna.3).	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição Geográfica do gênero <i>Piper</i> L.....	34
Figura 2: Folhas e frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC.....	37
Figura 3: Exemplar de exsicata de <i>Piper caldense</i> C.DC.	38
Figura 4: Representação esquemática da biossíntese dos derivados mevalônicos.....	48
Figura 4 (continuação): Representação esquemática da biossíntese dos derivados mevalônicos.....	49
Figura 5: Representação da síntese dos terpenoides a partir da via do Metileritritol Fosfato (MEP). Comparação com a via do Ácido Mevalônico (MVA).....	50
Figura 6: Núcleo básico do colesterol.	51
Figura 7: Estrutura química do anel tetrapirrólico das feofitinas.	52
Figura 8: Estruturas moleculares das clorofilas a e b	53
Figura 9: Reação de feofitização e formação das feofitinas e feoforbídeos.....	55
Figura 10: Estruturas químicas das substâncias <i>Pc-1a</i> e <i>Pc-1b</i>	91
Figura 11: Espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-1a/Pc-1b</i>	93
Figura 12: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-1a/Pc-1b</i> na região de 0,65 a 2,50 ppm.	93
Figura 13: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-1a/Pc-1b</i> na região de 3,20 a 5,50 ppm.	94
Figura 14: Espectro de RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Pc-1a/Pc-1b</i>	94
Figura 15: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Pc-1a/Pc-1b</i> na região de 62,0 a 83,0 ppm.	95
Figura 16: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Pc-1a/Pc-1b</i> na região de 11,0 a 21,5 ppm.	95
Figura 17: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>Pc-1a/Pc-1b</i> na região de 115,0 a 145,0 ppm.	96
Figura 18: Esqueleto porfirínico das feofitinas.....	98
Figura 19: Derivados porfirínicos tipo a e b	99
Figura 20: Cadeia fitílica.....	99
Figura 21: Diferença de absorção entre os anéis cetônico e lactônico.....	101
Figura 22: Estrutura química de <i>Pc-2</i>	103
Figura 23: Espectro de IV (KBr, cm ⁻¹) de <i>Pc-2</i>	108
Figura 24: Espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i>	109
Figura 25: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 8,55 a 9,85 ppm.	109

Figura 26: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 3,15 a 3,90 ppm.	110
Figura 27: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 5,70 a 8,30 ppm.	110
Figura 28: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 0,60 a 2,83 ppm.	111
Figura 29: Espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i>	111
Figura 30: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 157,0 a 179,0 ppm.	112
Figura 31: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 45,0 a 165,0 ppm.	112
Figura 32: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 34,0 a 63,0 ppm.	113
Figura 33: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 10,50 a 37,0 ppm.	113
Figura 34: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 54,5 a 19,0 ppm.	114
Figura 35: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-2</i>	114
Figura 36: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 6,0-10,0 e 60,0-140,0 ppm.	115
Figura 37: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de -0,5-5,0 e 0,0-70,5 ppm.	115
Figura 38: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 3,41-4,47 e 10,0-80,0 ppm.	116
Figura 39: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 0,25-4,25 e 5,0 -65,0 ppm.	116
Figura 40: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-2</i>	117
Figura 41: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 6,0-10,0 e 30,0-170,0 ppm.	117
Figura 42: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-2</i> na região de 4,2-1,0 e 100,0-190,0 ppm.	118
Figura 43': Espectrometria de massa de <i>Pc-2</i>	118
Figura 43 a: <i>Pc-2</i>	120
Figura 43b: <i>Pc-3</i>	120

Figura 44: Estrutura química de <i>Pc-3</i>	122
Figura 45: Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de <i>Pc-3</i>	128
Figura 46: Espectro de de RMN ¹ H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-3</i>	129
Figura 47: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 5,6-9,7 ppm.	129
Figura 48: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 3,05-4,10 ppm.....	130
Figura 49: Espectro de de RMN ¹³ C (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-3</i>	130
Figura 50: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 154,0-190,0 ppm.	131
Figura 51: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 49,0-65,0 ppm.	131
Figura 52: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-3</i>	132
Figura 53: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 6,2-9,6 e 90,0-130,0 ppm.	132
Figura 54: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 0,4-4,8 e 5,0-65 ppm.	133
Figura 55: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 3,15-3,75 e 4,0-23,0 ppm.	133
Figura 56: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 5,8-9,6 e 30,0-190,0 ppm.	134
Figura 57: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 4,7-3,0 e 10,0-180,0 ppm.	134
Figura 58: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-3</i> na região de 2,7-0,3 e 20,0-180,0 ppm.	135
Figura 59: Anel tetrassubstituído de <i>Pc-4</i>	136
Figura 60: Grupo geranyl-geranyl.	136
Figura 61: Estrutura química de <i>Pc-4</i>	138
Figura 62: Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de <i>Pc-4</i>	141
Figura 63: Espectro de de RMN ¹ H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-4</i>	142
Figura 64: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 6,55-7,80 ppm.	142
Figura 65: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 5,40-3,50 ppm.	143

Figura 66: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 2,20-1,45 ppm.	143
Figura 67: Espectro de de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-4</i>	144
Figura 68: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 110,0-174,0 ppm.	144
Figura 69: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 110,0-174,0 ppm.	145
Figura 70: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i>	145
Figura 71: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 6,4-7,8 e 100,0-1,05 ppm.	146
Figura 72: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 5,1-7,7 e 109,0-128,0 ppm.....	146
Figura 73: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 1,50-2,35 e 10,0-40,0 ppm.	147
Figura 74: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i>	147
Figura 75: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 5,30-4,45 e 120-145 ppm.....	148
Figura 76: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 6,60-7,80 e 30-180 ppm.	148
Figura 77: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 4,60-5,50 e 10,0-160,0 ppm.	149
Figura 78: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-4</i> na região de 2,50-1,10 e 10,0-150,0 ppm.	149
Figura 79: Anel trissubstituído de <i>Pc-5</i>	150
Figura 80: Estrutura química de <i>Pc-5</i>	152
Figura 81: Espectro de IV (KBr, cm ⁻¹) de <i>Pc-5</i>	155
Figura 82: Espectro de de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-5</i>	156
Figura 83: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 8,10-4,70 ppm.	156
Figura 84: Expansão do espectro de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 5,40-1,40 ppm.	157
Figura 85: Espectro de de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-5</i>	157
Figura 86: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ,CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 115,0-175,0 ppm.....	157

Figura 87: Expansão do espectro de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 15,0-41,0 ppm.	158
Figura 88: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i>	159
Figura 89: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 5,0-8,2 e 114,0-144,0 ppm.	159
Figura 90: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i>	160
Figura 91: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 6,2-8,8 e 10,0-190,0 ppm.	160
Figura 92: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 1,0-6,0 e 10,0-170,0 ppm.	161
Figura 93: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 4,7-5,9 e 5,0-55,0 ppm.	161
Figura 94: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 4,70-5,70 e 90,0-150,0 ppm.	162
Figura 95: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 3,15-3,75 e 12,0-44,0 ppm.	162
Figura 96: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 1,20-2,50 e 10,0-45,0 ppm.	163
Figura 97: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC (CDCl ₃ , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-5</i> na região de 1,50-2,35 e 116,0-146,0 ppm.	163
Figura 98: Anel tetrassubstituído de <i>Pc-6</i>	164
Figura 99: Estrutura química de <i>Pc-6</i>	166
Figura 100: Espectro de IV (KBr, cm ⁻¹) de <i>Pc-6</i>	168
Figura 101: Espectro de de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-6</i>	169
Figura 102: Expansão do espectro de de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-6</i> na região 7,38-7,90 ppm.	169
Figura 103: Expansão do espectro de de RMN ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-6</i> na região de 7,38 a 7,90 ppm.	170
Figura 104: Espectro de de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-6</i>	170
Figura 105: Expansão do espectro de de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-6</i> na região de 95,0 a 180,0 ppm.	171
Figura 106: Expansão do espectro de de RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-6</i> na região de 14,0 a 42,0 ppm.	171
Figura 107: Espectro de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMQC (CDCl ₃ , 500/ 125	

MHz) de <i>Pc-6</i>	172
Figura 108: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-6</i> na região de 4,9-7,5 e 108,0-138,0 ppm.	172
Figura 109: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-6</i> na região de 1,30-3,60 e 5,0-60,0 ppm.	173
Figura 110: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-6</i>	173
Figura 111: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-6</i> na região de 5,6-9,2 e 10,0-180,0 ppm.	174
Figura 112: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de <i>Pc-6</i> na região de 1,00-5,60 e 10,0-170,0 ppm.	174

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estimativas da biodiversidade nacional. Perfil do conhecimento da diversidade biológica do Brasil.....	28
Quadro 2: Substâncias isoladas de <i>Piper caldense</i> C.DC.....	45
Quadro 3: Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero <i>Piper</i> L.....	59
Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero <i>Piper</i> L. ...	60
Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero <i>Piper</i> L. ...	61
Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero <i>Piper</i> L. ...	62
Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero <i>Piper</i> L. ...	63
Quadro 3 (Continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero <i>Piper</i> L. ...	64
Quadro 3 (continuação): Ácidos benzoicos prenilados identificados no gênero <i>Piper</i> L.....	65
Quadro 4: Substâncias isoladas do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.....	88
Quadro 5: Substâncias isoladas do extrato hexânico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica de <i>Piper caldense</i> C.DC.	34
Tabela 2: Alguns derivados do ácido benzoico.	56
Tabela 3: Fracionamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (1:1) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	75
Tabela 4: Fracionamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	78
Tabela 5: Purificação por fracionamento cromatográfico da sub-fração 40-49 proveniente da coluna 2 da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC., utilizando como sistema de eluição Hex/CH ₂ Cl ₂ e MeOH em diferentes proporções (Coluna 2.1).	79
Tabela 6: Purificação por fracionamento cromatográfico da sub-fração 30-39 proveniente da coluna 2 da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC., utilizando como sistema de eluição Hex/AcOEt e MeOH em diferentes proporções (Col. 2.2).	81
Tabela 7: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC, utilizando como eluentes Hex/AcOEt e MeOH em diversas proporções (Col.7).	84
Tabela 8: Comparação dos dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e de ¹³ C (125 MHz) de Pc-1a/Pc-1b com dados de RMN ¹³ C dos modelos da literatura Mo-1 e Mo-2 (δ, CDCl ₃ , 25MHz). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.	92
Tabela 9: Comparação dos dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de Pc-2 registrados em CDCl ₃ com dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do modelo da literatura - Mo-3 (Porfirinolactona) em CDCl ₃ (400 e 100 MHz, respectivamente). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.	104
Tabela 9 (Continuação): Comparação dos dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de Pc-2 registrados em CDCl ₃ com dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do modelo da literatura - Mo-3 (Porfirinolactona) em CDCl ₃ (400 e 100 MHz, respectivamente). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.	105
Tabela 10: Dados espectrais de HMBC ¹ H x ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de Pc-2.	106
Tabela 10 (Continuação): Dados espectrais de HMBC ¹ H x ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) de Pc-2.	107
Tabela 11: Dados comparativos de RMN ¹ H e ¹³ C de Pc-3 (δ, CDCl ₃ , 500 e 125 MHz, respectivamente) com o modelo Pc-2 e Mo-5 (δ, CDCl ₃ , 200 e 50 MHz) (SILVA <i>et al.</i> , 2006). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.	123

Tabela 11 (Continuação): Dados comparativos de RMN ¹ H e ¹³ C de <i>Pc-3</i> (δ , CDCl ₃ , 500 e 125 MHz, respectivamente) com o modelo <i>Pc-2</i> e <i>Mo-5</i> (δ , CDCl ₃ , 200 e 50 MHz) (SILVA <i>et al.</i> , 2006). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (<i>J</i>) em Hz.....	124
Tabela 12: Dados comparativos de RMN ¹³ C da cadeia de fitil éster de <i>Pc-3</i> (δ , CDCl ₃ , 125 MHz) com o modelo <i>Mo-4</i> fitol.	125
Tabela 13: Dados espectrais de ¹ H x ¹³ C HMBC (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-3</i>	126
Tabela 13 (Continuação): Dados espectrais de ¹ H x ¹³ C HMBC (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-3</i>	127
Tabela 14: Comparação dos dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de <i>Pc-4</i> registrados em CDCl ₃ com dados de RMN ¹ H (80 MHz) e RMN ¹³ C (20 MHz) do modelo da literatura <i>Mo-7</i> registrados em CDCl ₃ (MAXELL & RAMPERSAD <i>et al.</i> , 1989). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (<i>J</i>) em Hz.	139
Tabela 15: Dados espectrais de HMBC ¹ H x ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-4</i>	140
Tabela 16: Comparação dos dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de <i>Pc-6</i> registrados em CDCl ₃ com dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) de <i>Pc-4</i> registrados em CDCl ₃ (Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (<i>J</i>) em Hz.)	153
Tabela 17: Dados espectrais de HMBC ¹ H x ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-5</i>	154
Tabela 18: Comparação dos dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de <i>Pc-6</i> registrados em CDCl ₃ com dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) de <i>Pc-4</i> registrados em CDCl ₃ . Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (<i>J</i>) em Hz.....	166
Tabela 19: Dados espectrais de HMBC ¹ H x ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Pc-6</i>	167
Tabela 20: Triagem dos compostos testados sobre as espécies do gênero <i>Staphylococcus</i> e <i>Pseudomonas</i>	180
Tabela 21: Triagem dos compostos testados sobre as espécies do gênero <i>Candida</i>	181
Tabela 22: Determinação da CIM (μ g/mL) do composto <i>Pc-4</i> sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	182
Tabela 23: Determinação da CIM (μ g/mL) do composto <i>Pc-5</i> sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	183
Tabela 24: Determinação da CIM (μ g/mL) do composto <i>Pc-6</i> sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	184
Tabela 25: Determinação da CIM (μ g/mL) do composto EHF <i>Pc</i> sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	185
Tabela 26: Determinação da CIM (μ g/mL) do composto EHD <i>Pc</i> sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	186

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 ASPECTOS GERAIS DOS PRODUTOS NATURAIS: BIODIVERSIDADE COMO FONTE DE MEDICAMENTOS	28
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	32
2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>PIPER</i> LINNEAUS (<i>PIPER</i> L.)	34
2.2.1 Distribuição geográfica	34
2.2.2 Descrição botânica de espécies do gênero <i>Piper</i> L.	35
2.2.3 <i>Piper caldense</i> C.DC. (Linnaea 37. 343. 1872)	35
2.2.3.1 Descrição botânica	35
2.2.4 Aspectos etnomedicinais	39
2.2.5 Aspectos quimiotaxonômicos	39
2.2.6 Atividade farmacológica	40
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>PIPER CALDENSE</i> C.DC.	43
2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS, QUÍMICAS E BIOSINTÉTICAS SOBRE AS CLASSES DE COMPOSTOS ISOLADOS	46
2.4.1 Derivados de esteroides (Terpenos)	46
2.4.2 Derivados porfirínicos	52
2.4.3 Compostos fenólicos derivados do ácido benzoico	55
3 OBJETIVOS	67
3.1 OBJETIVO GERAL	68
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	68
4 PARTE EXPERIMENTAL	69
4.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	70
4.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	70
4.3 REAGENTES E MATERIAIS	70
4.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	71
4.5 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E ESPECTROMÉTRICOS	72
4.5.1 Infravermelho	72
4.5.2 Ressonância magnética nuclear	72
4.5.3 Espectrometria de Massas	72

4.6 PONTO DE FUSÃO	73
4.7 PUREZA DA AMOSTRA	73
4.8 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE <i>PIPER CALDENSE</i> C.DC.	73
4.8.1 Processamento da planta e preparação dos extratos	73
4.8.1.1 Cromatografia líquida sob pressão reduzida do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	73
4.8.2 Processamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (1:1) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	75
4.8.3 Processamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	76
4.9 ESTUDO FITOQUÍMICO DOS FRUTOS DE <i>PIPER CALDENSE</i> C.DC.	83
4.9.1 Processamento da planta e preparação dos extratos	83
4.9.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos frutos de <i>Piper caldense</i> C.DC.	84
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.1 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS FOLHAS E FRUTOS DE <i>PIPER CALDENSE</i> C.DC.	87
5.1.1 Caracterização estrutural de <i>Pc-1</i>	89
5.1.2 Caracterização estrutural de <i>Pc-2</i>	96
5.1.3 Caracterização estrutural de <i>Pc-3</i>	118
5.1.4 Caracterização estrutural de <i>Pc-4</i>	135
5.1.5 Caracterização estrutural de <i>Pc-5</i>	150
5.1.6 Caracterização estrutural de <i>Pc-6</i>	164
6 ESTUDO MICROBIOLÓGICO	175
6.1 PRODUTOS TESTADOS.....	176
6.2 ANTIFÚNGICO PADRÃO	176
6.3 MICRORGANISMOS	176
6.4 MEIOS DE CULTURA	177
6.5 TRIAGEM MICROBIOLÓGICA	177
6.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	177
7 RESULTADOS	179
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	187

REFERÊNCIAS	189
--------------------------	------------

1 Introdução

1.1 ASPECTOS GERAIS DOS PRODUTOS NATURAIS: BIODIVERSIDADE COMO FONTE DE MEDICAMENTOS

O Brasil é o país com maior potencial para desenvolvimento de pesquisa científica utilizando as espécies vegetais como objeto desse propósito, uma vez que detém uma das maiores e mais ricas biodiversidades do mundo, distribuída em seis biomas distintos e estimado em cerca de 20% do número total de espécies endêmicas do planeta (NOLDIN *et al.*, 2006). Apesar disso, acredita-se que apenas 10% dessa biodiversidade planetária tenha sido estudada, com 140 mil metabólitos intermediários provenientes de microrganismos e vegetais superiores, isolados e caracterizados, mas ainda não avaliados em suas potencialidades biológicas na preparação de novos produtos (VERPOORTE, 1998) (**Quadro 1**).

Esta biodiversidade se tornou notável ao longo dos anos, confundindo-se com a própria história da Humanidade, uma vez que as plantas medicinais eram empregadas para o tratamento das mais diversas enfermidades, adquirindo também um caráter cultural nas comunidades e grupos étnicos, sendo possível, dessa forma integrá-la ao desenvolvimento racional de novos medicamentos e aperfeiçoar os já disponíveis no mercado, concedendo ao Brasil uma posição privilegiada para o desenvolvimento de novos produtos, situando-se como o mais importante dos países megabiodiversos do planeta (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001; VEIGA JR. *et al.*, 2005). Espécies do gênero *Piper* L. são uma das mais antigas empregadas na medicina ayurvédica, sendo utilizadas tanto na forma de especiarias, bem como na medicina popular para inúmeros fins (NAKATANI, 1986).

Quadro 1: Estimativas da biodiversidade nacional. Perfil do conhecimento da diversidade biológica do Brasil.

Táxon	Nº de SPP* conhecido	Nº de SPP* estimado
Vírus	350	55.000
Bactérias	1.200	136.000
Fungos	13.000	205.000
Algas	20.000	54.000
Plantas	47.500	52.000
Protozoários	8.500	27.000
Animais	132.000	1.337.000
Total	223.000	1.867.000

*A abreviatura SPP é utilizada para designar todas as espécies de um táxon superior.

Fonte: Produção própria baseada em Lewinson e Prado (2000).

Registros históricos revelam que as propriedades das plantas do Novo Mundo já eram aproveitadas pelos ameríndios antes mesmo da chegada dos europeus ao continente, como o

abacate (*Persea americana*), o cacau (*Theobroma cacao*), o mate (*Ilex paraguayensis*) e a batata-doce (*Ipomoeae batatas*). No Brasil, as primeiras documentações sobre o uso dos produtos medicinais pelos ameríndios são atribuídas ao português Gabriel Soares de Souza em seu livro intitulado “Tratado Descritivo do Brasil de 1587” (WOLTERS, 1992).

A utilização de plantas como fonte de medicamentos é uma prática bastante antiga. Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente, é estimado que as populações indígenas dominassem o conhecimento tradicional na aplicação medicinal de pelo menos 1300 plantas brasileiras (SILVEIRA, 2003), funcionando como um instrumento importante para a criação e desenvolvimento de produtos farmacêuticos, sobretudo com a elevada incidência das chamadas doenças “negligenciadas”, tais como a leishmaniose (UNICEF *et al.*, 2002e), esquistossomose (UNICEF *et al.*, 2002d), malária (UNICEF *et al.*, 2002b), tuberculose (UNICEF *et al.*, 2002a), mal de Chagas (UNICEF *et al.*, 2002c), que assolam as populações dos países em desenvolvimento, atingindo cerca de 12% da população do planeta (WHO, 2002).

De acordo com Atas, 2003, no período compreendido entre os anos de 1975 e 1999, apenas 15 produtos inéditos foram desenvolvidos para o tratamento de tais enfermidades, comparados com o surgimento de 179 drogas para o atendimento de portadores de doenças cardiovasculares, revelando uma nítida discrepância na prioridade de interesse pelas indústrias farmacêuticas do mercado mundial.

Para agravar este quadro de subaproveitamento dos nossos recursos vegetais, muitas espécies que já foram usadas por laboratórios nacionais tiveram seus produtos excluídos do mercado pela inexistência de estudos de validação. Assim, torna-se evidente a necessidade de se empreender esforços para valorar as plantas e seu uso tradicional, promovendo sua conservação e uso adequados. No Brasil, as inovações têm sido de baixa ou média intensidade, sendo os fitoterápicos mais vendidos no mercado brasileiro produzidos a partir de espécies estrangeiras (WAGNER, 2002). Por outro lado, grandes empresas sediadas em países industrializados, como Alemanha, França, Estados Unidos e Japão vêm aplicando competências científicas e tecnológicas no desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais, muitas vezes oriundas dos países em desenvolvimento e com emprego tradicional, e se consolidando como líderes neste crescente e promissor mercado (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Inúmeras publicações recentes reafirmam a importância dos produtos naturais na fabricação de fármacos, sobretudo aqueles derivados de plantas superiores, contribuindo para o avanço da medicina moderna, que hoje conta com milhares de medicamentos. O século XX

apresentou um grande avanço na pesquisa de produtos naturais, sobretudo de microrganismos e plantas medicinais no campo da oncologia, exercendo um verdadeiro fascínio na terapêutica antineoplásica, com grande número de produtos precursores direta ou indiretamente dos atuais medicamentos sintéticos (NEWMAN, 2007; BUTLER, 2008; HARVEY, 2008), como os derivados antraquinônicos isolados de *Streptomyces sp.* Dentre estes, destacam-se a daunorubicina e o análogo hidroxilado doxorubicina (ROCHA *et al.*, 2001). Outros compostos também podem ser citados, como a pilocarpina, os curares, os digitálicos, a quinina, atropina, escopolamina, artemisinina, cromolin, as estatinas para tratamento das dislipidemias, dentre outros (CALIXTO, 2003).

Integrando esses conhecimentos ao gênero *Piper L.*, que é objeto de estudo deste trabalho, destaca-se a piperartina, uma alcaloide, encontrada em várias espécies de piperáceas, como a *P. tuberculatum L.* (pimenta d'arda), *P. asborescens* Roxb. (Pimenta do fruto ganchoso), *P. longum L.* (pimenta longa), *P. callosum* Ruiz & Pav., *P. retrofractum* Vahl. e *P. sylvaticum* Roxb. (BEZERRA *et al.*, 2008). Esta substância apresentou diversas atividades biológicas, incluindo atividade citotóxica e antitumoral, atribuída à presença da carbonila α , β -insaturada do seu anel amídico (DUH, 1990; KONG, 2008).

Atualmente, as maiores indústrias farmacêuticas mundiais possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais, pois oferecem, entre outras, as seguintes vantagens: grande quantidade de estruturas químicas, muitas delas, complexas; muitas classes de estruturas homólogas; possibilidade de utilização como banco de moléculas para ensaios de alta velocidade; economia de tempo e recursos; fonte de pequenas moléculas para alvos moleculares complexos e, mais importante, capazes de serem absorvidas e metabolizadas pelo organismo (SHU, 1998).

Graças aos produtos naturais, incluindo as toxinas extraídas de animais, de bactérias, de fungos ou de plantas, os cientistas puderam compreender fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular e à eletrofisiologia, permitindo que enzimas, receptores, canais iônicos e outras estruturas biológicas fossem identificados, isolados e clonados. Isso possibilitou à indústria farmacêutica desenhar drogas dotadas de maior seletividade e também mais eficazes contra várias patologias de maior complexidade. Além disso, os produtos naturais são usados como matéria-prima na síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico (SHU, 1998).

Durante o último século vivenciou-se um imenso incremento no conhecimento das substâncias químicas presentes nos vegetais, material de estudo da Química de Produtos Naturais, integrando-se a natureza interdisciplinar desse processo de descoberta de fármacos

com a biodiversidade. 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* L., fazendo parte do material de estudo de pesquisadores, que têm desvendado substâncias de grande interesse comercial, medicinal e científico, sobretudo no setor farmacêutico (PARMAR *et al.*, 1997; SHU, 1998).

Segundo a literatura, de cada 250 a 500 mil espécies de plantas estudadas, cerca de 4.000 são de espécies do gênero *Piper* L. Aproximadamente 25 a 50% dos produtos farmacêuticos atuais são derivados de plantas. Apesar disso, nenhum agente terapêutico dessa natureza envolvendo espécies de *Piper* L. foi ainda desenvolvido como medicamento fitoterápico (NAKATANI *et al.*, 1986; COWAN, 1999; MAHESH; SATISH, 2008).

Vislumbrando os grandes benefícios que as espécies de *Piper* L. podem trazer para à humanidade optou-se por enveredar pela trilha do estudo fitoquímico da espécie *Piper caldense* C.DC., buscando o isolamento e identificação de constituintes químicos desta espécie, bem como a disponibilização de seus extratos, frações e substâncias isoladas, para realização de estudos farmacológicos, evidenciando sua importância na descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas.

2 Fundamentação Teórica

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA *PIPERACEAE* BAILL

As espécies de Piperaceae encontram-se evolutivamente na base das angiospermas e têm sido investigadas como modelos visando reconstrução de linhagens evolutivas de suas espécies, cuja perpetuação envolve fatores abióticos e bióticos, como a predação por insetos e a presença de microrganismos associados que afetam consideravelmente esse processo (RESEM, 2004) (**Tabela 1**).

Estudos mais abrangentes englobando as Piperaceae brasileiras foram realizados por Miquel (1852-1863) e Yuncker (1972; 1973; 1974). Os estudos taxonômicos enfocando gêneros isolados foram conduzidos por Ichaso *et al.* (1977) para *Piper* L.; Guimarães (1984) para *Ottonia*; Ichaso *et al.* (1984) e Guimarães *et al.* (1985) para *Peperomia*. As demais publicações sobre a taxonomia das Piperaceae referem-se a táxons novos para a flora brasileira (GUIMARÃES *et al.*, 1977; GUIMARÃES, 1988).

Em termos econômicos, científicos e culturais, esta família é uma das mais importantes da ordem Piperales (SANTOS *et al.*, 2001), compreendendo cerca de 14 gêneros e 1950 espécies, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo. 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 que vivem principalmente nas matas úmidas (MEDEIROS, 2006) ocupando frequentemente locais sombreados (CARVALHO-OKANO; ALVES, 1999) e habitando diversos estratos da floresta, particularmente na Mata Atlântica. O Brasil possui cerca de 500 espécies de Piperaceae (YUNCKER, 1972), pertencentes a cinco gêneros nativos: *Pothomorphe* Miq., *Sarcorrhachis* Trel., *Peperomia* Ruiz *et* Pav., *Ottonia* Spreng e *Piper* L. (MABBERLEY, 1997; ROSA; SOUZA, 2004).

As espécies de Piperaceae 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, apresentando um elevado valor comercial, econômico e medicinal (DOMINGUEZ; ALCORN, 1985).

Com relação à classificação botânica tem-se:

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

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

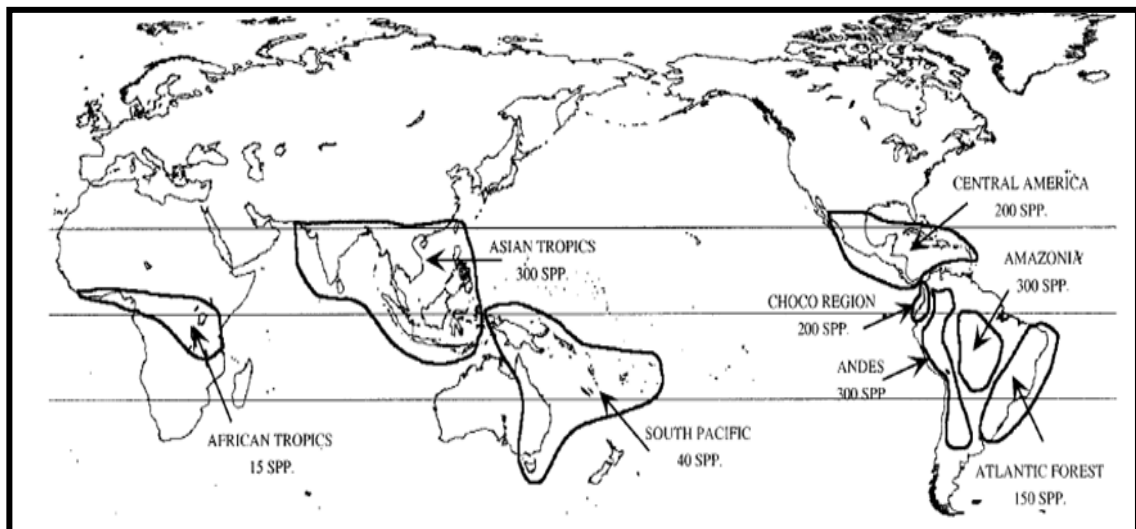
Fonte: Elaboração própria, 2013.

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *PIPER* LINNEAUS (*PIPER* L.)

2.2.1 Distribuição geográfica

O nome *Piper* é originário da palavra árabe que designa pimenta. O gênero *Piper* L. é o maior da família Piperaceae, com pelo menos 1000 espécies distribuídas especialmente na região neotropical do globo terrestre, onde cerca de dois terços das espécies descritas são encontrados (**Figura 1**). 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: JARAMILLO *et al.*, 2001, p. 58.

2.2.2 Descrição botânica de espécies do gênero *Piper* L.

Morfologicamente as espécies do gênero *Piper* L. são relativamente uniformes, com folhas simples e alternadas. Os seus caules são divididos por nodos salientes, onde os galhos quebram-se com mais facilidade, semelhantes aos nodos observados em bambus ou na cana de açúcar. Também são características suas, as inflorescências que podem ser opostas às folhas, axilares ou terminais, 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 indicada para a família (YUNCKER, 1972; JUDD *et al.*, 2002).

Suas espécies são geralmente arbustivas e herbáceas, porém ocorrem em diversas formas, sendo observadas também pequenas árvores, subarbustos e lianas (DYER; PALMER, 2004).

De acordo com a literatura, existem registros de 90 espécies de plantas dispersadas por morcegos no Brasil, incluindo a família Piperaceae, e dentro desta, todas as espécies registradas foram do gênero *Piper* L. Reprodução vegetativa por meio de estolões ou raízes é também relatada para espécies de *Piper* (GARTNER, 1989; GREIG; MAUSETH; GREIG, 1993; ROSA; SOUZA, 2004).

2.2.3 *Piper caldense* C.DC. (Linnaea 37. 343. 1872)

2.2.3.1 Descrição botânica

Piper caldense C.DC. é uma espécie arbustiva, medindo aproximadamente 0,5 a 3,0 m de altura, possuindo ramos com 4,0 a 12,0 mm de diâmetro, estriados e glabros. Suas folhas são pecioladas, com pecíolo do tipo canaliculado e comprimento que varia de 0,5 a 1,5 cm, apresentando bainha curta e basal. As lâminas foliares possuem dimensões entre 12,0–17,0 × 3,5–5,0 cm; são do tipo discolor, glabras e de consistência membranácea, sendo que a face adaxial caracteriza-se por ser castanho-glandulosa e translúcida. Outras características também estão presentes como as formas lanceolada, elíptica e às vezes obovada de suas folhas. Observa-se, ainda em relação a este último componente, a presença de um ápice

agudo, cuminado e mucronado, com margem foliar não indulada, prevalecendo base não peltada, a qual pode ser simétrica ou assimétrica, do tipo agudo-cuneada, possuindo um lado 2,0 a 5,0 mm mais curto em relação ao pecíolo. Pode-se também notar a presença de 6,0 a 8,0 nervuras secundárias saindo acima da base e dispostas até o ápice. Em relação aos demais caracteres botânicos ressalta-se ainda a presença de espigas esverdeado-alvacentas medindo 3,0–5,0 × 0,3–0,6 cm de comprimento, eretas, sutilmente curvas, reflexas na maturidade; pedúnculo, cujo tamanho compreende 0,7 a 1,5 cm de comprimento; bractéola triangular-peltada, franjada; 4,0 estames e ovário com estilete longo, 3,0 estigmas, filiformes. Os frutos desta espécie são estilosos, globosos, às vezes angulosos, glabros, agudos no ápice com estigmas persistentes e medindo entre 2,5 e 3,0 mm de comprimento. *Piper caldense* C.DC. tem distribuição geográfica nas Regiões Nordeste a Sul do Brasil, destacando-se os estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Seu hábitat é área de 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) (ver **Figuras 2 e 3**).

Figura 2: Folhas e frutos de *Piper caldense* C.DC.



Fonte: Disponível em: <<http://.webdm.cpqba.unicamp.br>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

Figura 3: Exemplar de exsicata de *Piper caldense* C.DC.



Fonte: www.ufjf.br/floraserranegra/herbario-virtual/angiospermas/piperaceae/piper-caldense-c-dc/.
Acesso em: 06 jun. 2013.

2.2.4 Aspectos etnomedicinais

O gênero *Piper* L. apresenta boa representatividade comercial e muitas aplicações medicinais (NUNES *et al.*, 2007). Na América tropical, inúmeras espécies são reconhecidas pelas populações locais como potencialmente benéficas (PARMAR *et al.*, 1997). *Piper* L. inclui grande número de espécies de valor econômico indiscutível como condimentos, inseticidas, cosmético e medicinal, devido à produção de óleos essenciais (SILVA; MACHADO, 1999), sendo encontradas no Brasil aproximadamente 500 espécies e 4 gêneros de Piperáceas aceitos.

O histórico do gênero *Piper* L. descrito por Parmar *et al.* (1997), relata o uso de espécies para o tratamento de algumas enfermidades em diferentes povos. Na China, algumas prescrições recomendam o uso das folhas de *P. futokasura* no tratamento de arritmias cardíacas e da asma. Na Jamaica dores estomacais são tratadas com uma infusão das folhas de *P. aduncum* e *P. hispidum*. No México e no Brasil usam-se as folhas de *P. amalago* para aliviar dores estomacais e no combate a diversas infecções.

De importância econômica e medicinal, algumas espécies fazem parte do mercado mundial, como a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e outras são usadas de modo empírico pelas populações em diferentes doenças. Muitas espécies de *Peperomia* são cultivadas como ornamentais, cuja beleza reside principalmente em sua folhagem, enquanto outras são utilizadas na alimentação (GUIMARÃES; MONTENEGRO, 2006).

Diante desse contexto, espécies do gênero *Piper* L. têm sido objeto de diversos estudos químico-farmacológicos, na tentativa de isolar e identificar substâncias bioativas que justifiquem o uso destas plantas na medicina popular. Neste estudo, em particular, abordou-se a espécie *Piper caldense* C.DC.

2.2.5 Aspectos quimiotaxonômicos

A investigação fitoquímica de espécies de *Piper* L. originou inúmeros trabalhos científicos em várias partes do mundo, o que levou ao isolamento de diversos compostos bioativos, tais como cavalactonas (WHITTON *et al.*, 2003; XUAN *et al.*, 2008), aristolactamas (CHAVES *et al.*, 2006), fenilpropanoides (CHAVES *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 1997), lignoides (CHEN *et al.*, 2007; BODIWALA *et al.*, 2007), cromonas (MORANDIM *et al.*, 2005), flavonóides e chalconas (LAGO *et al.*, 2007; ALVES; 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), e ainda amidas, sendo estas os metabólitos mais característico deste gênero (SRINIVASAN, 2007; COTINGUIBA *et al.*, 2009). Parmar *et al.* (1997) evidenciou no gênero a existência de 42 alcaloides com núcleo isoquinolínico, sendo este o tipo mais abundante. Além destas, também são verificadas isobutilamidas, amidas do tipo piperidínicas e pirrolidínicas, perfazendo quase a totalidade das amidas do gênero.

2.2.6 Atividade farmacológica

Espécies do gênero *Piper* L. têm-se tornado fontes de pesquisa de classes específicas de metabólitos secundários com marcantes atividades biológicas, incluindo alcaloides, amidas, esteroides, derivados porfirínicos, flavonoides, ácido benzoico e seus derivados, lignanas, terpenos e ciclopentanodionas. Pesquisas anteriores relataram vários compostos bioativos com atividade antioxidante (YAMAGUCHI *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).

O potencial farmacológico dos extratos e de algumas substâncias isoladas de espécies do gênero *Piper* tem-se mostrado bastante surpreendente. Entre as espécies mais estudadas do ponto de vista farmacológico e químico, está a *Piper methysticum* (kava-kava) nativa da Nova Guiné. A infusão em água das raízes de kava (*Piper methysticum*) tem sido usada como uma bebida ritualística na região das Ilhas do Pacífico, desde os tempos antigos por ter efeitos narcóticos. Vários extratos padronizados de kavalactonas biologicamente ativos são comercializados tanto para os transtornos de ansiedade, como suplementos dietéticos para melhorar distúrbios de estresse, tensão nervosa e inquietação (BILIA *et al.*, 2002; XUAN *et al.*, 2008).

As pimentas do gênero *Piper* L. são comuns na Amazônia brasileira e produzem muitos compostos com atividade inseticida, especialmente as espécies *Piper aduncum*, *Piper marginatum*, *Piper divaricatum* e *Piper callosum* (SOUTO *et al.*, 2012).

Estudos recentes realizados em 2012 com o extrato dos frutos de *Piper retrofractum* exibiram que estes eram úteis no tratamento da obesidade, bem como mostraram exercer atividade antidiabética (KIM *et al.*, 2012). Os extratos metanólico e clorofórmico das folhas

de *P. longum* mostraram atividades antidermatófica contra *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *Microsporum fulvum* e *M. gypseum* (SINGH *et al.*, 2012). Alcamidas e um composto benzenoide da fração hexânica dos frutos de *Piper longum* apresentaram potente atividade leishmanicida contra as formas promastigotas do protozoário *Leishmania donovani* (SAHI, 2012). Pesquisas atuais demonstraram que os extratos brutos de folhas de *P. regnellii* Var. *regnellii* e *P. regnellii* Var. *pallescens* apresentam atividade anti-leishmania (NAKAMURA *et al.*, 2006).

Os extratos obtidos dos frutos de *Piper longum* e *Piper nigrum* também apresentaram interesse biológico, ao revelarem significativa ação antiúlcera (ANNAMALAI; MANAVALAN, 1990).

Os óleos essenciais das folhas, sementes e frutos de *Piper divaricatum* mostraram atividade antibacteriana contra *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, frequentemente relacionadas a gastroenterites humanas (VINCENT *et al.*, 1995; RAMOS *et al.*, 2012).

A piplartina, uma amida isolada das plantas do gênero *Piper*, revelou propriedades farmacológicas contra as formas adultas de *Schistosoma mansoni* (MASSUO, 2012).

O estudo do extrato clorofórmico das folhas de *Piper chimonantifolium* conduziu ao isolamento de cromonas, flavonoides e esteroides, com propriedades antifúngicas (MASSUO, 2012).

Espécies de Piperaceae têm sido utilizadas como inseticidas, na alimentação e, também, na medicina tradicional, devido ao acúmulo de diferentes classes de metabólitos biologicamente ativos, tais como fenilpropanoides, lignanas/neolignanas, pironas, amidas alifáticas e aromáticas, alcaloides, policetídeos e cromenos, além de outros metabólitos de biossíntese mista (BALDOQUI *et al.*, 2009). Neste contexto, enfatizam-se 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.

Os estudos fitoquímicos e farmacológicos desenvolvidos pela equipe da Prof^a Dr^a Maria Célia de Oliveira Chaves, do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB, com espécies de *Piper* L. têm fornecido resultados promissores. Dentre as espécies destacam-se *Piper tuberculatum*, *Piper marginatum*, *Piper*

arboreum, *Piper carniconectivum*, *Piper montealegreanum*, *Piper glandulosissimum* e *Piper caldense* C.DC.,. Para esta pesquisa optou-se pela espécie *Piper caldense* C.DC., cujas pesquisas ainda se mostram incipientes dada a grande diversidade química dessa espécie e sua pouca investigação, sendo por isso foco deste trabalho científico. Segue abaixo algumas das produções científicas já elaboradas pela equipe citada.

Do caule de *Piper tuberculatum* foram isolados pipartina, β -sitosterol-3- β -glicosilado (ARAÚJO-JÚNIOR, 1996), cefaranona B (ARAÚJO-JÚNIOR *et al.*, 1999) e piperdardina, uma amida inédita (ARAÚJO-JÚNIOR *et al.*, 1997). O estudo dos frutos desta espécie forneceu os compostos *N*-isobutil-2*E*, 4-*E*-decadienamida; Piperidide-2-*E*, 4-*E*-decadienamida (DA CUNHA; CHAVES, 2001); piperina S e *N*-(12,13, 14-trimetoxidiidrocinaoil)- Δ^3 -piperidin-2-one (CHAVES *et al.*, 2003a).

Da fase clorofórmica obtida das partes aéreas de *Piper glandulosissimum* Yuncker foram isolados cinco flavonoides, dentre os quais 2',6'-diidroxí-3',4'-dimetoxichalcona e 5,8-diidroxí-7-metoxiflavona, ambas relatadas pela primeira vez na família Piperaceae; 2',4'-diidroxí-6'-metoxichalcona e 5,7,8-trimetoxiflavanona já isoladas no gênero, mas pela primeira vez nesta espécie, e 7-hidroxí-5,8-dimetoxiflavona, até então ainda não isolado de fontes naturais (SANTOS, 2004) e, ainda, a 2'-4'-dihidroxí-6'-metoxidiidrochalcona, isolada pela primeira vez no gênero (ALVES, 2008). Estudo de atividade biológica desta substância evidenciou atividade antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Trychophyton menfagiohytes* e *Microsporum canis* (SANTOS, 2004).

Das raízes e frutos de *Piper marginatum* Jacq. foram isolados 2-metoxi-4,5-metilenodioxipropiofenona (SANTOS; CHAVES, 2000); 2,4,5-trimetoxipropiofenona (SANTOS; CHAVES, 1999); 1-(1-*Z*-propenil)-2,4,6-trimetoxibenzeno, um novo produto natural (CHAVES; SANTOS, 2002); croweacina e 1-alil-2-metoxi-3,4-metilenodioxibenzeno (isolado pela primeira vez na família) (SANTOS *et al.*, 1997); *N*-isobutil-2-trans-4-trans-octadienamida, primeira amida isolada nesta espécie (CHAVES; SANTOS 1999), além dos fenilalcanoides 3,4-metilenodioxí-1(2-*E*-octenil)-benzeno; 2,6-dimetoxi-3,4-metilenodioxí-1-(2-propenil)-benzeno; 1-(1-*E*-propenil)-2,4,6-trimetoxibenzeno; apiol e isoasarona (SANTOS *et al.*, 1998). Ainda de *Piper marginatum* Jacq. foram isoladas, a partir do caule, as amidas 1-cinaoil pirrolidina (CHAVES *et al.*, 2003b), cefaranona B e piperolactama A (CHAVES *et al.*, 2006).

Também das partes aéreas de *Piper carniconectivum* foram isolados 3',4',5'-trihidroxí-7-metoxiflavona; 3',5 dihidroxí-7-metoxiflavona; palmitato de 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-ol, isoladas pela primeira vez no gênero; 3',5 dihidroxí-4',7-

dimetoxiflavona; β -sitosterol, estigmaterol, além de um derivado do ácido benzoico, o 3,4-dihidroxi-5-(11'-carboxila-3',7',15'-trimetilhexadeca-2'E,6'E,10'E, 14'E-tretraenil) (ALVES *et al.*, 2008).

A investigação fitoquímica do extrato etanólico bruto de *Piper montealegreanum* Yuncker revelou a presença dos compostos: 3,4-metilenodioxo-5-metoxi-7,8-diidrocinaemol-etil éster; β -sitosterol; estigmaterol; feofitina a e dois flavonoides: 8-formil-3',5-diidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona e 3'-formil-3,4',6'-triidroxi-2-metoxi-5-metilchalcona (ALVES *et al.*, 2011). Este é o único relato da espécie e acredita-se que seu potencial metabólico ainda tenha muito a ser explorado.

Do caule de *Piper arboreum* foram isolados piperóxido, 3,4-epoxi-8,9-diidropiplartina, sintepiridone, 8,9-diidropiplartina, piperlactama E e 10-metilamina-4-hidroxi-3-metoxifenantreno-1-ácido carboxílico-lactama (VASCONCELOS, 2011). Silva *et al.* (2004) relataram a identificação das amidas N-[10-(13,14-Metilenodioxifenil)-7 (E), 9 (Z)-pentadienoil]-pirrolidina, arboreumina, N-[10-(13,14-Metilenodioxifenil) -7(E)-pentaenoil]-pirrolidina e N-[10-(13,14-Metilenodioxifenil)-7 (E), 9 (E)-pentadienoil]-pirrolidina.

Extratos orgânicos das folhas de *P. aduncum* apresentaram atividades moluscicida, citotóxica e antibacteriana, para as quais se associou a presença de dihidrochalconas e derivados prenilados do ácido benzoico (ORJALA *et al.*, 1993; 1994).

Entre os constituintes fixos isolados de *P. hispidum* e *P. tuberculatum* destacam-se as amidas do tipo isobutílicas, pirrolidínicas, dihidropiridonas, piperidinas, derivados prenilados do ácido benzoico, derivados do ácido cinâmico e flavonoides (PARMAR *et al.*, 1997).

Estudos realizados com as raízes de *Piper caldense* levou ao isolamento do composto inédito N-metil-aristolactama (caldensina) (CARDOSO-JÚNIOR; CHAVES, 2003), sendo as folhas e os frutos estudados pela primeira vez por esta equipe.

Sendo assim, é possível observar que através da comparação dos esqueletos básicos de todas estas classes de compostos químicos isolados de espécies de *Piper* denota a grande variedade metabólica deste gênero, gerando expectativas sobre as possíveis relações quimiotaxonômicas que as espécies de *Piper* possam ter entre si e entre representantes de outros gêneros.

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE *PIPER CALDENSE* C.DC.

Do ponto de vista fitoquímico e biológico, estudos mostram que a espécie *P. 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) e do estudo fitoquímico das raízes (CARDOZO; CHAVES, 2003).

Piper caldense C.DC., conhecida pelo nome vernacular de “pimenta d’arda” e “pimenta d’água”, é utilizada na Paraíba como sedativa, antídoto para picadas de cobras, para dores de dente, bem como para alívio da dor na forma de compressa no local afetado (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).

Os extratos brutos metanólico e 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 ácido benzoico prenilado, o qual apresentou intensa atividade contra as espécies fúngicas patogênicas *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (KATO *et al.*, 2009).

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

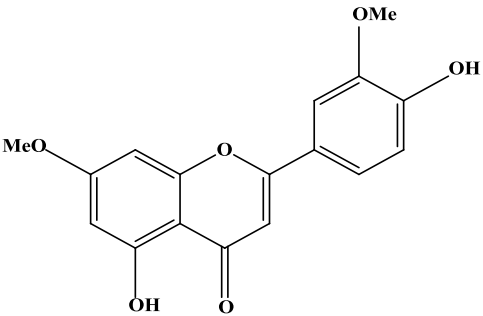
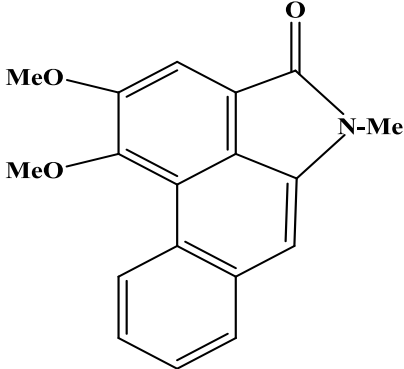
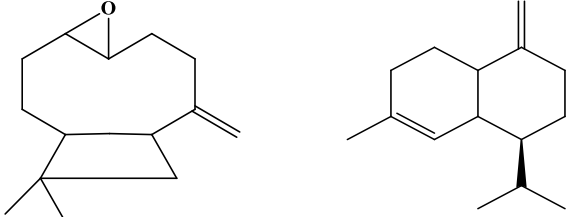
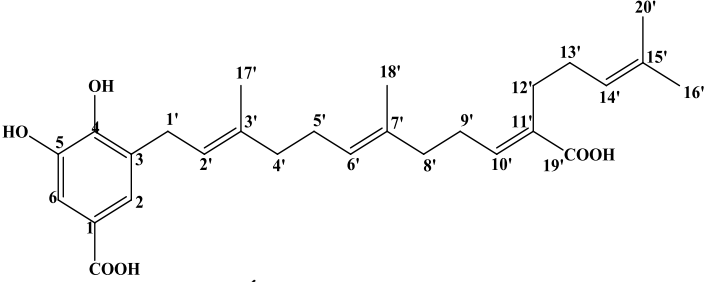
O extrato bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC. mostrou atividade antibacteriana frente às espécies *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (CORDOVA *et al.*, 2007).

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* C.DC. 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 *P. caldense* C.DC. foi γ -Muurolene, seguido de óxido de cariofileno. Este é o primeiro relato da composição química do óleo essencial de *P. caldense* C.DC. (ARAÚJO, 2011).

A investigação de todos esses biometabólitos, em um gênero tão bem adaptado ao habitat brasileiro, torna-se de grande relevância para uma maior apreciação de suas potencialidades química, farmacológica e industrial.

Na literatura consta o isolamento das seguintes substâncias em *Piper caldense* C.DC (Quadro 2):

Quadro 2: Substâncias isoladas de *Piper caldense* C.DC.

Classe de substâncias isoladas de <i>Piper caldense</i> C.DC.	Estrutura química	Referências
Flavonoide	 <p>7,3'-di-<i>O</i>-metilluteolina</p>	FREITAS; KATO, 2008
Alcamida	 <p>3,4-Dimetóxi-N-Metil-aristolactama</p>	CARDOSO JÚNIOR; CHAVES, 2003
Constituintes de óleos essenciais	 <p>γ-Muurolene Óxido de cariofileno</p>	ARAÚJO, 2011
Derivado do ácido benzoico	 <p>Ácido caldensínico</p>	KATO <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Elaboração própria, 2013.

2.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS, QUÍMICAS E BIOSSINTÉTICAS SOBRE AS CLASSES DE COMPOSTOS ISOLADOS

Os metabólitos secundários de plantas são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética (HARBORNE, 1999). As três famílias de moléculas principais geralmente consideradas são: os terpênicos, os compostos que contêm nitrogênio e os compostos fenólicos.

No presente trabalho foi possível isolar e identificar das folhas de *Piper caldense* C.DC. uma mistura de esteroides, o sitosterol e o estigmasterol e duas substâncias porfirínicas, todas inéditas na espécie; e, dos frutos, três derivados do ácido benzoico, todas três inéditas na espécie.

2.4.1 Derivados de esteroides (Terpenos)

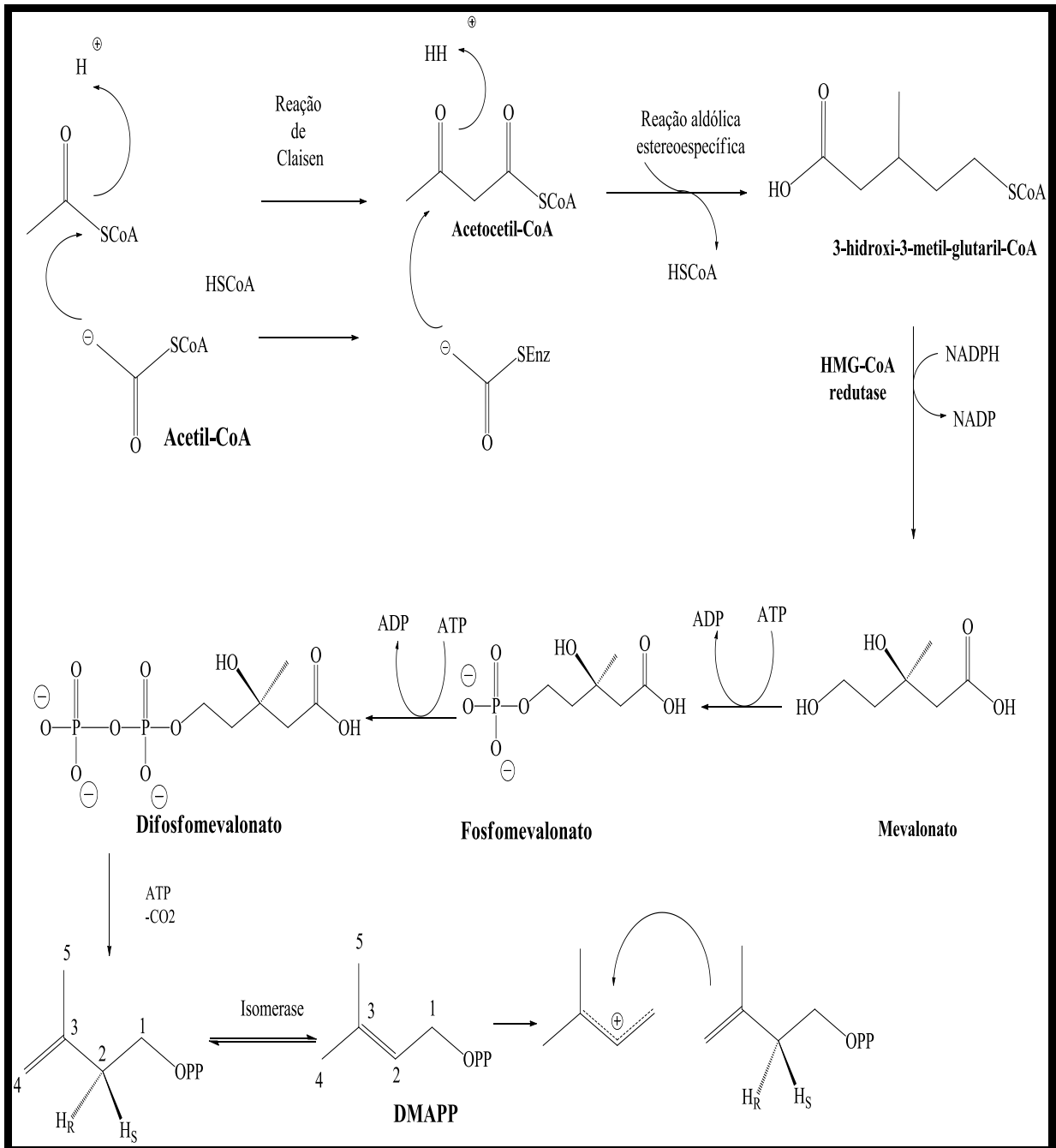
Os terpenos representam a segunda maior classe de constituintes de plantas, perdendo apenas para os alcaloides (LARCHER, 2004), compreendendo cerca de 30.000 compostos, subdivididos em várias subclasses de acordo com o número de unidades de isopreno que se combinam em ligações cabeça-cauda, originando assim os hemiterpenos (C₅ – um isopreno), monoterpenos (C₁₀ – dois isoprenos), sesquiterpenos (C₁₅ – três isoprenos), diterpenos (C₂₀ – quatro isoprenos), sesterpenos (C₂₅ – cinco isoprenos), triterpenos (C₃₀ – seis isoprenos) e tetraterpenos (C₄₀ – oito isoprenos) (DUBEY *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas o isopreno foi caracterizado como um produto de degradação de hidrocarbonetos cíclicos (isoprenoides), não estando diretamente envolvido na síntese dos produtos naturais desta classe, porém através de suas unidades bioquimicamente ativas, isto é, o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e o isopentenil difosfato (IPP), que condensados dão origem ao geranyl difosfato (GPP), precursor dos monoterpenos. Na via metabólica clássica, basicamente as unidades de isopreno se combinam em ligações cabeça-cauda como o geraniol (C₁₀), farnesol (C₁₅) e geranylgeraniol (C₂₀) (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Outros produtos naturais possuem unidades de isopreno em suas moléculas, em combinação com esqueletos carbônicos derivados de outras vias. Muitos compostos fenólicos como os derivados prenilados do ácido benzoico e as vitaminas são exemplos disto. Um fragmento comumente encontrado nestas moléculas é o substituinte dimetilalil. Moléculas contendo esse fragmento são frequentemente chamadas de preniladas ou monoterpenoides (BRUNETON, 1991).

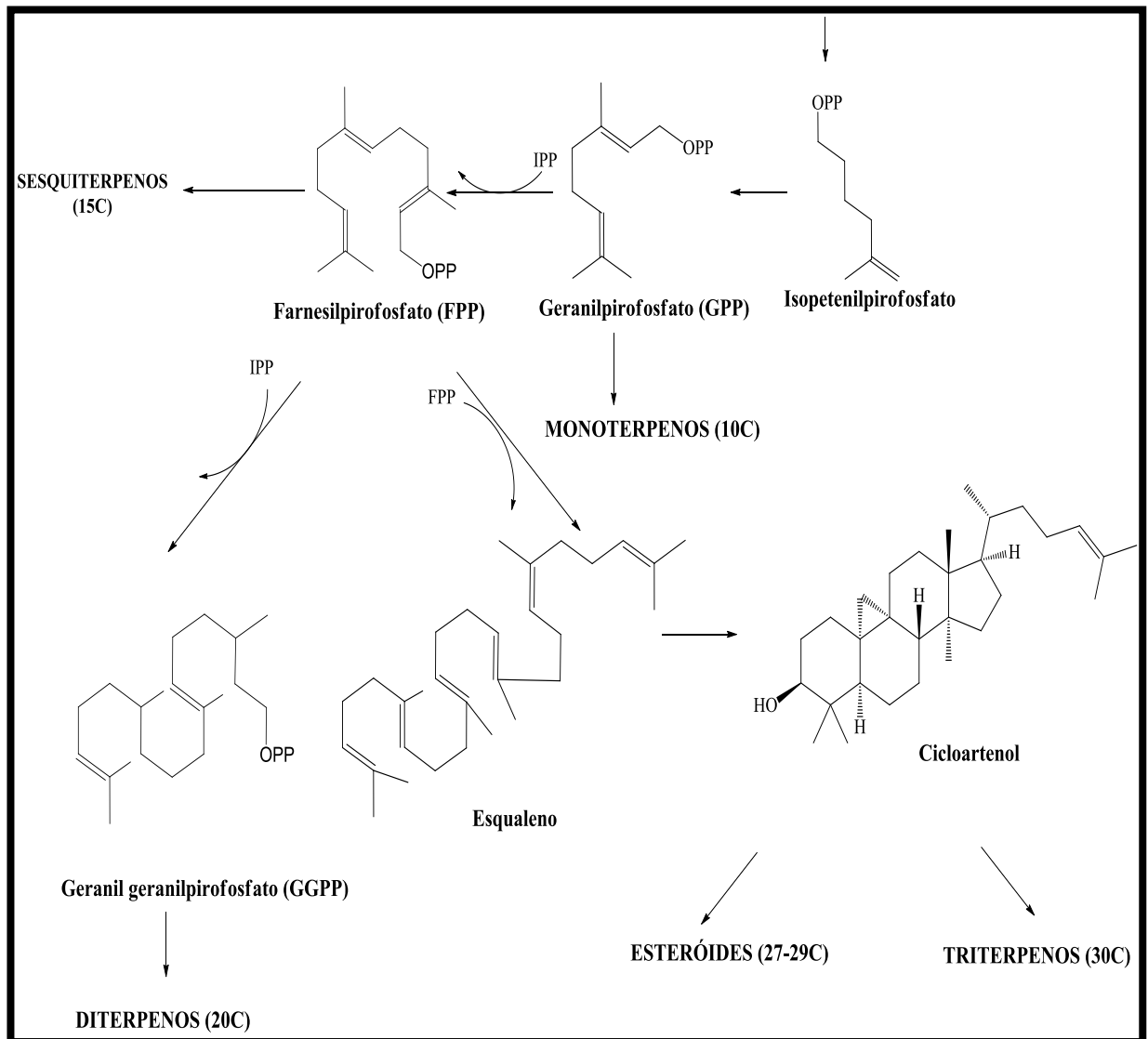
Os terpenos são sintetizados por duas rotas metabólicas distintas. A primeira delas, a via do ácido mevalônico, ocorre no citoplasma da célula vegetal a partir do grupo acetil da acetil-coA, que resulta na formação do isopentenil fosfato (IPP) e serve de base para a síntese dos terpenos. Nesse processo, o acetato é primeiramente convertido a unidades de isopreno (C-5), pela descarboxilação do mevalonato, que contém seis átomos de carbono. O envolvimento dessas unidades de isopreno é fundamental no processo metabólico de formação dos esteroides, posteriormente condensadas para formar o esqualeno, uma molécula linear, que contém 30 átomos de carbono e é precursora do colesterol e de outros esteroides (VOET, 2006; CAMPBELL, 2005) (**Figura 4**). A segunda rota metabólica acontece nos cloroplastos e é conhecida como rota do metileritritol fosfato (MEP), que também leva à formação do isopentenil fosfato (IPP), por meio da reação de condensação entre uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, originando o dimetilalil-difosfato (DMAPP), que por sua vez sofre protonação do seu oxigênio, com conseqüente formação de carbocátion alílico e dimerização, gerando o geranyl difosfato (GPP) (DEWICK, 2009) (**Figura 5**).

Figura 4: Representação esquemática da biossíntese dos derivados mevalônicos.



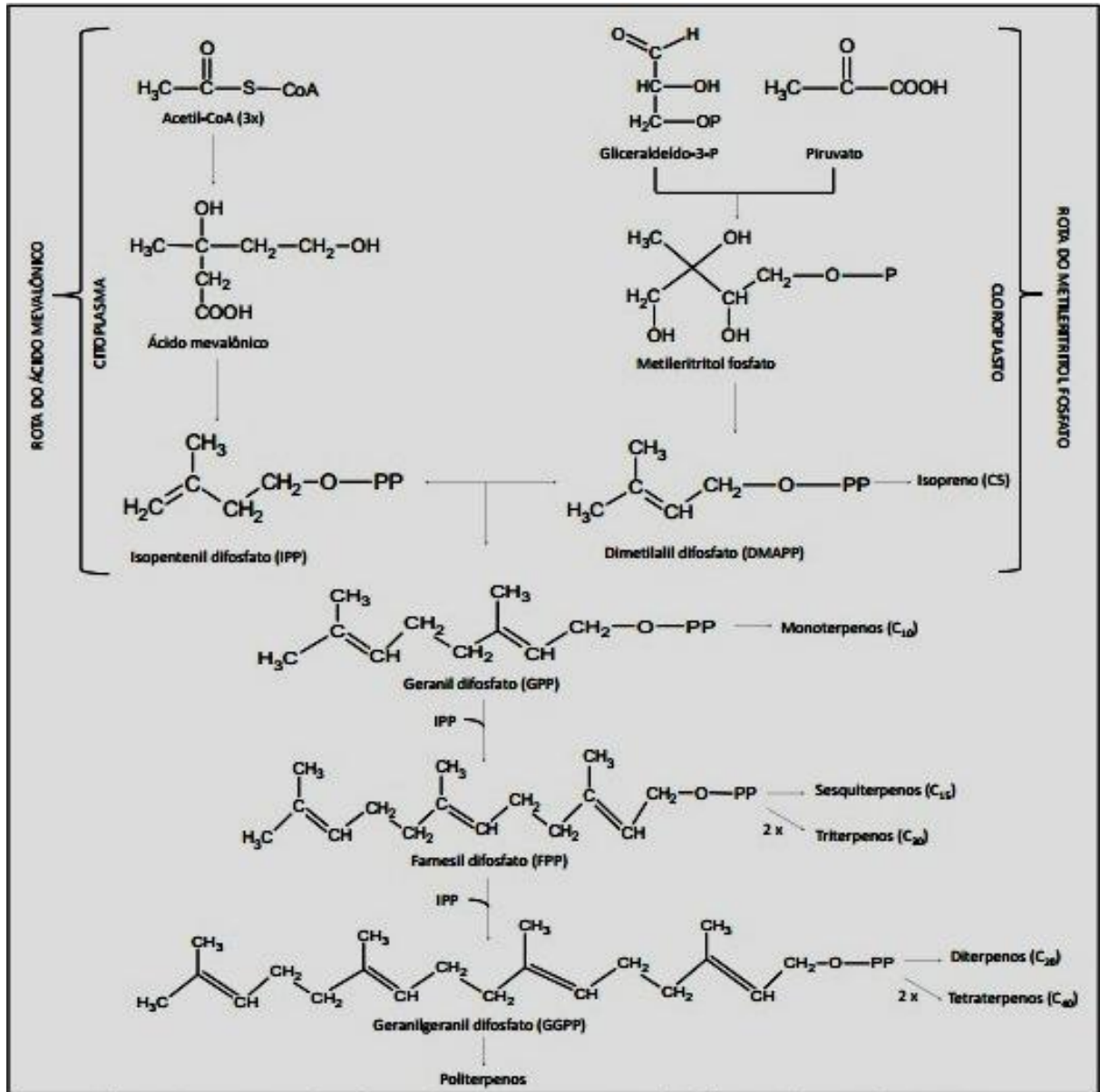
Fonte: Elaboração própria adaptada de Rohdich *et al.* (2003) e Simões (2012).

Figura 4 (continuação): Representação esquemática da biossíntese dos derivados mevalônicos.



Fonte: Elaboração própria adaptada de Rohdich *et al.* (2003) e Simões (2012).

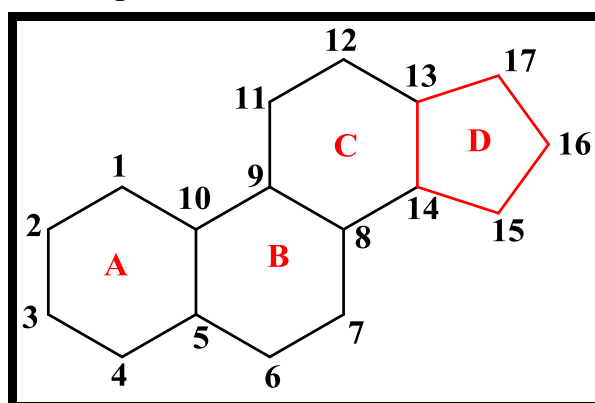
Figura 5: Representação da síntese dos terpenoides a partir da via do Metileritritol Fosfato (MEP). Comparação com a via do Ácido Mevalônico (MVA).



Fonte: GARCIA; CARRIL, 2009, p. 58.

Sendo assim, os esteroides são uma classe de terpenoides modificados derivados da via do ácido mevalônico, a partir de unidades de isopreno ativo, que se caracterizam quimicamente por apresentar em comum a estrutura química denominada ciclopentanoperidrofenantreno (**Figura 6**), um núcleo cíclico semelhante ao fenantreno (anéis A, B e C, de seis membros), ligado a um anel ciclopentano (D), considerados triterpenos modificados devido à ausência de três metilas nos carbonos C-4, C-5 e C-14, sendo o colesterol um modelo estrutural básico, o qual é encontrado em praticamente todos os organismos eucariontes. Já o β -sitosterol e o estigmasterol, aqui tratados, são encontrados nos óleos vegetais (ROBBERS *et al.*, 1997; DEWICK, 2009).

Figura 6: Núcleo básico do colesterol.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Os esteroides são substâncias dotadas de grande diversidade farmacológica, destacando-se como reguladores biológicos, provocando efeitos fisiológicos pronunciados nos seres vivos nos quais são administradas, sobretudo no crescimento, etapas especiais como a gravidez e defesa e proteção do organismo. Dentre suas principais funções estão o desenvolvimento e o controle do sistema reprodutor humano, pois estão presentes na composição química dos hormônios sexuais, ácidos biliares, adrenocorticoides (manutenção do balanço eletrolítico), além de funcionarem como agentes cardiotônicos, anticoncepcionais, precursores da vitamina D, anabolizantes e anti-inflamatórios (DANNHARDT *et al.*, 2001; LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

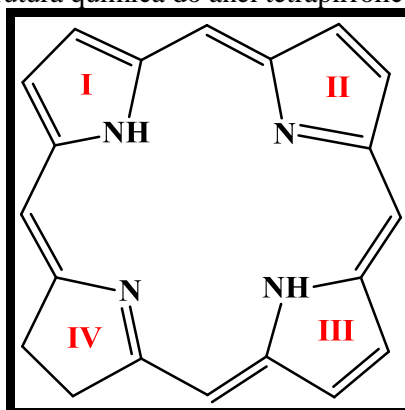
As células eucarióticas expressam muitas proteínas célula-específicas em resposta à presença de vários compostos esteroidais (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011) e, em virtude de sua importância farmacológica, o Brasil os importa em larga escala para o controle de enfermidades e da natalidade. Dentre os esteroides destacam-se as progestinas, que têm sido amplamente usados como fármacos nas últimas décadas.

A elucidação da estrutura dos esteroides levou muitas décadas. Em 1928, Windaus e Wieland receberam o prêmio Nobel de química pelos estudos realizados com tais compostos (BARCHMANN *et al.*, 1939) e, após sua descoberta, centenas de plantas foram investigadas no intuito de descobrir moléculas que contivessem um sistema de anel do tipo esteroidal, que funcionasse, dessa forma, como um protótipo na síntese de novos esteroides e, tendo-se descoberto que, atualmente, sua fonte majoritária são as espécies produtoras de sapogeninas esteroidais (HOSTETTMANN, 2003).

2.4.2 Derivados porfirínicos

As porfirinas compreendem um vasto grupo de entidades químicas diversas que estão presentes em muitos sistemas biológicos (citocromos, hemoglobinas) e são constituídas basicamente de quatro anéis pirrólicos ligados entre si por uma ponte metínica, numerados de 1 a 4 ou “I” a “IV” (**Figura 7**), formando um macrociclo (SOARES, 2006). As diferenças estruturais na série de porfirinas decorrem do grau de insaturação dos anéis, na composição das cadeias laterais anexadas aos anéis pirrólicos e nas posições axiais do macrociclo, originando as clorofilas e as feofitinas, produtos de sua degradação (STERNBERG *et al.*, 1998).

Figura 7: Estrutura química do anel tetrapirrólico das feofitinas.



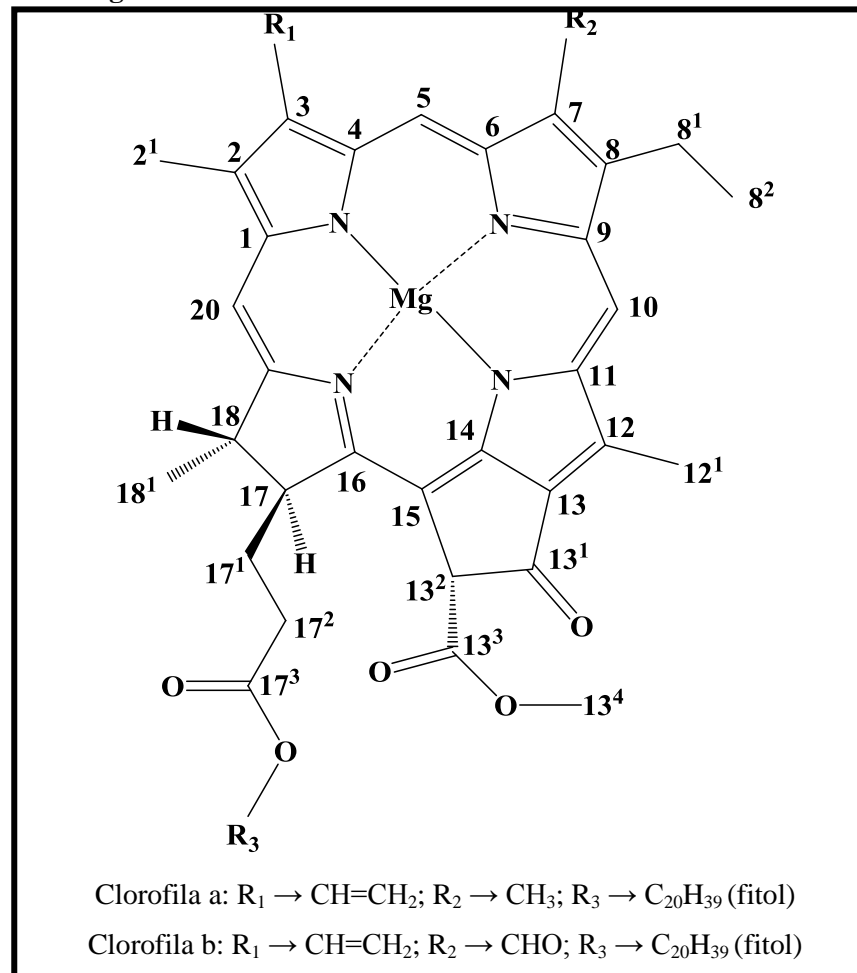
Fonte: Elaboração própria, 2013.

As clorofilas constituem a base estrutural das feofitinas (Pheo) aqui abordadas. Sua estrutura é semelhante à do grupo heme da mioglobina, da hemoglobina e dos citocromos, a qual é baseada no anel tetrapirrólico das porfirinas, porém apresentando o magnésio (Mg^{+2}) como íon metálico central do núcleo porfirínico, em substituição aos dois átomos de hidrogênio das feofitinas (**Figura 8**). O íon metálico divalente aumenta a polaridade dos compostos macrocíclicos, atenuando o caráter hidrofóbico de todo o sistema químico. Além disso, apresentam um anel ciclopentanona ligado ao anel tetrapirrólico e uma longa cadeia lateral fitílica, conferindo caráter hidrofóbico à molécula. O grupo fitol ($C_{20}H_{39}$) contém quatro unidades isoprenóides e se liga à molécula da clorofila por uma ligação éster entre o grupo álcool do fitol e uma cadeia lateral de ácido propiônico no anel porfirínico, sendo uma forma reduzida do diterpeno geranylgeraniol (WHITE; JONES; GIBBS, 1963; CAMPBELL, 2005). De maneira geral, a biossíntese da clorofila é realizada a partir do ácido glutâmico,

seguido de sucessivas reações, com posterior adição do grupo fitol (WETTSTEIN *et al.*, 1995).

A clorofila não é uma molécula isolada, compreendendo uma família de substâncias semelhantes entre si, designadas de clorofila **a**, **b**, **c** e **d**. Há dois tipos principais de clorofila: **a** e **b**, ambas presentes nos eucariotos, como as plantas e as algas verdes (**Figura 8**). A clorofila **a** (Chl *a*) é a mais abundante e a mais importante dessa família, correspondendo a aproximadamente 75% dos pigmentos verdes encontrados nos organismos fotossintetizantes que produzem oxigênio. Já a clorofila **b** (Chl *b*) está presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias. A diferença entre as clorofilas **a** e **b** está na substituição de um grupo aldeído por uma metila inserida no carbono da posição 7 (C-7) do anel porfirínico.

Figura 8: Estruturas moleculares das clorofilas **a** e **b**.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

A formação dos derivados da clorofila se deve a um processo de degradação da mesma através da substituição do magnésio do centro da molécula da clorofila pelo hidrogênio em

meio ácido (hidrólise ácida), num fenômeno denominado feofitinação. Sendo assim, a clorofila **a** ao sofrer tal mudança estrutural, origina a feofitina **a**, que por sua vez levará à formação das demais feofitinas (feofitinas **b** e **d**, por exemplo) (STREIT *et al.*, 2005). A feofitina **a** (2), por sua vez, quando hidroxilada gera 13²-hidroxi feofitina **a** (3) e/ou quando hidrolisada na porção éster (remoção da cadeia fitol) por ação da enzima clorofilase, produzirá o feoforbídeo **a** (4) e o fitol (5) (SOARES, 2006; GREGORY, 1978; BARKER, 1977) (**Figura 9**).

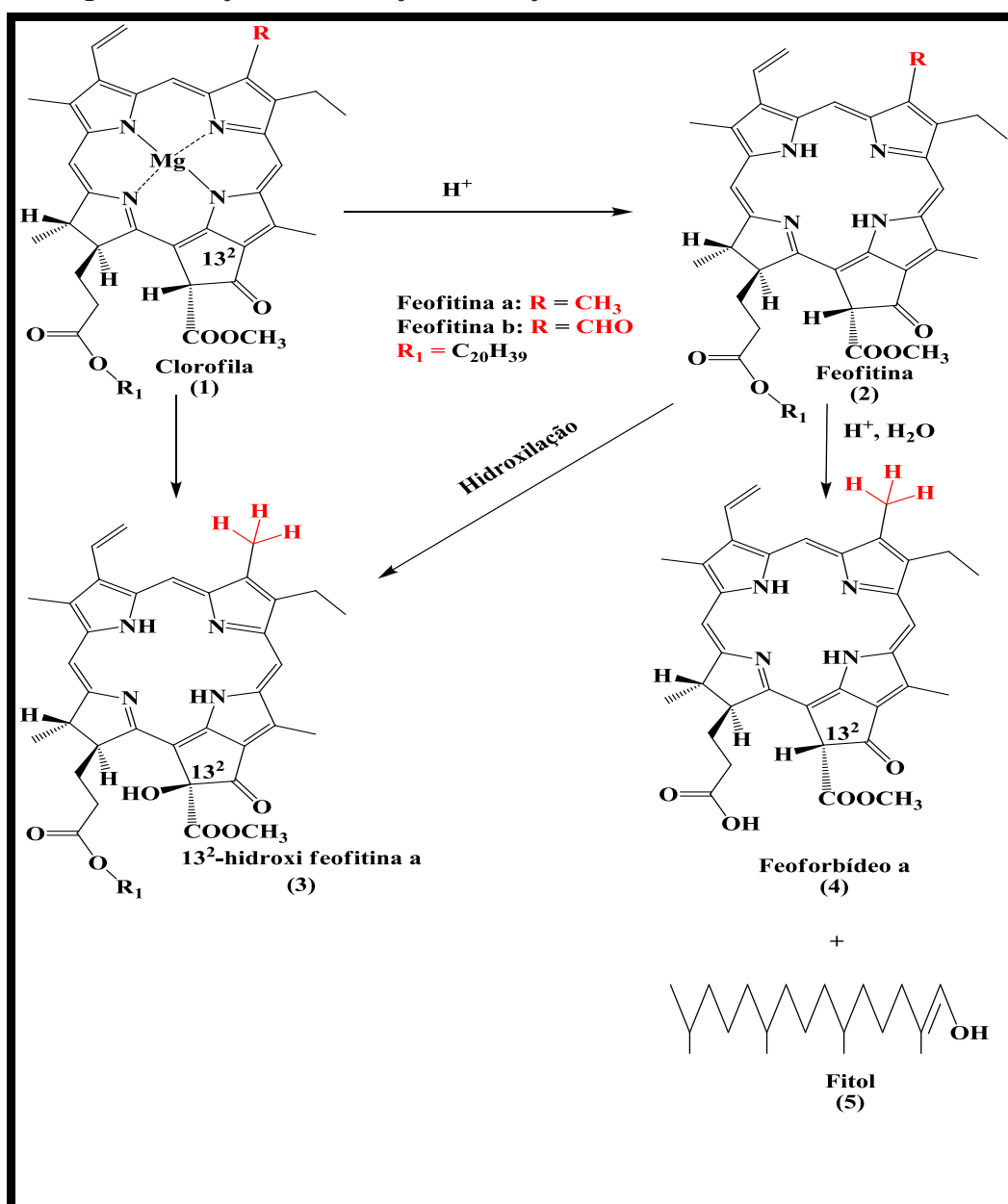
A mudança das Chl **a** e **b** para as respectivas feofitinas pode ser notada visualmente pela mudança de cor durante o armazenamento, sob congelamento, pois as baixas temperaturas ao diminuírem o pH dos compostos aumentam a tendência de precipitação de proteínas acelerando as reações de catálises ácidas, como a feofitinação, verificando-se o desvanecimento da cor verde vívida da clorofila **a** um marrom azeitona da feofitina causado pela substituição do magnésio do centro da molécula de clorofila pelo hidrogênio (HEATON, 1996; MARTINS; SILVA, 2002).

As clorofilas são os pigmentos naturais verdes mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais, sendo responsáveis através da fotossíntese pela absorção de luz solar, produção de oxigênio e carboidratos, como a glicose, havendo mais de cem estruturas de seus derivados já descritas, as quais advêm de diversas fontes, dentre elas plantas, samambaias, musgos, algas verdes e organismos procariontes (WISSGOTT *et al.*, 1996; DOWNHAM, 2000). A intensa cor verde das clorofilas deve-se a suas fortes absorções nas regiões do azul e vermelho do espectro eletromagnético, transmitido na região do verde (MAESTRIN *et al.*, 2009).

Estudos científicos têm demonstrado importantes propriedades biológicas comprovadas da clorofila, bem como de seus derivados, destacando-se propriedades antimutagênicas, antígenotóxicas, anti-inflamatórios e antioxidativos, prevenindo o processo da aterosclerose e das doenças cardiovasculares aterotrombóticas (LILA, 2004; HSU, 2005).

Neste trabalho foi possível isolar e identificar duas substâncias porfirínicas, identificadas como *Pc-2* e *Pc-3* (**Quadro 3**), ambas novas na espécie botânica estudada. As feofitinas dentro do gênero *Piper* são substâncias pouco isoladas, tendo sido descrita anteriormente uma única vez a presença de feofitina **a** em *Piper carniconectivum* (ALVES, 2010).

Figura 9: Reação de feofitização e formação das feofitinas e feoforbídeos.



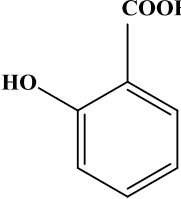
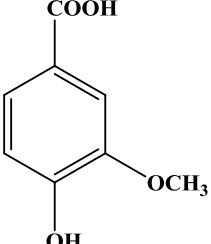
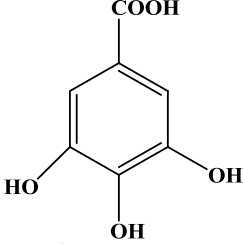
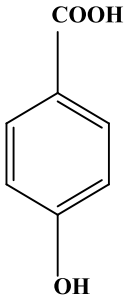
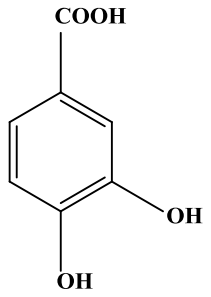
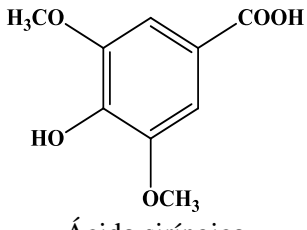
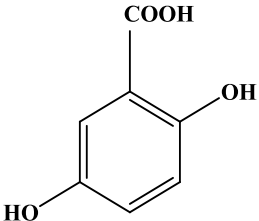
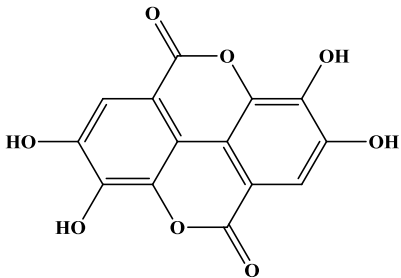
Fonte: Elaboração própria, 2013.

2.4.3 Compostos fenólicos derivados do ácido benzoico

De acordo com Lincoln e Zeiger (2004), os compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo vegetal que possuem em comum um anel aromático substituído por um ou mais grupos hidroxila ou outros substitutos, 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 fenilpropanóis simples (como os ácidos caféico e ferúlico), as cumarinas (como a

umbeliferona e o psoraleno), os **derivados do ácido benzoico** (como o ácido vanílico, o ácido protocatéquico, o ácido gálico, o ácido elágico, o ácido sirínico, o ácido gentísico, o ácido *o*-hidróxi-benzoico e o ácido *p*-hidróxi-benzoico (**Tabela 2**), os flavonoides (antocianinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas), a lignina e os taninos (condensados e hidrolisáveis) (CARVALHO *et al.*, 1999).

Tabela 2: Alguns derivados do ácido benzoico.

Mono-hidroxilados	Di-hidroxilados	Tri-hidroxilados ou polihidroxilados
 <p data-bbox="272 880 580 909">Ácido <i>o</i>-hidróxi-benzoico</p>	 <p data-bbox="727 925 903 954">Ácido vanílico</p>	 <p data-bbox="1145 925 1302 954">Ácido gálico</p>
 <p data-bbox="272 1447 580 1476">Ácido <i>p</i>-hidróxi-benzoico</p>	 <p data-bbox="691 1290 943 1319">Ácido protocatéquico</p>	 <p data-bbox="1129 1290 1318 1319">Ácido sirínico</p>
 <p data-bbox="719 1682 911 1711">Ácido gentísico</p>	 <p data-bbox="1137 1659 1310 1688">Ácido elágico</p>	

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Apesar de questionável, é geralmente aceito que os ácidos benzoicos são derivados dos correspondentes ácidos cinâmicos, com o mesmo padrão de substituição do anel aromático, através da remoção de uma unidade de acetato da cadeia lateral acrílica, sendo a maioria solúvel em água e ocorrem na forma de glicosídeos. A biogênese dos compostos fenólicos acontece através de duas rotas conhecidas: **a via do ácido chiquímico**, a partir do

ácido cinâmico, 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 padrão de substituição meta das hidroxilas. O padrão de substituição é determinado pela origem biossintética (GEISSMAN; CROUT, 1969; DIXON; PAIVA, 1995).

De maneira geral, os derivados do ácido benzoico são encontrados tanto nas angiospermas como nas gimnospermas, com ampla distribuição. 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-benzoico (ácido anísico), ácido 3,4-dimetóxi-benzoico (ácido verátrico) e o ácido 3,4,5-trimetóxi-benzoico podem ser citados.

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos micro-organismos, fazendo também parte do metabolismo animal, no qual são produzidos em pequenas quantidades, utilizando o anel benzênico de substâncias provenientes da dieta alimentar (os mais frequentes nos alimentos são os flavonoides, os ácidos fenólicos e as lignanas). Já os vegetais e a maioria dos micro-organismos detêm a capacidade de sintetizar o anel benzênico, e a partir dele, os compostos fenólicos (CARVALHO *et al.*, 1999).

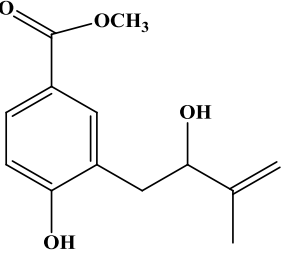
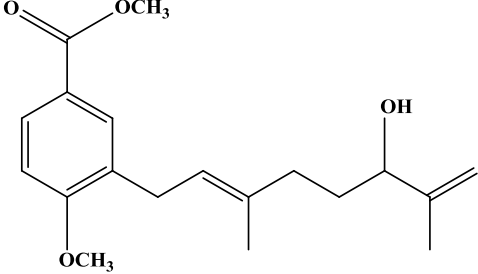
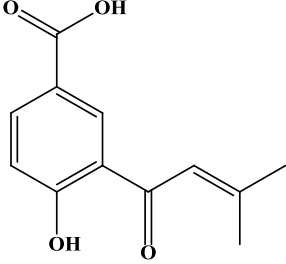
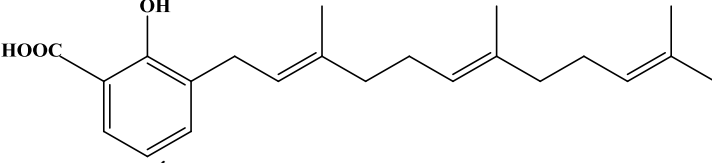
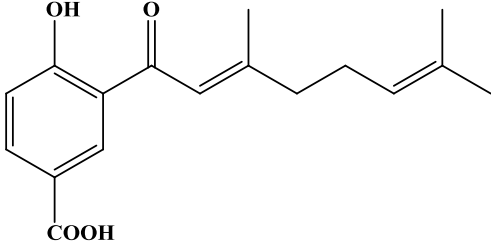
São abundantes em frutas, vegetais e alimentos derivados dos mesmos, que são consistentemente associados à redução no risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas, devido à sua propriedade de sequestrar radicais livres e metais pró-oxidantes explicando, em parte, esta associação (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).

Apesar do gênero *Piper* L. apresentar uma composição fitoquímica muito diversificada e as amidas serem os componentes mais característicos de suas espécies, os derivados do ácido benzoico compreendem uma outra importante classe de substâncias dentro do gênero em virtude de seu potencial farmacológico. López, 2002 cita a atividade fungicida

dos derivados prenilados do ácido benzoico de *Piper lanceaefolium*. De *Piper multiplinervium*, espécie encontrada nas regiões de 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).

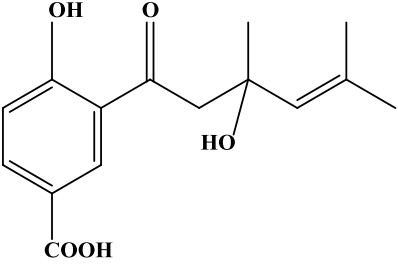
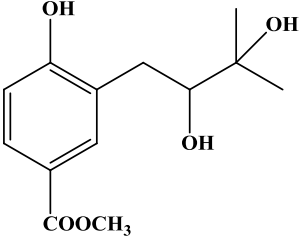
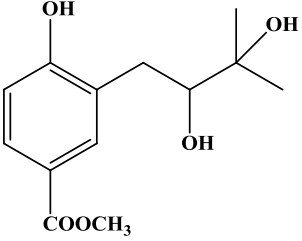
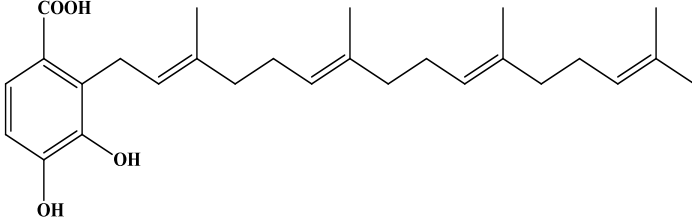
De acordo com relatos da literatura, um certo número de derivados prenilados do ácido benzoico com diversas atividades biológicas têm sido isoladas e caracterizadas a partir de diferentes espécies da família Piperaceae, sendo possível observar semelhanças estruturais entre esses compostos destacando-se 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]-benzoico (KATO, 2006), dentre outros. Os compostos isolados das folhas de *P. aduncum* revelaram atividade antiparasitária contra *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*. Outras espécies também foram relatadas, dentre elas, *Piper heterophyllum*, *Piper murrayanum*, *Piper guadichaudianum*, *Piper saltuum*, *Piper guanacastensis*, *Piper arieianum*, *Piper acutifolium*, *Piper glabratum*, *Piper lanceaefolium* e *Piper hostmannianum* apresentando atividades antibacterianas, antiparasitárias, inseticidas e antifúngicas (MALAMI, 2012). Um quadro contendo derivados de ácido benzoico prenilados oriundos das espécies botânicas anteriormente citadas com suas respectivas atividades biológicas foi compilado, para um melhor entendimento acerca do tema em curso (**Quadro 3**).

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>	 <p>3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-4-hidroxibenzoato de metila</p>	Moluscicida	DIAZ <i>et al.</i> , 1987; ORJALA <i>et al.</i> , 1993.
<i>Piper aduncum</i>	 <p>3-(6-hidroxi-3,7-dimetil-2,7-octadienil)-4-metoxibenzoato de metila)</p>	Moluscicida	ORJALA <i>et al.</i> , 1993.
<i>Piper dilatatum</i>	 <p>Ácido tabogânico</p>	Antifúngica	TERREAUX <i>et al.</i> , 1998.
<i>Piper multiplinervium</i>	 <p>Ácido 3-farnesil-2-hidroxibenzoico</p>	Antimicrobiana e bactericida	RÜEG <i>et al.</i> , 2006.
<i>Piper crassinervium</i>	 <p>Ácido 4-hidroxi-3-(3',7'-dimetil-1'-oxo-octa-2'-E-6'-dienil)-benzoico</p>	Antifúngica	KATO, 2006.

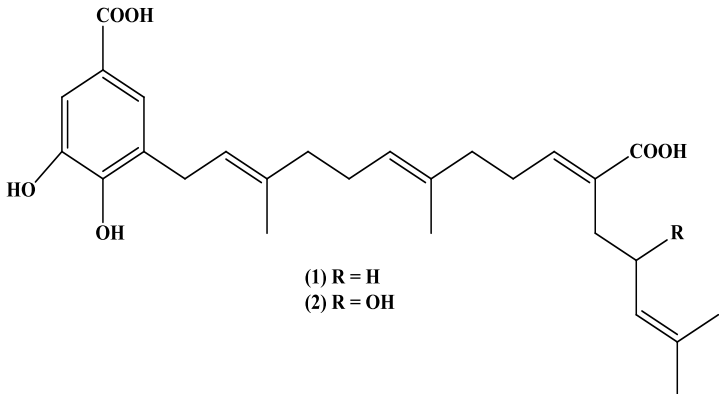
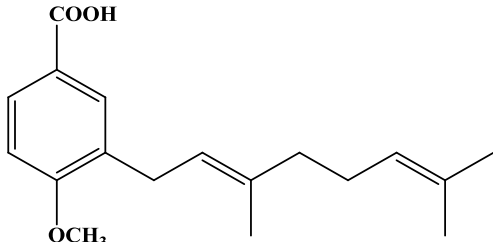
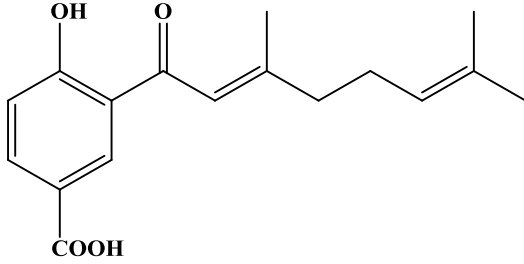
Fonte: Elaboração própria, 2013.

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-3'-hidroxi-1'-oxo-6'-octenil) benzoico</p>	Antifúngica	DANELUTTE <i>et al.</i> , 2003; LAGO <i>et al.</i> , 2004.
<i>Piper hostmannianum</i>	 <p>Metil 3-(2,3-dihidroxi-3-metilbutil)-4-hidroxibenzoato</p>	Antifúngica	LAGO, 2004.
<i>Piper hostmannianum</i>	 <p>Metil 3-(2,3-dihidroxi-3-metilbutil)-4-hidroxibenzoato</p>	Antifúngica	LAGO, 2004.
<i>Piper saltuum</i>	 <p>3,4-dihidroxi-2-((2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il) ácido benzoico</p>	Anifúngica	MAXWELL; RAMPERSAD, 1989.

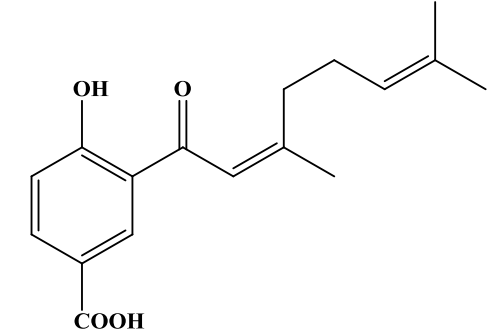
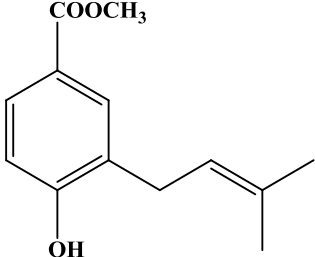
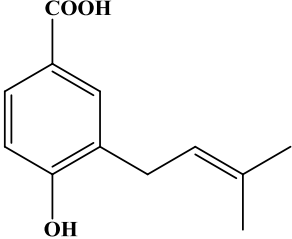
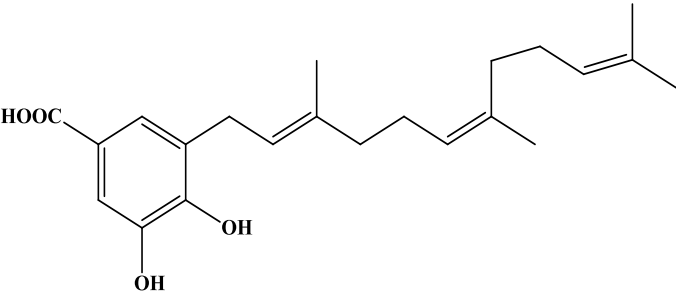
Fonte: Elaboração própria, 2013.

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

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<p><i>Piper heterophyllum</i> e <i>Piper aduncum</i></p>	 <p>(1) R = H (2) R = OH</p> <p>(1) 3-((2E,6E,10E)-11-carboxi-3,7,15-trimetilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il)-4,5-ácido dihidroxibenzoico</p> <p>(2) 3-((2E,6E,10E)-11-carboxi-13-hidroxi-3,7,15-trimetilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il)-4,5-ácido dihidroxibenzoico</p>	Antiparasitária	<p>ORJALA <i>et al.</i>, 1993; FLORES <i>et al.</i>, 2009; BALDOQUI <i>et al.</i>, 1999; GREEN <i>et al.</i>, 1999; LAGO <i>et al.</i>, 2004; 2009.</p>
<p><i>Piper heterophyllum</i> <i>Piper aduncum</i> e <i>Piper arieianum</i></p>	 <p>(E)-3-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-4-ácido metoxibenzoico</p>	Antiparasitária Antibacteriana Moluscicida	<p>ORJALA <i>et al.</i>, 1993; FLORES <i>et al.</i>, 2009; BALDOQUI <i>et al.</i>, 1999; GREEN <i>et al.</i>, 1999; LAGO <i>et al.</i>, 2004; 2009.</p>
<p><i>P. guadichaudianum</i> e <i>P. murrayanum</i></p>	 <p>(E)-3-(3,7-dimetilocta-2,6-dienoil)-4-ácido hidroxibenzoico</p>	Antibacteriana	<p>SEERAM <i>et al.</i>, 1996; GREEN <i>et al.</i>, 1999 PUHL <i>et al.</i>, 2011.</p>

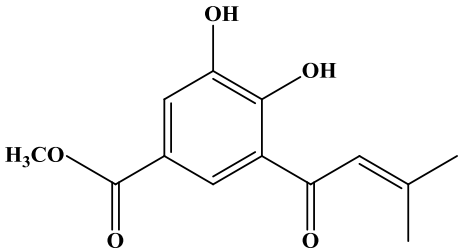
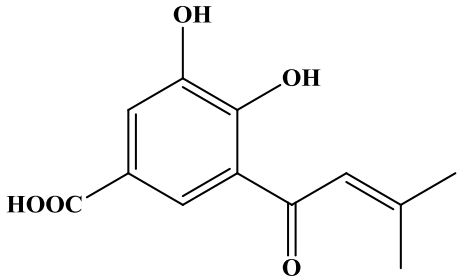
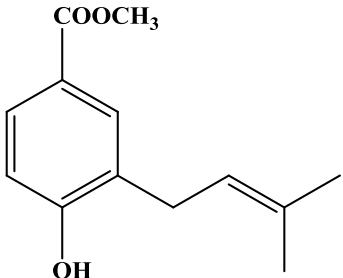
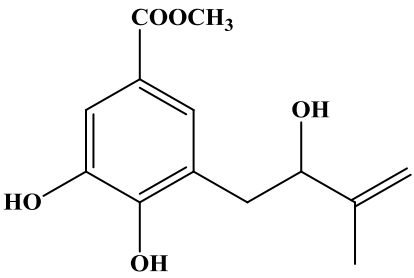
Fonte: Elaboração própria, 2013.

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

Espécie botânica	Substância isolada	Atividade farmacológica	Referência
<i>P.guadichaudianum</i> e <i>P. murrayanum</i>	 <p>(Z)-3-(3,7-dimetilocta-2,6-dienoil)-4-ácido hidroxibenzoico</p>	Antibacteriana	SEERAM <i>et al.</i> , 1996; GREEN <i>et al.</i> , 1999; PUHL <i>et al.</i> , 2011.
<i>Piper guanacastensis</i>	 <p>Metil-4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)benzoate</p>	Antifúngica	MIRANDA, 1997.
<i>Piper guanacastensis</i>	 <p>4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il) ácido benzoico</p>	Antifúngica	MIRANDA, 1997.
<i>Piper aduncum</i> e <i>Piper arieianum</i>	 <p>3,4-dihidroxi-5-((2E,6Z)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il) ácido benzoico</p>	Antiparasitária Antifúngica	BALDOQUI; GREEN, 1999.

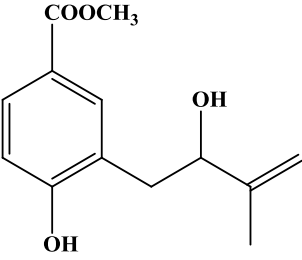
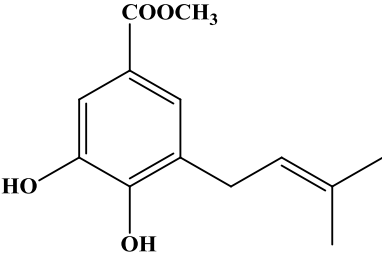
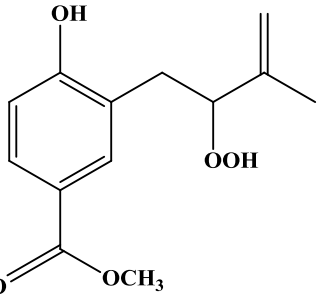
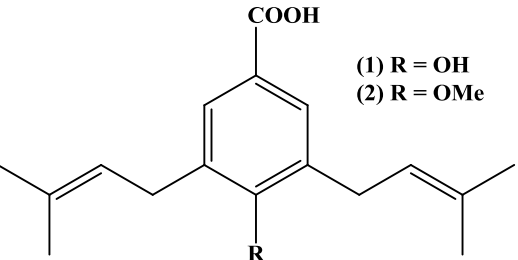
Fonte: Elaboração própria, 2013.

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> e <i>P. hostmannianum</i></p>	 <p>2,3-dihidroxi-5-(metoxicarbonil)-3-(3-metilbut-2-enoil) ácido benzoico</p>	<p>Antiparasitária Antifúngica</p>	<p>LOPEZ <i>et al.</i>, 2002; LAGO, 2004, 2009.</p>
	 <p>4-hidroxi-5-(3-metilbut-2-enoil) ácido isoftálico</p>	<p>Antifúngica</p>	<p>LOPEZ <i>et al.</i>, 2002; LAGO, 2004; 2009.</p>
<p><i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaefolium</i> e <i>P. hostmannianum</i></p>	 <p>Metil-4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il) benzoato</p>	<p>Antiparasitária Antibacteriana Moluscicida</p>	<p>LOPEZ <i>et al.</i>, 2002; LAGO, 2004; 2009.</p>
	 <p>Metil-3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metilbut-3-en-1-il) benzoato</p>	<p>Antifúngica</p>	<p>LOPEZ <i>et al.</i>, 2002; LAGO, 2004; 2009.</p>

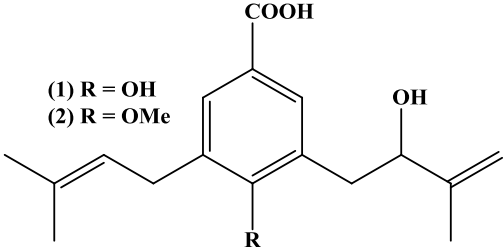
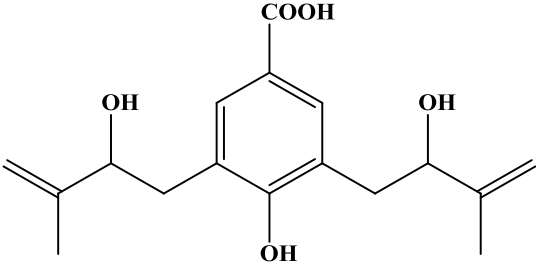
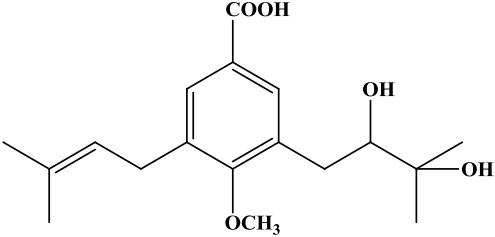
Fonte: Elaboração própria, 2013.

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. lanceaeifolium</i> <i>e</i> <i>P. hostmannianum</i>	 <p>Metil-4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbut-3-en-1-il) benzoate</p>	Antifúngica	LOPEZ <i>et al.</i> , 2002; LAGO, 2004; 2009.
	 <p>Metil-3,4-dihidroxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il) benzoato</p>	Antifúngica	LOPEZ <i>et al.</i> , 2002; LAGO, 2004; 2009.
	 <p>Metil-3-(2-hidroperoxi-3-oxobutil)-4-hidroxi benzoato</p>	Antifúngica	LOPEZ <i>et al.</i> , 2002; LAGO, 2004; 2009.
<i>P. aduncum</i> <i>P. acutifolium</i> <i>P. glabratum</i> <i>P. lanceaeifolium</i> <i>e</i> <i>P. hostmannianum</i>	 <p>(1) R = OH (2) R = OMe</p> <p>(1) 4-hidroxi-3,5-bis (3-metilbut-2-en-1-il) ácido benzoico (2) 4-metoxi-3,5-bis (3-metilbut-2-en-1-il) ácido benzoico</p>	Antifúngica	LOPEZ <i>et al.</i> , 2002; LAGO, 2004; 2009.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

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> e <i>P. hostmannianum</i></p>	 <p>(1) 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)-5-(3-metilbut-2-en-1-il) ácido benzoico (2) 4-metoxi-3-(2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il) ácido benzoico</p>	Antifúngica	LOPEZ <i>et al.</i> , 2002; LAGO, 2004; 2009.
	 <p>Ácido 4-hidroxi-3,5-bis (2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-benzoico</p>	Antifúngica	LOPEZ <i>et al.</i> , 2002; LAGO, 2004; 2009.
	 <p>3-(2,3-dihidroxi-3-metilbutil)-4-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il) ácido benzoico</p>	Antifúngica	LOPEZ <i>et al.</i> , 2002; LAGO, 2004; 2009.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

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 benzóicos prenilados derivados de produtos naturais, como um sistema de defesa química. Apesar do isolamento freqüente 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. Os três compostos aqui isolados

estão sendo relatados pela primeira vez em *Piper caldense* C.DC., tendo sido *Pc-5* e *Pc-6* isolados anteriormente nas espécies *Piper aduncum*, *Piper heterophyllum* e *Piper saltuum*. Já *Pc-4* está sendo relatado pela segunda vez no gênero *Piper* L., tendo sido isolado pela primeira vez em *Piper saltuum* (MAXWELL; RAMPERSAD, 1989; ORJALA *et al.*, 1993; FLORES *et al.*, 2009; BALDOQUI *et al.*, 1999; GREEN *et al.*, 1999; LAGO *et al.*, 2004; 2009).

3 Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com estudo quimiotaxonômico do gênero *Piper* L. por meio da investigação dos metabólitos secundários de *Piper caldense* C.DC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os componentes do material vegetal com solventes orgânicos bem como isolar, purificar e analisar os metabólitos secundários por técnicas cromatográficas usuais.
- Identificar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos através de técnicas espectroscópicas como IV, UV, RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, além de determinar suas características físico-químicas.
- Determinar a atividade antimicrobiana de extratos, fases, frações e substâncias isoladas e caracterizadas estruturalmente.

4 Parte Experimental

4.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

O levantamento bibliográfico da espécie *Piper caldense* C.DC foi realizado 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 2000-2012, sendo possível encontrar 632 referências contendo o descritivo acima. Usando-se apenas o descritivo “Piper” nos anos de 2011 a 2012 foi possível encontrar 1857 referências. Também foram consultados os descritivos “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.

4.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas e frutos 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. Sua identificação botânica foi realizada pela Prof^a Dr^a Maria de Fátima Agra da PgPNSB/CCS/UFPB. Uma exsicata do material encontra-se arquivada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (CCEN/UFPB) sob a numeração Agra 20.311.

4.3 REAGENTES E MATERIAIS

Os adsorventes sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh), sílica flash (partículas com 0,04-0,063mm, 230-400 mesh) e Sephadex LH-20 (Merck) foram utilizados para cromatografia em coluna, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas com dimensões variando de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Como fases móveis foram utilizados solventes comerciais redestilados. A Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) foram empregadas para a análise e purificação das frações, respectivamente, obtidas por cromatografia em coluna. Foram utilizadas placas de vidro com

dimensões de 5x20, 10x20 e 20x20 cm, sendo a espessura da camada de sílica igual a 0,30 mm e 0,75 mm, e preparadas com uma suspensão de sílica gel PF254 (Art. 7749 Merck) em água destilada, seguindo técnica descrita por Matos (1997). As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e também impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo. O monitoramento através de fator de retenção (Rf) na CCDA foi o método utilizado para reunir as frações coletadas durante os processos cromatográficos.

4.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

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

Para as cromatografias em coluna a pressão atmosférica, utilizou-se como fase estacionária sílica-gel 60 (Merck) (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 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 as cromatografias em coluna a média pressão, utilizou-se o aparelho Buchi Pump Maager C_615, empregando-se como fase estacionária sílica gel 60 (Merck) (partículas com 0,04-0,063 mm, 230-400 mesh). Como fases móveis foram utilizados os solventes comerciais Hexano, Clorofórmio, Acetato de Etila e Metanol, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

As CCDA e CCDP foram empregadas para a análise e purificação das frações obtidas por CC. Como suportes foram utilizadas 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 cromatoplasmas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 110 °C durante duas horas.

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

4.5 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E ESPECTROMÉTRICOS

A caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados da espécie botânica estudada foi realizada pela análise do ponto de fusão, dos espectros obtidos através de métodos espectroscópicos no Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13, bem como espectrometria de massa (EMS) e comparações com modelos da literatura.

4.5.1 Infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}) foram obtidos em aparelho de BOMEM FT-IR, série 100 MB do Centro de Biotecnologia da UFPB, utilizando de 1,00 a 3,00 mg de amostra em pastilhas de KBr, com frequência medida em cm^{-1} .

4.5.2 Ressonância magnética nuclear

Para os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear utilizou-se espectrômetros VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz e VARIAN-NMR-SYSTEM 200 MHz, otimizados para técnicas uni e bidimensionais, do Laboratório Multiusuário da Central Analítica (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba. Todas as amostras encaminhadas para análise foram preparadas dissolvendo-as em solventes deuterados como Clorofórmio (CDCl_3).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), sendo referenciados para RMN de ^1H os picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas do solvente: clorofórmio ($\delta_{\text{H}} = 7,24$ ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio ($\delta_{\text{C}} = 77,00$ ppm). As multiplicidades dos sinais de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), ddd (duplo duplo dubleto), dtd (duplo tripleto dobrado), dtl (duplo tripleto largo), m (multiplete), t (tripleto) e tl (tripleto largo).

4.5.3 Espectrometria de Massas

Para espectrometria de massa utilizou-se o Espectrômetro de Massas de Baixa Resolução, modelo Amazon X, marca Bruker, com detector tipo ESI, bem como o LCQFL Thermo Electron espectrômetro de massa-100000, o qual foi realizado para realização dos

espectros de massa ESI (ESI-MS) com analisador íon trap. Os espectros foram adquiridos no modo de detecção de íons positivos e negativos. O intervalo de massas para os experimentos foi de $m/z = 70$ a $m/z = 1000$.

4.6 PONTO DE FUSÃO

O ponto de fusão de cada substância foi determinado em aparelho digital para ponto de fusão (PF digital, modelo PFD III- Ver. 01 da Marte[®]) com temperatura variando de 0-350°C.

4.7 PUREZA DA AMOSTRA

O grau de pureza das substâncias por CCDA foi determinado quando observada uma única mancha após eluição, em pelo menos três tipos de sistemas de eluições diferentes.

Além disso, também foram considerados a determinação do ponto de fusão das substâncias (o critério de pureza adotado é que a diferença entre o PF final e o PF inicial não seja maior que 2°C), bem como a análise dos dados espectrais.

4.8 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *PIPER CALDENSE* C.DC.

4.8.1 Processamento da planta e preparação dos extratos

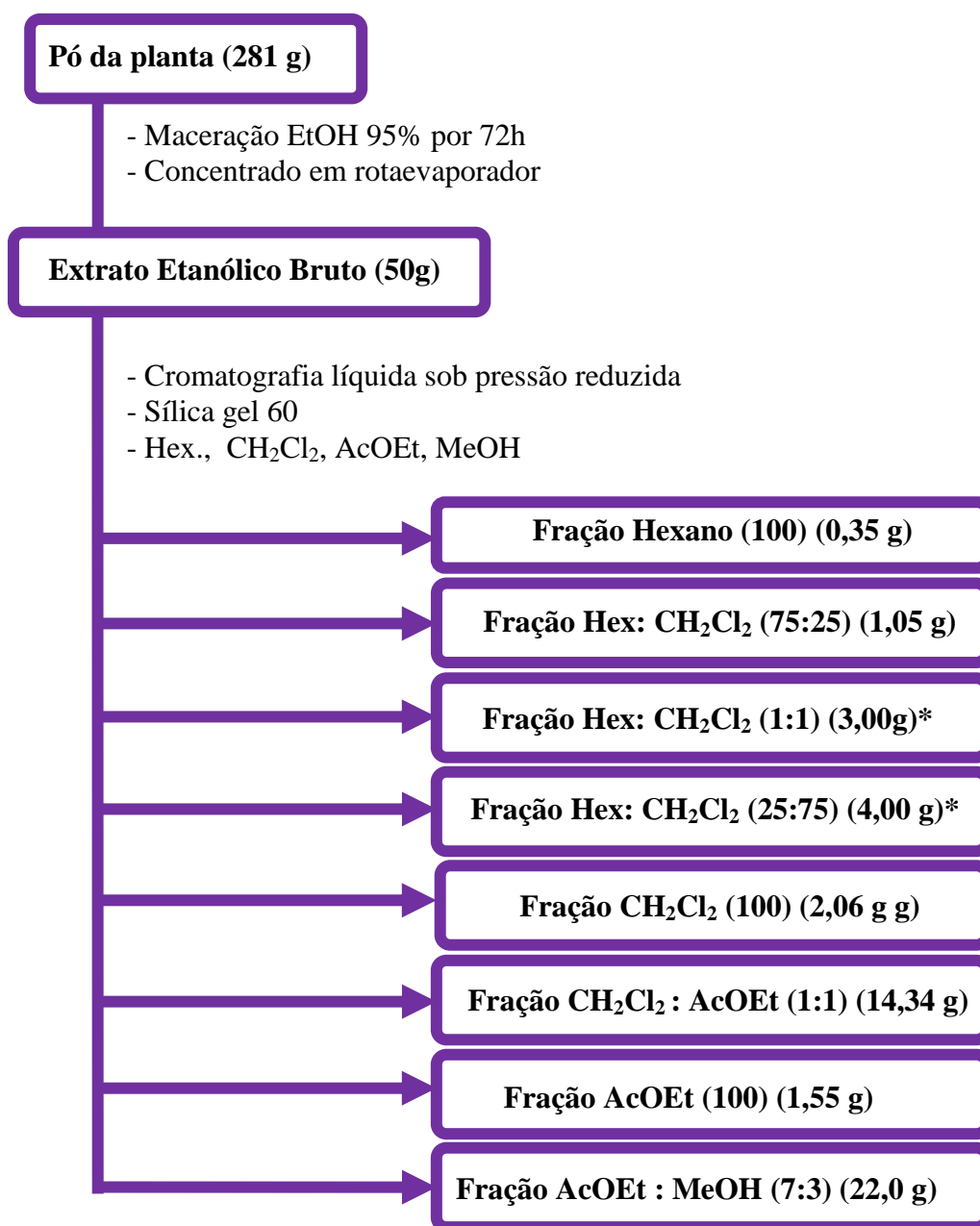
As folhas de *Piper caldense* C.DC foram desidratadas em estufa, com ar circulante, à temperatura média de 40 °C durante 96 horas, sendo em seguida trituradas em moinho mecânico, obtendo-se 0,281 Kg de pó. Este foi macerado em etanol (EtOH) a 95% por 72 horas para a extração dos constituintes orgânicos. A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador a 40 °C, fornecendo 50,0 g do extrato etanólico bruto (EEB), o que equivale a um rendimento de 17,78% (**Esquema 1**, pág. 95).

4.8.1.1 Cromatografia líquida sob pressão reduzida do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.

O extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC (50,0 g) foi submetido à cromatografia sob pressão reduzida, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh), tendo como suporte um funil de

Buckner, de placa porosa, acoplado a um kitassato. Como fase móvel foram utilizados Hexano, Diclorometano (CH_2Cl_2), Acetato de etila (AcOEt) e Metanol (MeOH) em diferentes proporções (**Esquema 1**). As frações foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e posteriormente pesadas.

Esquema 1: Obtenção de frações e cromatografia líquida sob pressão reduzida do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.



*Frações que foram utilizadas

Fonte: Elaboração própria, 2013.

No estudo fitoquímico das folhas de *Piper caldense* C.DC foram utilizadas as frações Hexano:Diclorometano (1:1) e Hexano:Diclorometano (25:75), que forneceram o composto *Pc-1a/Pc-1b*, e duas substâncias, *Pc-2* e *Pc-3*. Essas frações foram escolhidas após uma análise geral das mesmas, utilizando a técnica de RMN de ^1H , que revelou quais frações eram as mais promissoras. Levou-se em consideração, também, se as frações apresentavam peso molecular suficiente para a prospecção fitoquímica deste trabalho.

4.8.2 Processamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (1:1) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.

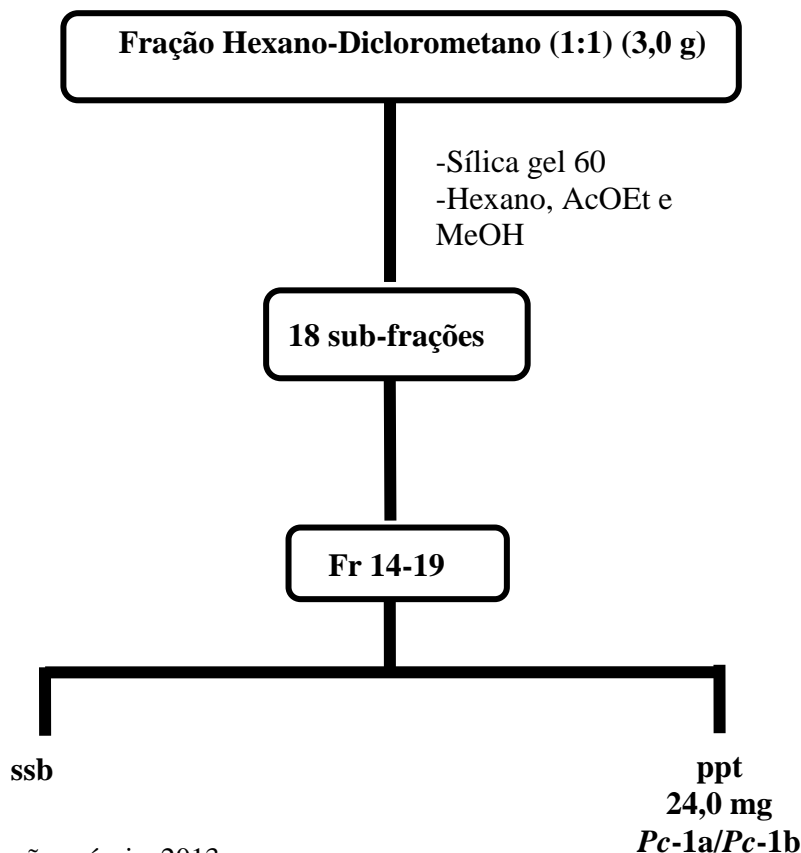
A fração Hexano-Diclorometano (1:1) (3,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna, denominada coluna 1, utilizando-se como adsorvente sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh) e como eluentes hexano, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade (**Esquema 2**), obtendo-se 87 frações de 100 mL cada, concentradas em evaporador rotativo, analisadas em CCDA e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (R_f 's) (**Tabela 3**), resultando em 18 grupos de frações. A sub-fração 14/19 forneceu um sobrenadante e um precipitado (24,0 mg), o qual se apresentou sob a forma de cristais brancos em agulhas que, ao ser analisado em CCDA, em vários sistemas de solventes, revelou-se uma mistura de duas substâncias, sendo, portanto, codificado como *Pc-1a/Pc-1b*.

Tabela 3: Fracionamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (1:1) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.

Fração	Eluente	Proporção	Reunidas
-	Hex	100	1-3
1-33	Hex:AcOEt	98:2	4
34-40	Hex:AcOEt	96:4	5-6
41-43	Hex:AcOEt	9:1	7
44-53	Hex:AcOEt	85:15	8-10
54-56	Hex:AcOEt	8:2	11-13
57-60	Hex:AcOEt	75:25	14-19
61-62	Hex:AcOEt	70:30	20-24
63-67	Hex:AcOEt	60:40	25-28
68-70	Hex:AcOEt	50:50	29-38
71	Hex:AcOEt	40:60	39-43
72-73	Hex:AcOEt	30:70	44
74-76	Hex:AcOEt	20:80	45
77-79	Hex:AcOEt	10:90	46-55
80-81	AcOEt	100	56-63
82-84	AcOEt:MeOH	90:10	64
85-86	AcOEt:MeOH	80:20	
87	AcOEt:MeOH	70:30	

Fonte: Elaboração própria, 2013.

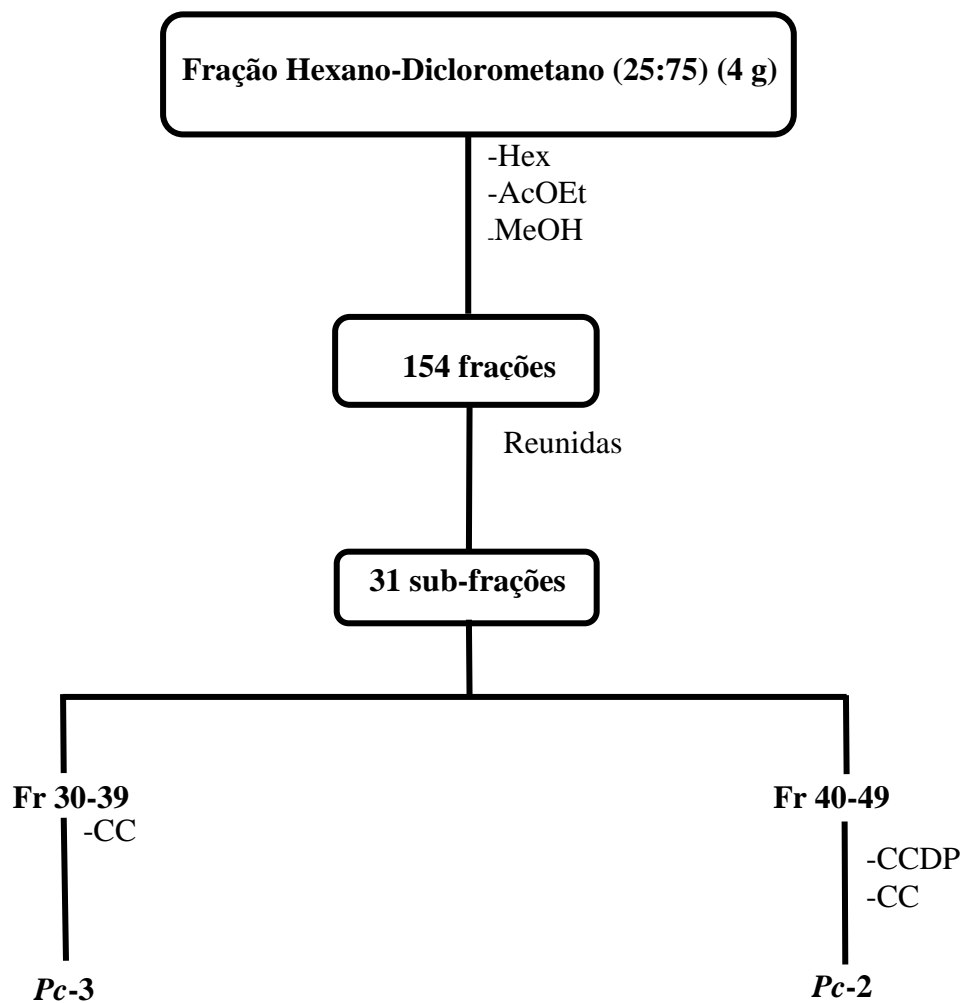
Esquema 2: Processamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (1:1) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.



4.8.3 Processamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.

A fração Hexano-Diclorometano (25:75) (4,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna (coluna 2), 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. Desta coluna foram coletadas 154 frações de 250 mL cada, concentradas em evaporador rotativo, analisados por CCDA e reunidas de acordo com seus Rf's em 31 sub-frações, dentre as quais as sub-frações 40-49 e 30-39 mostraram-se promissoras, fornecendo um pó verde-escuro com massa de 24,0 mg e 29,0 mg, respectivamente, ambos com brilho metálico que, após vários outros processos cromatográficos de purificação, revelaram-se puros, sendo então codificados como *Pc-2* e *Pc-3*, respectivamente (**Tabela 4** e **Esquema 3**). Os esquemas detalhados da rota laboratorial para a obtenção de *Pc-2* e *Pc-3* encontram-se nos **esquemas 4** e **5** respectivamente.

Esquema 3: Processamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 4: Fracionamento cromatográfico da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.

Fração	Eluente	Proporção	Reunidas
-	Hex	100	1-2
1-3	Hex:AcOEt	98:2	3-4
4-7	Hex:AcOEt	96:4	5-6
8-27	Hex:AcOEt	94:6	7-8
28-52	Hex:AcOEt	92:8	9-10
53-64	Hex:AcOEt	90:10	11-13
65-69	Hex:AcOEt	88:12	14-17
70-71	Hex:AcOEt	85:15	18-19
72-81	Hex:AcOEt	80:20	20-26
82-83	Hex:AcOEt	75:25	27-29
84-91	Hex:AcOEt	70:30	30-39
92-95	Hex:AcOEt	65:35	40-49
96-102	Hex:AcOEt	60:40	50-59
103-108	Hex:AcOEt	55:45	60-65
109-112	Hex:AcOEt	50:50	66-70
113-118	Hex:AcOEt	40:60	71-79
119-124	Hex:AcOEt	30:70	80-83
125-130	Hex:AcOEt	20:80	84-86
131-135	Hex:AcOEt	10:90	87-99
136-139	AcOEt	100	100-104
140-142	AcOEt:MeOH	90:10	105-109
143-148	AcOEt:MeOH	80:20	110-113
149-154	AcOEt:MeOH	70:30	114-154

Fonte: Elaboração própria, 2013.

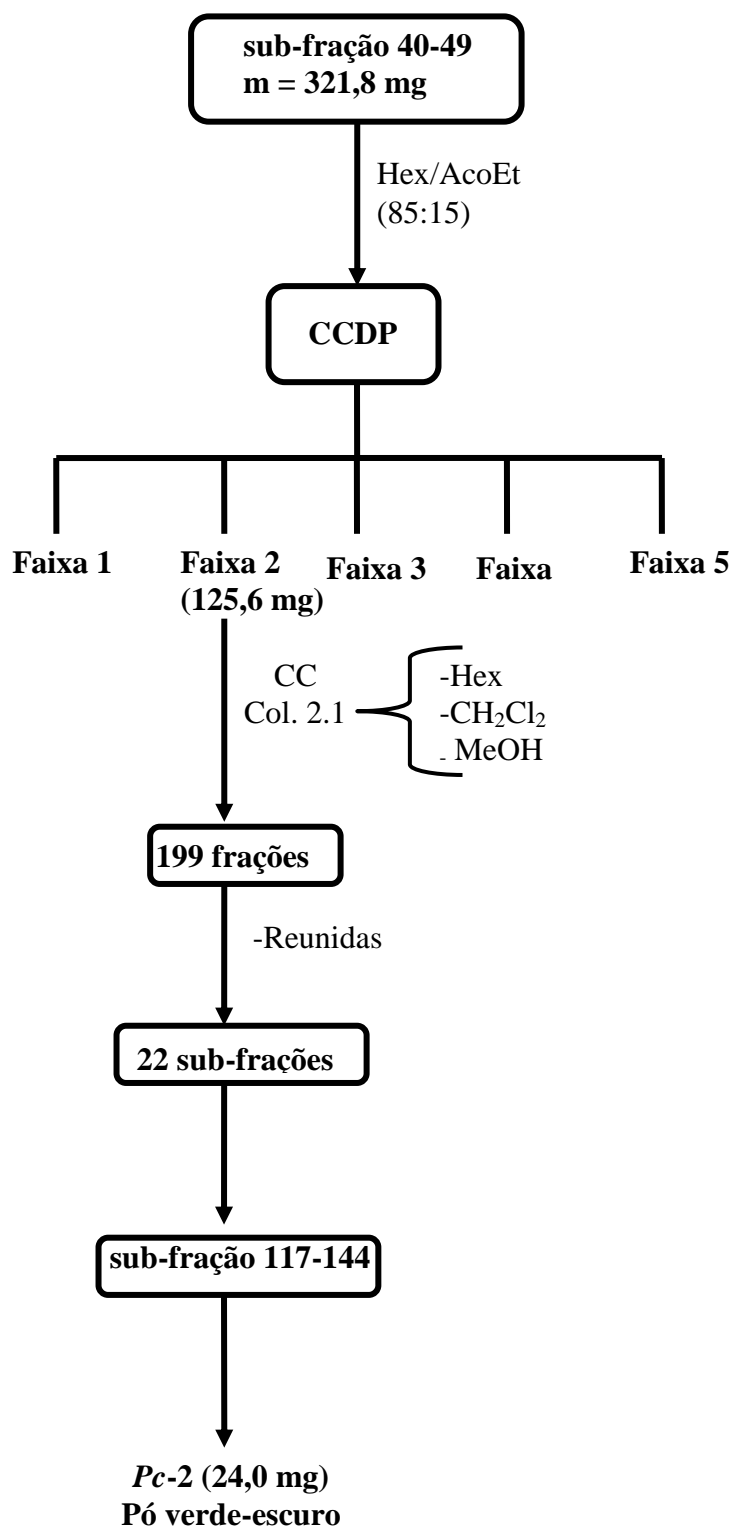
A sub-fração 40/49 (321,8 mg) obtida da coluna 2 foi submetida à purificação por CCDP, utilizando como sistema de eluição Hex/AcoEt (85:15), sendo obtidas 5 faixas, dentre as quais a faixa 2 revelou-se promissora, com massa de 125,6 mg. A mesma foi submetida, então, a uma nova purificação em cromatografia em coluna (Col 2.1) utilizando como fase estacionária sílica-gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh) e eluída com hexano, CH₂Cl₂ e MeOH puros ou em misturas binárias, em diferentes proporções. Foram recolhidas 199 frações que após análise em CCDA foram reunidas em 24 grupos de frações (**Tabela 5**). A sub-fração 117-144 forneceu um pó verde-escuro com massa de 24,0 mg, com brilho metálico, que se mostrou pura, quando analisada em CCDA em vários sistemas de solventes, sendo então codificada como **Pc-2 (Esquema 4)**.

Tabela 5: Purificação por fracionamento cromatográfico da sub-fração 40-49 proveniente da coluna 2 da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC., utilizando como sistema de eluição Hex/CH₂Cl₂ e MeOH em diferentes proporções (Coluna 2.1).

Fração	Eluente	Proporção	Reunidas
-	Hex	100	1-22
-	Hex: CH ₂ Cl ₂	90:10	23-31
1-3	Hex: CH ₂ Cl ₂	80:20	32-41
4-8	Hex: CH ₂ Cl ₂	70:30	42-47
9-15	Hex: CH ₂ Cl ₂	60:40	48-56
16-21	Hex: CH ₂ Cl ₂	50:50	57-68
22-57	Hex: CH ₂ Cl ₂	40:60	69-76
58-64	Hex: CH ₂ Cl ₂	30:70	77-94
65-76	Hex: CH ₂ Cl ₂	20:80	95-111
77-87	Hex: CH ₂ Cl ₂	10:90	112-113
88-101	CH ₂ Cl ₂	100	114-116
102-131	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	99,5:0,5	117-144
132-142	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	99:1	145-152
143-153	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98,5:1,5	153-154
154-160	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98:2	155-156
161-166	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	95:5	157-159
167-175	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	160-161
176-181	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	85:15	162-168
182-188	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	80:20	169-173
189-197	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	75:25	174-181
198-199	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	70:30	182-199

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Esquema 4: Purificação por CCDP da sub-fração 40-49 proveniente da coluna 2 da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC., utilizando como sistema de eluição Hex/AcoEt (85:15) com posterior fracionamento cromatográfico (Col 2.1).



Fonte: Elaboração própria, 2013.

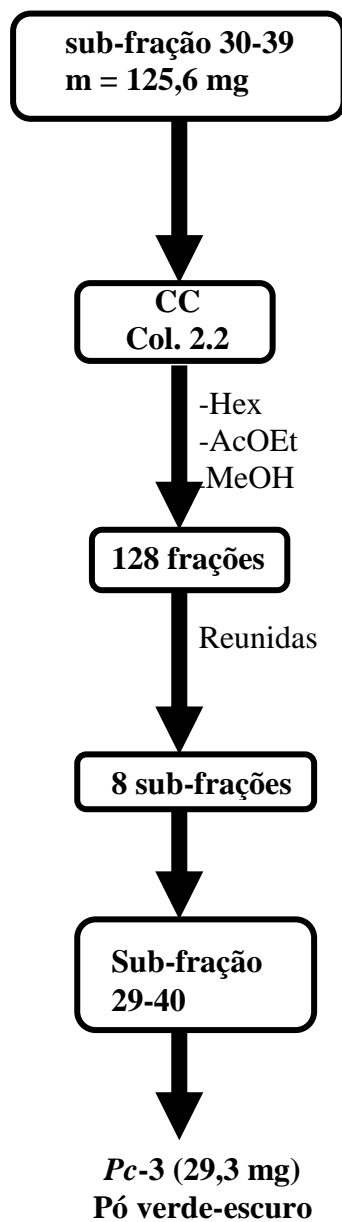
A sub-fração 30/39 (125,6 mg) obtida da coluna 2 foi submetida à cromatografia em coluna utilizando como adsorvente sílica flash (partículas com 0,04-0,063mm, 230-400 mesh) e como eluentes hexano, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade. Desta coluna foram coletadas 128 frações de 25 mL cada, concentradas em evaporador rotativo, analisados por CCDA e reunidas de acordo com seus Rf's, sendo obtidos 8 grupos de sub-frações (**Tabela 6**). A sub-fração 29-40 forneceu um pó verde-escuro (29,3 mg), mostrando-se pura quando analisada em CCDA em vários sistemas de solventes sendo, então codificados como **Pc-3** (**Esquema 5**).

Tabela 6: Purificação por fracionamento cromatográfico da sub-fração 30-39 proveniente da coluna 2 da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC., utilizando como sistema de eluição Hex/AcOEt e MeOH em diferentes proporções (Col. 2.2).

Fração	Eluente	Proporção	Reunidas
-	Hex	100	
1-10	Hex:AcOEt	98:2	1-17
11-46	Hex:AcOEt	96:4	18-20
47-55	Hex:AcOEt	94:6	21-28
56-63	Hex:AcOEt	92:8	29-40
64-70	Hex:AcOEt	90:10	41-60
71-75	Hex:AcOEt	88:12	61-80
76-78	Hex:AcOEt	85:15	81-100
79-81	Hex:AcOEt	8:2	101-128
82-84	Hex:AcOEt	75:25	
85-87	Hex:AcOEt	7:3	
88-90	Hex:AcOEt	65:35	
91-95	Hex:AcOEt	6:4	
96-99	Hex:AcOEt	55:45	
100-102	Hex:AcOEt	1:1	
103-105	Hex:AcOEt	4:6	
106-108	Hex:AcOEt	3:7	
109-112	Hex:AcOEt	2:8	
113-115	Hex:AcOEt	1:9	
116-118	AcOEt	100	
119-122	AcOEt:MeOH	9:1	
123-125	AcOEt:MeOH	8:2	
126-128	AcOEt:MeOH	7:3	

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Esquema 5: Purificação por fracionamento cromatográfico da sub-fração 30-39 proveniente da coluna 2 da fração Hexano-Diclorometano (25:75) do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC., utilizando como sistema de eluição Hex/AcoEt e MeOH em diferentes proporções (Col. 2.2).



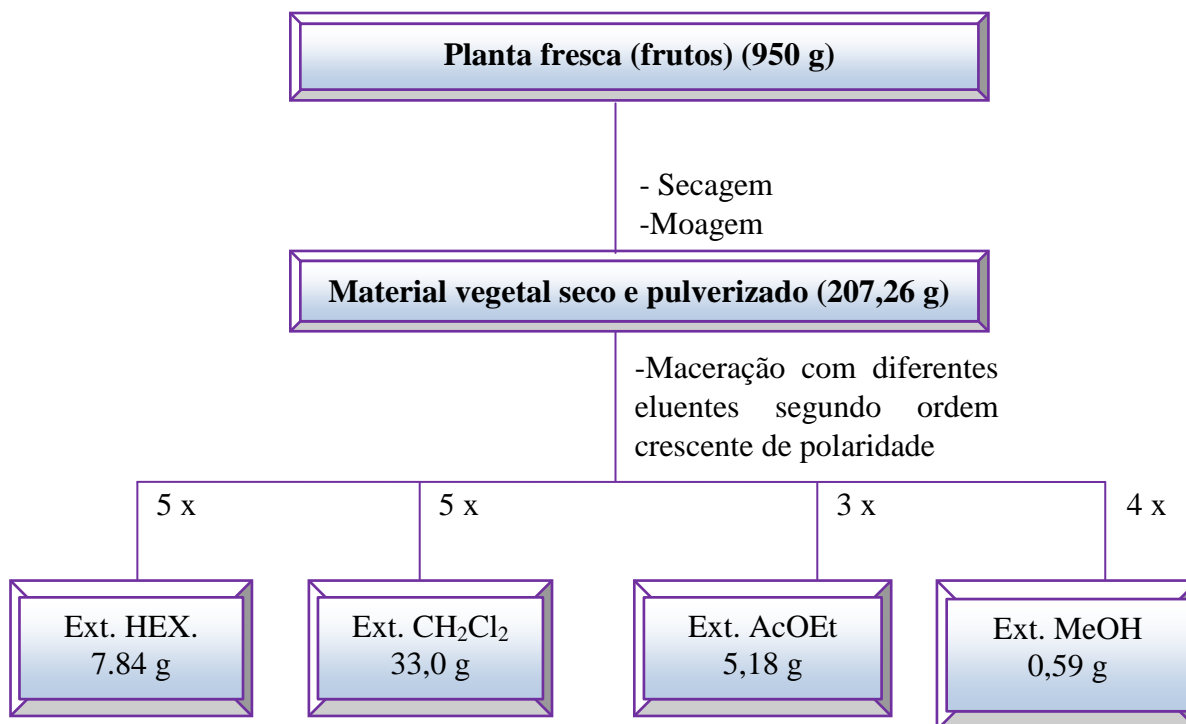
Fonte: Elaboração própria, 2013.

4.9 ESTUDO FITOQUÍMICO DOS FRUTOS DE *PIPER CALDENSE* C.DC.

4.9.1 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 207,26 g do pó dos frutos. 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 6**).

Esquema 6: Processo de extração do pó dos frutos de *Piper caldense* C.DC.



4.9.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC

Uma alíquota de 5,0 g do extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC. foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica-gel 60 (Merck) (partículas com 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh), eluída com Hexano, Acetato de Etila e Metanol, puros ou em misturas binárias, em diversas proporções, segundo ordem crescente de polaridade (coluna 3). Foram recolhidas 107 frações de 250 mL cada, dentre as quais as frações Fr 61, Fr 68, eluídas em Hex:AcOEt 80:20, e Fr 83, eluída em Hex:AcOEt 60:40, após concentração em evaporador rotativo, revelaram-se puras, com formação de precipitado amarelo, amorfo, tendo sido obtidas diretamente da coluna (**Tabela 7**).

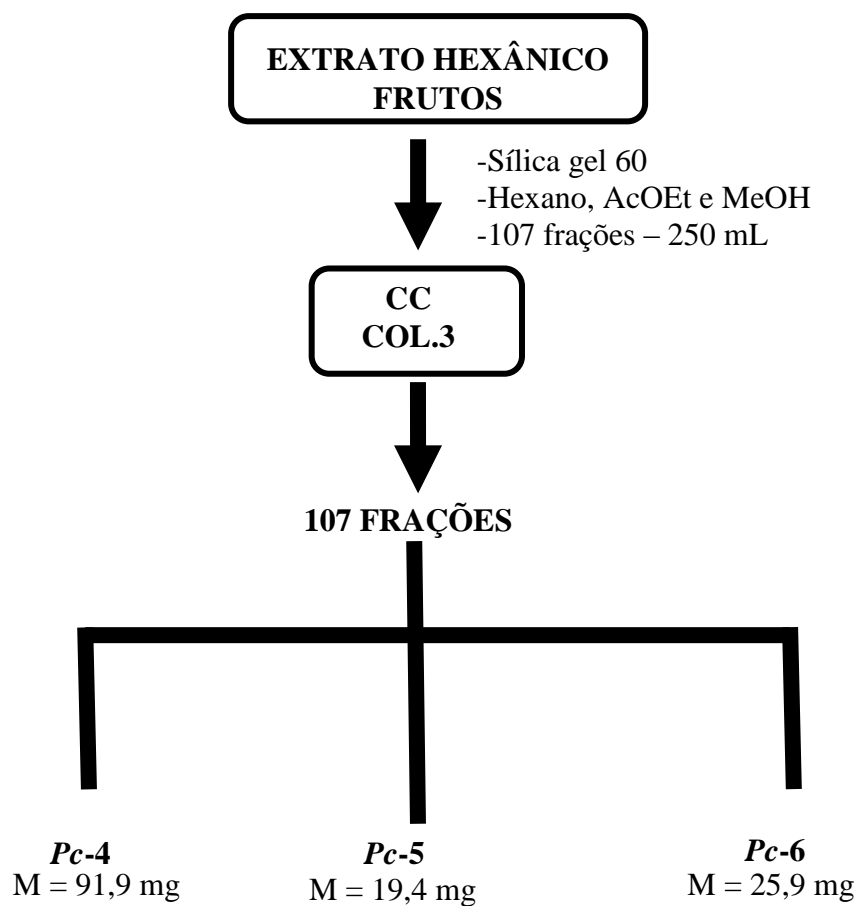
As sub-frações que apresentaram significativo grau de pureza quando analisadas em RMN¹H e RMN¹³C receberam os seguintes códigos: *Pc-4*, *Pc-5* e *Pc-6*, respectivamente (**Esquema 7**).

Tabela 7: Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC, utilizando como eluentes Hex/AcOEt e MeOH em diversas proporções (Col.7).

Fração	Eluente	Proporção
1-8	Hex	100
9-27	Hex:AcOEt	98:2
28-34	Hex:AcOEt	96:4
35-42	Hex:AcOEt	94:6
43-50	Hex:AcOEt	92:8
51-52	Hex:AcOEt	90:10
53-55	Hex:AcOEt	88:12
56-60	Hex:AcOEt	85:15
61-68	Hex:AcOEt	80:20
69-73	Hex:AcOEt	76:24
74-76	Hex:AcOEt	74:26
77-82	Hex:AcOEt	70:30
83-85	Hex:AcOEt	60:40
86-91	Hex:AcOEt	50:50
92-94	Hex:AcOEt	40:60
95-97	Hex:AcOEt	30:70
98-99	Hex:AcOEt	20:80
100-101	Hex:AcOEt	10:90
102-103	AcOEt	100
104-105	AcOEt:MeOH	90:10
106	AcOEt:MeOH	80:20
107	AcOEt:MeOH	70:30

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Esquema 7: Purificação por fracionamento cromatográfico do extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC., utilizando como eluentes Hex/AcoEt e MeOH em diversas proporções (Coluna.3).

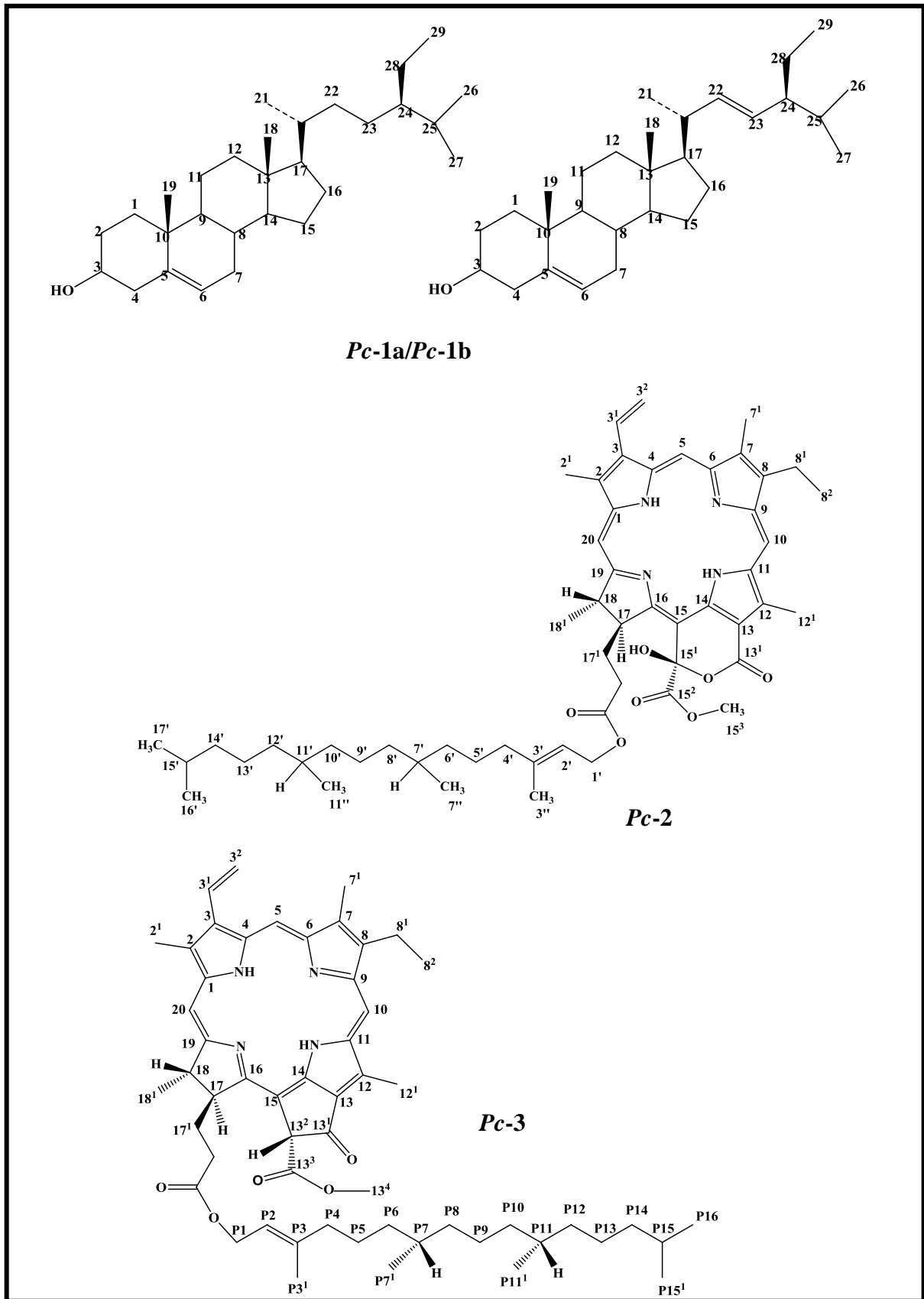


Fonte: Elaboração própria, 2013.

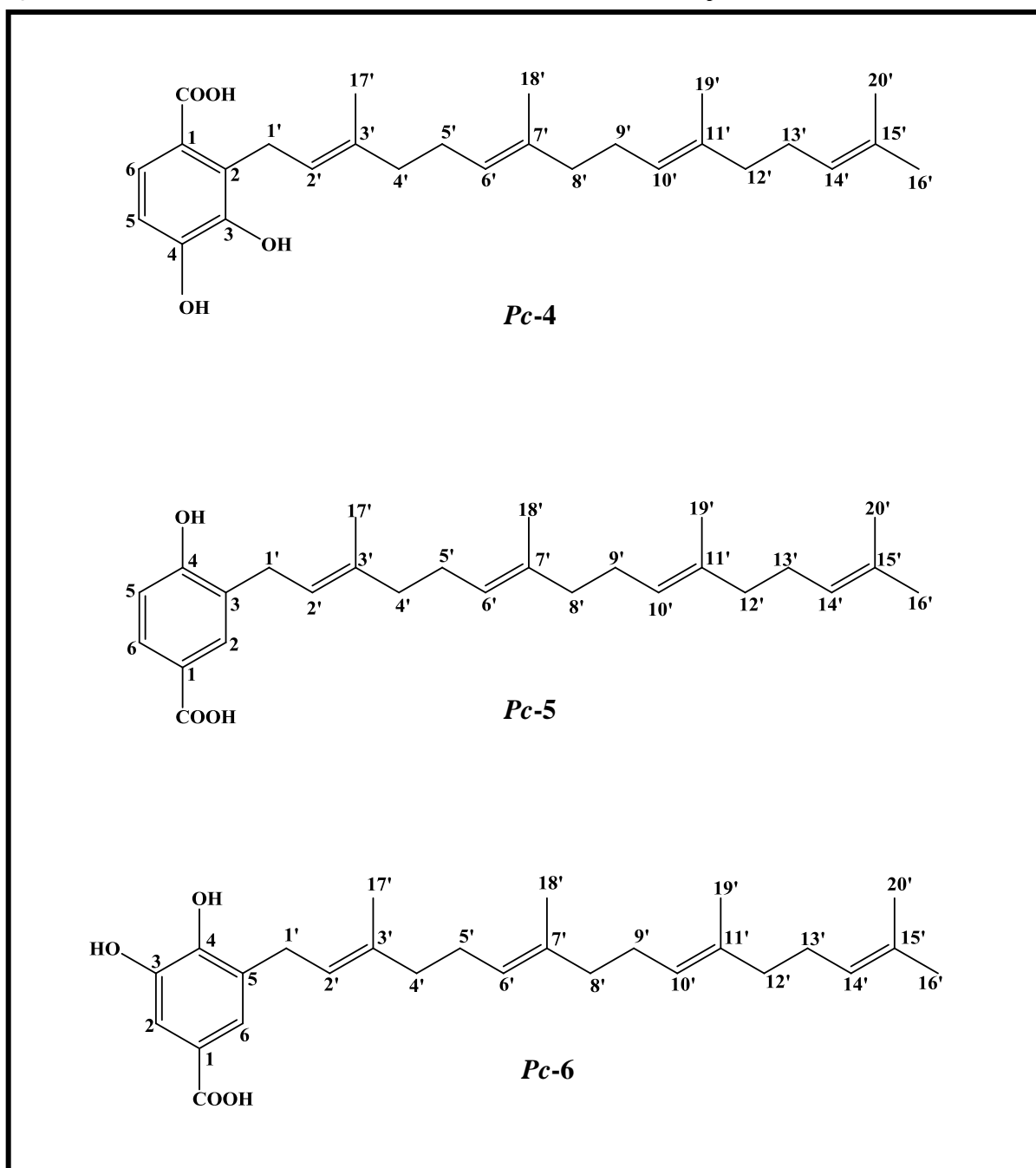
5 Resultados e Discussão

5.1 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS FOLHAS E FRUTOS DE *PIPER CALDENSE* C.DC.

O estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC. resultou no isolamento de uma mistura de esteroides (*Pc-1a/Pc-1b*) e duas substâncias porfirínicas (*Pc-2* e *Pc-3*) (**Quadro 4**). O extrato hexânico dos frutos da espécie botânica conduziu ao isolamento de três substâncias, codificadas como *Pc-4*, *Pc-5* e *Pc-6*, correspondentes a derivados de três ácidos hidróxi-benzoicos, bem como uma mistura de esteroides. A definição dos códigos dos compostos isolados foi determinada a partir das iniciais da espécie estudada, seguindo a ordem crescente de isolamento no decorrer dos experimentos (**Quadro 5**). Os compostos fornecidos, apesar de estarem presentes em várias espécies vegetais, estão sendo descritas pela primeira vez em *Piper caldense* C. DC., sendo *Pc-2* inédito na família Piperaceae e, *Pc-4*, isolado pela segunda vez no gênero *Piper* L.

Quadro 4: Substâncias isoladas do extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Quadro 5: Substâncias isoladas do extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

5.1.1 Caracterização estrutural de *Pc-1*

A substância codificada como *Pc-1* (**Figura 10**) apresentou-se, sob análise macroscópica, como cristais brancos e aculiformes, possuindo boa solubilidade em clorofórmio e rendimento de 59 mg, correspondendo a 0,021% em relação ao peso da planta seca e, 8,47% em relação ao extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC.

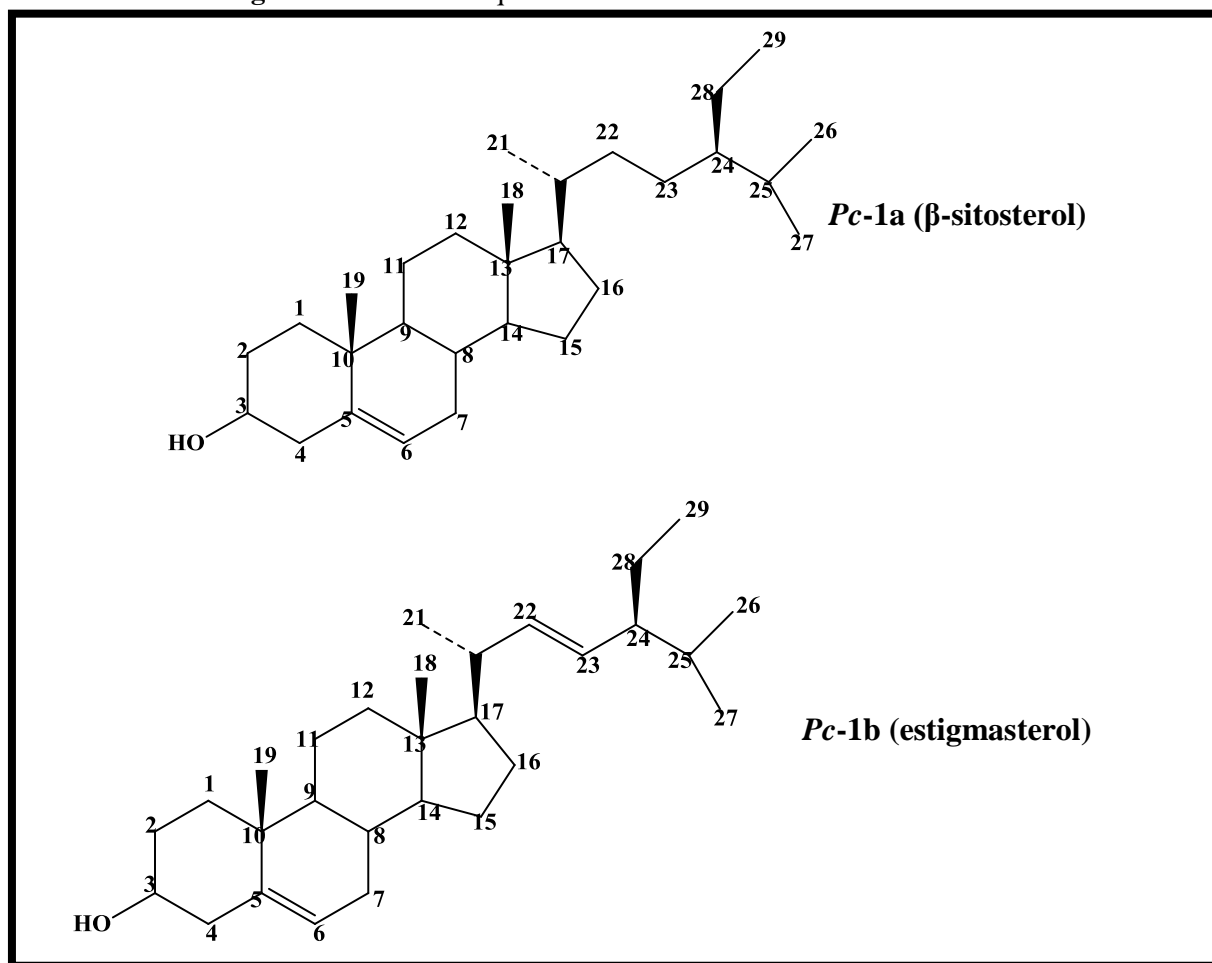
O espectro de RMN ^1H (500 MHz, **Figura 11**) de *Pc-1* e suas correspondentes expansões exibiram um envelope de absorções simples e múltiplas na região compreendida entre δ_{H} 0,65 e δ_{H} 2,50 ppm (**Figura 12**) características de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos de núcleo triterpênico e/ou esteroidal. Pela análise do multipletto 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 dupletto em δ_{H} 5,32 (d, $J = 4,0$ Hz) atribuído ao hidrogênio metínico na posição H-6 de fitoesteroide alílico (AHMED; AHMAD; MALIK, 1992). Esse próton 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, 1 H) e 5,00 (dd, $J = 8,5$ e $15,5$ Hz, 1 H), característicos de hidrogênios H-22 e H-23, respectivamente, de núcleo estigmastano, possibilitando sugerir a presença do sistema *trans* alílico em *Pc-1* (**Figura 13**).

No espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , **Figura 14**), realizado por meio da técnica APT, alguns sinais permitiram reforçar a hipótese sobre o esqueleto esteroidal da mistura dada pelo espectro de RMN ^1H , destacando-se a presença de 49 sinais, sendo 5 referentes a carbonos quaternários, 17 a carbonos metínicos, 16 a carbonos metilênicos e 11 a carbonos metílicos. Destes, ressalta-se a presença de um sinal em δ_{C} 71,8, típico de carbono C-3 hidroxilado (**Figura 15**), além de um envelope de sinais entre δ_{C} 11,80 e δ_{C} 21,10 (**Figura 16**), referentes às metilas triterpênicas (6 CH_3) na região de campo mais alto característicos de fitoesteroide (HAM *et al.*, 2010).

Os sinais para carbono sp^2 mono hidrogenado em δ_{C} 121,70 (C-6) e carbono insaturado não hidrogenado em δ_{C} 140,77 (C-5) do β -sitosterol e estigmasterol (**Figura 17**), juntamente com as absorções em δ_{C} 138,29 e δ_{C} 129,30, pertinentes aos carbonos olefínicos (C-22 e C-23) do estigmasterol (KOJIMA, 1990) fortaleceram a proposta de que *Pc-1* trata-se de uma mistura de esteroides, codificados como: *Pc-1a* (β -sitosterol) e *Pc-2b* (estigmasterol).

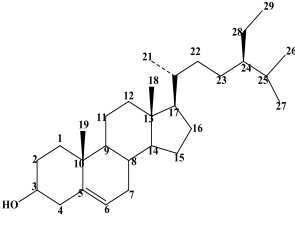
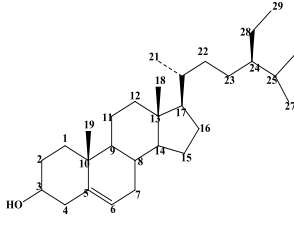
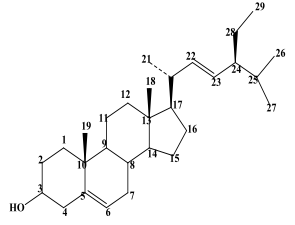
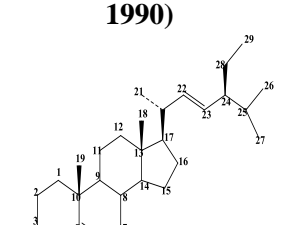
A análise espectral de RMN ^1H e ^{13}C de *Pc-1a/Pc-1b* e comparações realizadas com modelos da literatura *Mo-1* e *Mo-2* (KOJIMA, 1990) (**Tabela 8**) tornaram possível identificar as substâncias como sendo o β -sitosterol (*Pc-1a*) e o estigmasterol (*Pc-1b*) (**Figura 10**), cujas presenças são observadas em diversas espécies vegetais sendo descritas, porém, pela primeira vez em *Piper caldense* C.DC, tanto nas folhas como nos frutos.

Figura 10: Estruturas químicas das substâncias *Pc-1a* e *Pc-1b*.



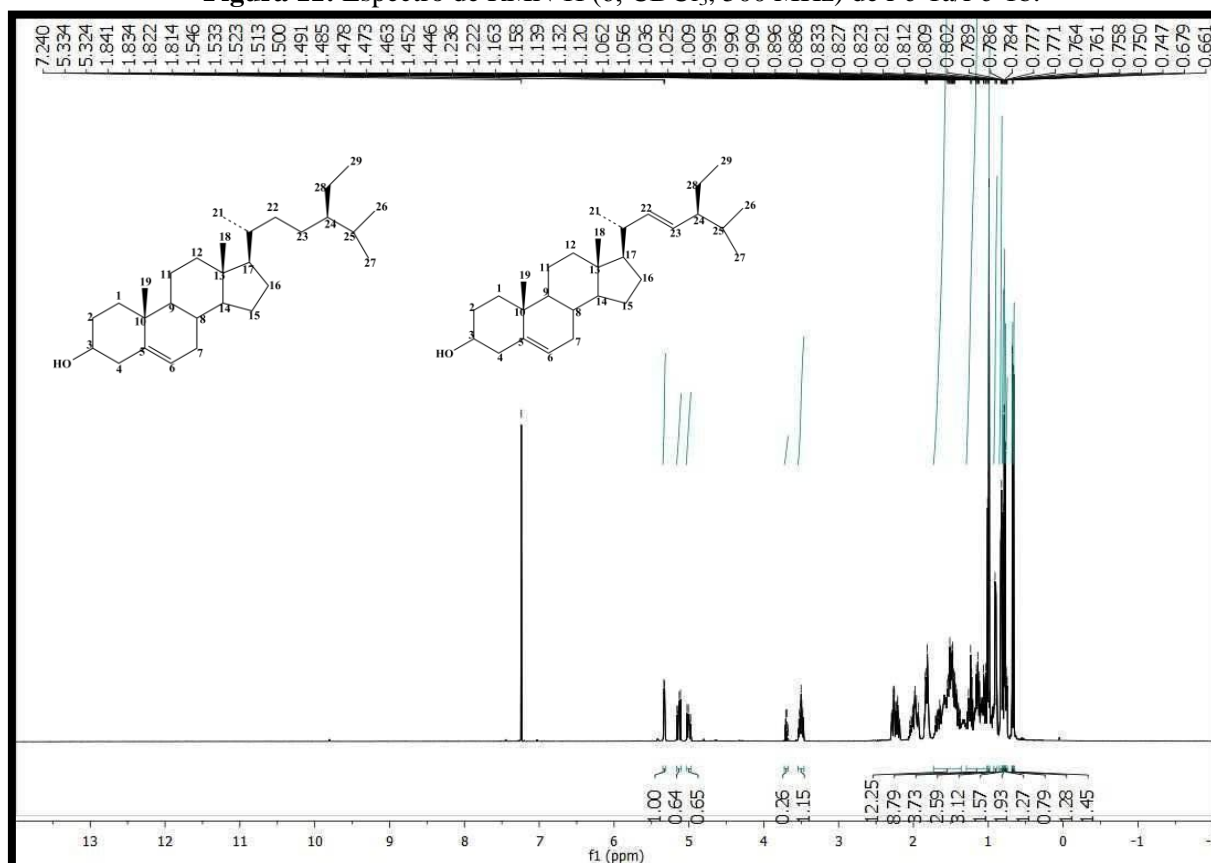
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 8: Comparação dos dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) de Pc-1a/Pc-1b com dados de RMN ^{13}C dos modelos da literatura Mo-1 e Mo-2 (δ , CDCl_3 , 25MHz). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.

PC-1a			Mo-1 (KOJIMA, 1990)			PC-1b			Mo-2 (KOJIMA, 1990)		
											
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}			
5	140,77	-	140,70	140,77	-	140,70		140,70			
10	36,53	-	36,50	36,19	-	36,50		36,50			
13	42,33	-	42,30	42,24	-	42,30		42,30			
CH											
3	71,82	3,50 (m)	71,80	71,82	3,50 (m)	71,80		71,80			
6	121,70	5,32 (d)	121,70	121,70	5,32 (d)	121,70		121,70			
8	31,88	-	31,90	31,88	-	31,90		31,90			
9	50,19	-	50,10	50,17	-	50,10		50,10			
14	56,79	-	56,80	56,89	-	56,80		56,80			
17	55,99	-	56,00	56,09	-	55,90		55,90			
20	36,15	-	36,10	40,47	-	40,50		40,50			
22	-	-	-	138,29	5,14 (dd, $J = 8,5$ e 15,5 Hz, 1 H)	138,30		138,30			
23	-	-	-	129,30	5,00 (dd, $J = 8,5$ e 15,5 Hz, 1 H)	129,20		129,20			
24	45,88	-	45,80	51,25	-	51,20		51,20			
25	29,20	-	29,10	35,89	-	-		-			
CH₂											
1	37,28	-	37,20	37,28	-	37,20		37,20			
2	31,69	-	31,60	31,69	-	31,60		31,60			
4	42,33	-	42,30	42,33	-	42,30		42,30			
7	31,91	-	31,90	31,93	-	31,90		31,90			
11	21,10	-	21,10	21,10	-	21,10		21,10			
12	39,80	-	39,80	39,70	-	39,70		39,70			
15	24,31	-	24,30	24,37	-	24,40		24,40			
16	28,25	-	28,20	28,90	-	28,40		28,40			
22	33,98	-	33,90	-	-	-		-			
23	26,14	-	26,00	-	-	-		-			
28	23,10	-	23,00	25,40	-	-		-			
CH₃											
18	11,87	-	11,90	11,99	-	12,00		12,00			
19	19,40	-	19,40	19,40	-	19,40		19,40			
21	18,99	-	18,80	21,22	-	21,20		21,20			
26	19,81	-	19,80	21,07	-	-		-			
27	19,05	-	19,00	18,79	-	-		-			
29	12,06	-	12,00	12,23	-	-		-			

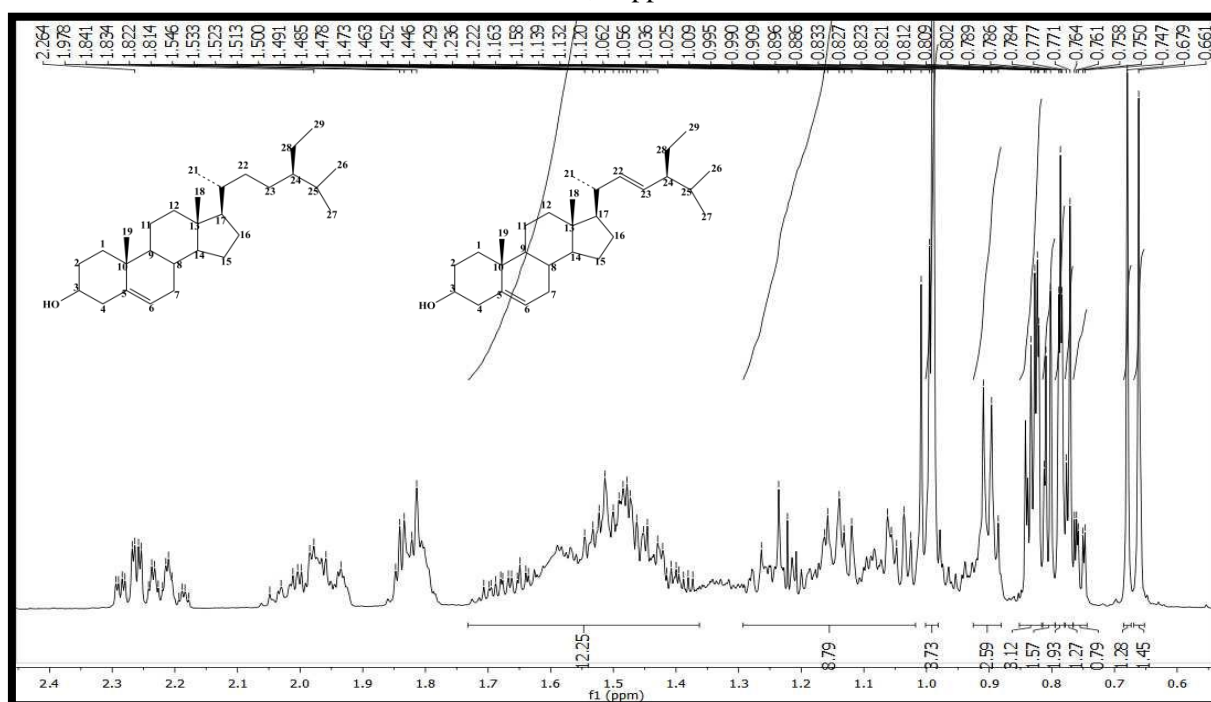
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 11: Espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-1a/Pc-1b*.



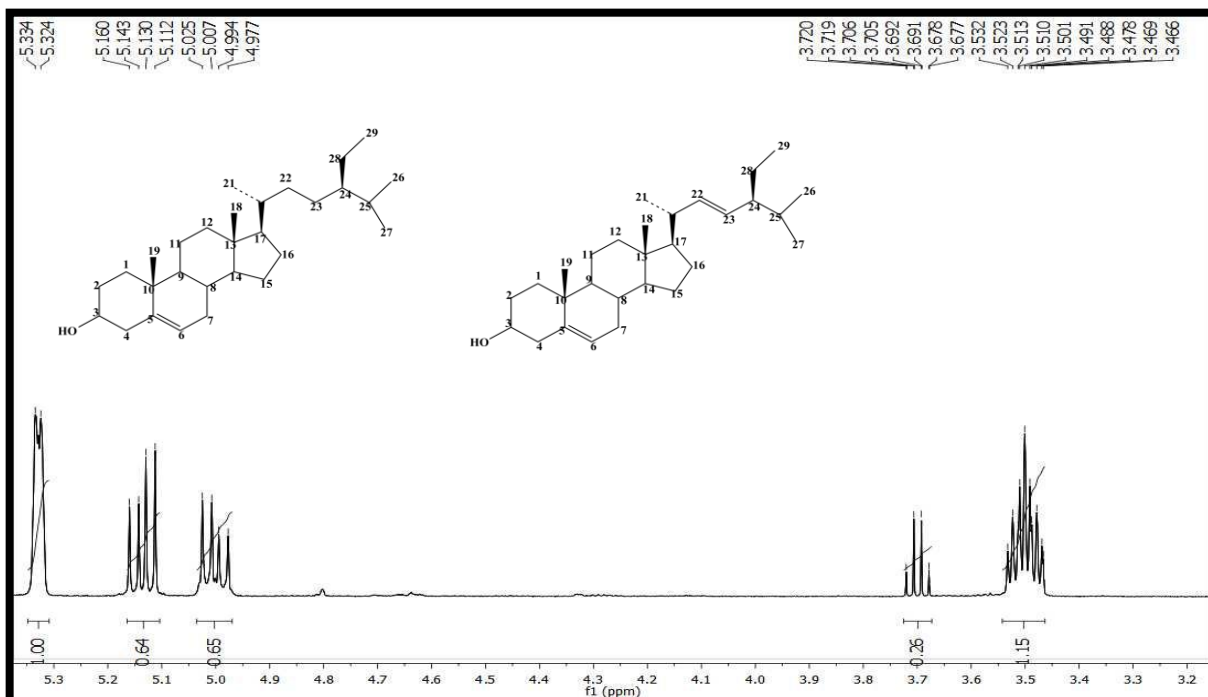
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 12: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-1a/Pc-1b* na região de 0,65 a 2,50 ppm.



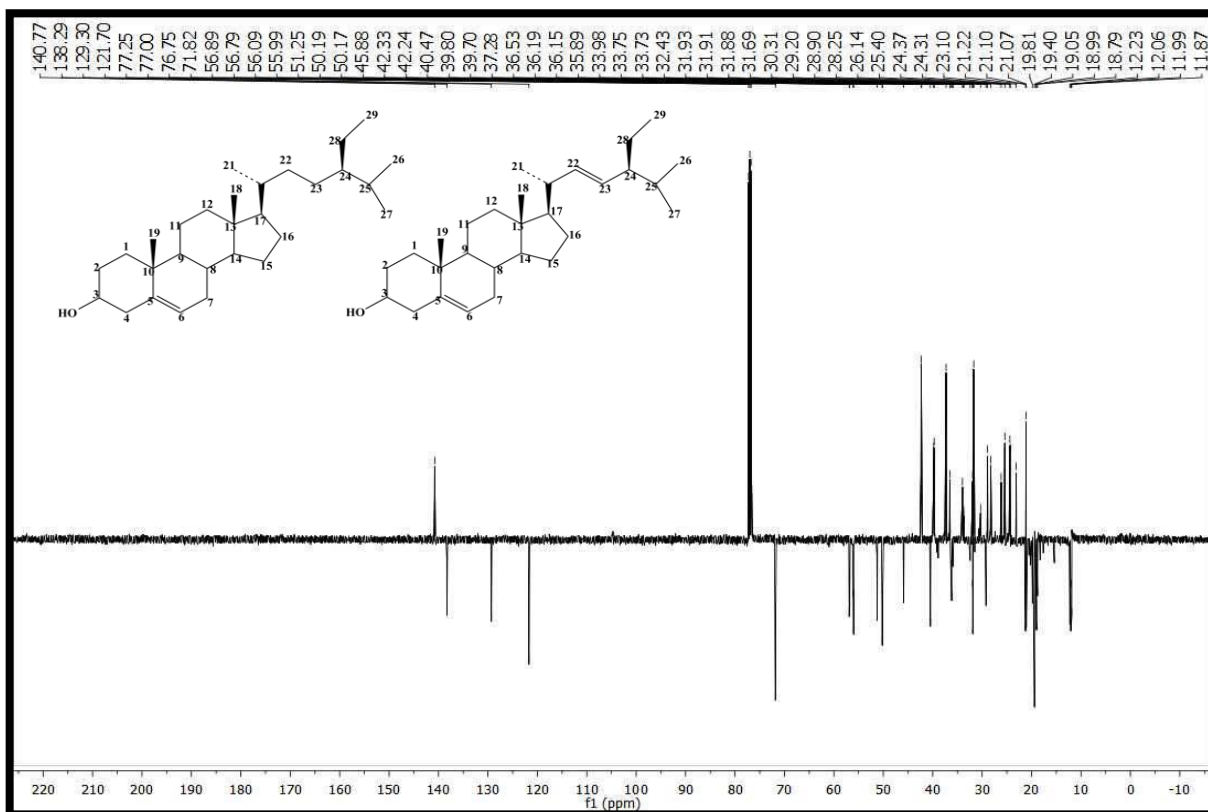
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 13: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-1a/Pc-1b* na região de 3,20 a 5,50 ppm.



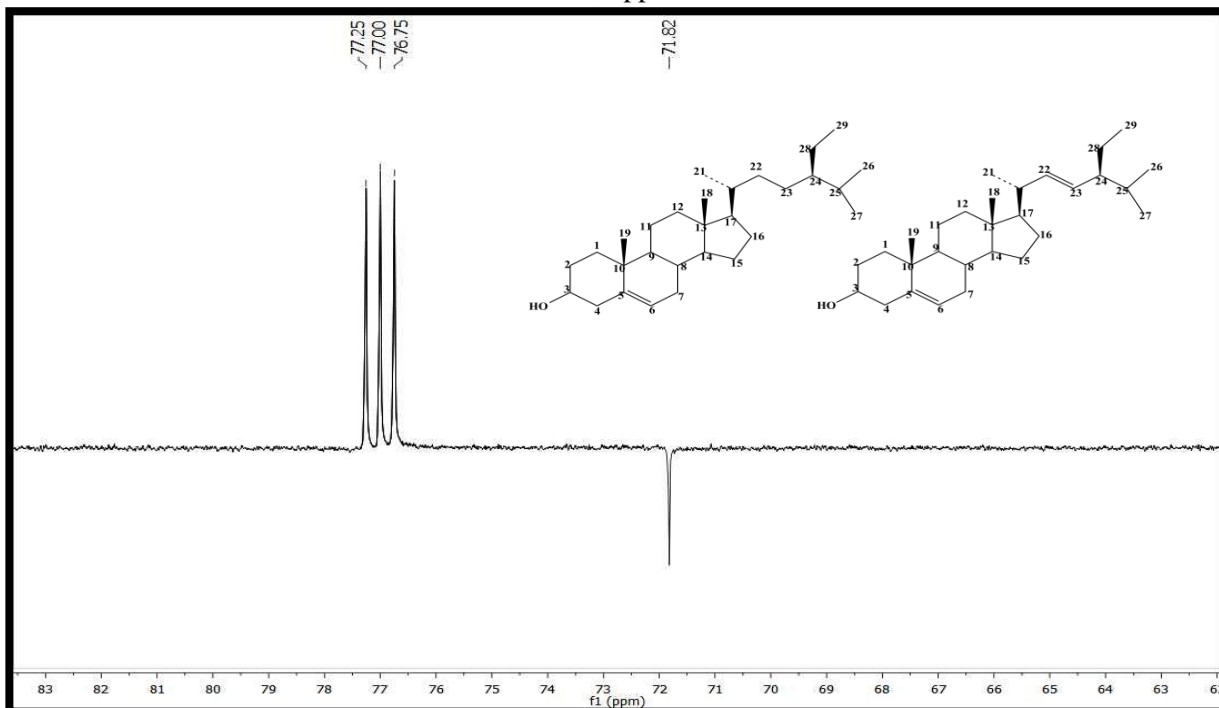
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 14: Espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 125 MHz) de *Pc-1a/Pc-1b*.



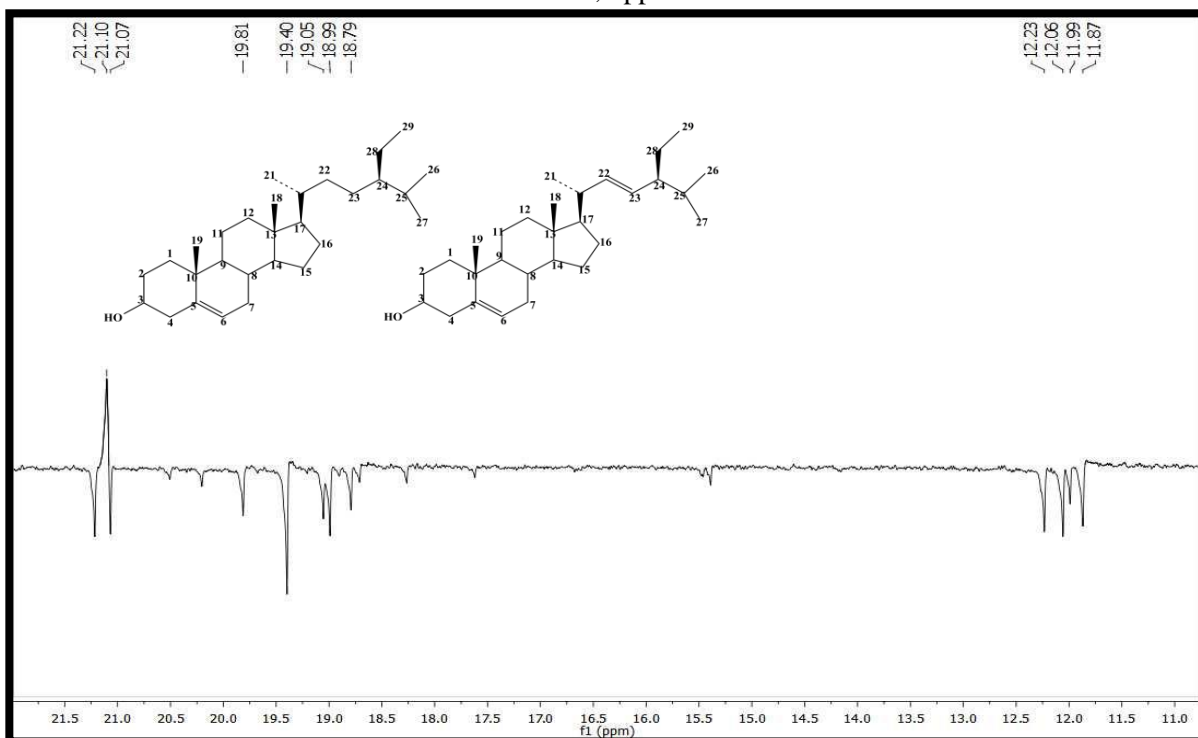
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 15: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ, CDCl₃, 125 MHz) de *Pc-1a/Pc-1b* na região de 62,0 a 83,0 ppm.



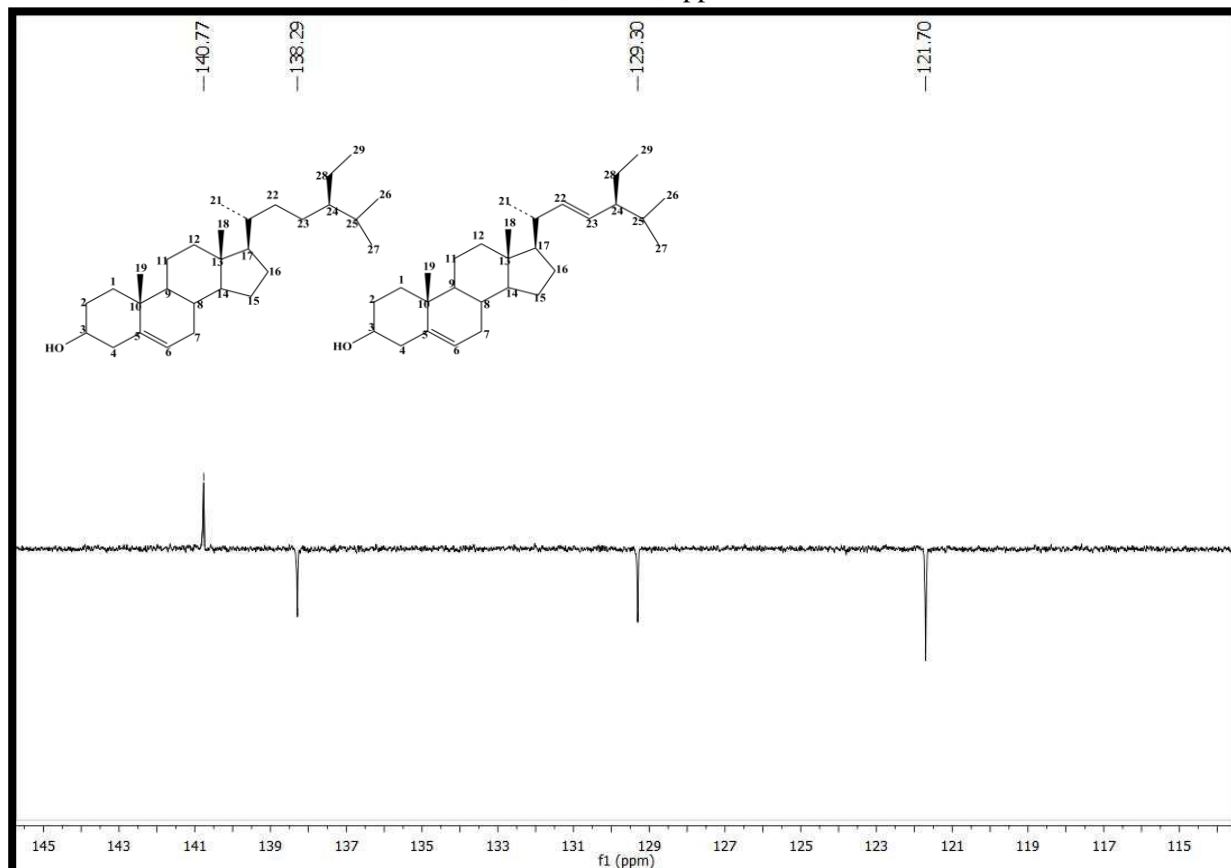
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 16: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ, CDCl₃, 125 MHz) de *Pc-1a/Pc-1b* na região de 11,0 a 21,5 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 17: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 125 MHz) de *Pc-1a/Pc-1b* na região de 115,0 a 145,0 ppm.



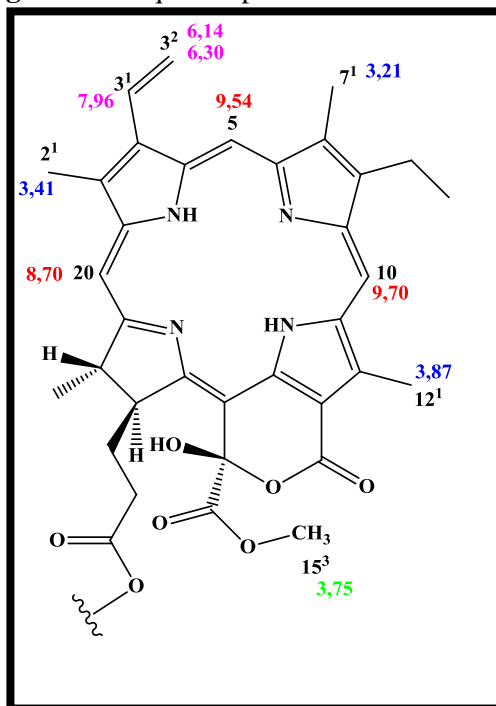
Fonte: Elaboração própria, 2013.

5.1.2 Caracterização estrutural de *Pc-2*

A substância codificada como *Pc-2* foi obtida na forma de um pó verde-escuro amorfo, com ponto de fusão entre 125-126 °C e com rendimento de 24 mg, ou seja, 0,009% em relação ao peso da planta seca e 0,048% em relação ao extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC., apresentando fluorescência na luz UV, indicativo da presença de cromóforo.

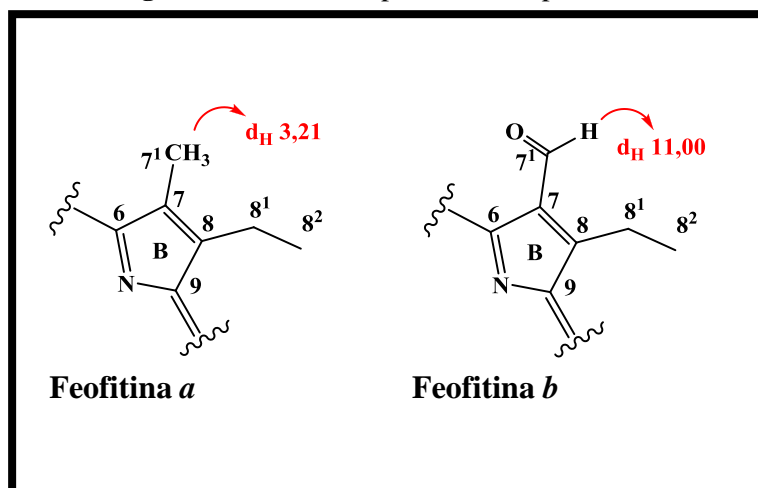
O espectro de IV (**Figura 23**) desta substância revelou uma banda de absorção em 3433 cm⁻¹ típico de deformação axial de N-H ou O-H, sugerindo a presença de amins e/ou hidroxilas. A análise também permitiu observar bandas características de estiramento de CH₃, CH₂ e CH alifático em 2924 cm⁻¹ e absorção 2866 cm⁻¹. Uma outra banda observada em 1377 cm⁻¹ reforçou a sugestão da presença de amins, por tratar-se de deformação axial de ligação C-N conjugada (PAVIA, *et al.*, 2010). Esta observação, aliada à presença de uma banda em 1604 cm⁻¹, condizente com a absorção de ligação dupla em sistemas conjugados está de acordo com estruturas contendo núcleo porfirínico (TOMAZ, *et al.*, 2008).

Também foi possível observar baseado nos dados de espectroscopia no IV de *Pc-2* a presença de bandas para carbonila de éster alifático em 1735 cm^{-1} e ausência de carbonila de cetona e aldeído em 1701 cm^{-1} e 1761 cm^{-1} , respectivamente. Ademais, verificou-se uma banda de absorção referente a C=O de éster conjugado em 1654 cm^{-1} , sugerindo a presença de uma estrutura do tipo δ -lactona conjugada ligada ao sistema de anéis porfirínicos. Todas essas absorções permitiram, dessa forma, levantar a hipótese de que *Pc-2* pode tratar-se de uma feofitina. O espectro de RMN¹H de *Pc-2* e suas expansões (**Figuras 24, 25, 26, 27 e 28**) apresentaram sinais distintivos de derivados porfirínicos: três singletos referentes aos hidrogênios olefínicos: H-10, H-5 e H-20, em 9,70, 9,48 e 8,70, respectivamente (**Figura 25**); outros três singletos em $\delta_{\text{H}} 3,87$ (H-12¹), $\delta_{\text{H}} 3,41$ (H-2¹) e $\delta_{\text{H}} 3,21$ (H-7¹) (**Figura 26**) correspondentes às metilas ligadas aos carbonos sp² C-12¹, C-2¹ e C-7¹, respectivamente (MATSUO, *et al.*, 1996; SILVA, *et al.*, 2006); um duplo-duplete acoplando trans em $\delta_{\text{H}} 7,96$ ($J = 11,5$ e $17,5$ Hz) com um duplete em $\delta_{\text{H}} 6,30$ ($J = 17,50$ Hz) e cis com outro duplete em $\delta_{\text{H}} 6,14$ ($J = 11,50$ Hz) (**Figura 27**) condizentes com os hidrogênios vinílicos do grupo vinila terminal inserido na posição 3 (H-3¹, H-3² (E) e H-3² (Z)). Pode-se ainda evidenciar a absorção em $\delta_{\text{H}} 3,75$ (s, 3H), atribuída aos hidrogênios de grupo metoxílico na posição C-15³ (**Figura 26 e Tabela 9**), além de sinais característicos de cadeia fitílica em C-17³ (**Figura 24 e 28**).

Figura 18: Esqueleto porfirínico das feofitinas

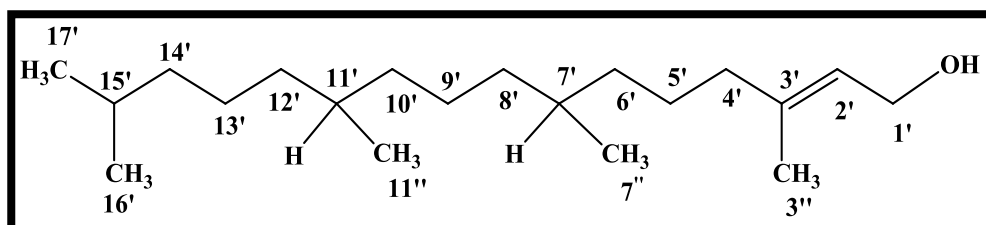
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Também foram evidenciados dois singletos largos em $\delta_{\text{H}} -1,44$ e $\delta_{\text{H}} -1,13$ (**Figura 24**), correspondentes a N-H pirrólico, protegidos pelo efeito da anisotropia do anel (PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN *et al.*, 2007). O surgimento desse pico no espectro indica a ausência do átomo de magnésio central, sugerindo que a substância corresponde a um derivado da clorofila (CHENG *et al.*, 2001; OCAMPO, 2004). A análise diferencial para classificar a substância como um derivado do tipo **a** foi baseada na presença de metila em C-7, visto em $\delta_{\text{H}} 3,21$ no espectro de RMN ^1H . A literatura relata que derivados da clorofila **b** possuem um grupo aldeído nesta posição com o H-7¹ absorvendo em $\delta_{\text{H}} 11,0$ (**Figura 19**).

Figura 19: Derivados porfíricos tipo **a** e **b**

Fonte: Elaboração própria, 2013.

A feição do espectro de hidrogênio ainda mostrou um envelope de sinais em 0,76 – 2,83 (**Figura 28**, pág. 132), referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, correspondendo à existência do grupo fitil éster ($-C_{20}H_{39}$) (**Figura 20** e **Tabela 9**) que nas feofitinas ocorre como substituinte ligado ao carbono 17^3 do anel IV da estrutura.

Figura 20: Cadeia fitílica.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

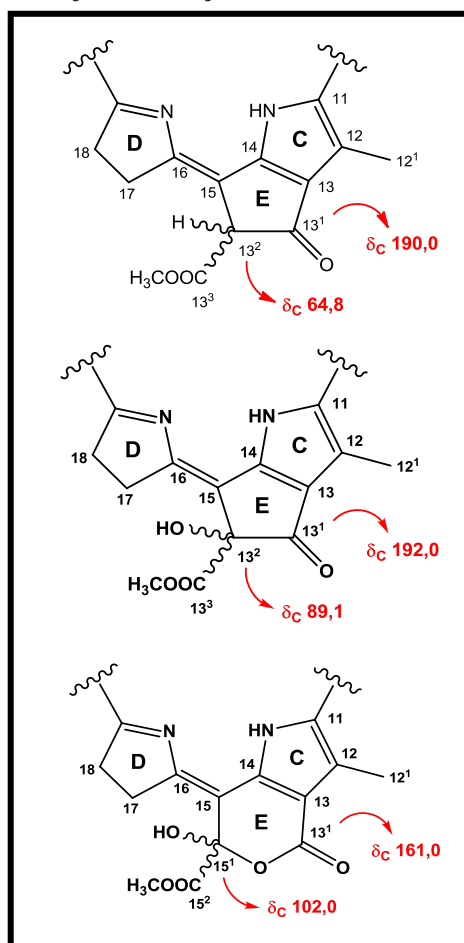
A análise espectral de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃, (**Figura 29**), realizado por meio da técnica APT evidenciou picos para 55 átomos de carbono, sendo 20 não hidrogenados, 10 metínicos, 14 metilênicos e 11 metílicos, ressaltando a presença adicional de um carbono não hidrogenado na posição C-15¹. Sinais característicos dos núcleos das feofitinas estão presentes: as absorções em δ_C 122,68 e δ_H 128,92 para carbonos metilênico e metínico das posições C-3² e C-3¹ (**Figura 31**), respectivamente; δ_C 54,09 (**Figura 32**), referente à metoxila de éster C-15³ e δ_C 11,20 (**Figura 33**) do carbono C-7¹ (metílico) (NOGUEIRA, 2009; SILVA *et al.*, 2006). Porém, a possibilidade de *Pc-2* ser uma feofitina **a** com anel ciclopentanoico foi descartada devido à ausência de carbono hidrogenado na posição C-13², apesar de a maioria dos demais sinais característicos de tal derivado porfírico estar presente. Sua diferença básica em relação à feofitina do tipo **a** consiste no anel E do tipo lactônico que, segundo a

literatura, trata-se de um produto de alomerização daqueles compostos que possuem sistema de anel E do tipo ciclopentanona, como é o caso das feofitinas **a** (OCAMPO; REPETA, 2004; HUANG *et al.*, 2007).

De acordo com Kobayashi *et al* (1991), a alomerização é a auto oxidação da clorofila **a**, quando a carbonila cetônica é convertida em carbonila de éster e o sinal da mesma é deslocado para frequências menores, aproximadamente δ_C 161,0, e o carbono C-15¹, denominado C-13² (antes da alomerização), apresenta-se hidroxilado com deslocamento em torno de δ_C 102,0 (**Figura 31**). Nesse caso, ocorre uma variação do sinal para carbono C-15¹, antes denominado C-13², conforme o tipo de substituinte a ele ligado, sendo aproximadamente δ_C 89,1 quando se trata de um carbono não hydrogenado e hidroxilado ou δ_C 64,8 quando o mesmo é um carbono metínico não hidroxilado em estruturas com anel E do tipo ciclopentanona (KOBAYASHI *et al.*, 1991; MATSUO *et al.*, 1996).

A alomerização pode ocorrer por via enzimática ou química, tendo como principais produtos a 13²-hidroxi-clorofila **a**, 13²-metoxi-clorofila **a** e a 15¹-metoxi-lactona-clorofila **a** (HYVÄRINEN; HINNYNEN, 1999; FENNEMA, 2000; MINGUÉZ-MOSQUERA; GANDUL-ROJAS, 2004).

Portanto, a ausência de sinais em aproximadamente de δ_C 190,0 e 89,1 ou 64,8, bem como, a presença de sinais em δ_C 161,0 para carbonila conjugada e δ_C 102,0 para carbono não hydrogenado (**Figura 21** e **30**) aliado à ausência de absorção para carbonila cetônica entre 1725-1705 cm⁻¹ no IV permitiram sugerir uma estrutura do tipo δ -lactona conjugada para o anel E de *Pc-2*.

Figura 21: Diferença de absorção entre os anéis cetônico e lactônico.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

No espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) (**Figura 35**) foram observadas inicialmente as correlações dos sinais em δ_{H} 9,70 (H-10)/ δ_{C} 104,5 (C-10), δ_{H} 9,48 (H-5)/ δ_{C} 99,57 (C-5) e δ_{H} 8,70 (H-20)/ δ_{C} 93,00 (C-20) (**Figura 36**), estando, dessa forma, de acordo com as atribuições feitas aos prótons e aos carbonos olefínicos do anel porfirínico da substância em análise. Ademais, destacam-se as correlações para os deslocamentos em δ_{H} 7,96 (H-3¹)/ δ_{C} 128,92 (C-3¹) e em δ_{H} 6,30/6,14 (H-3²_(trans)/H-3²_(cis))/ δ_{C} 122,68 (C-3²), correspondentes ao grupo vinila terminal da molécula (**Figura 36**). Correlações para metilas alílicas também estão presentes em δ_{H} 3,87 (H-12¹)/ δ_{C} 12,39 (C-12¹), 3,21 (H-7¹)/ 11,20 (C-7¹) e 3,41 (H-2¹)/ 12,05 (C-2¹) (**Figuras 38 e 39**), bem como para a metila da posição 15³ em δ_{H} 3,75 (OMe-15³) e δ_{C} 54,09 (C-15³).

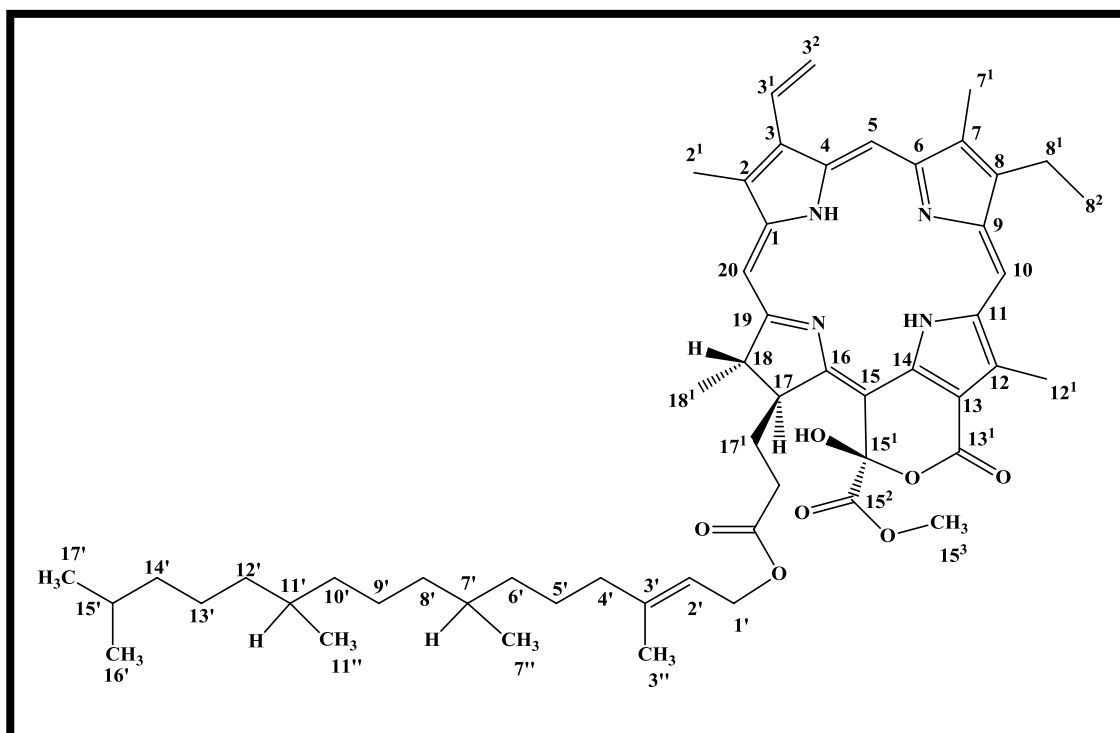
A atribuição dos demais carbonos da estrutura porfirínica foi realizada por análise das correlações a duas (²J) e três ligações (³J), apresentadas nos espectros de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) (**Figuras 40 e 41**) para os hidrogênios H-5, H-10 e H-20 que mostraram a conectividade entre os quatro anéis pirrólicos. O sinal de

H-5 (δ_H 9,48) mostrou correlação a 3J com C-3 (δ_C 136,33) e a 2J com o C-4 (δ_C 136,01), ambos do anel A. O H-10 (δ_H 9,70) fez correlação a 3J com C-8 (δ_C 145,43) do anel B e a 2J com C-11 (δ_C 139,05) e com C-12 (δ_C 131,41) do anel C. Do mesmo modo, o H-20 (δ_H 8,70) mostrou correlação a 2J e 3J com C-1 (δ_C 141,25) e C-2 (δ_C 131,52), ambos do anel A (**Figura 41**).

O espectro de HMBC e suas expansões também apresentaram dados que confirmaram a localização do grupo vinila terminal em C-3 ao mostrar correlação a 3J entre os hidrogênios terminais H-3² (δ_H 6,30 e 6,14) e o carbono C-3 (δ_C 136,36) (**Figura 41**), bem como, do radical etila em C-8 pela correlação entre os hidrogênios H-8¹ (δ_H 3,70) e H-8² (δ_H 1,67) com C-8 (δ_C 145,43) (**Figura 42**). Uma correlação a 3J dos hidrogênios da metoxila H-15³ em δ_H 3,75 com o sinal para a carbonila C-15² em δ_C 170,85 definiu a posição do metil-éster (**Figura 42**).

O espectro de massas ESI-MS (**Figura 43'**, pág: 118) de *Pc-2* mostrou um pico de íon molecular de $[M + H]^+$: m/z 903.6, condizente com a proposta estrutural feita para a substância analisada, cuja fórmula molecular é C₅₅H₇₄N₄O₇ (903 u.m.a).

Assim, após a análise espectral de IV e RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais de *Pc-2*, combinada com os dados da literatura foi possível identificar *Pc-2* como sendo feofitina, (15¹-hidroxí -porfirinolactona *a*) (**Figura 22**). Entretanto existem pouquíssimos relatos na literatura de derivados porfirínicos com anel E do tipo δ -lactona conjugados, acentuando a importância do isolamento de *Pc-2*, que é inédita na família Piperaceae, tendo sido encontrados registros que evidenciaram também a presença dessa estrutura com OH em C-15¹ em algumas espécies botânicas, como nas folhas do bambu *Phyllostachys pubescens* (Poaceae) (NATIONAL, 2004), bem como registros da mesma em trabalhos produzidos neste programa de pós-graduação como *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae) (NUNES *et al.*, 2008), *Anisacanthus brasiliensis* Lindau (Acanthaceae) (DIAS *et al.*, 2007), *Richardia brasilienses* Gomes (SOUSA, 2010) e, mais recentemente, da alga marinha *Sargassum vulgare* var. *nanum* (Sargassaceae) (MONTES, 2012) e das partes aéreas da *Thyrsacanthus ramosissimus* Moric.(BARBOSA-FILHO *et al.*, 2012). A estrutura com OCH₃ em C-15¹ foi descrita uma única vez nas folhas de *Ficus microcarpa* (LIN, H. Y *et al.*, 2011).

Figura 22: Estrutura química de *Pc-2*.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 9: Comparação dos dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de *Pc-2* registrados em CDCl_3 com dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do modelo da literatura - *Mo-3* (hidroxiporfirinolactona) (MONTES, R. C., 2012) em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.

Posição	<i>Pc-2</i> (HMQC)		Hidroxiporfirinolactona (<i>Mo-3</i>)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	141,25	-	142,80
2	-	131,52	-	131,60
2 ¹	3,41 (s, 3H)	12,05	3,42 (s, 3H)	12,10
3	-	136,36	-	136,10
3 ¹	7,96 (dd, $J=11,5$ e $17,5$ Hz, 1H)	128,92	7,99 (dd, $J=10,0$ e $20,0$ Hz, 1H)	128,90
3 ²	6,30 (dl, $J=17,5$ Hz, 1H) 6,14 (dl, $J=11,5$ Hz, 1H)	122,68	6,32 (d, $J=20,0$ Hz, 1H) 6,16 (d, $J=20,0$ Hz, 1H)	123,20
4	-	136,01	-	136,00
5	9,48 (s, 1H)	99,57	9,52 (s, 1H)	99,60
6	-	155,50	-	155,70
7	-	136,01	-	136,50
7 ¹	3,21 (s, 3H)	11,20	3,25 (s, 3H)	11,30
8	-	145,43	-	145,60
8 ¹	3,70 (m, 2H)	19,49	3,73 (q, $J=5,0$ e $15,0$ Hz, 2H)	19,60
8 ²	1,67 (t, $J=7,0$ Hz, 3H)	17,48	1,70 (t, $J=7,5$ Hz, 3H)	17,50
9	-	150,00	-	150,00
10	9,70 (s, 1H)	104,05	9,74 (s, 1H)	104,10
11	-	139,05	-	138,70
12	-	131,41	-	131,40
12 ¹	3,87 (s, 3H)	12,39	3,88 (s, 3H)	12,50
13	-	112,00	-	111,40
13 ¹	-	161,00	-	160,80
14	-	145,43	-	145,60
15	-	134,86	-	134,80
15 ¹	-	102,00	-	102,00
15 ²	-	170,85	-	170,90
15 ³	3,75 (s, 3H)	54,09	3,74 (s, 3H)	54,20
16	-	166,46	-	166,30
17	4,10 (dl, 1H)	53,76	4,07 (d, $J=10,0$ Hz, 1H)	53,80
17 ¹	2,20 (m); 2,52 (m)	32,17	1,87 (m, 1H) e 2,56 (m, 1H)	32,20
17 ²	2,33 (m); e 2,57 (m)	31,36	2,17 (m, 1H) e 2,43 (m, 1H)	31,40
17 ³	-	173,29	-	173,20

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 9 (Continuação): Comparação dos dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de *Pc-2* registrados em CDCl_3 com dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do modelo da literatura - *Mo-3* (hidroxiporfirinolactona) (MONTES, R. C., 2012) em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.

Posição	<i>Pc-2</i> (HMQC)		Hidroxiporfirinolactona (<i>Mo-3</i>)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
18	4,44 (m, 1H)	50,18	4,44 (m)	50,20
18¹	1,60 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)	22,24	1,58 (d, $J = 5,0$ Hz, 3H)	22,20
19	-	171,20	-	171,1
20	8,70 (s, 1H)	93,00	8,70 (s, 1H)	93,80
1^o	4,44 (m)	61,46	4,44 (m, 2H)	61,40
2^o	5,13 (tl, 1H)	117,79	5,13 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H)	117,60
3^o	-	142,77	-	142,80
3^o	1,57 (s, 3H)	16,27	1,56 (sl, 3H)	16,30
4^o	-	39,79	1,87 (m, 2H)	39,80
5^o	-	24,99	1,29 (m, 2H)	25,00
6^o	-	37,25	0,97 (m, 2H)	36,60
7^o	-	32,75	1,29 (m, 1H)	32,80
7^o	0,77 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	19,70	0,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	19,60
8^o	-	36,62	1,24 (m, 2H)	37,40
9^o	-	24,40	1,24 (m, 2H)	24,40
10^o	-	37,38	0,97 (m, 2H)	37,30
11^o	-	32,59	1,24 (m, 1H)	32,60
11^o	0,79 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)	19,63	0,79 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	19,70
12^o	-	37,30	0,97 (m, 2H)	37,30
13^o	-	24,75	1,65 (m, 2H)	24,80
14^o	-	39,34	1,10 (m, 2H)	39,40
15^o	-	27,94	1,52 (m, 1H)	27,90
16^o	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H)	22,69	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	22,70
17^o	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H)	22,59	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	22,60
21-NH	-1,12 (sl, 1H)	-	-1,11 (sl, 1H)	-
23-NH	-1,44 (sl, 1H)	-	-1,42 (sl, 1H)	-

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 10: Dados espectrais de HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de *Pc-2*.

Posição	<i>Pc-2</i>	HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$	
		δ_{H}	2J 3J
1		-	
2		-	
2 ¹		3,41 (s, 3H)	C-2 C-3, C-1
3		-	
3 ¹		7,96 (dd, $J = 11,5$ e $17,5$ Hz, 1H)	C-3 ² C-4, C-2
3 ²		6,30 (dl, $J = 17,5$ Hz, 1H)	C-3 ¹ C-3
		6,14 (dl, $J = 11,5$ Hz, 1H)	
4		-	
5		9,48 (s, 1H)	C-4 C-3, C-7
6		-	
7		-	
7 ¹		3,21 (s, 3H)	C-7 C-6, C-8
8		-	
8 ¹		3,70 (m, 2H)	C-8 C-7, C-9
8 ²		1,67 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H)	C-8
9		-	
10		9,70 (s, 1H)	C-11 C-12, C-8
11		-	
12		-	
12 ¹		3,87 (s, 3H)	C-12 C-13, C-11
13		-	
13 ¹		-	
14		-	
15		-	
15 ¹		-	
15 ²		-	
15 ³		3,75 (s, 3H)	C-15 ²
15 ⁴		3,46 (s, 3H)	
16		-	
17		4,10 (dl, 1H)	C-17 ¹ Me-18 ¹ , C-17 ²
17 ¹		2,20 (m); 2,52 (m)	C-17 ³
17 ²		2,33 (m); e 2,57 (m)	
17 ³		-	
18		4,44 (m, 1H)	C-18 ¹ C-17 ¹ , C-16
18 ¹		1,60 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H)	C-18 C-17, C-19
19		-	
20		8,70 (s, 1H)	C-1 C-2
1'		4,47 (m)	C-2' C-17 ³ , C-3'
2'		5,15 (tl, 1H)	C-4' C-3''
3'		-	
3''		1,57 (s, 3H)	C-3' C-2', C-4'

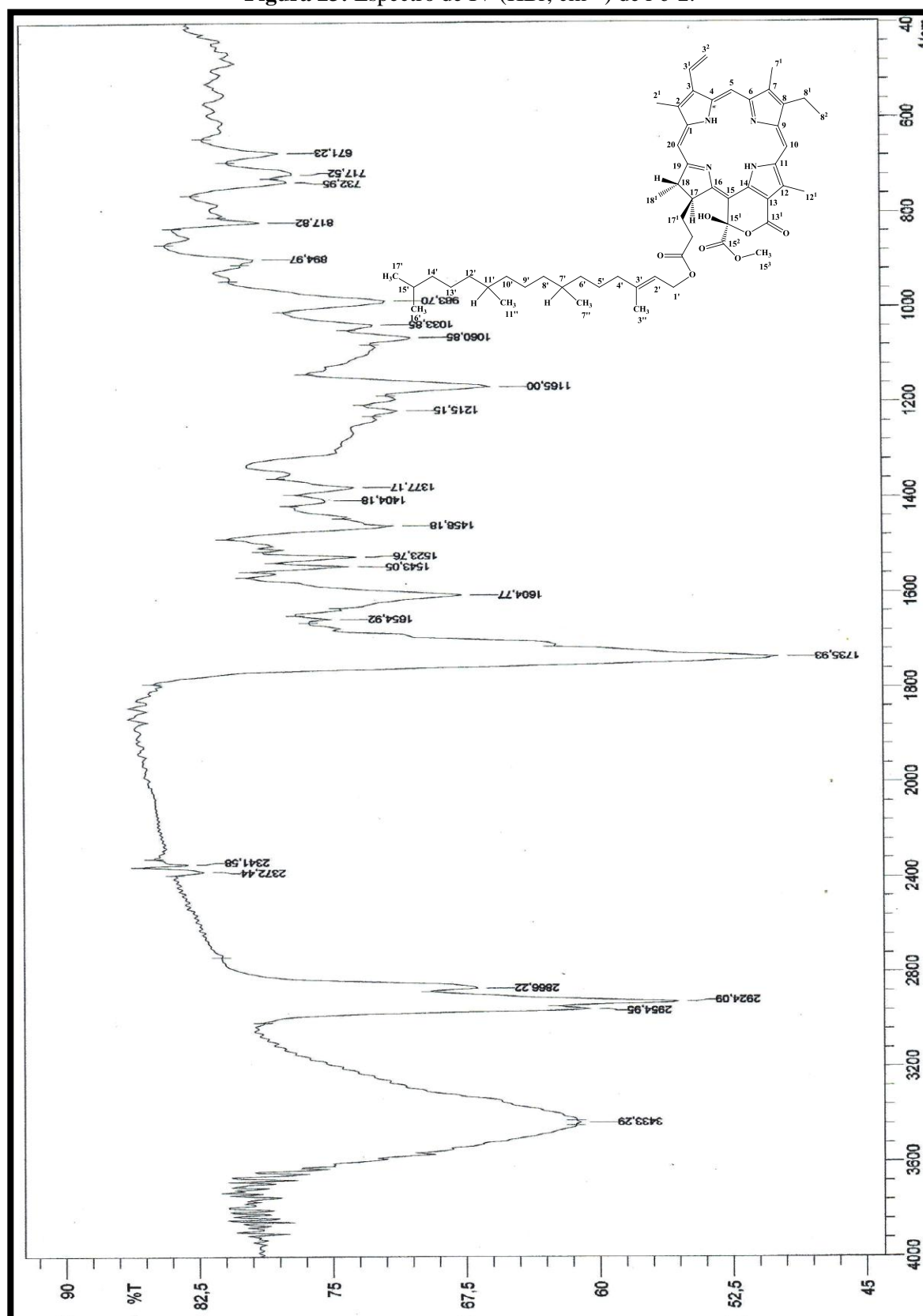
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 10 (Continuação): Dados espectrais de HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de *Pc-2*.

Posição	<i>Pc-2</i>	HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$	
		δ_{H}	2J 3J
4'		-	
5'		-	
6'		-	
7'		-	
7''	0,77 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)		
8'		-	
9'		-	
10'		-	
11'		-	
11''	0,79 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)		
12'		-	
13'		-	
14'		-	
15'		-	
16'	0,84 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H)		C-15' C-14'
17'	0,84 (d, $J = 6,5$, 6H)		C-15' C-14', C-16'
15 ¹ -OH	0,84 (d, $J = 6,5$, 6H)		
21-NH	-1,12 (sl, 1H)		
23-NH	-1,44 (sl, 1H)		

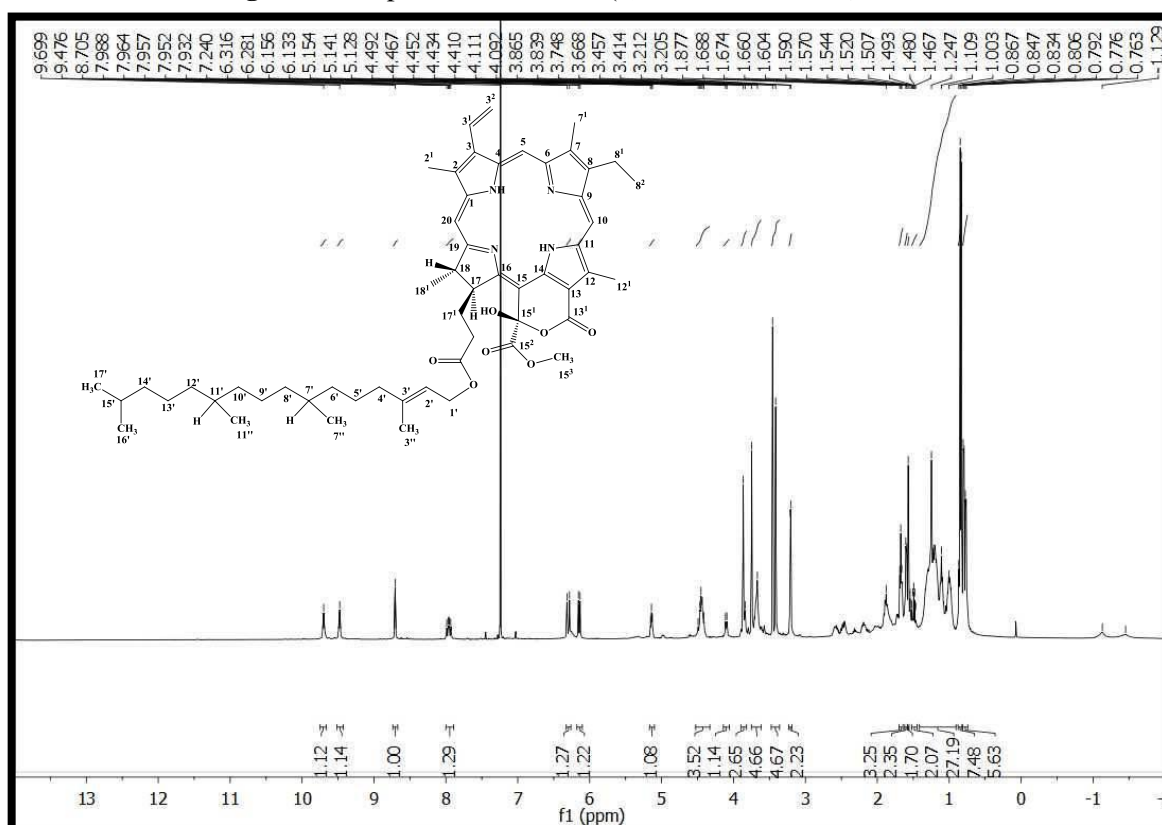
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 23: Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de *Pc-2*.



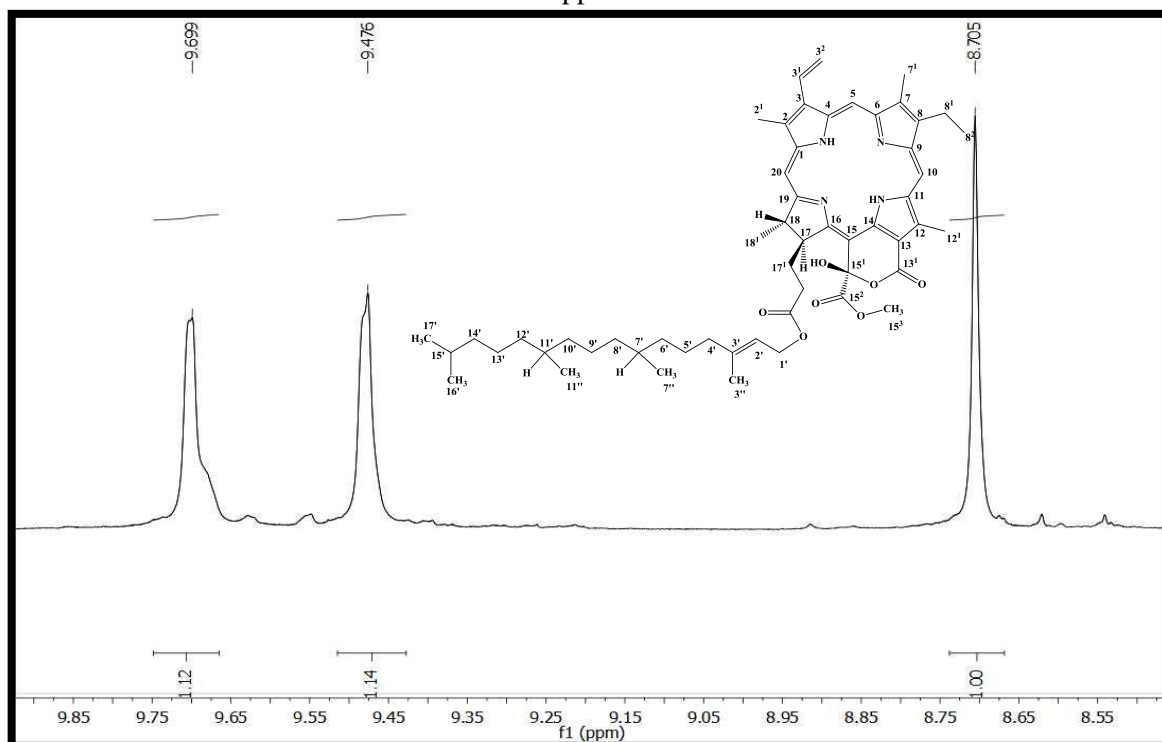
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 24: Espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2*.



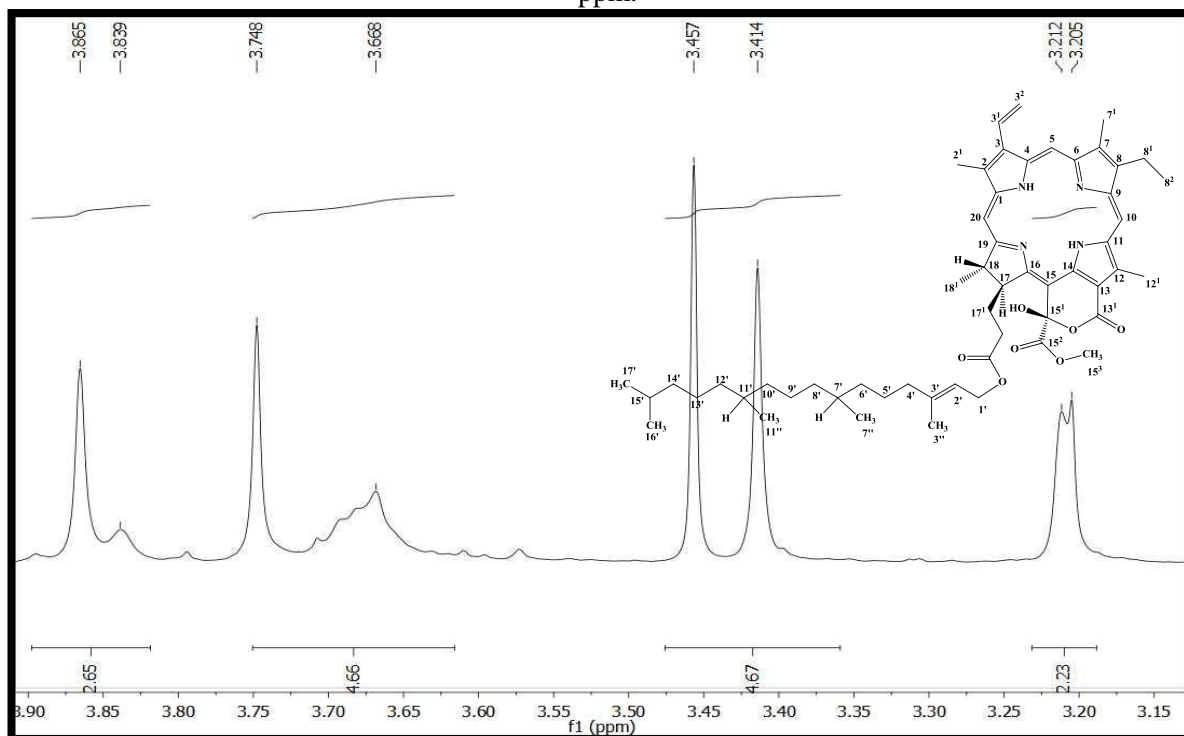
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 25: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 8,55 a 9,85 ppm.



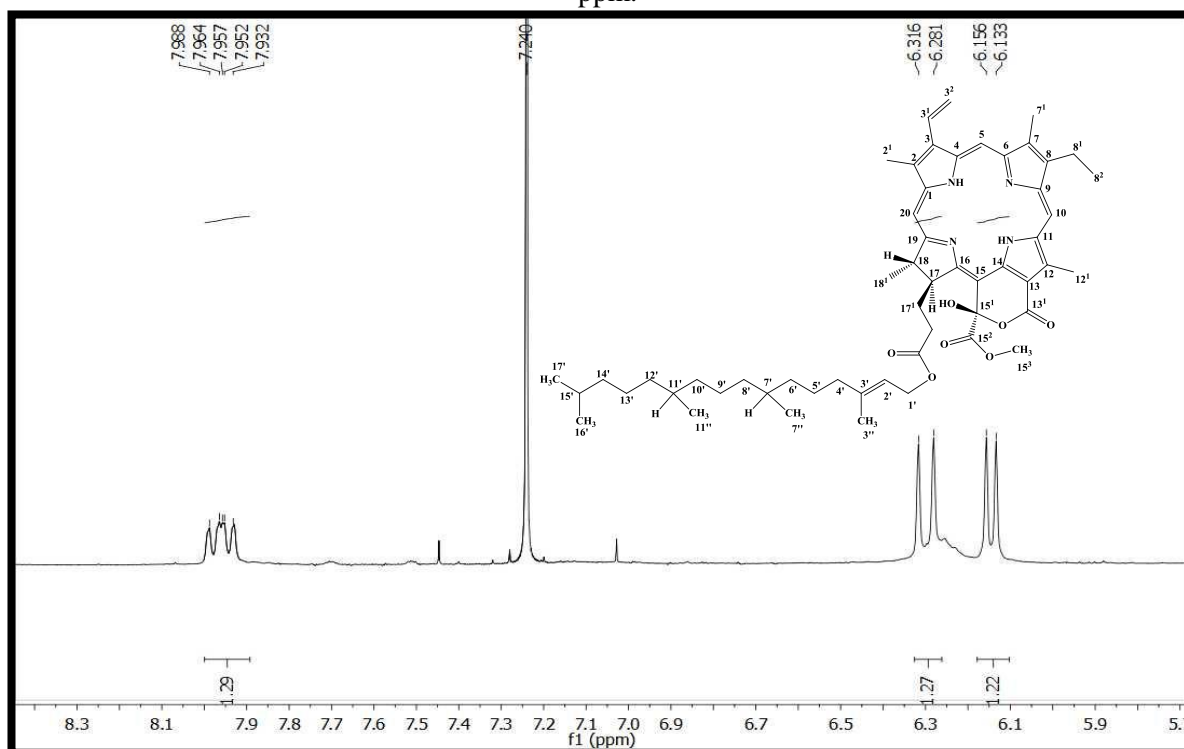
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 26: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 3,15 a 3,90 ppm.



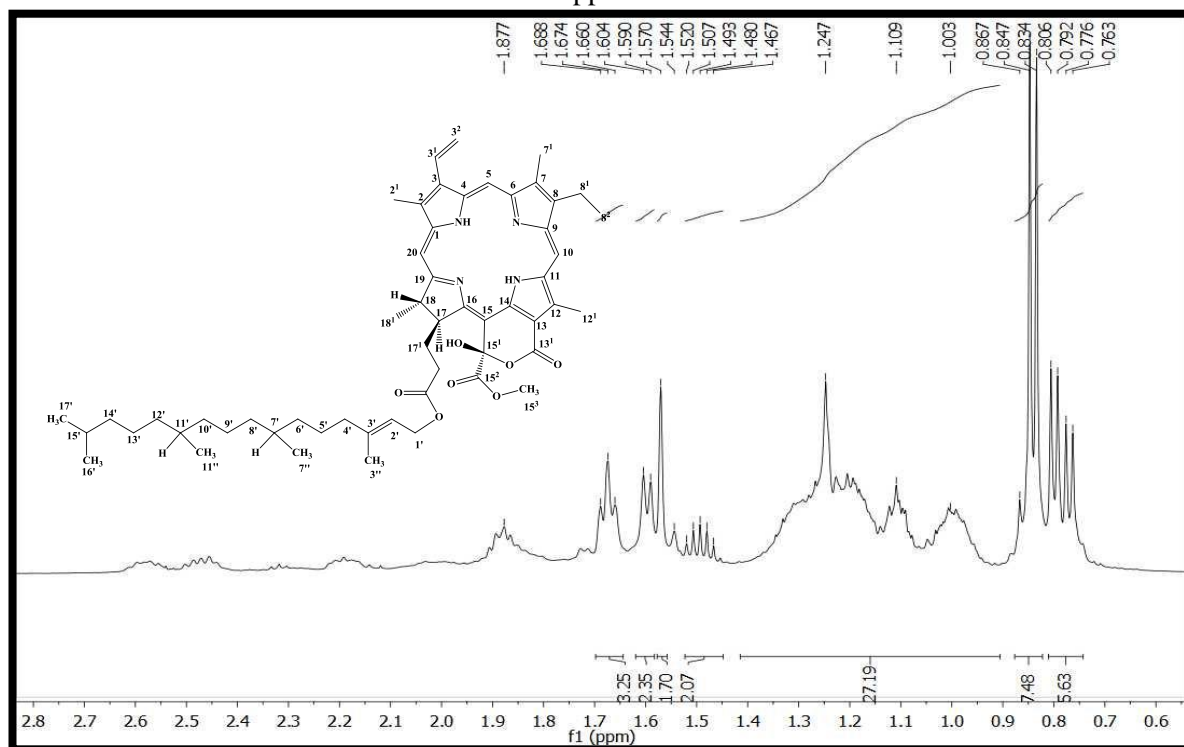
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 27: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 5,70 a 8,30 ppm.



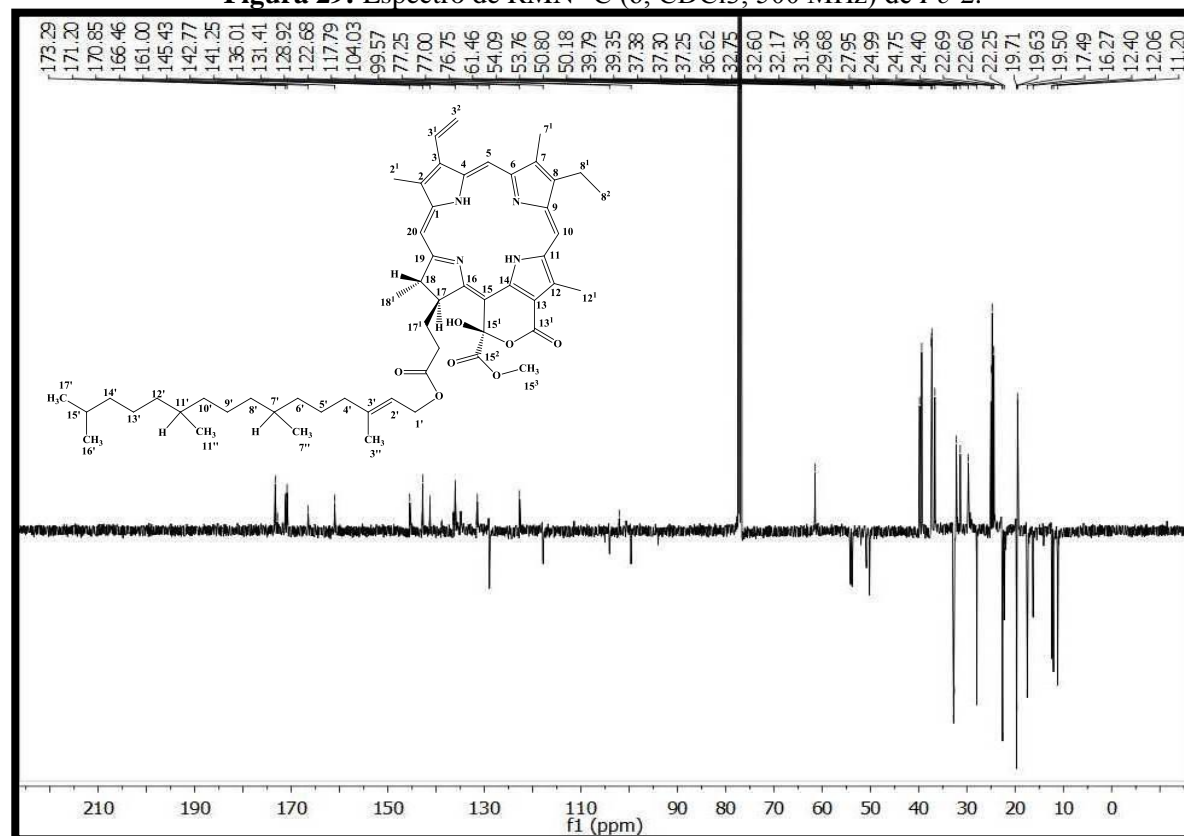
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 28: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 0,60 a 2,83 ppm.



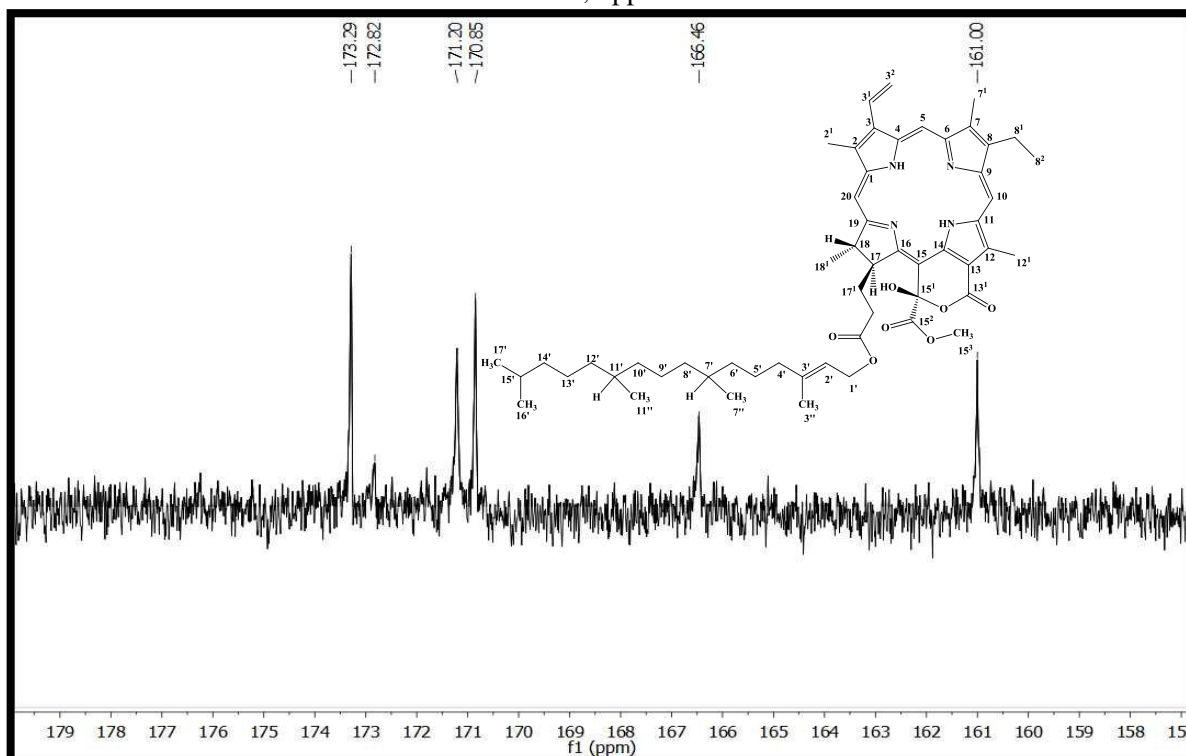
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 29: Espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2*.



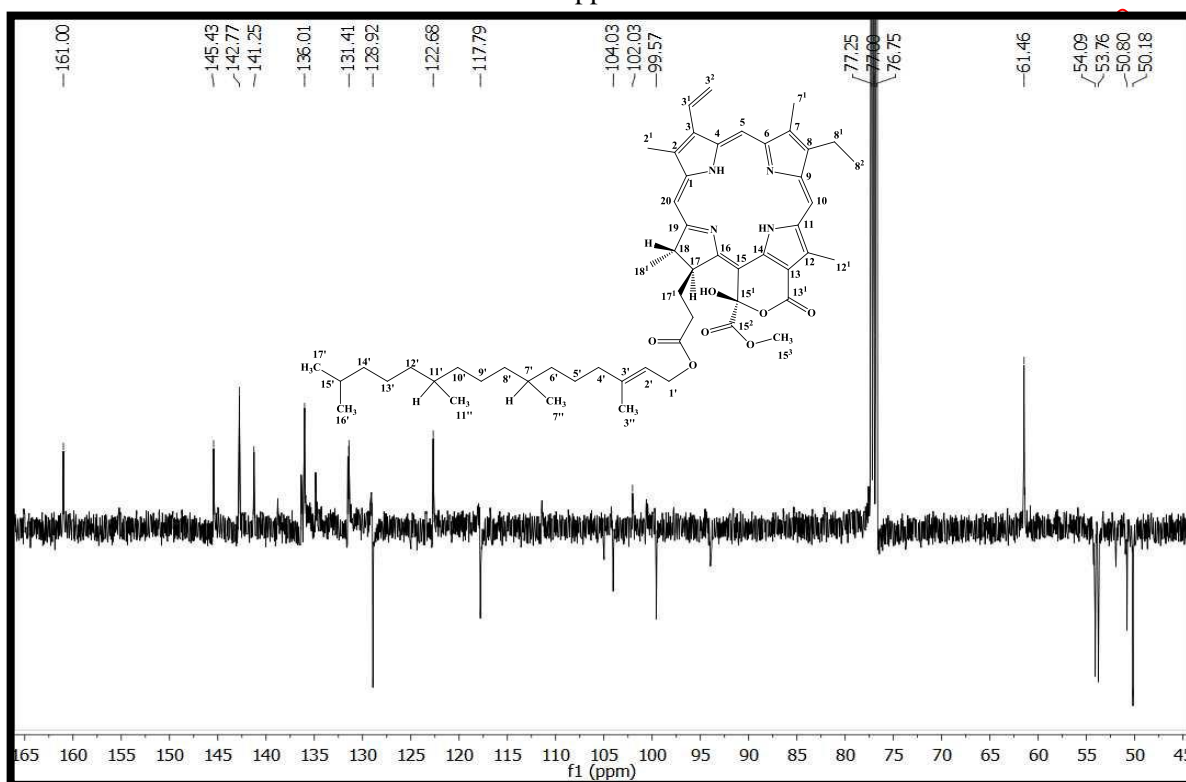
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 30: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 157,0 a 179,0 ppm.



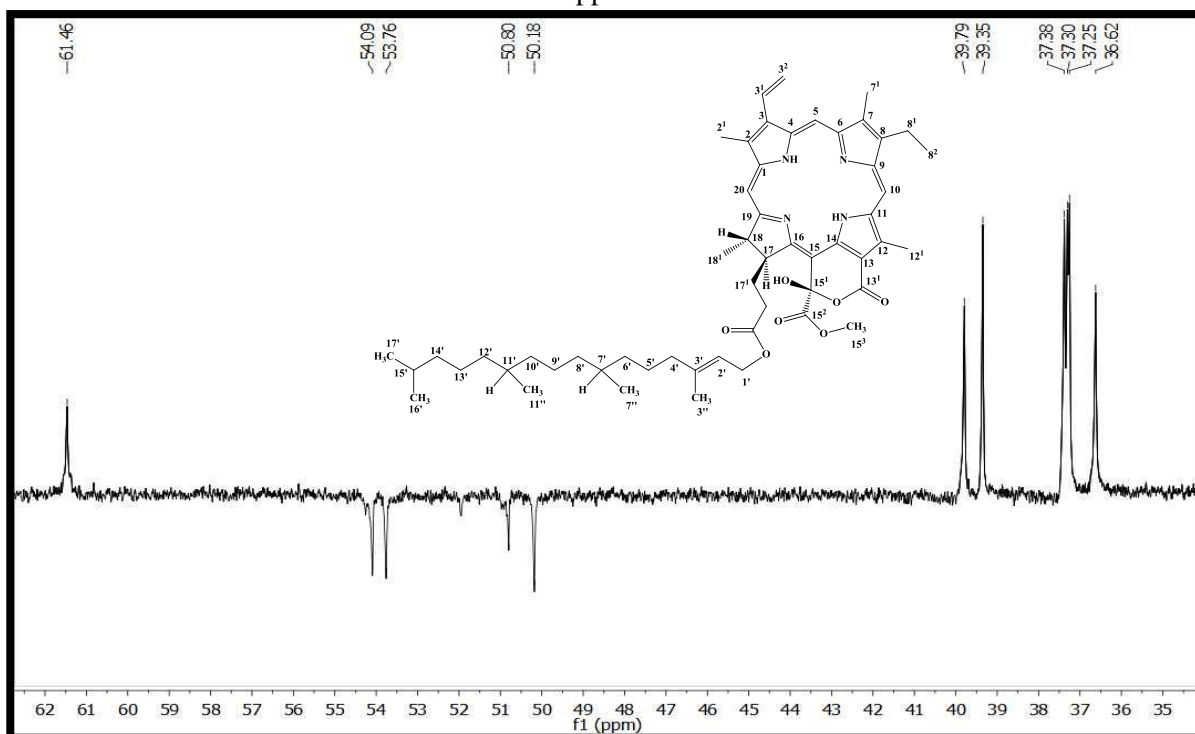
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 31: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 45,0 a 165,0 ppm.



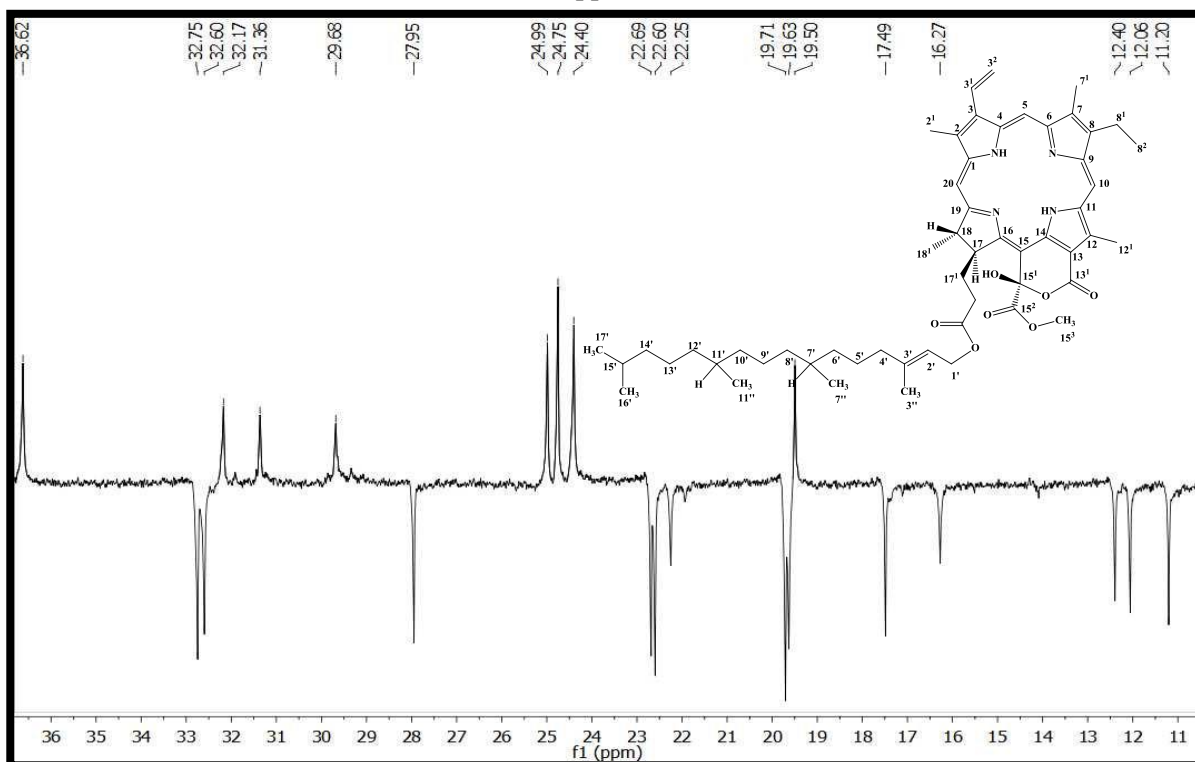
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 32: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 34,0 a 63,0 ppm.



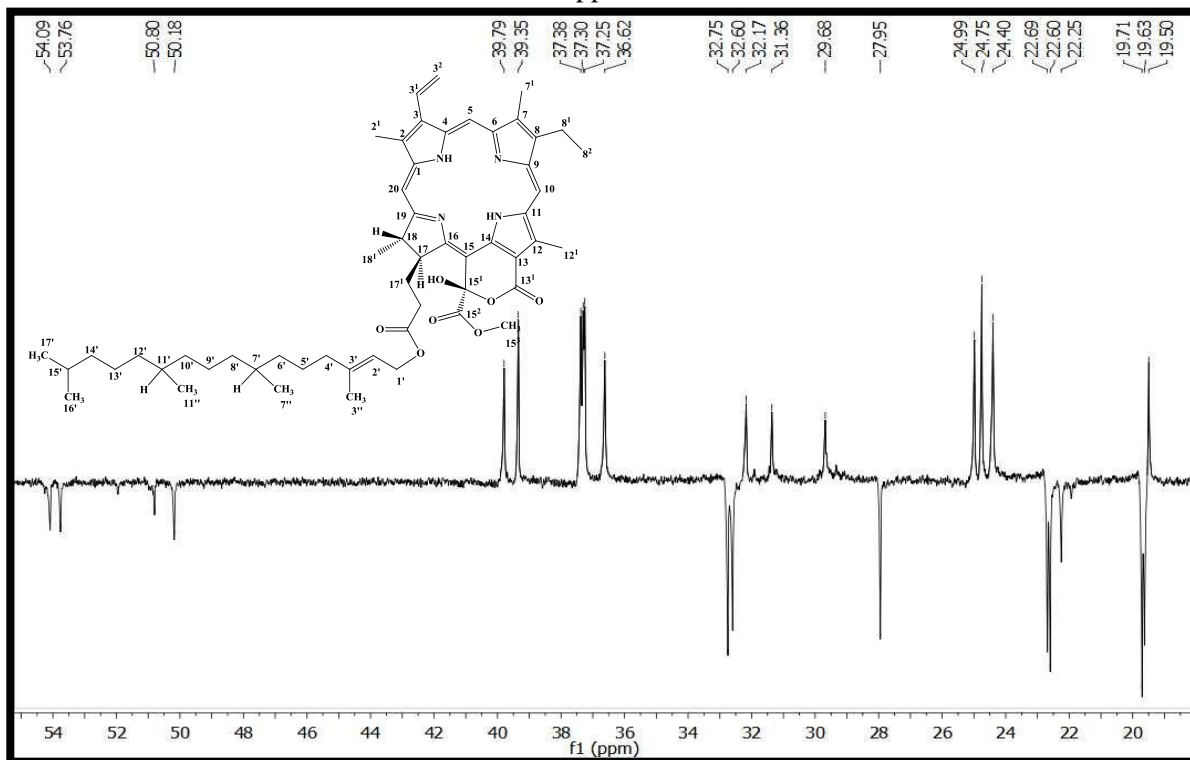
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 33: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 10,50 a 37,0 ppm.



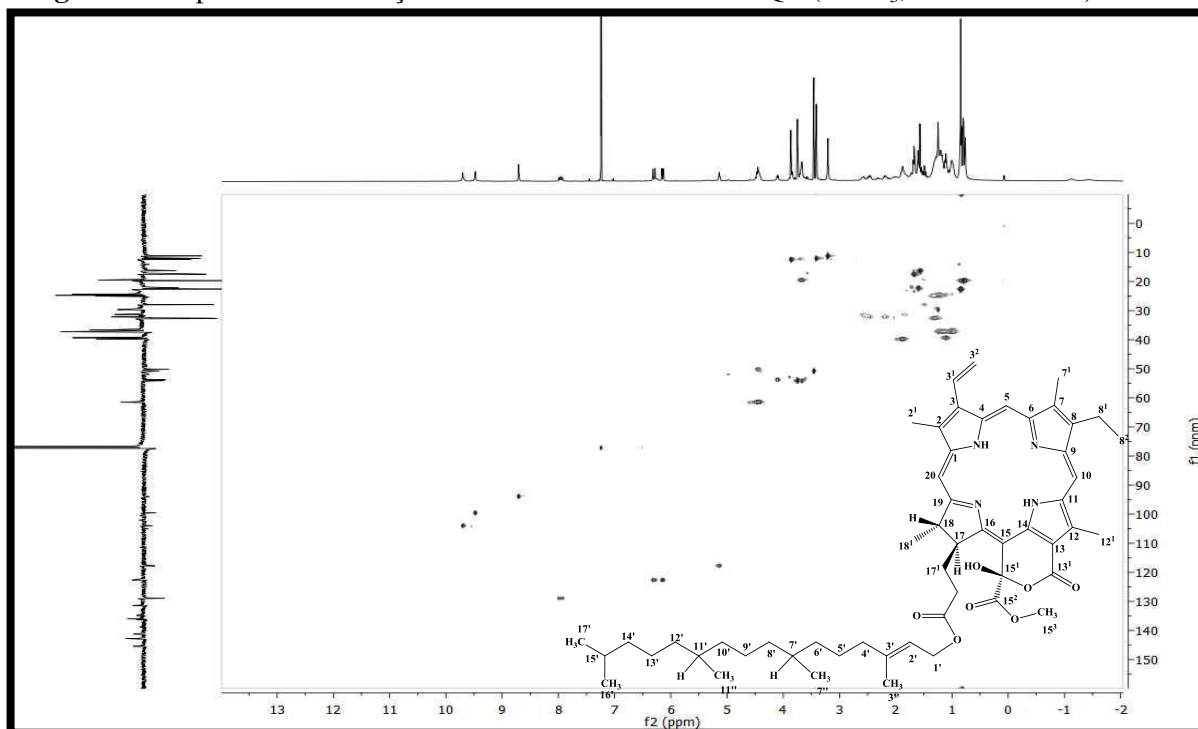
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 34: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-2* na região de 54,5 a 19,0 ppm.



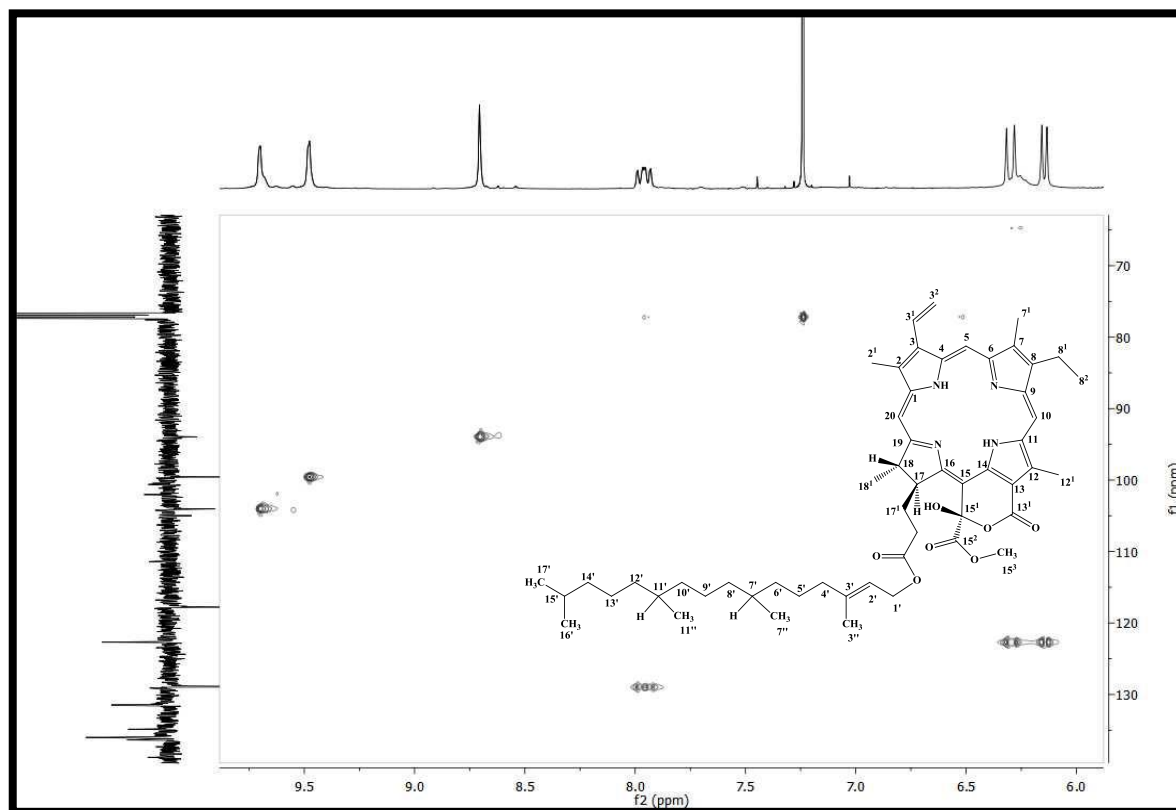
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 35: Espectro de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C-HMQC (CDCl₃, 500/ 125 MHz) de *Pc-2*.



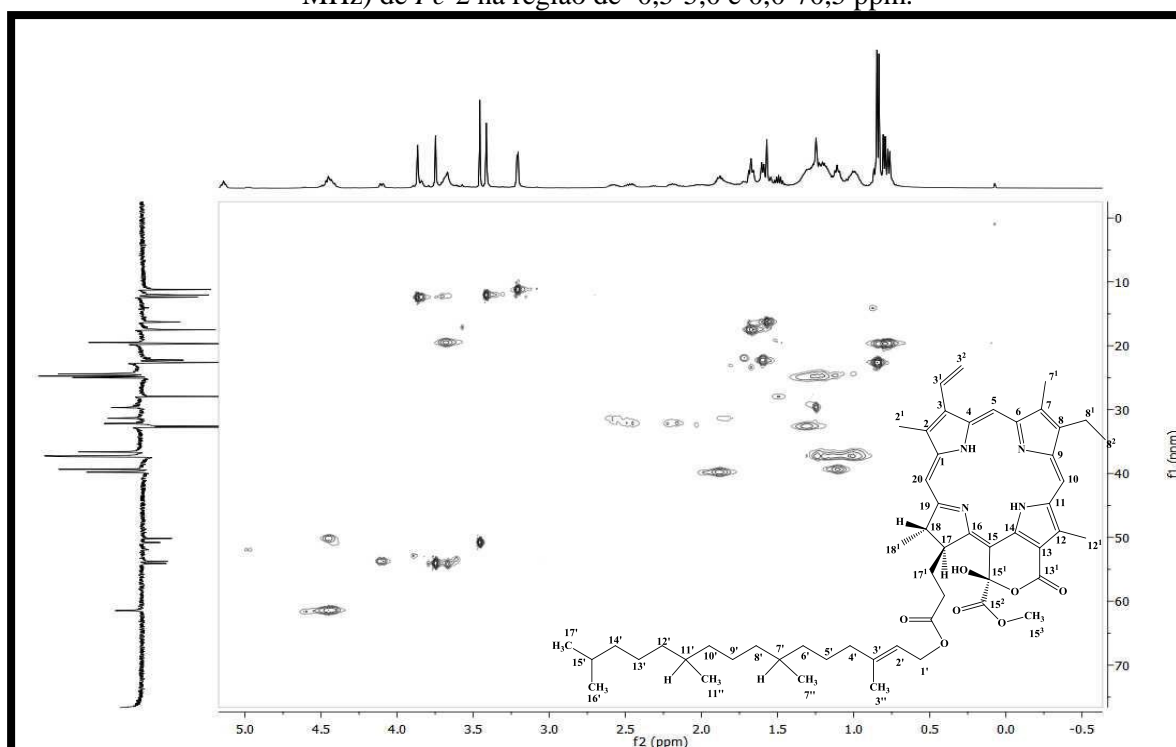
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 36: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-2* na região de 6,0-10,0 e 60,0-140,0 ppm.



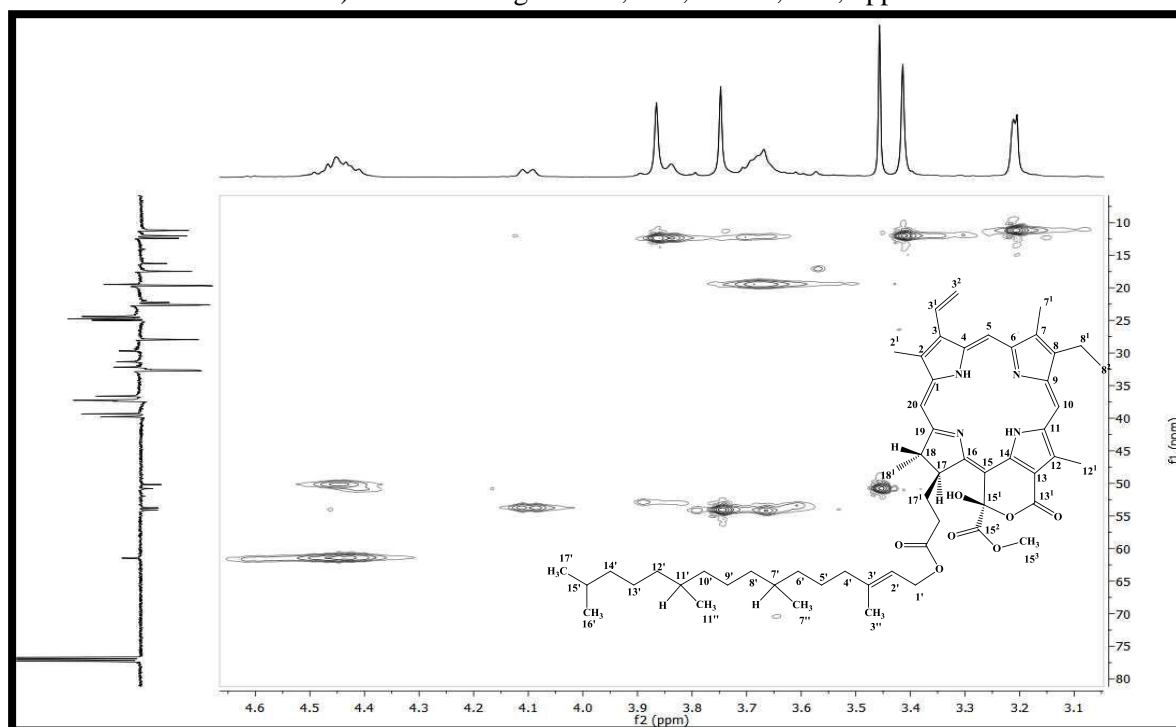
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 37: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-2* na região de -0,5-5,0 e 0,0-70,5 ppm.



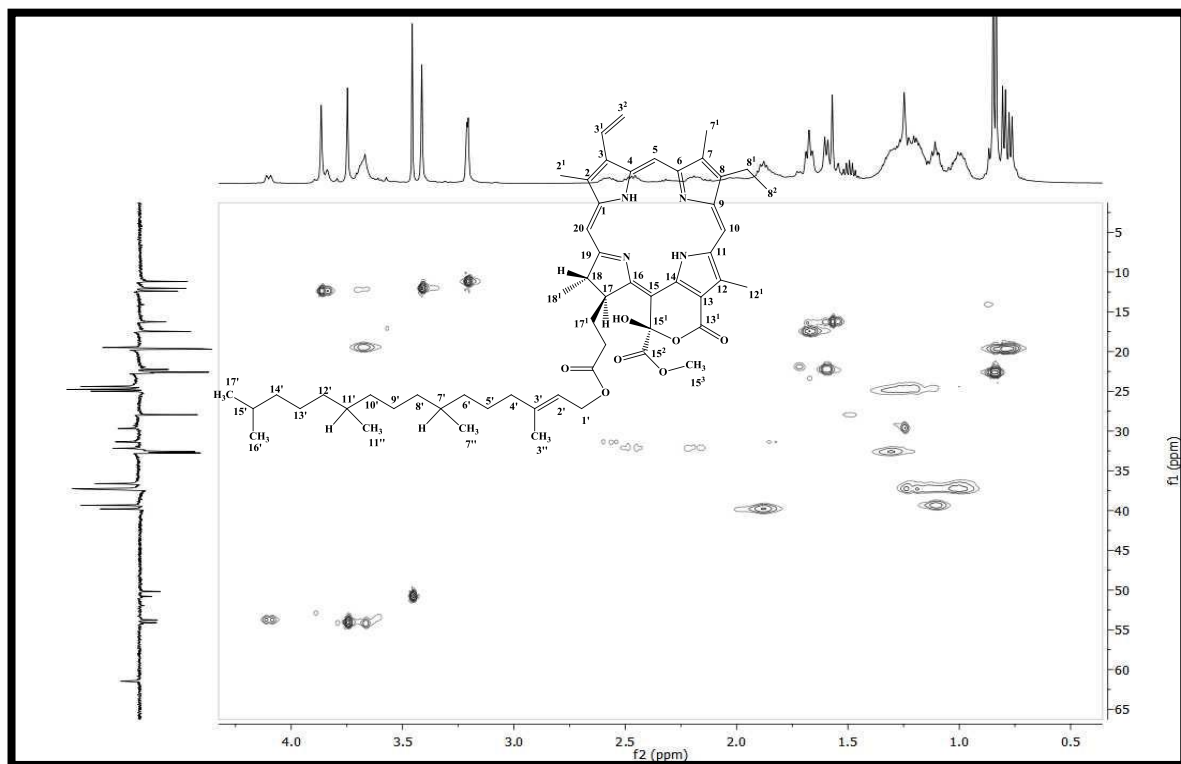
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 38: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-2* na região de 3,41-4,47 e 10,0-80,0 ppm.



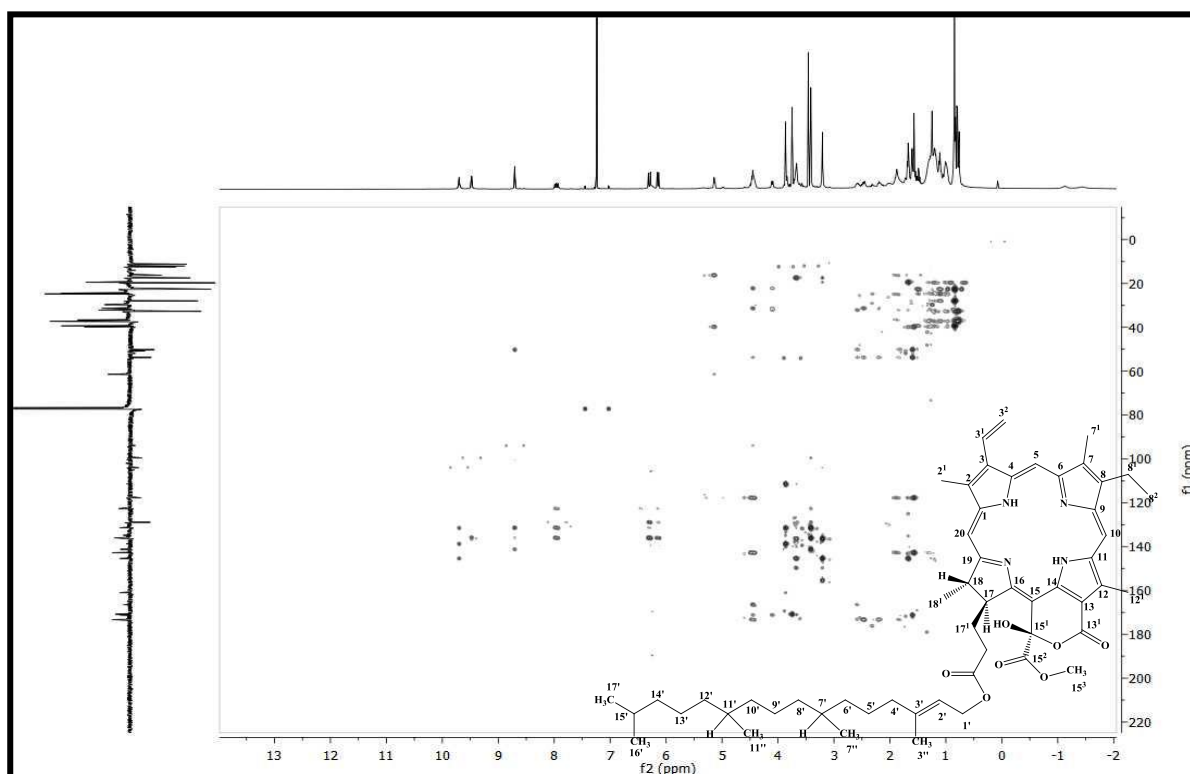
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 39: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-2* na região de 0,25-4,25 e 5,0 -65,0 ppm.



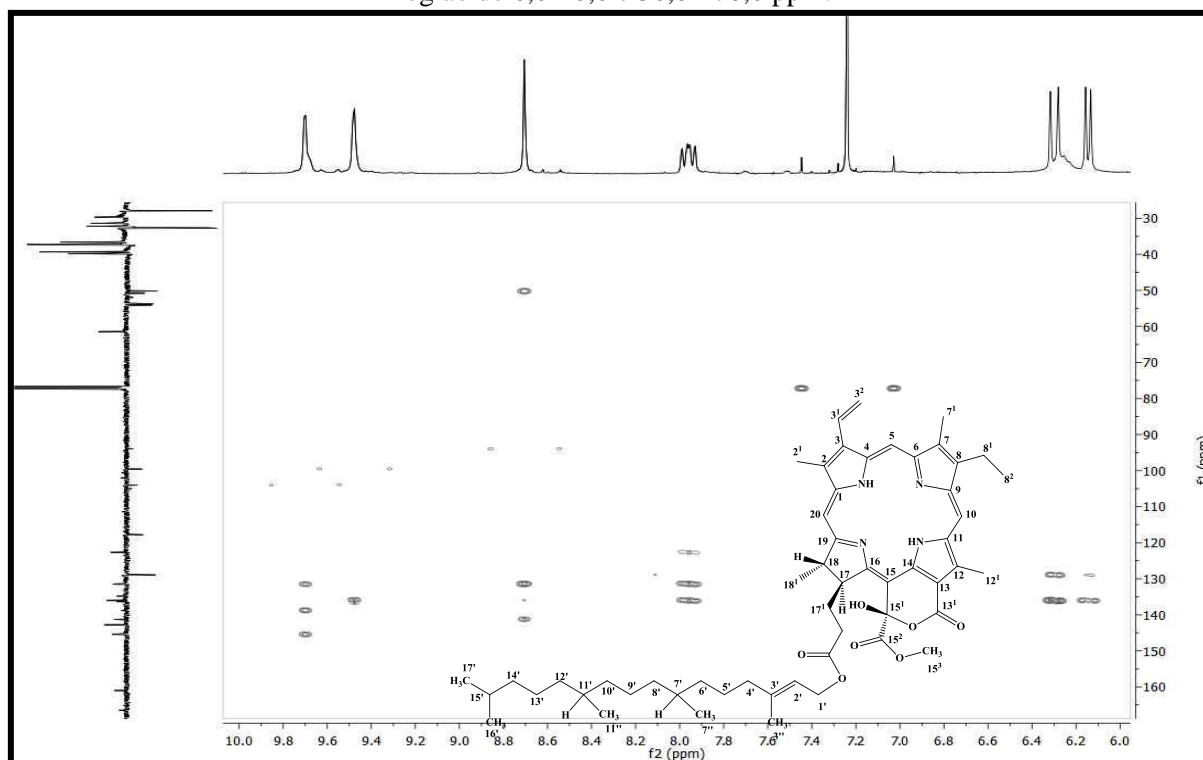
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 40: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-2*.



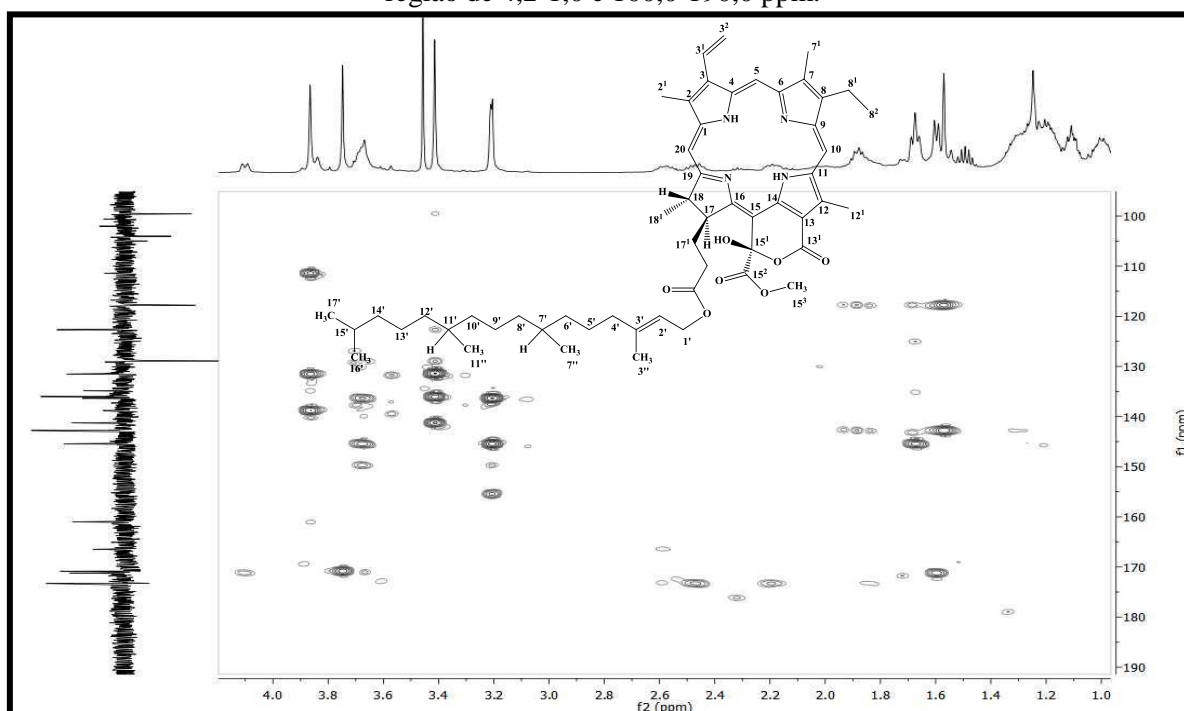
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 41: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-2* na região de 6,0-10,0 e 30,0-170,0 ppm.



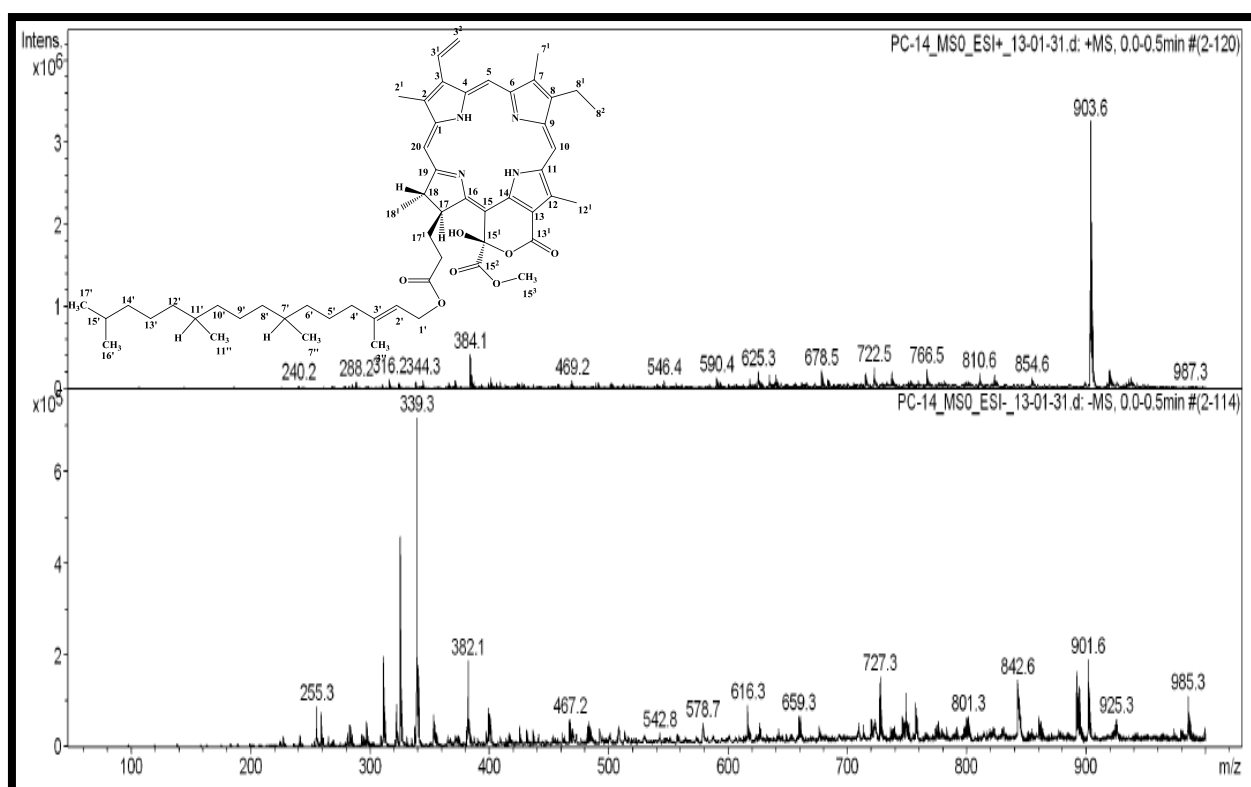
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 42: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-2* na região de 4,2-1,0 e 100,0-190,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 43': Espectrometria de massa de *Pc-2*.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

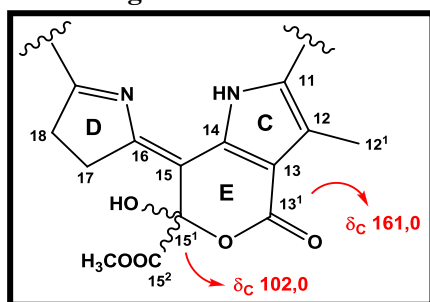
5.1.3 Caracterização estrutural de *Pc-3*

A substância codificada como *Pc-3* apresentou-se como um pó verde azulado, possuindo brilho metálico com rendimento de 29,0 mg, ou seja, 0,010% em relação ao peso da planta seca e, 0,058% em relação ao extrato etanólico bruto das folhas de *Piper caldense* C.DC. Assim como *Pc-2*, anteriormente descrita, apresentou fluorescência na luz UV, indicativo da presença de cromóforo.

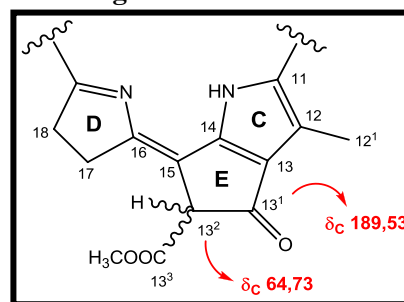
O espectro de Infravermelho de *Pc-3* (**Figura 45**) revelou bandas de absorção semelhantes às mostradas no espectro de IV de *Pc-2*, levando a sugerir que um núcleo porfirínico também pode estar presente em *Pc-3*, o que foi confirmado pelas demais análises espectrais de RMN¹H, RMN¹³C, uni e bidimensionais. A diferença básica do espectro de IV desta substância em relação aquele revelado para *Pc-2* é a presença de duas bandas de absorção em 1735 e 1701 cm⁻¹ que remetem à deformação axial de grupo carbonílico de éster e cetona conjugada, respectivamente (SILVERSTEIN, 1994; PAVIA, *et al.*, 2010), indicando, portanto, a presença de carbonila cetônica, a qual está ausente em *Pc-2*.

As absorções reveladas no espectro de RMN¹H (**Tabela 11**) permitiu confirmar a presença do núcleo porfirínico (**Figura 46**) pela existência de sinais em δ_H 9,37, δ_H 9,52 e δ_H 8,59, correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-5, H-10 e H-20 do núcleo porfirínico, respectivamente (**Figura 47**), além de absorções características das metilas olefínicas (no total de três) nas posições em H-2¹ (δ_H 3,38), H-7¹ (δ_H , 3,18) e H-12¹ (δ_H 3,68) (**Figura 48**), que aparecem no espectro na forma de singletos. Ademais, pode-se verificar um envelope de absorções na região de prótons metílicos, metínicos e metilênicos, sugerindo assim como *Pc-2*, a presença de cadeia fitil éster na molécula, ocorrendo aí, por se tratar de uma feofitina, como substituinte no carbono C-17³. Deslocamentos para hidrogênios vinílicos também foram observados nas posições H-3¹ (δ_H 7,94 (dd, $J = 11,5$ e $18,0$ Hz, 1H)) e H-3² (δ_H 6,16 (dd, $J = 11,5$ e $1,5$, 1H), δ_H 6,25 (dd, $J = 18,0$ e $1,5$ Hz, 1H)) (**Figura 47**), compatíveis com a descrição estrutural dos derivados porfirínicos.

A análise dos espectros de RMN¹³C-APT e suas expansões (**Figuras 49, 50 e 51**) mostrou 55 sinais, sendo 19 para carbonos não hidrogenados, 11 metínicos, 14 metilênicos e 11 metílicos, apresentando absorções semelhantes àquelas observadas em *Pc-2*, diferenciando-se desta nas absorções referentes às posições dos carbonos C-13¹ e C-13², δ_C 189,53 e 64,73 (**Figuras 50 e 51**), respectivamente (**Figura 43a e Figura 43b**).

Figura 43a: *Pc-2*.

Fonte: Elaboração própria, 2013

Figura 43b: *Pc-3*.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

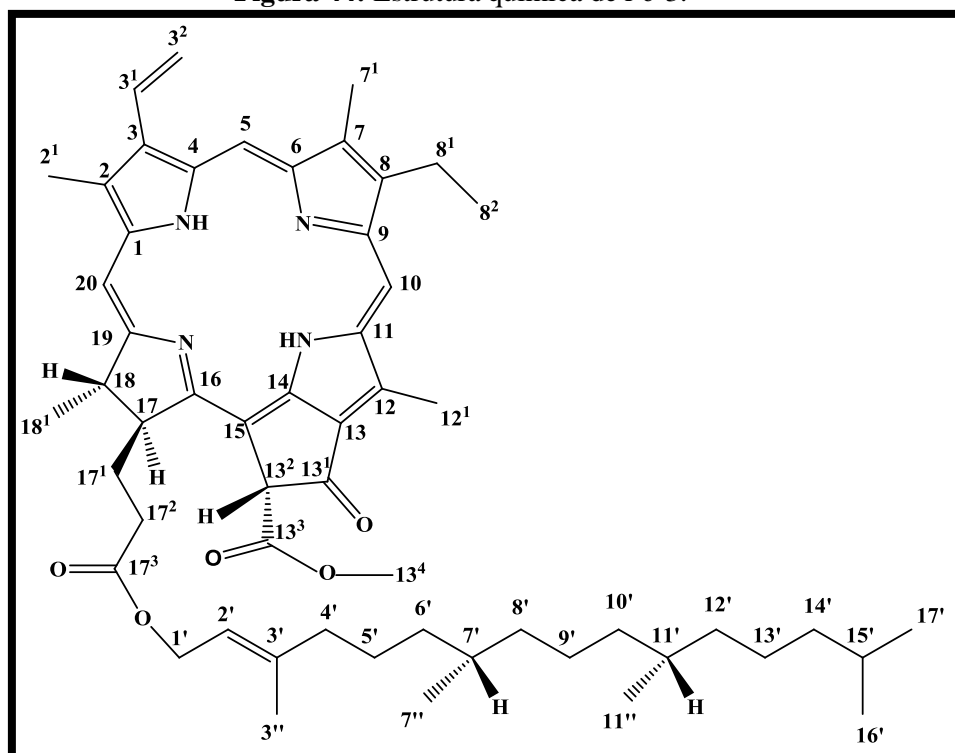
Os espectros de correlação bidimensional heteronuclear HMQC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - (CDCl_3 , 500/125 MHz) (**Figura 52**) permitiram destacar as seguintes correlações em $\delta_{\text{H}} 9,37 / \delta_{\text{C}} 97,48$, $\delta_{\text{H}} 9,52 / \delta_{\text{C}} 104,98$ e $\delta_{\text{H}} 8,59 / \delta_{\text{C}} 93,57$ (**Figura 53**) sugerindo $\delta_{\text{C}} 97,48$, $\delta_{\text{C}} 104,98$ e $\delta_{\text{C}} 93,57$ para as posições 5, 10 e 20, respectivamente, dos anéis de porfirina, bem como $\delta_{\text{H}} 3,38 / \delta_{\text{C}} 12,06$, $\delta_{\text{H}} 3,18 / \delta_{\text{C}} 11,17$ e $\delta_{\text{H}} 3,68 / \delta_{\text{C}} 12,03$ correspondentes às metilas olefínicas em 2^1 , 7^1 e 12^1 (**Figura 54 e 55**). A atribuição parcial dos carbonos dos anéis I, II, III e IV foi feita utilizando, além do experimento HMQC, comparações com dados da literatura (SILVA *et al.*, 2006; NOGUEIRA, 2009). Outras correlações também foram evidenciadas entre os dubletos dos hidrogênios da posição $\text{H}-3^2$ ($\delta_{\text{H}} 6,16$ e $\delta_{\text{H}} 6,25$) com o carbono $\text{C}-3^2$ ($\delta_{\text{C}} 122,88$) e entre os duplos dubletos da posição $\text{H}-3^1$ ($\delta_{\text{H}} 7,94$) com o carbono $\text{C}-3^1$ ($\delta_{\text{C}} 129,01$) (**Figura 53**), corroborando, assim, com os assinalamentos realizados (**Figura 54**).

Os espectros de correlação bidimensional heteronuclear a duas ($^2J_{\text{CH}}$) e a três ($^3J_{\text{CH}}$) ligações HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (δ , CDCl_3 , 500 MHz) e suas expansões (**Figuras 56 a 58**), mostraram correlações entre os hidrogênios e os carbonos semelhantes àquelas observadas em *Pc-2* tanto para núcleo porfirínico quanto para grupo fitílico, inserindo-a também na classe das fofitinas, diferenciando-se do composto anterior pela correlação a duas ligações (2J) entre o $\text{H}-13^2$ e o $\text{C}-13^1$, em $\delta_{\text{H}} 6,27$ e $\delta_{\text{C}} 189,53$, respectivamente, referente à carbonila cetônica do anel E de *Pc-3* (**Figuras 56 e Tabela 13**). Esta carbonila, em *Pc-2*, apresentou valor de deslocamento em torno de $\delta_{\text{C}} 161,0$ ppm, isto é, mais protegida, em virtude da presença de conjugação no anel E.

Outras correlações (**Figuras 57 e 58**) foram evidenciadas em: CH_3-2^1 ($\delta_{\text{H}} 3,38$) (3J) com $\delta_{\text{C}} 142,15$ (C-1) e $\delta_{\text{C}} 136,36$ (C-3), $\delta_{\text{C}} 131,96$ (C-2), CH_3-7^1 ($\delta_{\text{H}} 3,18$) (2J) com $\delta_{\text{C}} 135,87$ (C-7), $\delta_{\text{C}} 145,02$ (C-8) e $\delta_{\text{C}} 155,66$ (C-6), CH_3-8^2 ($\delta_{\text{H}} 1,66$) (2J) com $\delta_{\text{C}} 19,43$ (C-8¹) e (3J) com $\delta_{\text{C}} 145,02$ (C-8); CH_3-12^1 ($\delta_{\text{H}} 3,68$) (2J) com $\delta_{\text{C}} 129,04$ (C-12) e (3J) com $\delta_{\text{C}} 137,97$ (C-11) e $\delta_{\text{C}} 129,10$ (C-13), CH_3-18^1 ($\delta_{\text{H}} 1,82$) (2J) com $\delta_{\text{C}} 50,19$ (C-18) e (3J) com $\delta_{\text{C}} 51,28$ (C-

17) e δ_C 172,41 (C-19); correlações em δ_H 3,64 (**H-8**¹) / δ_C 19,43 (C-8²) e com δ_C 135,87 (C-7) e δ_C 149,94 (C-9) referente ao grupamento etílico; correlações em δ_H 6,27 (**H-13**²) (²*J*) com δ_C 189,53 (C-13¹) e com δ_C 105,38 (C-15) e (³*J*) com δ_C 149,77 (C-14) e δ_C 161,81 (C-16), e, por fim, as correlações em δ_H 3,88 (OMe-13⁴) (³*J*) com δ_C 169,51(C-13³), que permitiram assinalar os hidrogênios e o carbono da metoxila em C-13⁴.

Comparações com modelos da literatura *Mo-4* (δ , CDCl₃, 500 e 125 MHz) (NOGUEIRA, 2009) e *Mo-5* (δ , CDCl₃, 200 e 50 MHz) (SILVA *et al.*, 2006) (**Tabelas 11, 12 e 13**) aliados à compilação dos dados espectroscópicos de *Pc-3* (**Figura 44**) levou a identificar a substância em questão como sendo a feofitina a, descrita anteriormente uma única vez em *Piper carniconnectivum* (ALVES, 2005), entretanto, pela primeira vez em *Piper caldense* C.DC.

Figura 44: Estrutura química de *Pc-3*.

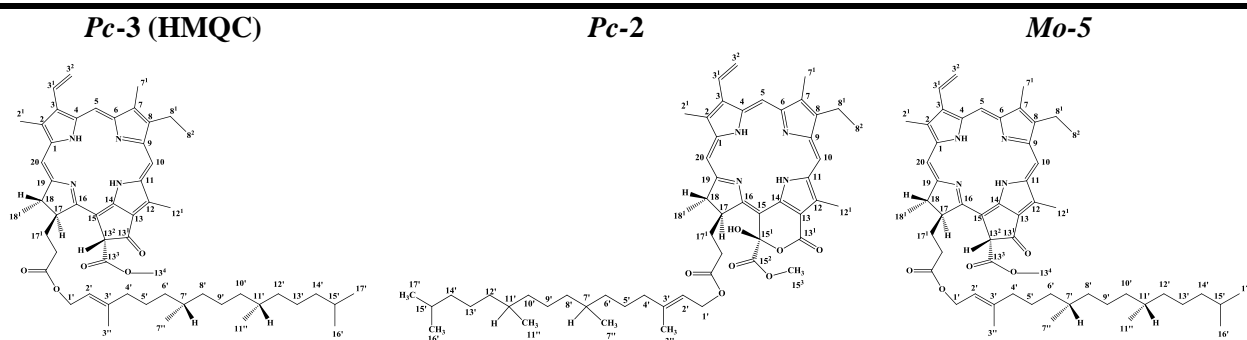
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 11: Dados comparativos de RMN¹H e ¹³C de *Pc-3* (δ , CDCl₃, 500 e 125 MHz) com o modelo *Pc-2* e *Mo-4* (δ , CDCl₃, 500 e 125 MHz) (NOGUEIRA, 2009).
Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (*J*) em Hz.

Posição	<i>Pc-3</i> (HMQC)		<i>Pc-2</i>		<i>Mo-4</i>	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	142,15	-	141,25	-	142,34
2	-	131,96	-	131,52	-	131,10
2¹	3,38 (s, 3H)	12,06	3,41 (s, 3H)	12,05	3,38 (s)	12,26
3	-	136,36	-	136,36	-	136,82
3¹	7,94 (dd, <i>J</i> = 11,5 e 18,0 Hz, 1H)	129,01	7,96 (dd, <i>J</i> = 11,5 e 17,5 Hz, 1H)	128,92	7,98 (dd, <i>J</i> = 15,19 e 11,39)	129,19
3²	6,16 (dd, <i>J</i> = 11,5 e 1,5, 1H) 6,25 (dd, <i>J</i> = 18,0 e 1,5 Hz, 1H)	122,88	6,30 (dl, <i>J</i> = 17,5 Hz, 1H) 6,14 (dl, <i>J</i> = 11,5 Hz, 1H)	122,68	6,28 (trans) (dd, <i>J</i> = 15,19 e 2,29) e 6,17 (cis) (dd, <i>J</i> = 11,39 e 2,28)	123,11
4	-	136,63	-	136,01	-	136,51
5	9,37 (s, 1H)	97,48	9,48 (s, 1H)	99,57	9,36 (s)	97,66
6	-	155,66	-	155,50	-	155,55
7	-	135,87	-	136,01	-	136,14
7¹	3,18 (s, 3H)	11,17	3,21 (s, 3H)	11,20	3,21 (s)	11,35
8	-	145,02	-	145,43	-	145,25
8¹	3,64 (m, 2H)	19,43	3,70 (m, 2H)	19,49	3,66 (m)	19,60
8²	1,66 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 3H)	17,29	1,67 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H)	17,48	1,68 (t)	17,52
9	-	149,94	-	150,00	-	150,92
10	9,52 (s, 1H)	104,98	9,50 (s)	104,05	9,50 (s)	104,59
11	-	137,97	-	139,05	-	138,14
12	-	129,04	-	131,41	-	129,03
12¹	3,68 (s, 3H)	12,03	9,70 (s, 1H)	12,39	3,68 (s)	12,32
13	-	129,10	-	112,00	-	129,14
13¹	-	189,53	-	161,00	-	189,81
13²(15¹)	6,27 (s, 1H)	64,73	-	102,00	6,26 (s)	64,90

Fonte: Elaboração própria, 2013.

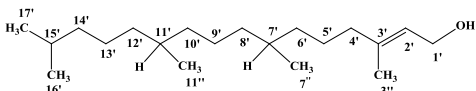
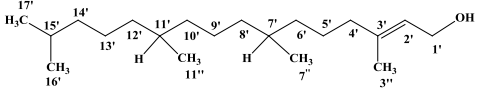
Tabela 11 (Continuação): Dados comparativos de RMN¹H e ¹³C de *Pc-3* (δ , CDCl₃, 500 e 125 MHz, respectivamente) com o modelo *Pc-2* e *Mo-5* (δ , CDCl₃, 500 e 125 MHz) (NOGUEIRA, 2009). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (*J*) em Hz.



Posição	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
13³(15²)	-	169,51	-	170,85	-	169,77
13⁴(15³)	3,88 (s, 3H)	52,83	3,75 (s, 3H)	54,09	3,88	53,07
14	-	149,77	-	145,43	-	149,59
15	-	105,38	-	134,86	-	105,10
16	-	161,81	-	166,46	-	161,28
17	4,17 (m, 1H)	51,28	4,10 (dl, 1H)	53,76	4,20 (m)	51,42
17¹	-	29,82	2,20 (m); 2,52 (m)	32,17	-	29,89
17²	-	31,25	2,33 (m); e 2,57(m)	31,36	-	31,42
17³	-	172,89	-	173,29	-	172,18
18	4,40 (m, 1H)	50,19	4,44 (m, 1H)	50,18	4,45 (m)	50,36
18¹	1,82 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 3H)	23,07	1,60 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H)	22,24	1,80 (d)	23,28
19	-	172,41	8,70 (s, 1H)	171,20	-	172,63
20	8,59 (s, 1H)	93,57	-1,12 (sl, 1H)	93,00	8,55 (s, 1 H)	93,72
21-NH	-1,50 (sl, 1H)	-	-1,44 (sl, 1H)	-	-1,11 (sl, 1 H)	-
23-NH	-1,68 (sl, 1H)	-	-	-	-1,42 (sl, 1 H)	-

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 12: Dados comparativos de RMN ^{13}C da cadeia de fitil éster de *Pc-3* (δ , CDCl_3 , 125 MHz) com o modelo *Mo-4* fitol.

<i>Mo-4</i>		<i>Pc-3</i>	
			
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1'	61,69	61,47	4,50 (m, 2H)
2'	117,93	117,76	5,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H)
3'	143,02	142,78	-
4'	39,98	39,78	1,88 (m, 2H)
5'	25,17	24,99	0,98-1,30
6'	37,57	37,38	0,98-1,30 (m, 6H)
7'	32,93	32,75	-
8'	37,50	37,31	0,98-1,30 (m, 6H)
9'	24,60	24,40	0,98-1,30 (m)
10'	36,82	36,63	0,98-1,30 (m, 6H)
11'	32,79	32,60	-
12'	37,44	37,25	0,98-1,30 (m)
13'	24,95	24,75	-
14'	39,53	39,75	0,98-1,30 (m)
15'	28,14	27,94	-
17'	22,89	22,59	0,84 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)
16'	22,80	22,68	0,84 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)
11''	19,84	19,64	0,79 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
7''	19,90	19,70	0,79 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
3''	16,48	16,27	1,58 (sl, 3H)

Fonte: Elaboração própria adaptado de Nogueira (2009), 2013.

Tabela 13: Dados espectrais de ^1H x ^{13}C HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de *Pc-3*.

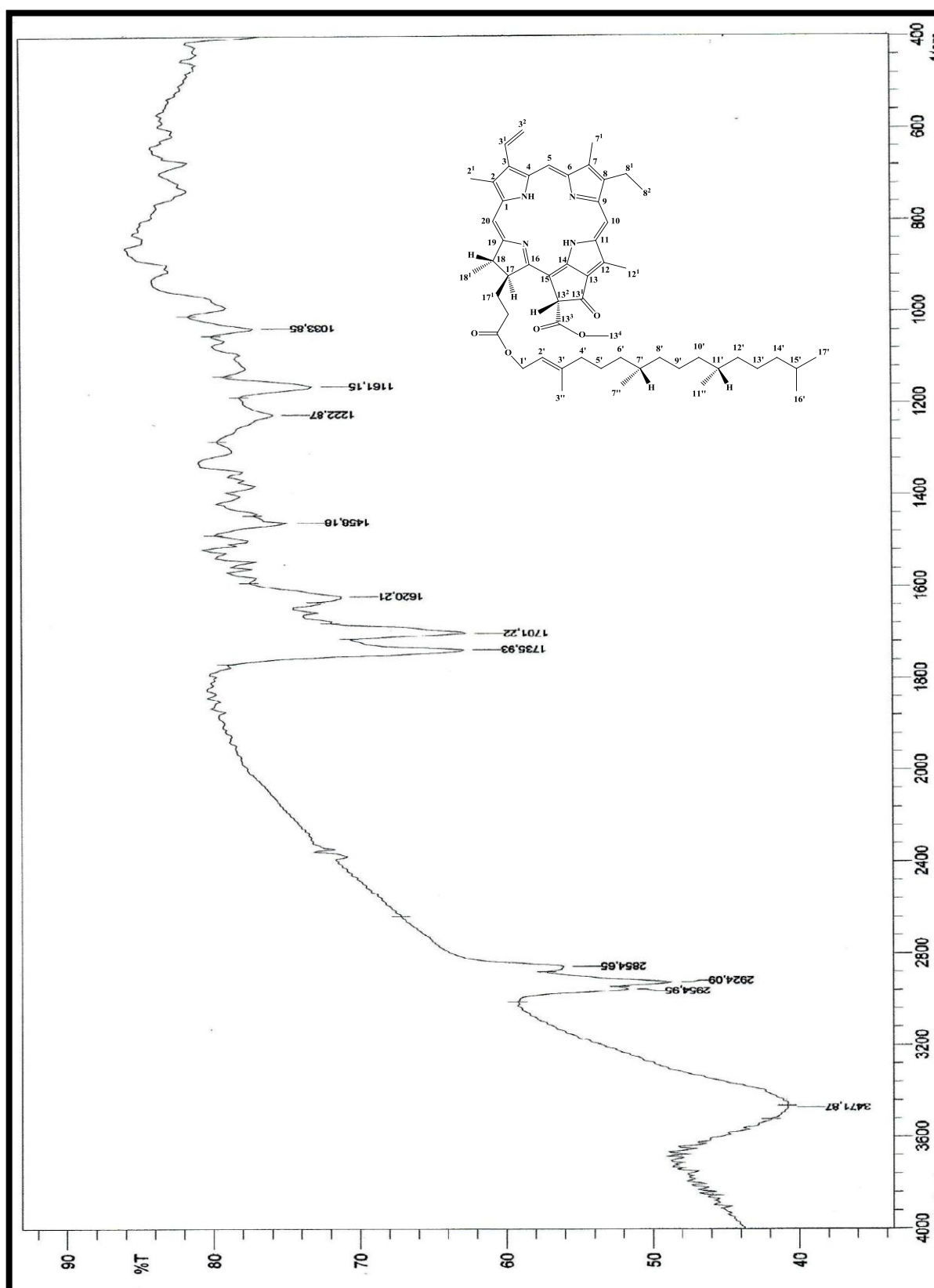
Posição	<i>Pc-3</i>	HMBC ^1H x ^{13}C	
	δ_{H}	2J	3J
1	-		
2	-		
2 ¹	3,38 (s, 3H)	C-2	C-3, C-1
3	-		
3 ¹	7,94 (dd, $J = 11,5$ e $18,0$ Hz, 1H)	C-3, C-3 ²	C-2, C-4
3 ²	6,16 (dd, $J = 11,5$ e $1,5$ Hz, 1H) 6,25 (dd, $J = 18,0$ e $1,5$ Hz, 1H)	C-3 ¹	C-3
4	-		
5	9,37 (s, 1H)		C-3
6	-		
7	-		
7 ¹	3,18 (s, 3H)	C-7	C-8, C-6
8	-		
8 ¹	3,64 (m, 2H)	C-8 ²	C-7, C-9
8 ²	1,66 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H)	C-8 ¹	C-8
9	-		
10	9,52 (s, 1H)	C-11	C-8, C-12
11	-		
12	-		
12 ¹	3,68 (s, 3H)	C-12	C-11, C-13
13	-		
13 ¹	-		
13 ²	6,27 (s, 1H)	C-15, C-13 ¹	C-16, C-14
13 ³	-		
13 ⁴	3,88 (s, 3H)		C-13 ³
14	-		
15	-		
16	-		
17	4,17 (m, 1H)		
17 ¹	-		
17 ²	-		
17 ³	-		
18	4,40 (m, 1H)		
18 ¹	1,82 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H)	C-18	C-19, C-17
19	-		
20	8,59 (s, 1H)	C-1	C-2
1'	4,50 (m, 2H)		C-3', C-17 ³
2'	5,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H)		
3'	-		
4'	1,88 (m, 2H)		
5'	0,98-1,30		

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 13 (Continuação): Dados espectrais de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de *Pc-3*.

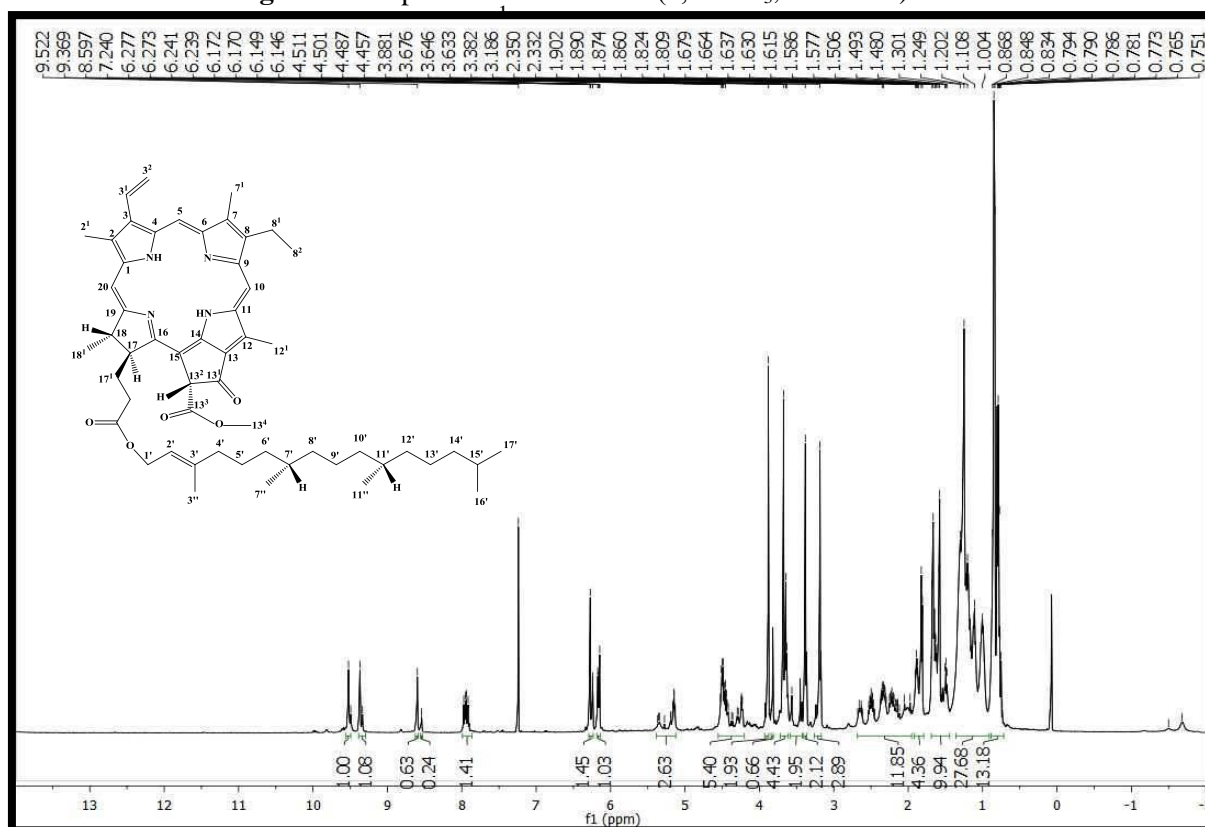
Posição	<i>Pc-3</i>	HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$	
	δ_{H}	2J	3J
6'	0,98-1,30 (m, 6H)		
7'	-		
8'	0,98-1,30 (m, 6H)		
9'	0,98-1,30 (m)		
10'	0,98-1,30 (m, 6H)		
11'	-		
12'	0,98-1,30 (m)		
13'	-		
14'	0,98-1,30 (m)		
15'	-		
17'	0,84 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)	C-15'	C-14'
16'	0,84 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)	C-15'	C-17'
11''	0,79 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)		C-10', C-12'
7''	0,79 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	C-7'	C-8'
3''	1,58 (sl, 3H)	C-3'	C-2'

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 45: Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de *Pc-3*.

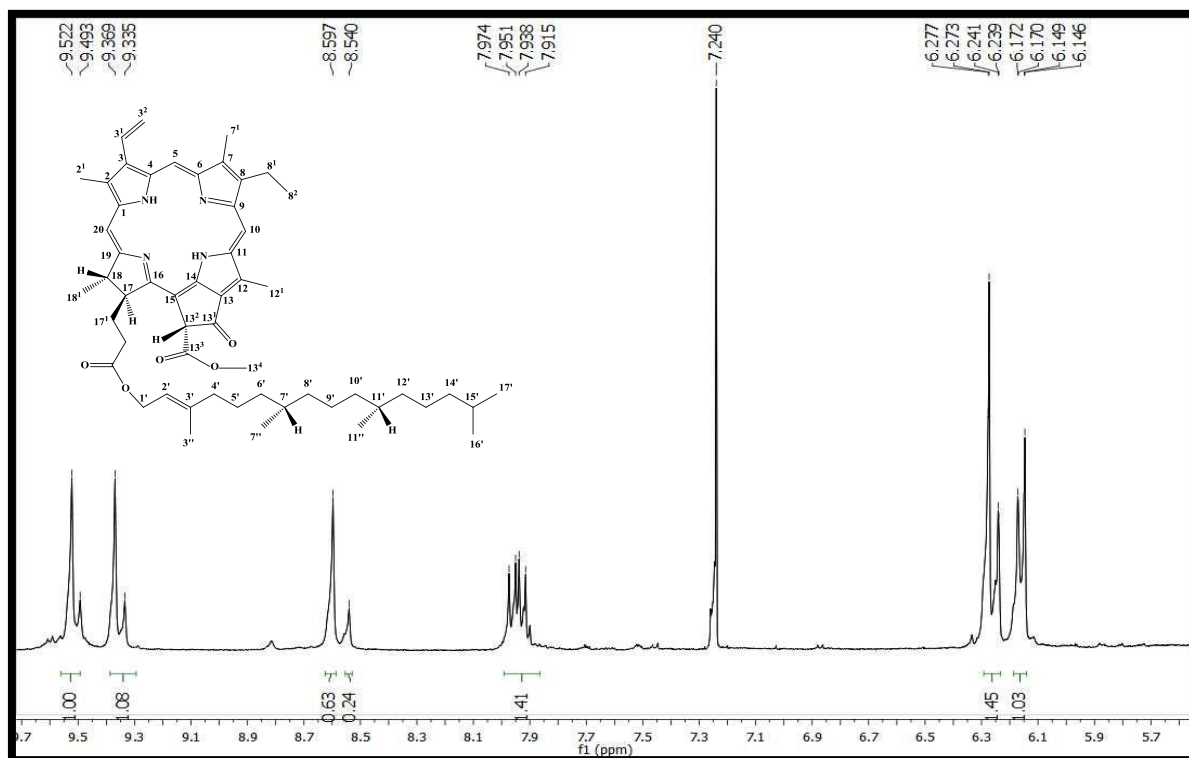
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 46: Espectro de de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-3*.



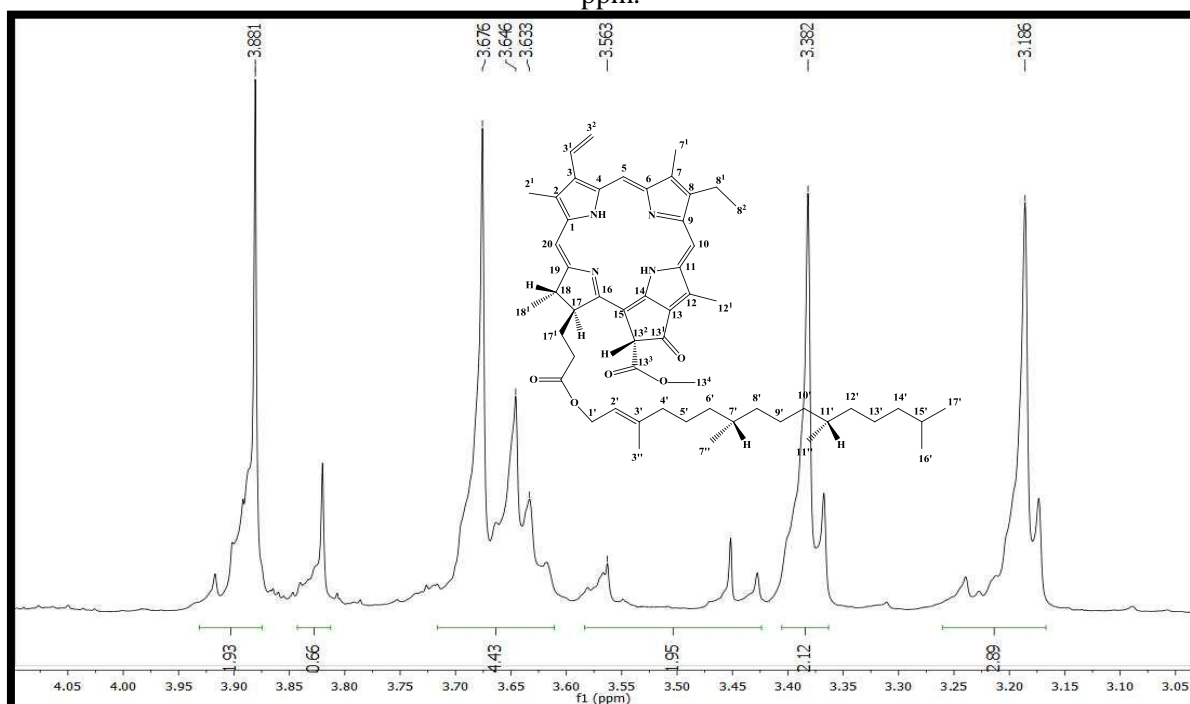
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 47: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-3* na região de 5,6-9,7 ppm.



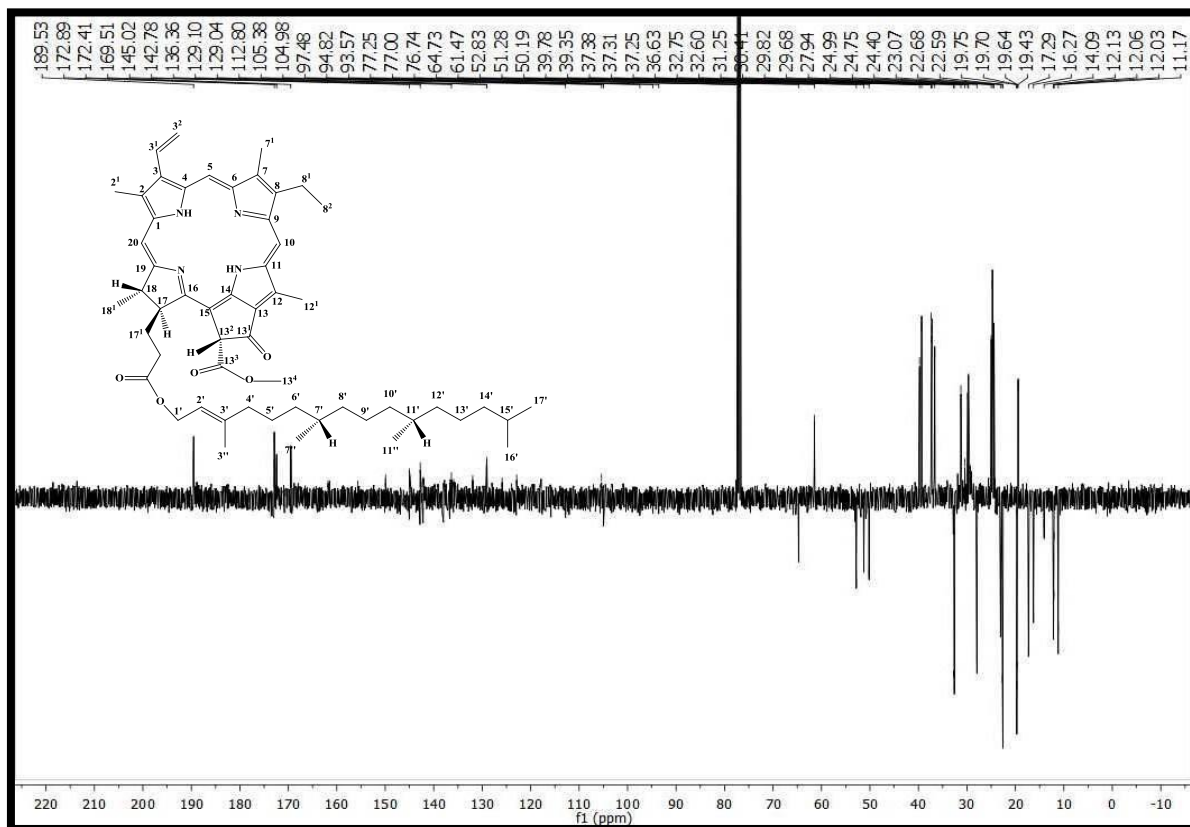
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 48: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-3* na região de 3,05-4,10 ppm.



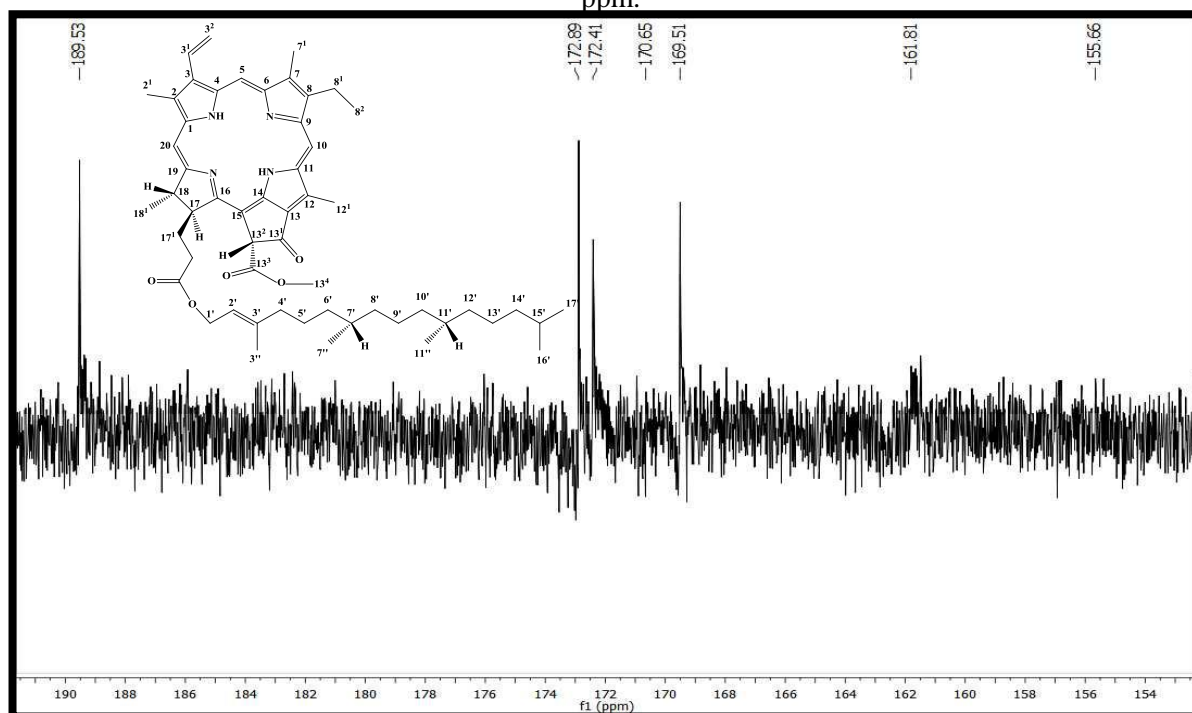
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 49: Espectro de de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-3*.



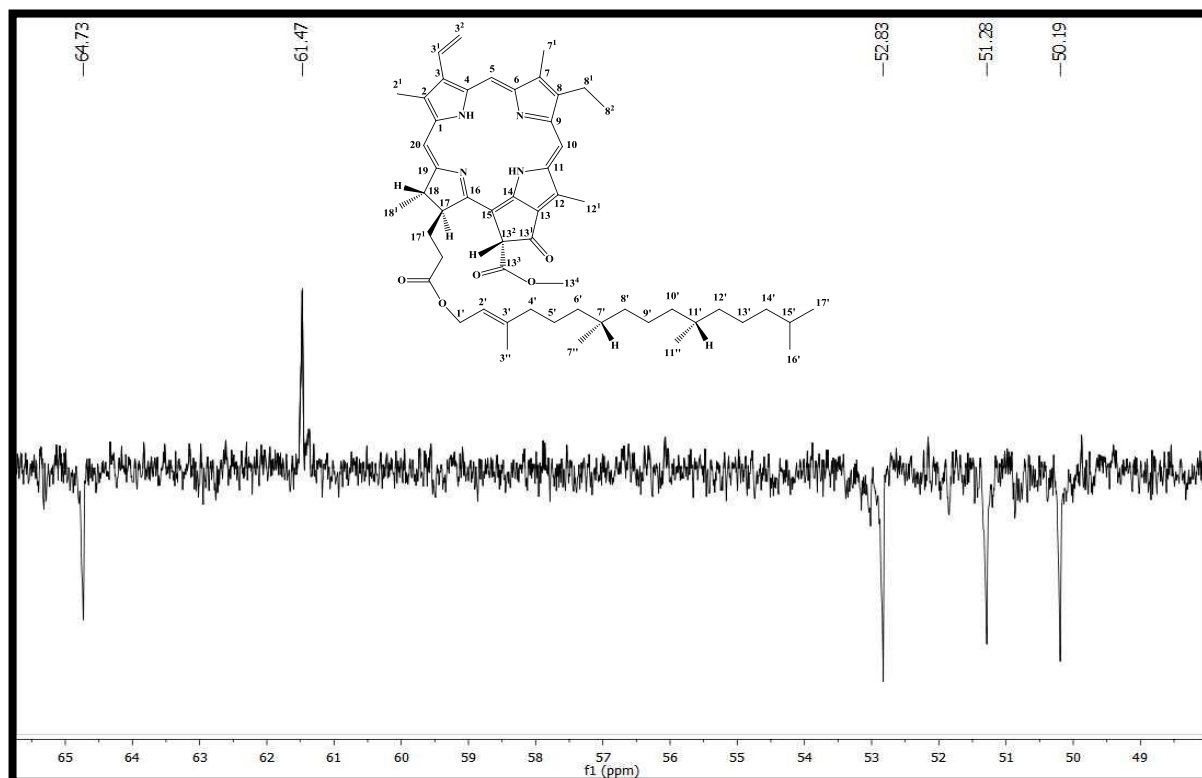
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 50: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ, CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-3* na região de 154,0-190,0 ppm.



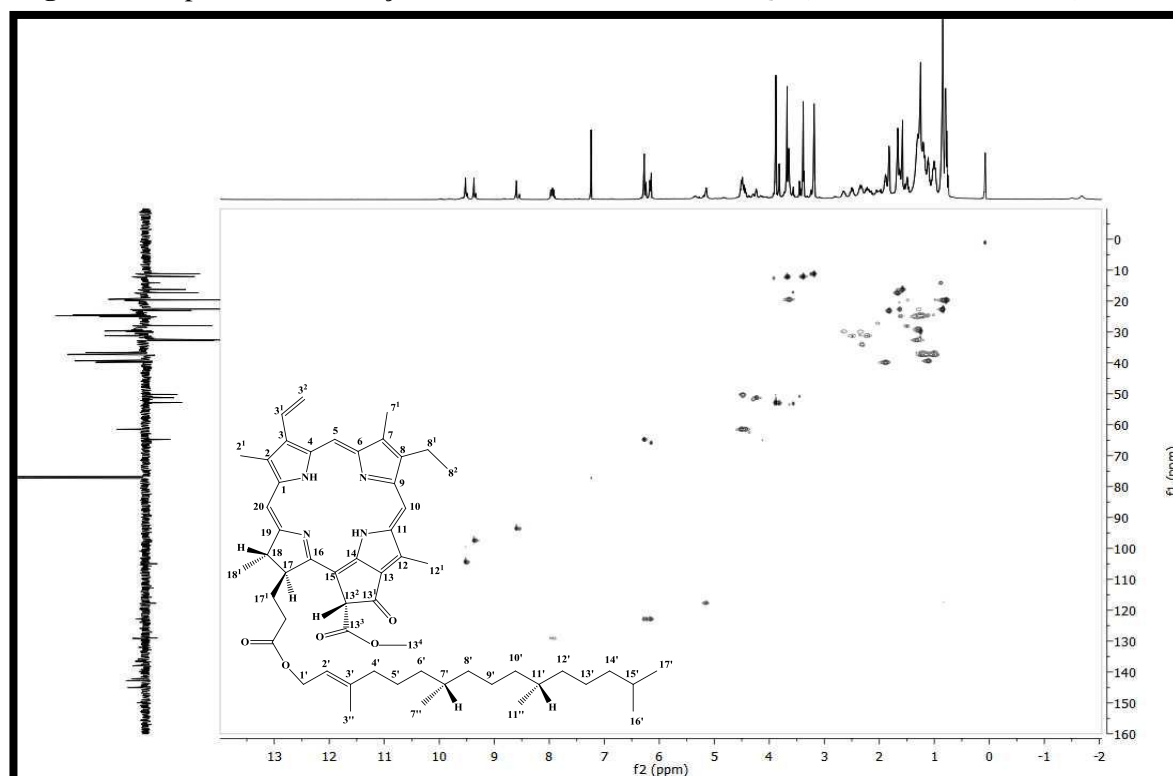
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 51: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ, CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-3* na região de 49,0-65,0 ppm.



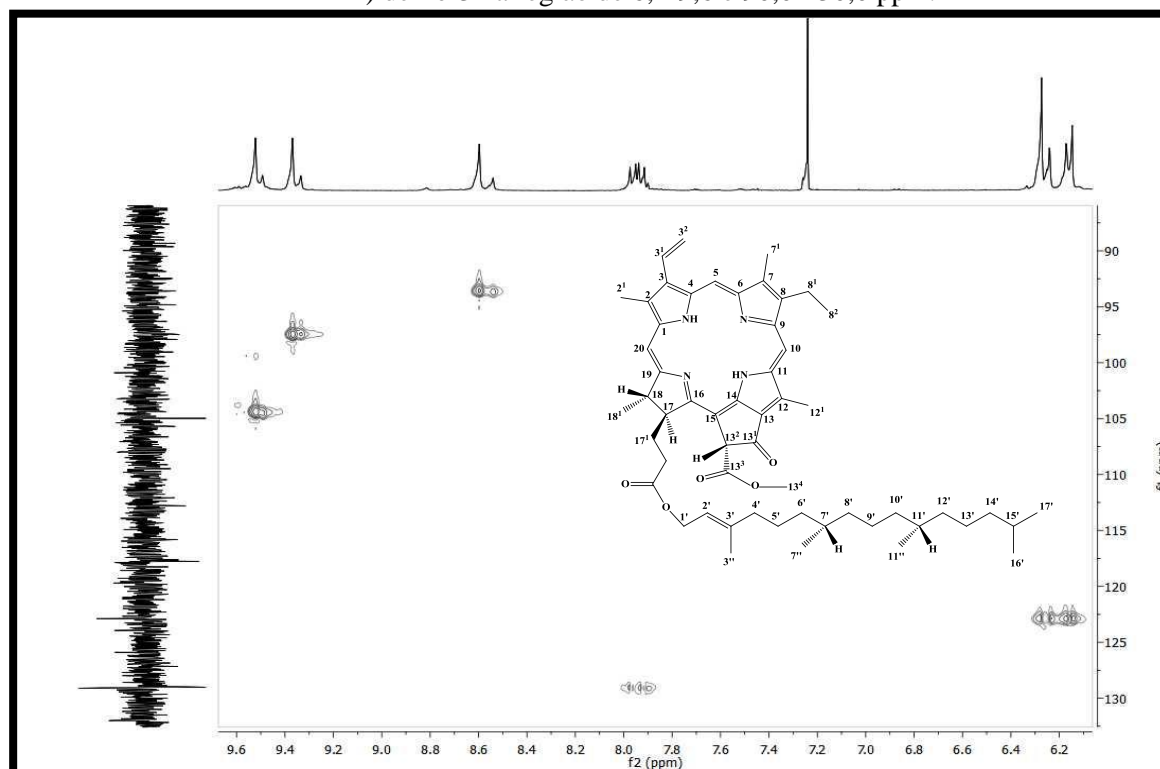
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 52: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-3*.



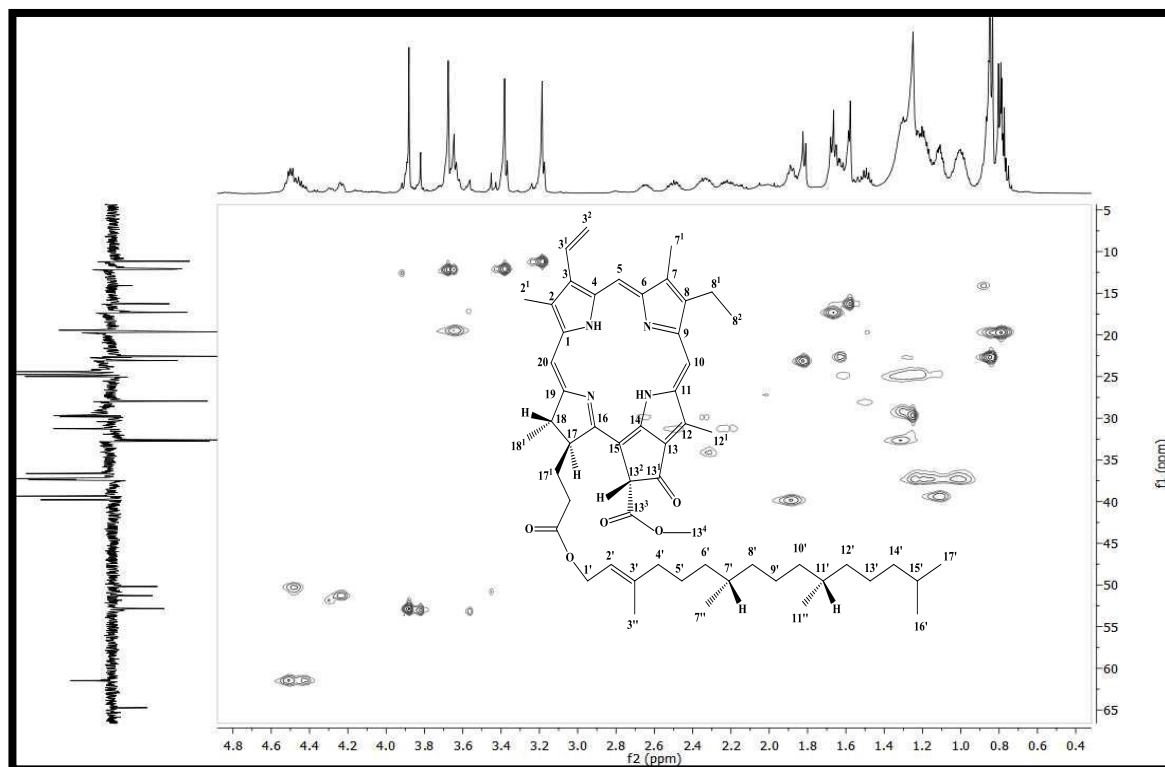
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 53: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-3* na região de 6,2-9,6 e 90,0-130,0 ppm.



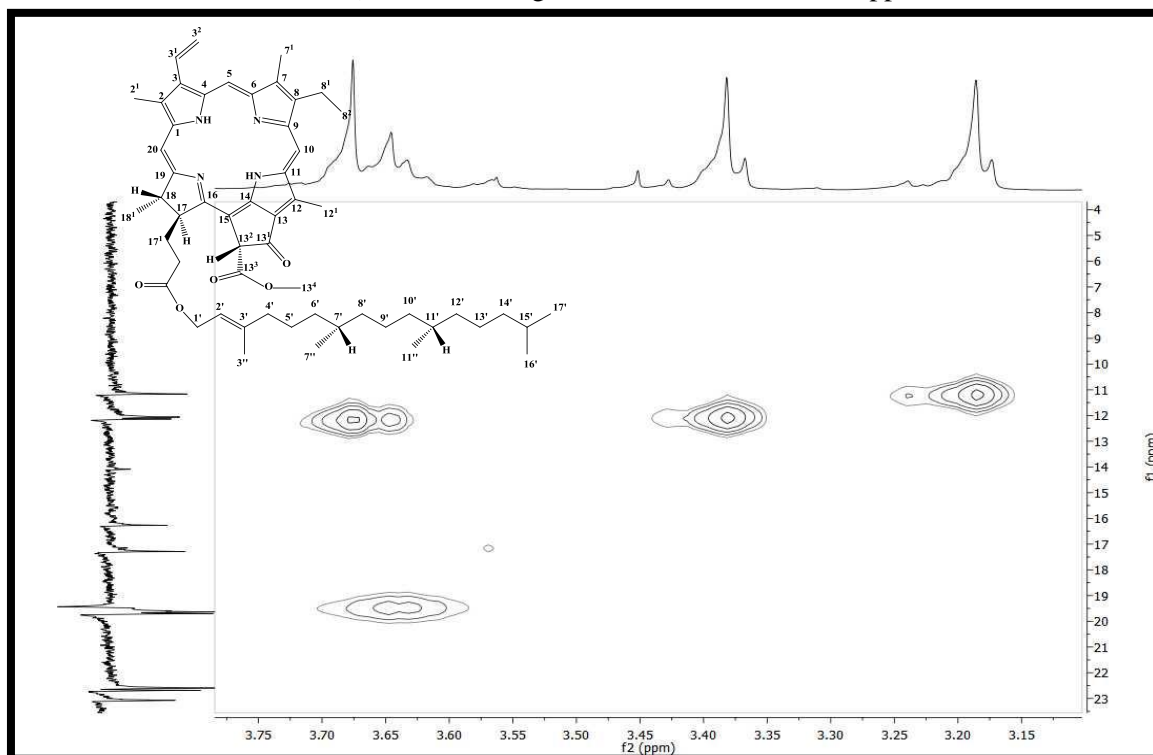
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 54: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-3* na região de 0,4-4,8 e 5,0-65 ppm.



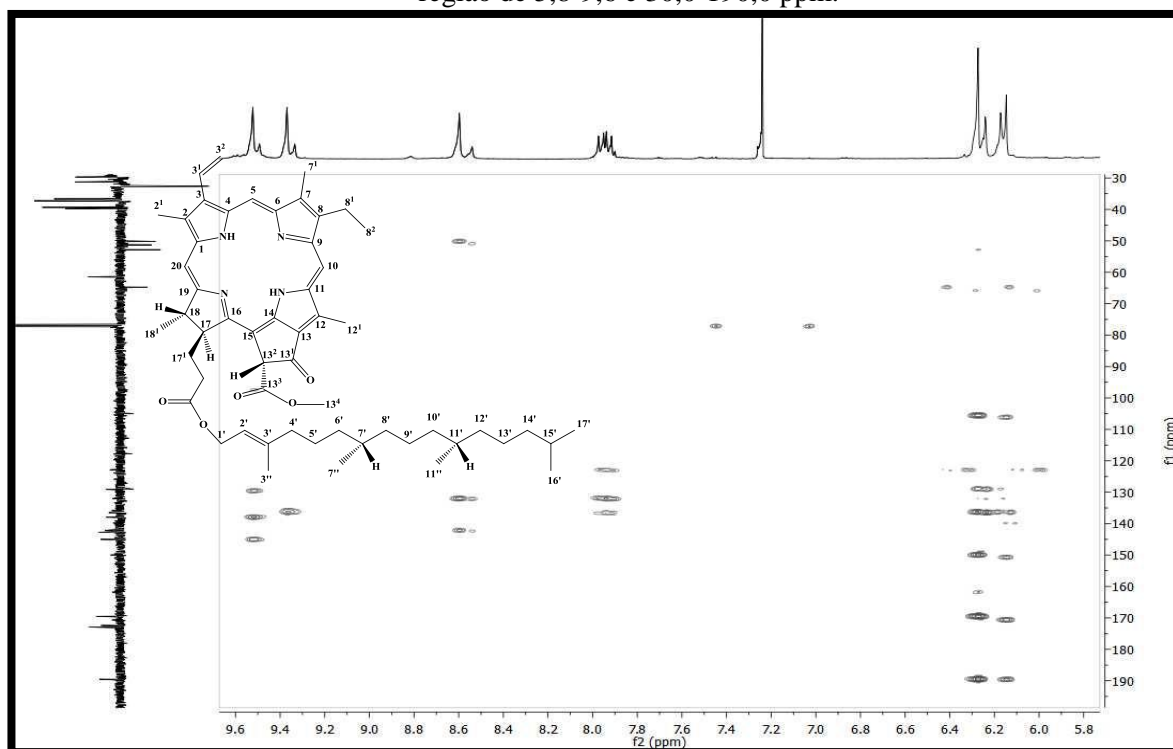
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 55: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-3* na região de 3,15-3,75 e 4,0-23,0 ppm.



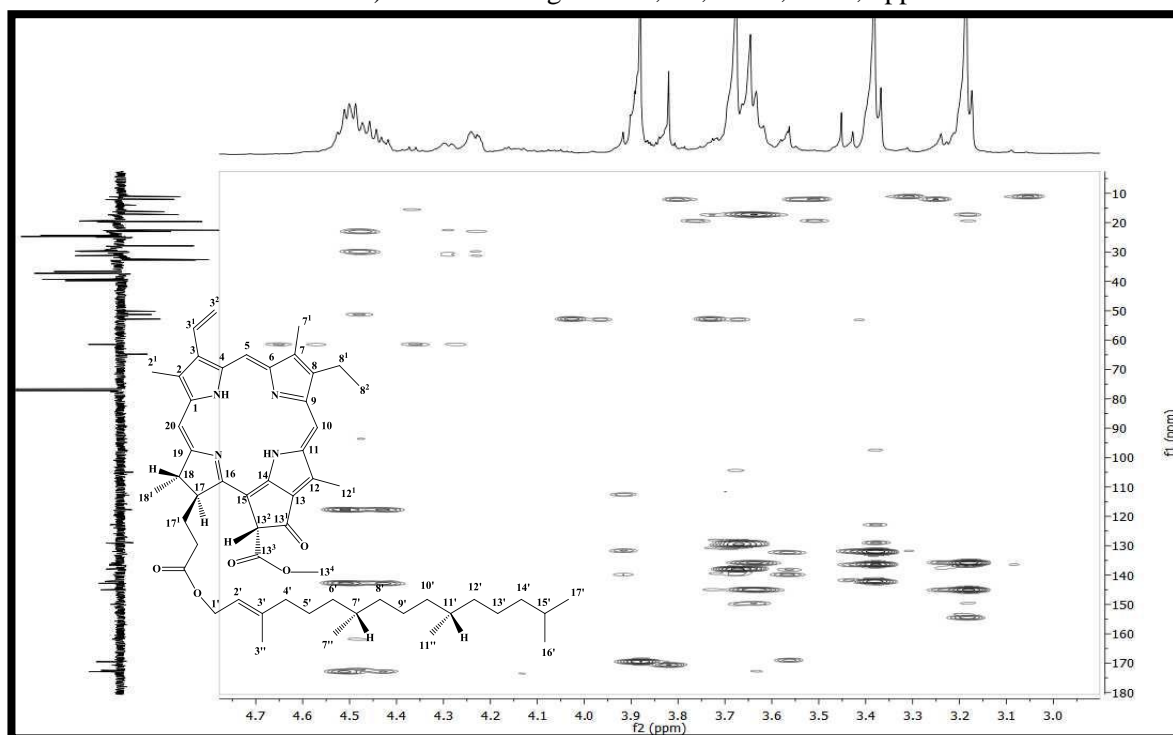
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 56: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-3* na região de 5,8-9,6 e 30,0-190,0 ppm.



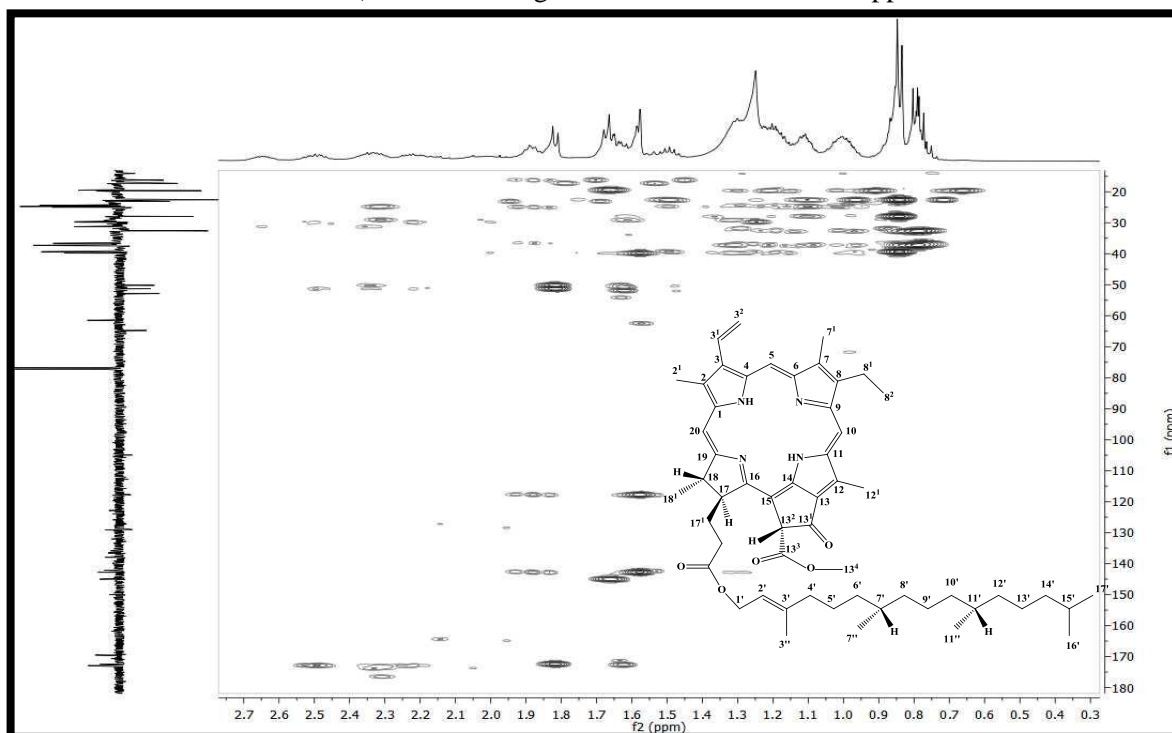
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 57: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-3* na região de 4,7-3,0 e 10,0-180,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 58: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-3* na região de 2,7-0,3 e 20,0-180,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

5.1.4 Caracterização estrutural de *Pc-4*

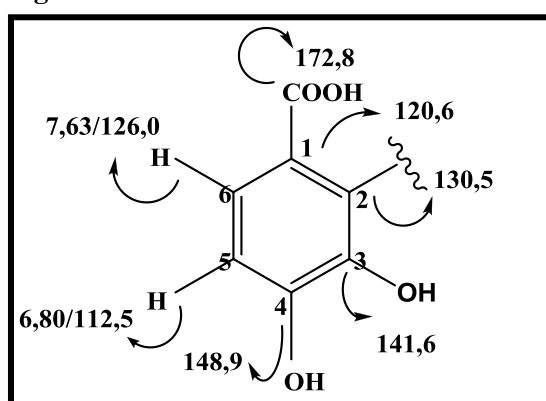
A substância codificada como *Pc-4* apresentou-se com um aspecto oleoso, de cor amarelada e totalmente solúvel em clorofórmio, possuindo massa de 91,9 mg, que corresponde a 0,04 % em relação ao peso bruto do pó dos frutos e 1,84 % em relação ao extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC.

O espectro de IV de *Pc-4* (**Figura 62**) apresentou uma banda larga de média intensidade em 3433 cm^{-1} sugestiva da presença de hidroxila fenólica na substância analisada (PAVIA *et al.*, 2001). Uma banda característica de carbonila de ácido foi verificada em torno de 1.685 cm^{-1} , bem como sinais indicativos da presença de estiramento $\text{C}=\text{C}$ de aromático em 1612 e 1496 cm^{-1} e de estiramento $\text{C}-\text{H}$ sp^2 ($=\text{C}-\text{H}$) permitindo propor a existência de um anel aromático na estrutura. Sugere-se que este anel pode ser do tipo tetrassubstituído, em virtude da presença de uma banda de absorção em $820,30\text{ cm}^{-1}$ que, de acordo com a literatura (PAVIA, 2010), é típico desse padrão de substituição. As bandas mais importantes e que fornecem mais informações sobre a estrutura dos compostos aromáticos são encontradas na região de baixa frequência, entre 900 e 675 cm^{-1} . Foi possível observar também bandas de absorção nas regiões de 2962 , 2924 e 2854 cm^{-1} , sugestivas de CH , CH_2 e CH_3 na molécula.

Ademais, bandas de média e forte intensidade em 1296 cm^{-1} e 1203 cm^{-1} indicaram a presença de estiramento C-O de ácido e C-O de álcool, respectivamente (SILVERSTEIN *et al.*, 1994; PAVIA *et al.*, 2001).

No espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) (**Figuras 63 e 64**) foi possível observar a presença de apenas dois sinais para hidrogênios aromáticos em $\delta_{\text{H}} 7,63$ (d, $J = 8,5\text{ Hz}$ 1H) e $\delta_{\text{H}} 6,80$ (d, $J = 8,5\text{ Hz}$, 1H), cuja constante de acoplamento sugere acoplamento orto e a presença de um anel tetrassubstituído (**Figura 59**), reforçando a proposta acima descrita dada pelo IV.

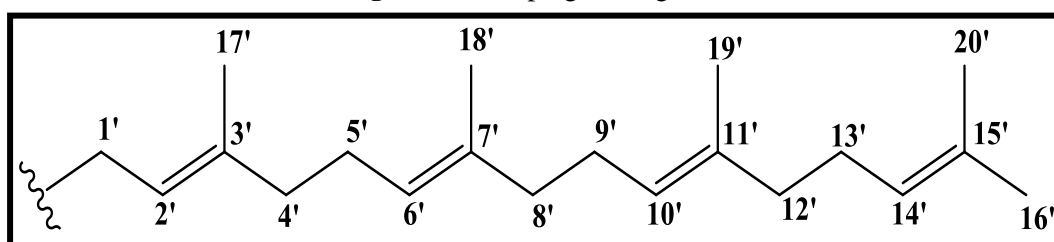
Figura 59: Anel tetrassubstituído de Pc-4.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Foi possível ainda identificar a presença de 4 singletos em $\delta_{\text{H}} 1,83$ (s,3H), $\delta_{\text{H}} 1,66$ (s,3H), $\delta_{\text{H}} 1,58$ (s,6H) e $\delta_{\text{H}} 1,56$ (s,3H), que sugerem a presença de 5 grupos metil vinílicos, sendo três com integração para nove hidrogênios, e um com integração para três. Estes sinais, associados às absorções em $\delta_{\text{H}} 5,26$ (t, $J = 6,5\text{ Hz}$ 1H) e $\delta_{\text{H}} 5,07$ (m, 3H), referentes a prótons olefínicos e, os sinais em $\delta_{\text{H}} 3,91$ (d, $J = 7,0\text{ Hz}$, 2H) (**Figura 65**), 2,07-2,12 (m, 4H), 2,01-2,06 (m, 4H) e 1,92-1,97 (m, 4H) (**Figura 66**), indicativos de deslocamentos para hidrogênios metilênicos, levam a supor a existência de um grupo geranyl-geranyl na estrutura (**Figura 60**).

Figura 60: Grupo geranyl-geranyl.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

O RMN¹³C-APT (CDCl₃, 125 MHz) (**Figura 67**), mostrou a presença de 27 sinais para carbonos, sendo 9 atribuídos a carbonos não hidrogenados (δ_C : 172,84, 148,91, 142,62, 139,25, 135,82, 135,02, 131,23, 130,46 e 120,55, sendo o deslocamento em δ_C 172,84 sugestivo da presença de um grupo carboxílico na molécula), 6 referentes a carbonos metínicos (δ_C : 125,97, 124,39, 124,12, 123,49, 121,55 e 112,46) (**Figura 68**), 7 atribuídos a carbonos metilênicos (δ_C : 39,69, 39,66, 39,65, 26,76, 26,57, 26,49 e 26,31) e 5 a carbonos metílicos (δ_C = 25,65, 17,65, 16,27, 16,07 e 15,97)) (**Figura 69**).

No espectro de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C-HMQC (CDCl₃, 500/ 125 MHz) (**Figuras 70 e 71**) foram observadas as correlações em δ_H 7,63/ δ_C 125,97 e δ_H 6,80/ δ_C 112,46 sugestivas para as posições 6 e 5 do anel aromático, respectivamente. Ainda pela análise do espectro de HMQC foi possível observar as correlações diretas de δ_H 5,26/ δ_C 121,55 (**Figura 72**); δ_H 2,07-2,12/ δ_C 39,65 e δ_C 26,31; δ_H 2,01-2,06/ δ_C 39,69 e 26,57; δ_H 1,92-1,97/ δ_C 39,66 e 26,76; δ_H 1,83/ δ_C 16,27; δ_H 1,66/ δ_C 25,65; δ_H 1,58/ δ_C 16,07 e δ_C 17,65; δ_H 1,56/ δ_C 15,9 (**Figura 73**).

O sinal em δ_H 7,63 (H-6) mostrou correlações a longa distância (HMBC) (**Figuras 74 e 76**) com δ_C 172,84, δ_C 148,91 e δ_C 130,46, o que permite assinalar o δ_C 172,84 para a carbonila do grupo ácido, bem como sugerir o δ_C 148,91 para o carbono com substituinte oxigenado da posição 4 e, o δ_C 130,46, para a posição 2 da estrutura de *Pc-4*. O sinal em δ_H 6,80 mostrou correlação no HMBC com δ_C 148,91 a duas ligações (²J), referente ao carbono C-4, bem como correlações a três ligações (³J) com δ_C 120,55 (C-1) e δ_C 142,62 (C-3) (**Figura 76**) o que corroborou com o deslocamento em δ_C 148,91 para o C-4 e sugeriu o δ_C 142,62 para a posição 3 e o δ_C 120,55 para a posição 1.

As correlações diretas do espectro de HMQC de *Pc-4* observadas anteriormente na figura 72 aliadas às correlações à longa distância de δ_H 5,26/ δ_C 26,49, δ_C 130,46, δ_C 16,27 e δ_C 39,65 (**Figura 77**) permitiu confirmar o δ_C 26,49 e δ_C 130,46 para as posições C-1' e C-2, respectivamente e atribuir δ_C 16,27 e δ_C 39,65 para a Me-17' e C-4', respectivamente, além de δ_H 5,26/ δ_C 121,55 para C-2'.

Os hidrogênios metílicos da posição 17' em δ_H 1,83 mostraram correlações no HMBC (**Figura 76**) com os carbonos δ_C 121,55 e δ_C 139,25 juntamente com a correlação de δ_H 2,07-2,12/ δ_C 139,25 e δ_C 16,27 possibilitando atribuir δ_C 139,25 para a posição C-3' e corroborar a absorção dos sinais de carbono em δ_C 121,55 e δ_C 16,27 para as posições C-2' e C-17' e, conseqüentemente, o sinal δ_H 2,07-2,12 para os hidrogênios metilênicos 4' e 5'.

No espectro de correlação HMQC (**Figura 70**) foram observadas as correlações δ_H 5,07/ δ_C 123,49, δ_C 124,12 e δ_C 124,39; δ_H 2,07-2,12/ δ_C 39,65 e 26,31; δ_H 2,01-2,06/ δ_C 39,7 e

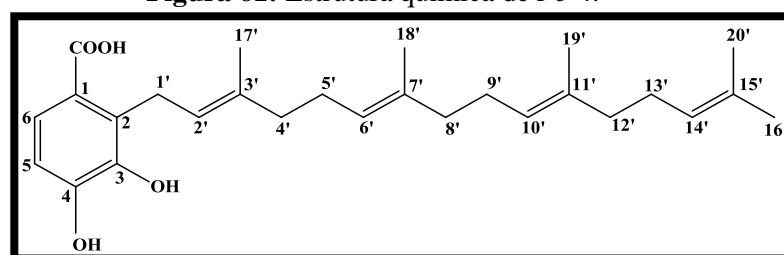
δ_C 26,57; δ_H 1,92-1,97/ δ_C 26,76 e δ_C 39,66 ou δ_C 39,69 e δ_H 1,58/ δ_C 16,07 e δ_C 15,97 aliadas às correlações constatadas no HMBC (**Figura 74 e 75**) δ_H 5,07/ δ_C 135,82, δ_C 26,76, δ_C 26,57, δ_C 26,31, δ_C 17,65 e δ_C 16,07; δ_H 2,07-2,12/ δ_C 139,25, 123,49; δ_H 2,01-2,06/ δ_C 135,02, δ_C 124,39, δ_C 131,23; δ_H 1,92-1,97/ δ_C 26,76, δ_C 124,12, δ_C 16,07 e δ_C 135,82; δ_H 1,58/ δ_C 135,82, δ_C 39,66 e δ_C 135,02, tornou possível assinalar os sinais δ_C 139,25, δ_C 26,31, δ_C 123,49, δ_C 135,82 ADICIONAR ESPECTRO QUE MOSTRE, δ_C 39, δ_C 39,66, δ_C 26,76, δ_C 124,12, δ_C 135,02, δ_C 39,69, δ_C 26,57, δ_C 124,39, δ_C 131,23, δ_C 16,27 e δ_C 16,07 para as posições C-3', C-5', C-6', C-7', C-8', C-9', C-10', C-11', C-12', C-13', C-14', C-15', C-17' e C-18', respectivamente, indicativos da presença do grupo geranyl-geranyl.

A correlação à longa distância (HMBC) do δ_H 3,91 (H-1') com sinais de carbono do anel aromático em δ_C 120,55 (C-1), δ_C 130,46 (C-2) e δ_C 142,62 (C-3) indica que o grupo geranyl-geranyl está ligado ao anel aromático e que este sinal δ_H 3,91 é atribuído ao hidrogênio da posição 1', estando diretamente correlacionado (HMQC) com o carbono δ_C 26,49 (posição C-1') (**Figura 74**).

O espectro HMBC e suas expansões permitiram ainda observar as correlações δ_H 1,56/ δ_C 131,23 e δ_H 1,66/ δ_C 131,23 e 124,39 (**Figura 78**), além de correlações diretas δ_H 1,56/ δ_C 15,97 e δ_H 1,66/ δ_C 25,65 (**Figura 73**). Foi possível confirmar δ_C 124,39 e δ_C 131,23 para as posições C-14' e C-15' e atribuir δ_C 15,97 e δ_C 25,65 para as posições C-20' e C-16'.

Sendo assim, a análise de todos estes deslocamentos e suas interações espectrais uni e bidimensionais, levou a supor que *Pc-4* tratava-se de um derivado prenilado do ácido benzoico. Comparações com a literatura (MAXELL; RAMPERSAD *et al.*, 1989) (**Tabelas 14 e 15**) permitiu identificar *Pc-4* como o ácido-2-geranyl-3,4-di-hidróxidobenzóico (**Figura 61**), que está sendo isolado pela segunda vez no gênero *Piper* e pela primeira vez em *Piper caldense* C.DC.

Figura 61: Estrutura química de *Pc-4*.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 14: Comparação dos dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de *Pc-4* registrados em CDCl_3 com dados de RMN ^1H (80 MHz) e RMN ^{13}C (20 MHz) do modelo da literatura *Mo-7* registrados em CDCl_3 (MAXELL & RAMPERSAD *et al.*, 1989). Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.

HMQC (<i>Pc-4</i>)		<i>Mo-7</i>		
Posição	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	120,55	-	121,70
2	-	130,46	-	132,40
3	-	142,62	-	143,90
4	-	148,91	-	150,00
5	6,80 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	112,46	6,85 (d, $J_{5,6} = 9$ Hz)	113,30
6	7,63 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	125,97	7,68 (d, $J_{6,5} = 9$ Hz)	125,30
1'	3,91 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H)	26,49	3,92 (d, $J_{1',2'} = 7$ Hz)	29,90
2'	5,26 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H)	121,55	5,30 (t, $J_{2',1'} = 7$ Hz)	122,80
3'	-	139,25	-	140,00
4'	2,07-2,12 (m, 2H)	39,65	2,06 (m)	40,00
5'	2,07-2,12 (m, 2H)	26,31	2,06 (m)	26,80
6'	5,07 (m, 1H)	123,49	5,10 (m)	124,70
7'	-	135,82	-	136,90
8'	1,92-1,97 (m, 2H)	39,66	2,06 (m)	40,00
9'	1,92-1,97 (m, 2H)	26,76	2,06 (m)	26,90
10'	5,07 (m, 1H)	124,12	5,10 (m)	125,50
11'	-	135,02	-	136,10
12'	2,01-2,06 (m, 2H)	39,69	2,06 (m)	40,00
13'	2,01-2,06 (m, 2H)	26,57	2,06 (m)	27,00
14'	5,07 (m, 1H)	124,39	5,10 (m)	126,80
15'	-	131,23	-	131,60
16'	1,66 (s, 3H)	25,65	1,68 (sl)	26,00
17'	1,83 (s, 3H)	16,27	1,86 (sl)	16,50
18'	1,58 (s, 3H)	16,07	1,60 (sl)	16,30
19'	1,58 (s, 3H)	17,65	1,60 (sl)	16,30
20'	1,56 (s, 3H)	15,97	1,60 (sl)	17,80
COOH	-	172,84	-	173,50

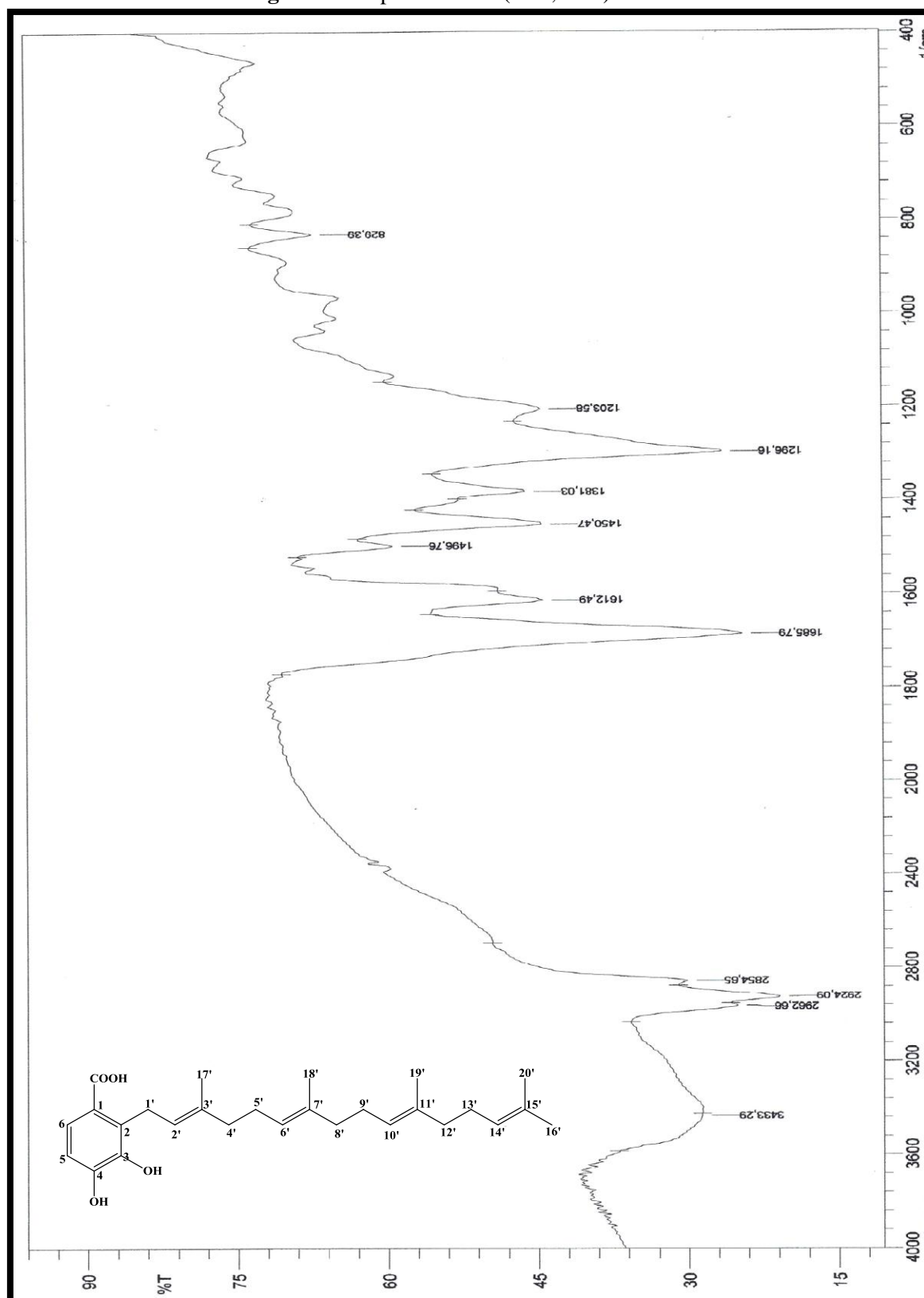
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 15: Dados espectrais de HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de *Pc-4*.

Posição	<i>Pc-4</i>	HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$	
	δ_{H}	2J	3J
1	-		
2	-		
3	-		
4	-		
5	6,80 (d, $J = 8,50$ Hz, 1H)	C-6; C-4; C-2	C-1; C-3
6	7,63 (d, $J = 8,50$ Hz, 1H)		C-2; C-4; COOH
1'	3,91 (d, $J = 6,75$ Hz, 1H)	C-2; C-2'	C-1; C-3; C-3'
2'	5,26 (t, $J = 6,75$ Hz, 1H)		C-2; C-4', C-17'
3'	-		
4'	2,07-2,12 (m, 2H)	C-3'	C-6'
5'	2,07-2,12 (m, 2H)	C-6'	C-3'
6'	5,07 (m, 1H)	C-5'	C-18'
7'	-		
8'	1,96 (m, 2H)	C-9'	C-10'; C-18'
9'	1,92-1,97 (m, 2H)	C-10'; C-8'	C-7'
10'	5,07 (m, 1H)	C-9'	C-7'
11'	-		
12'	2,01-2,06 (m, 2H)	C-11'	C-14'
13'	2,01-2,06 (m, 2H)	C-14'	C-11'; C-15'
14'	5,07 (m, 1H)	C-13'	C-20'
15'	-		
16'	1,66 (s, 3H)	C-15'	C-14'
17'	1,83 (s, 3H)	C-3'	C-2'
18'	1,58 (s, 3H)	C-7'	C-6'
19'	1,58 (s, 3H)	C-11'	
20'	1,56 (s, 3H)	C-15'	
COOH	-		

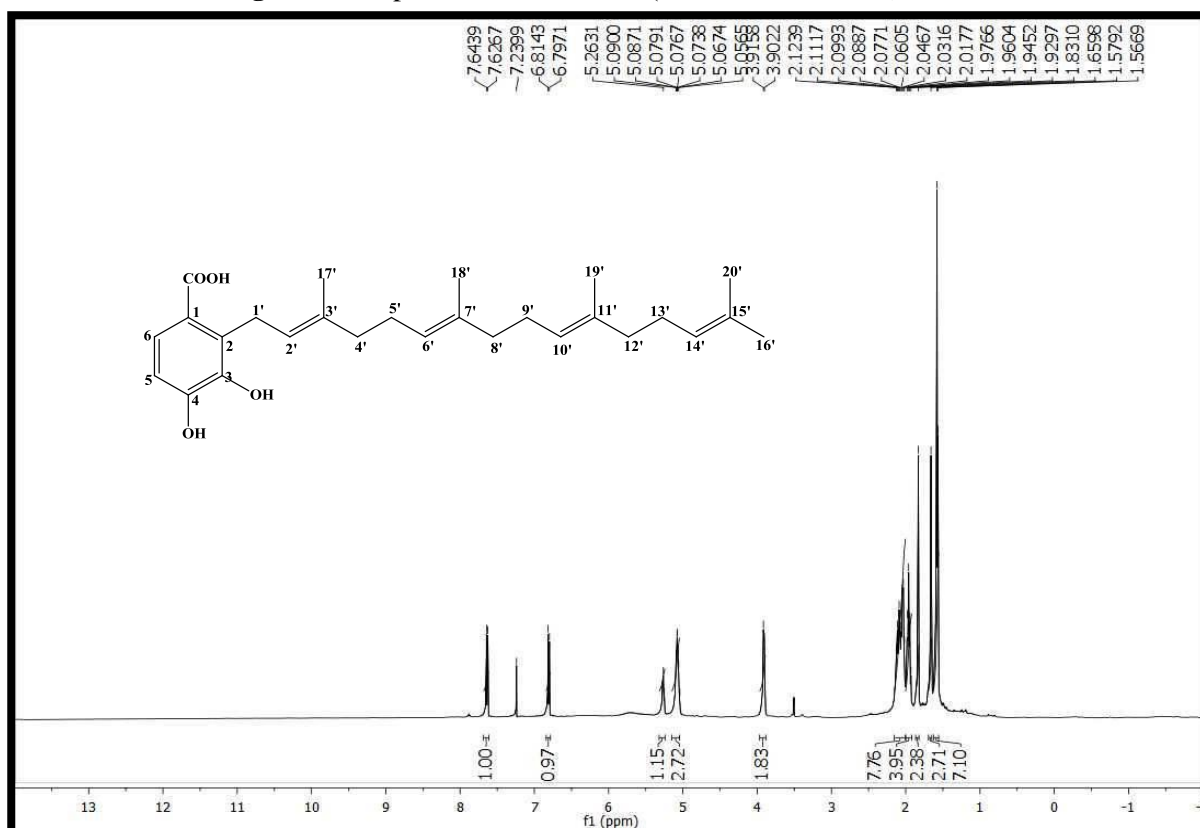
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 62: Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de *Pc-4*.



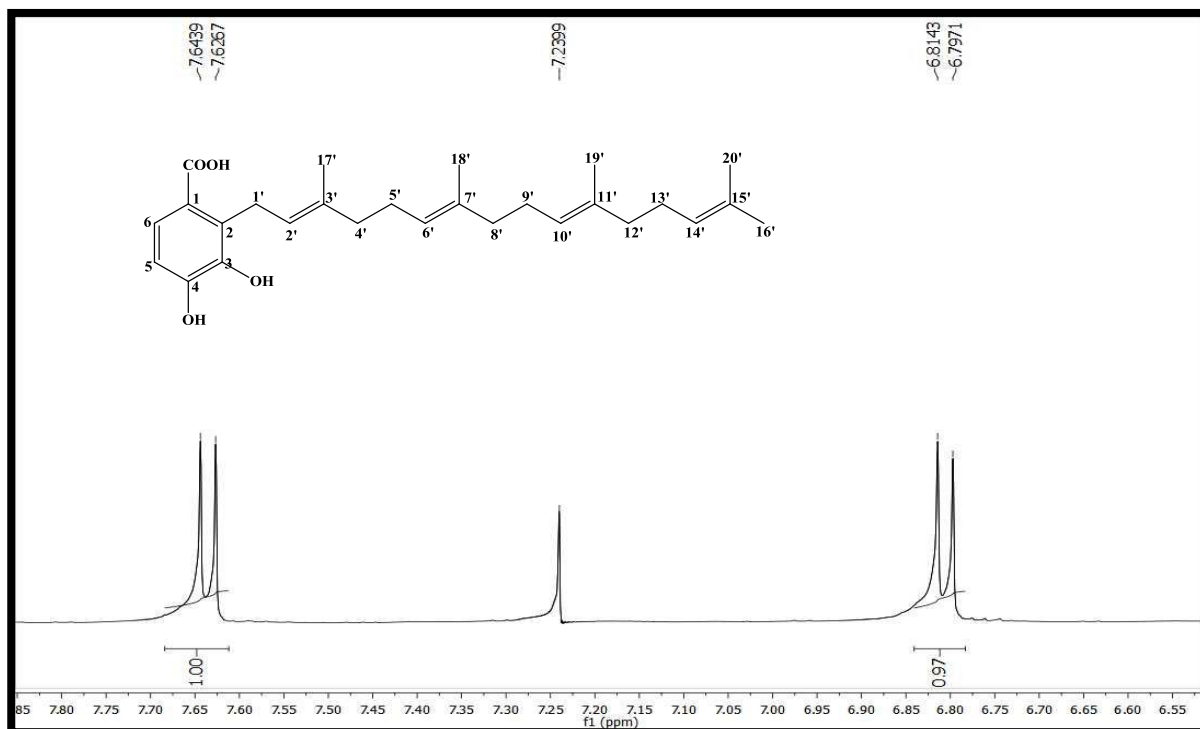
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 63: Espectro de de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-4*.



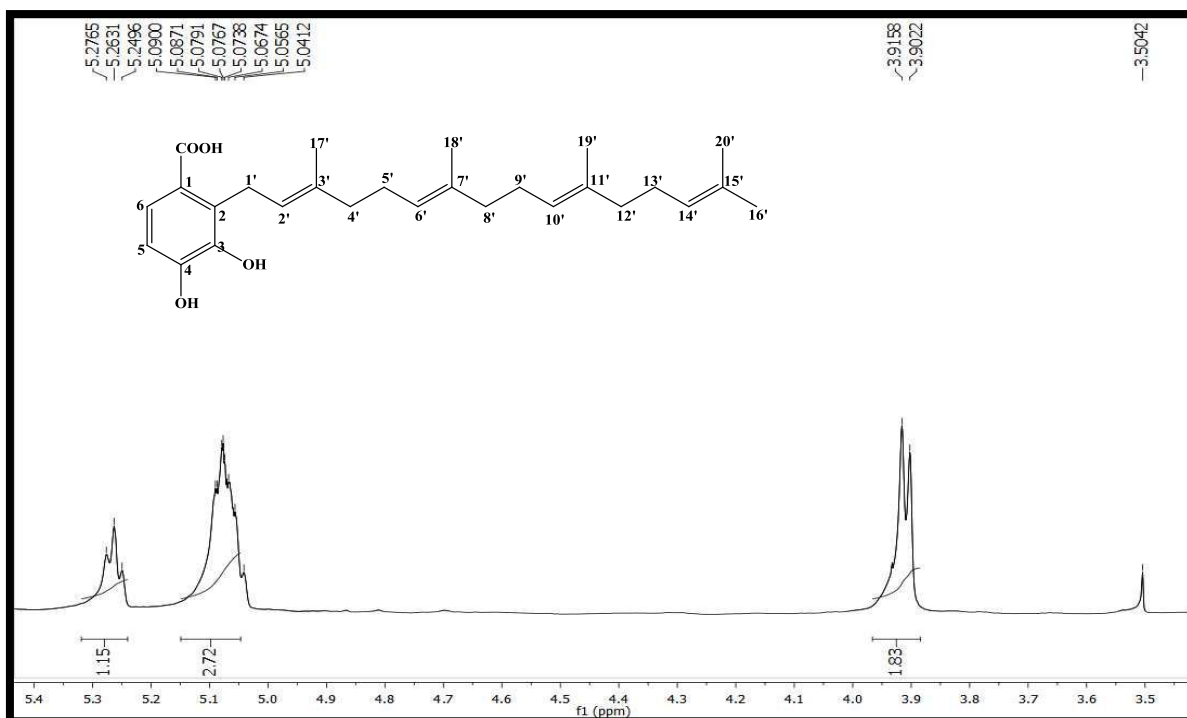
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 64: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-4* na região de 6,55-7,80 ppm.



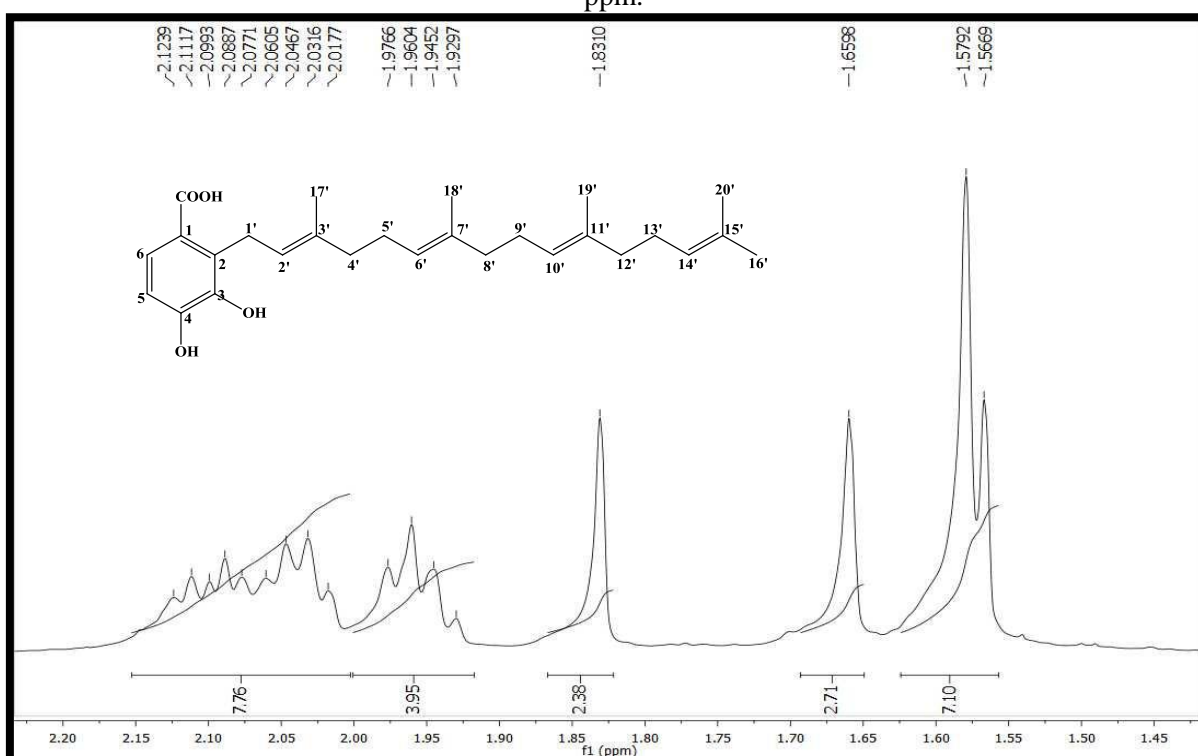
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 65: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-4* na região de 5,40-3,50 ppm.



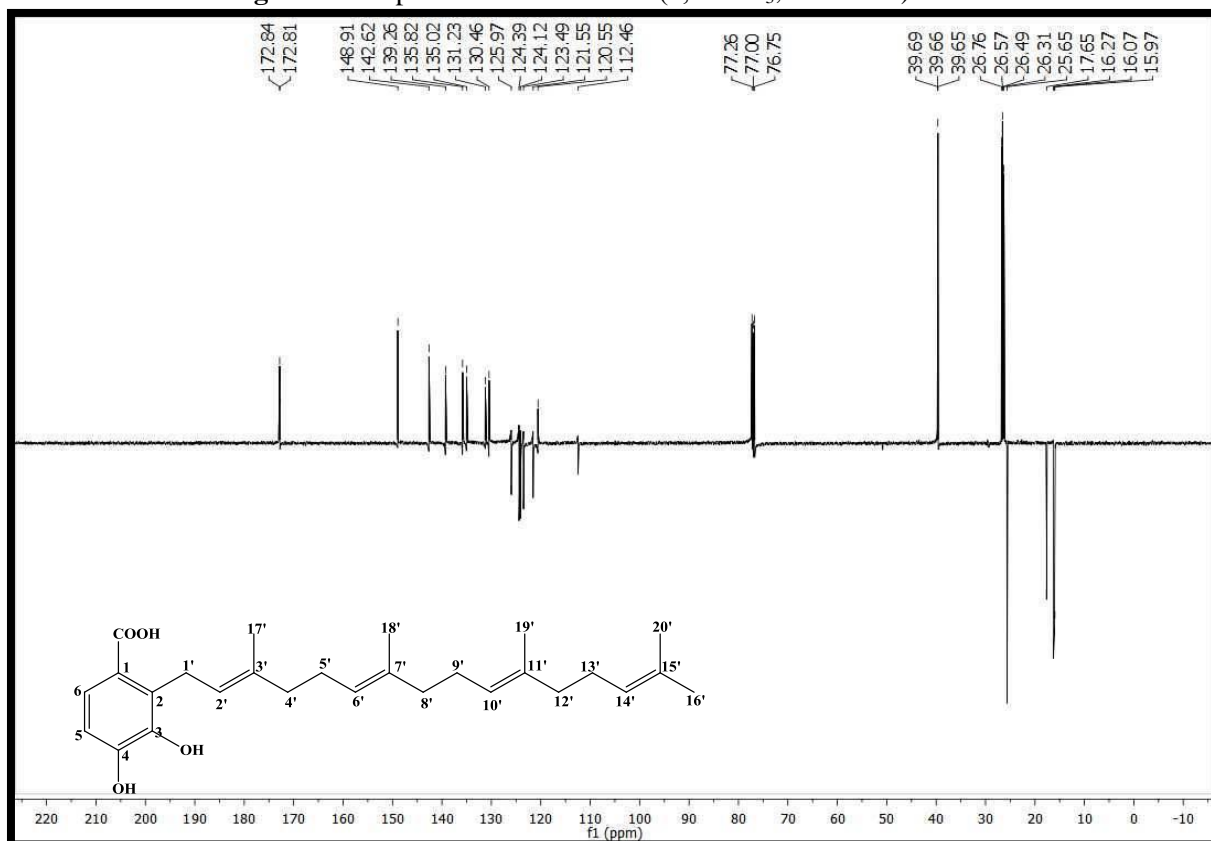
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 66: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-4* na região de 2,20-1,45 ppm.



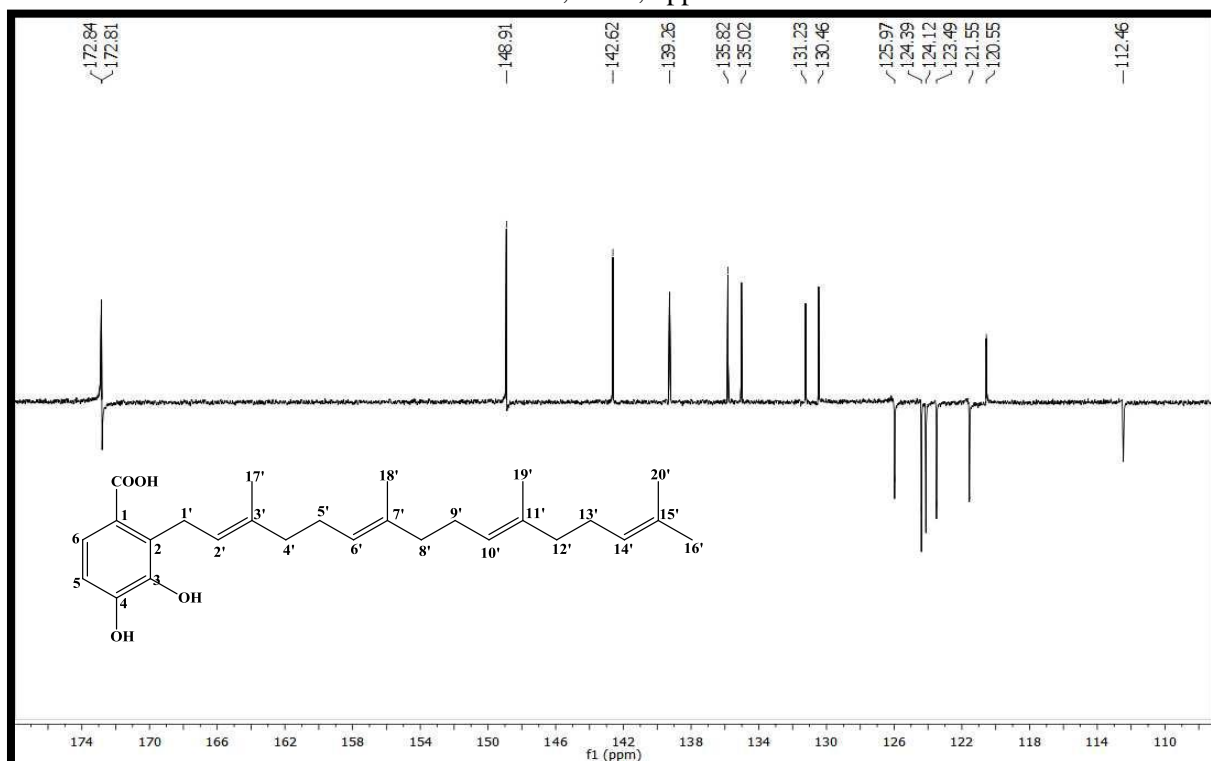
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 67: Espectro de de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-4*.



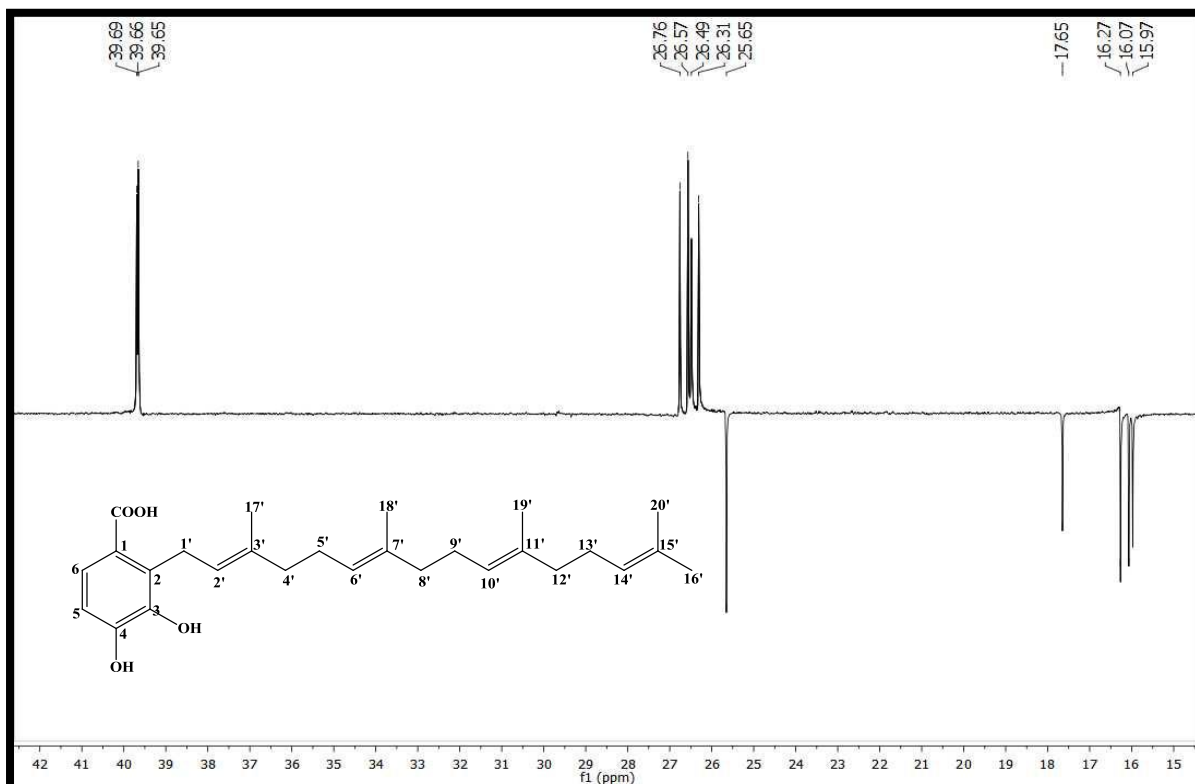
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 68: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-4* na região de 110,0-174,0 ppm.



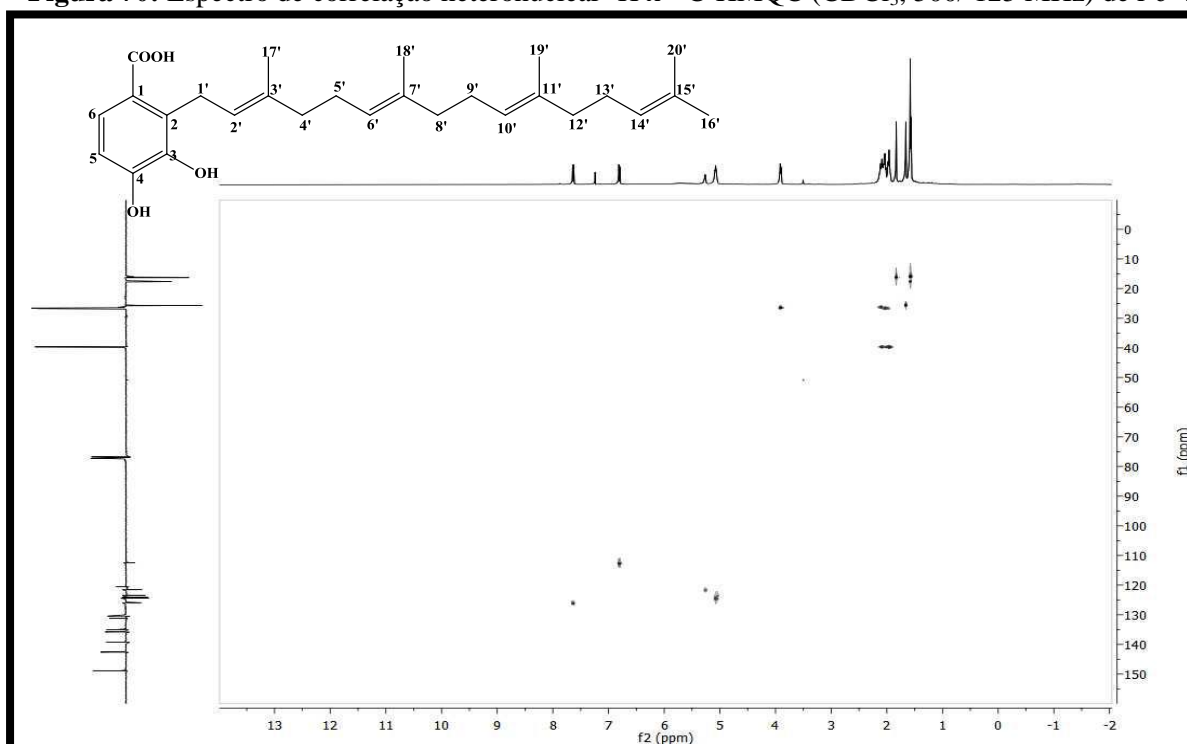
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 69: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-4* na região de 110,0-174,0 ppm.



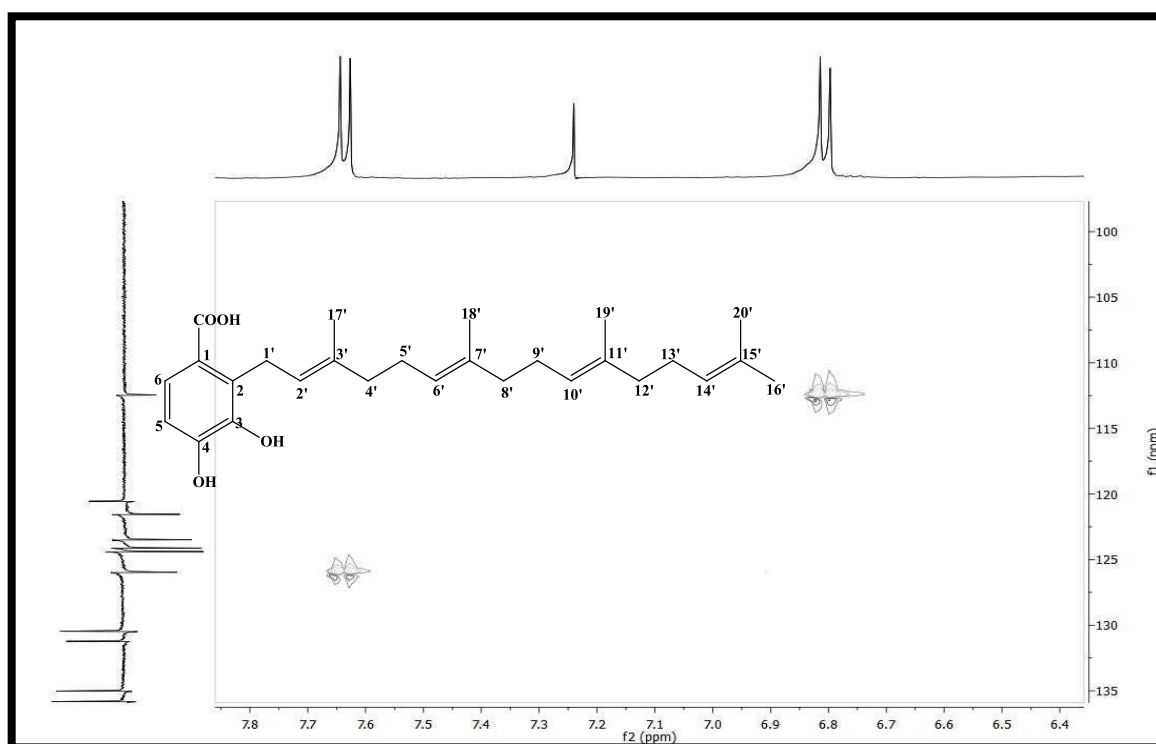
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 70: Espectro de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C-HMQC (CDCl₃, 500/ 125 MHz) de *Pc-4*.



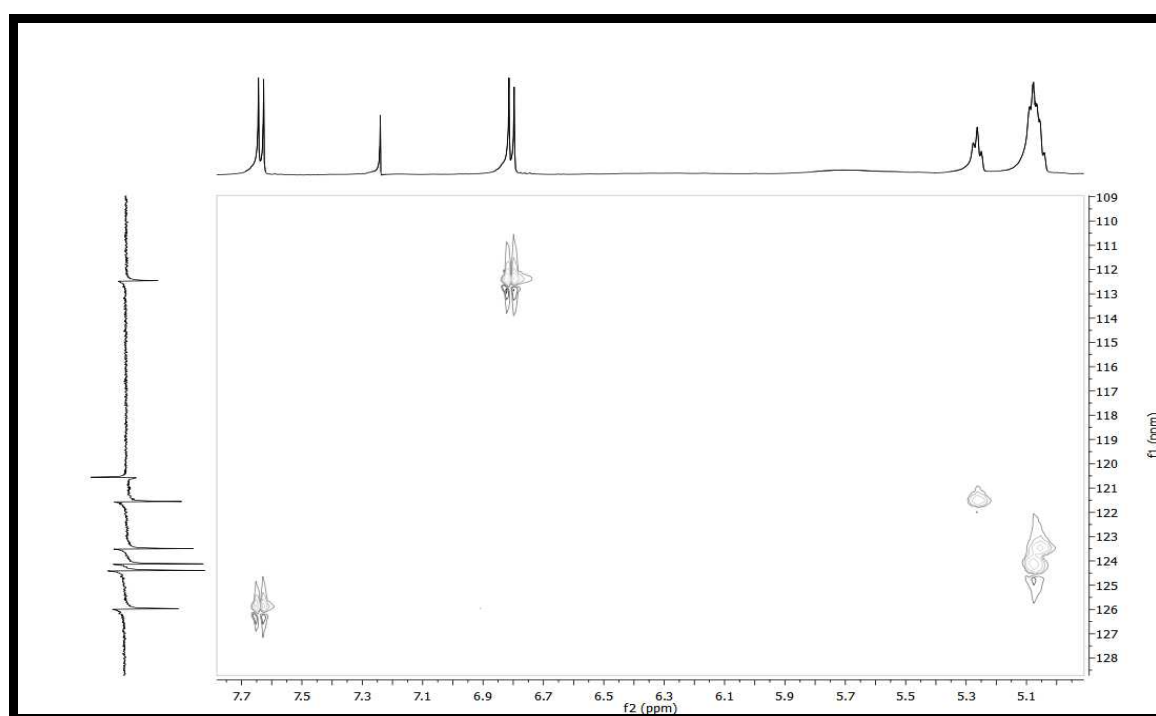
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 71: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-4* na região de 6,4-7,8 e 100,0-1,05 ppm.



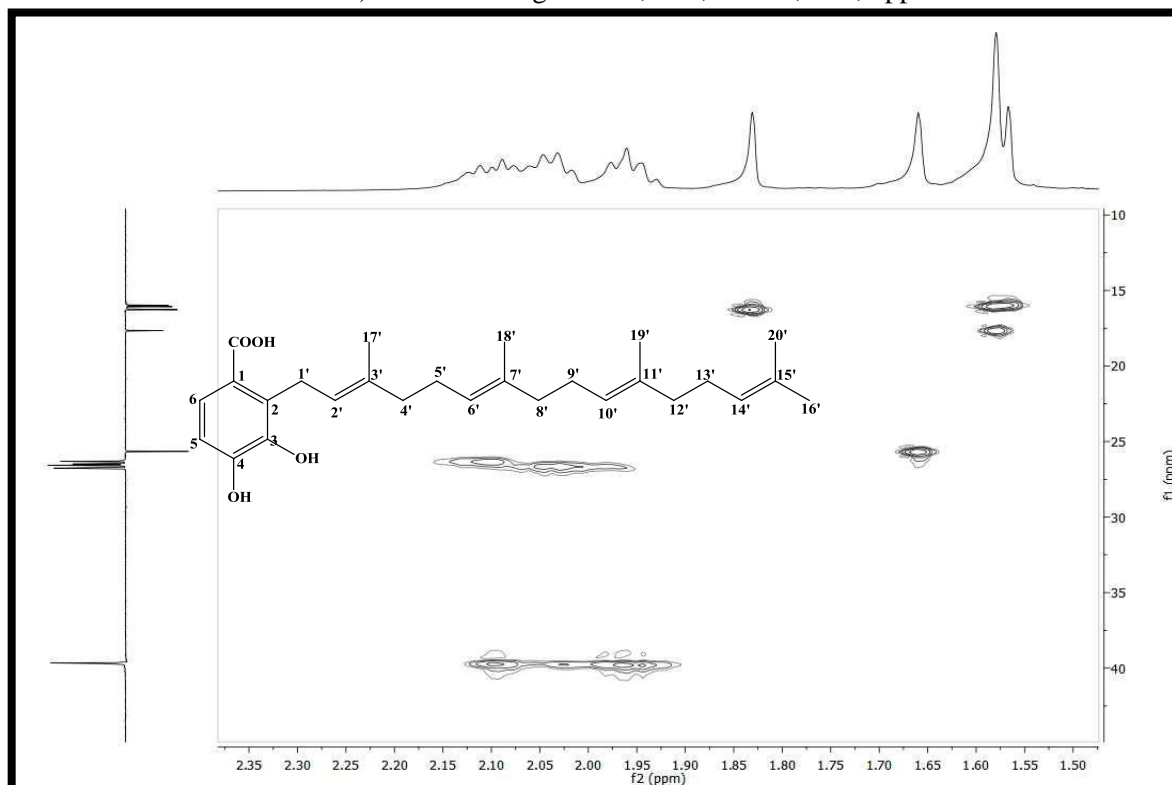
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 72: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-4* na região de 5,1-7,7 e 109,0-128,0 ppm.



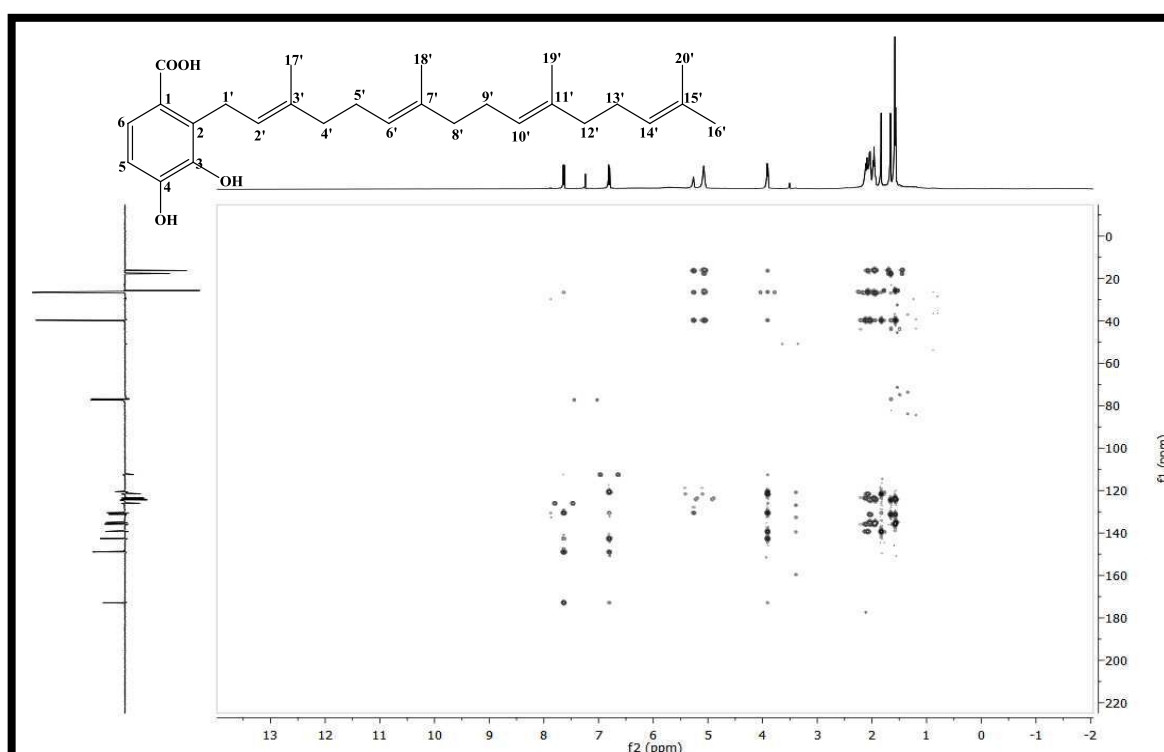
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 73: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-4* na região de 1,50-2,35 e 10,0-40,0 ppm.



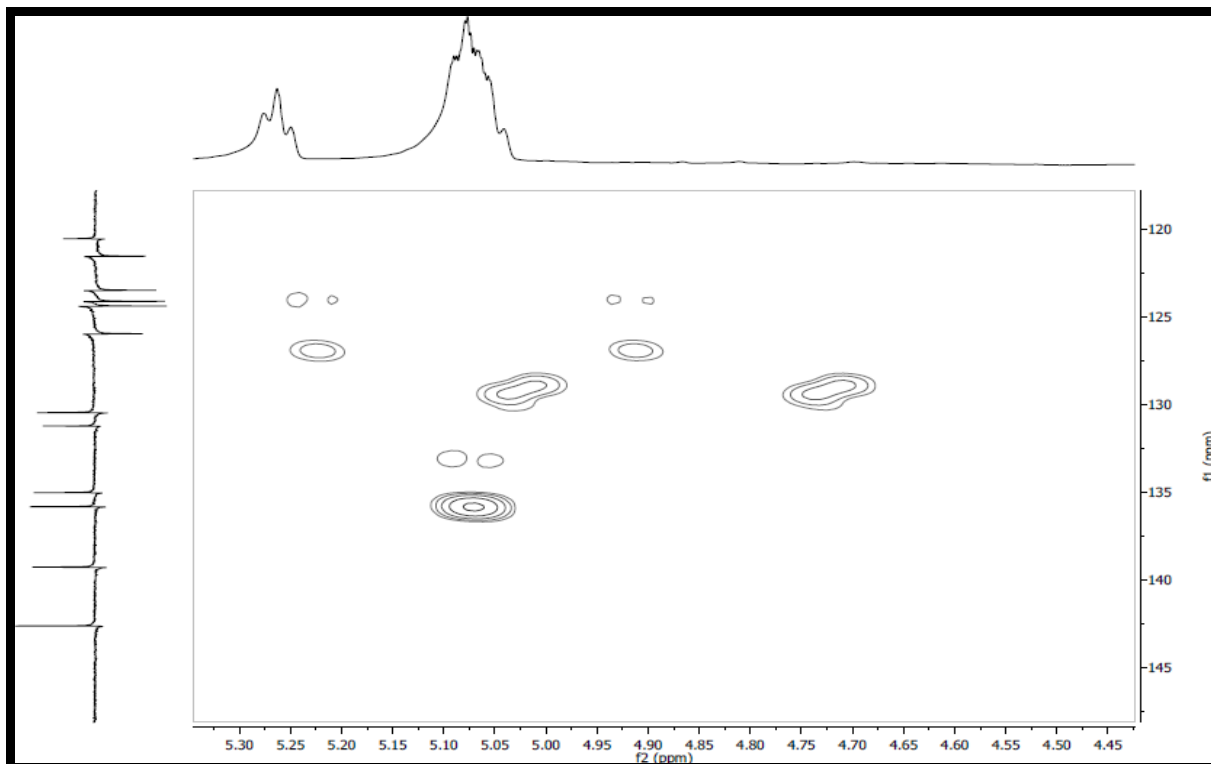
Fonte: Elaboração própria, 2013

Figura 74: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-4*.



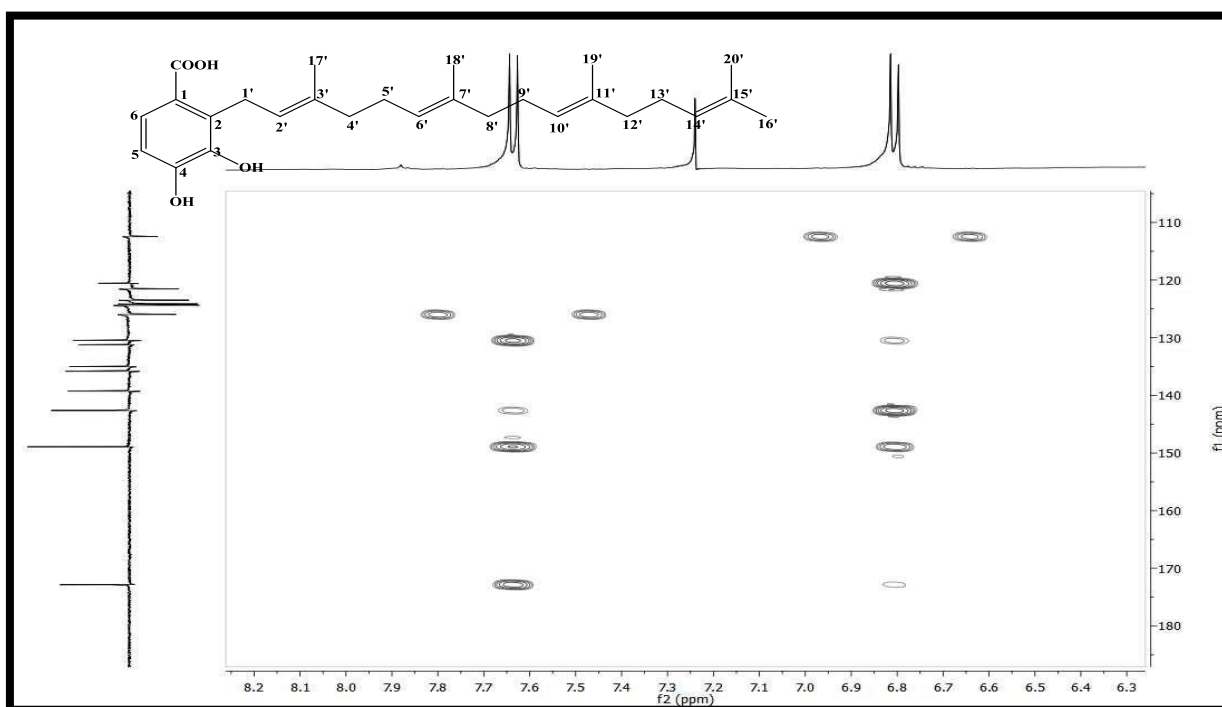
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 75: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-4* na região de 5,30-4,45 e 120-145 ppm.



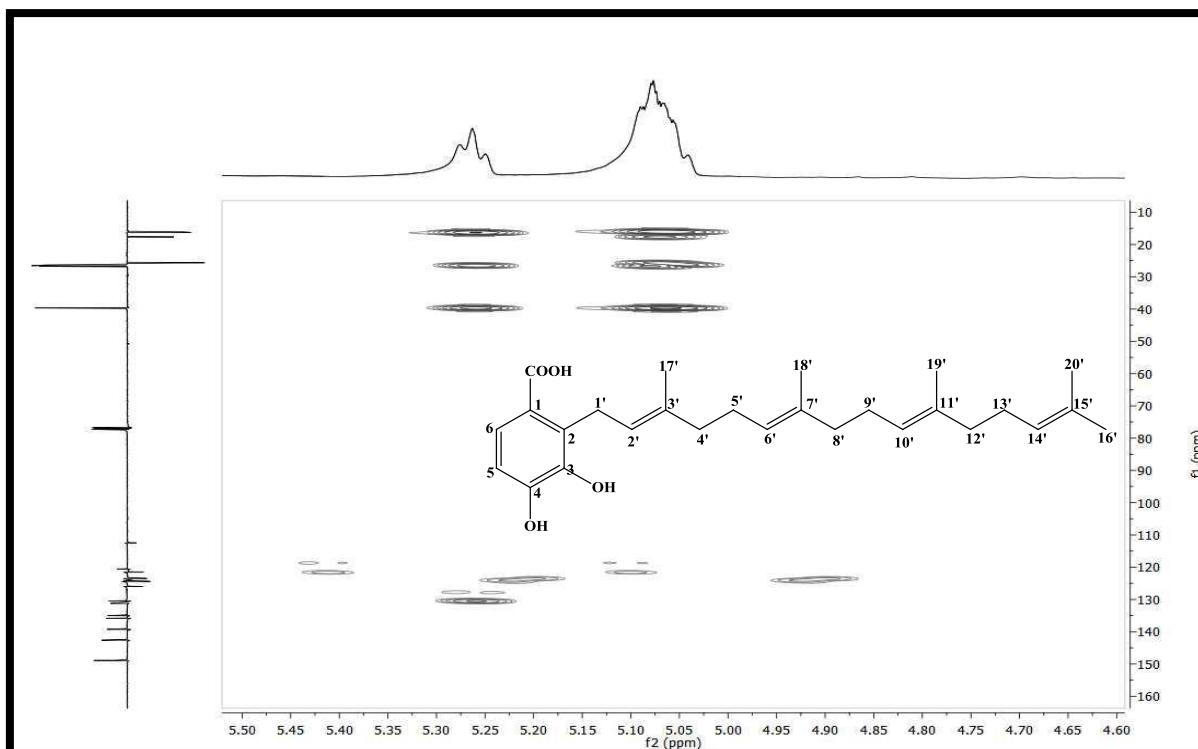
Fonte: Elaboração própria, 2013

Figura 76: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-4* na região de 6,60-7,80 e 30-180 ppm.



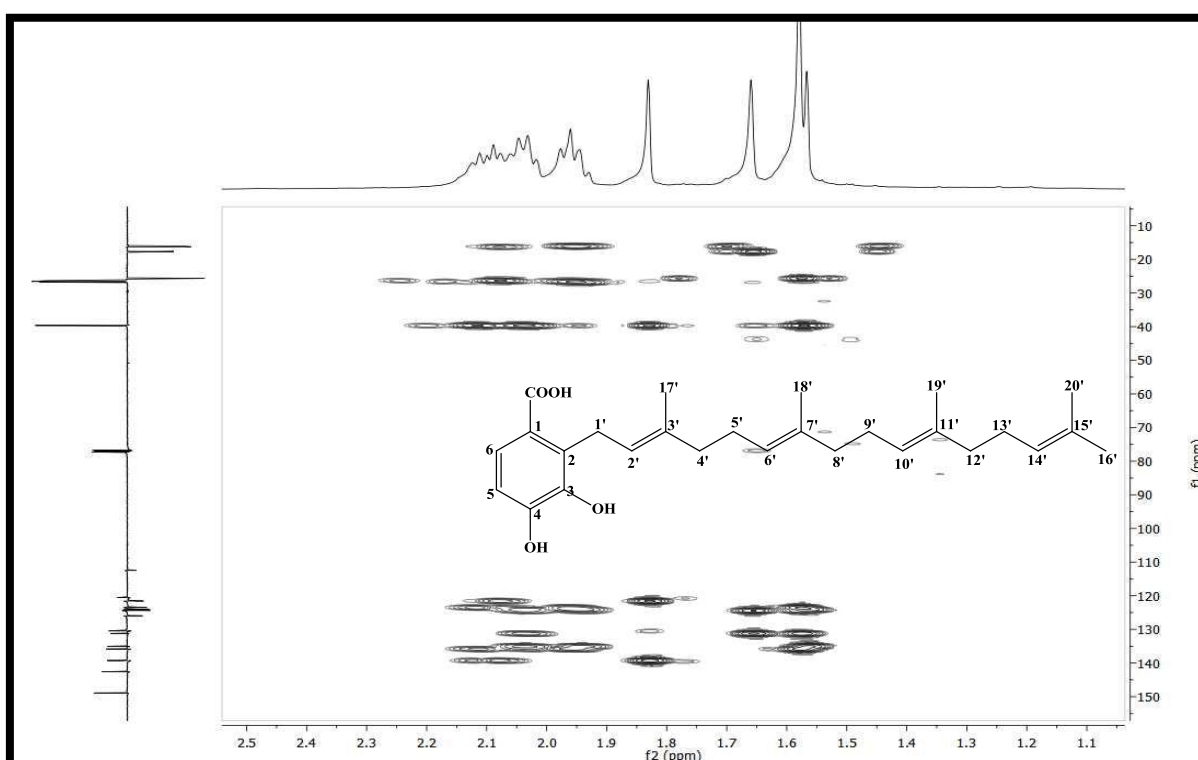
Fonte: Elaboração própria, 2013

Figura 77: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-4* na região de 4,60-5,50 e 10,0-160,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 78: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-4* na região de 2,50-1,10 e 10,0-150,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

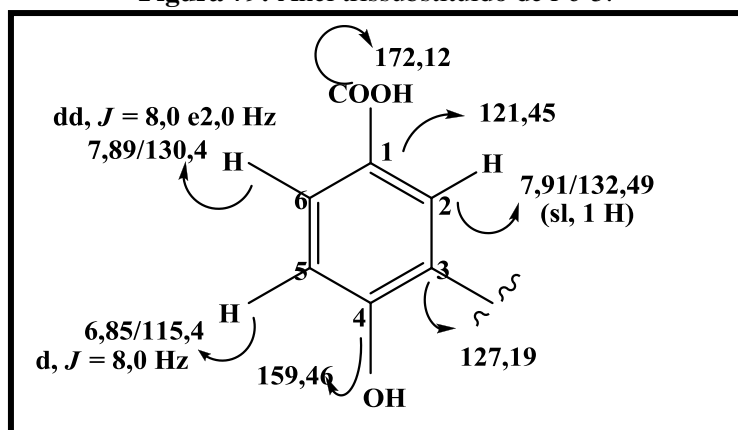
5.1.5 Caracterização estrutural de *Pc-5*

A substância codificada como *Pc-5*, assim como *Pc-4*, apresentou-se com um aspecto oleoso, de cor amarelada e solúvel em clorofórmio, possuindo massa de 219,4 mg, que corresponde a 0,11 % em relação ao peso bruto do pó dos frutos e 4,28 % em relação ao extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC.

O espectro de IV de *Pc-5* (**Figura 81**) revelou bandas de absorção semelhantes às observadas em *Pc-4* destacando-se entre elas as absorções em: 1683 cm^{-1} , característica de carbonila ácido; duas bandas em 1600 e 1506 cm^{-1} , referentes a estiramento C=C de aromáticos e uma banda larga de média intensidade em 3400 sugestiva da presença de hidroxila fenólica na molécula. Ademais, pôde-se visualizar bandas de fraca intensidade entre 900 e 690 cm^{-1} indicativos de dobramento fora do plano (=C-H), característicos de anéis parassubstituídos e bandas em 833,25 e 771,58 cm^{-1} sugestivas de anel trissubstituído (SILVERSTEIN *et al.*, 1994; PAVIA *et al.*, 2001).

O espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) (**Figuras 82 e 83**) na região de aromáticos revelou um duplo dubleto em δ_{H} 7,89 ($J = 8,0$ Hz e $J = 2,0$ Hz) acoplado orto com dubleto em δ_{H} 6,85 ($J = 8,0$ Hz) e meta com o singlete largo em δ_{H} 7,91, fortalecendo a sugestão dada pelo IV da presença de um anel aromático trissubstituído (**Figura 79**).

Figura 79: Anel trissubstituído de *Pc-5*.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Ainda no espectro de RMN¹H (500 MHz) foi possível observar absorções características do grupo geranyl geranyl, semelhantes a *Pc-4*: δ_{H} 5,35 (t, $J = 7\text{Hz}$, 1 H), δ_{H} 5,11 (m, 2 H), δ_{H} 5,09 (m, 1 H), δ_{H} 3,41 (d, $J = 7\text{ Hz}$, 2 H), δ_{H} 2,15-2,08 (m, 4 H), δ_{H} 2,01-2,07 (m, 4 H), δ_{H} 2,00-1,96 (m, 4 H), δ_{H} 1,78 (s, 3 H), δ_{H} 1,68 (s, 3 H), δ_{H} 1,61 (s, 3 H), δ_{H} 1,59 (s, 6 H) (**Figura 84**).

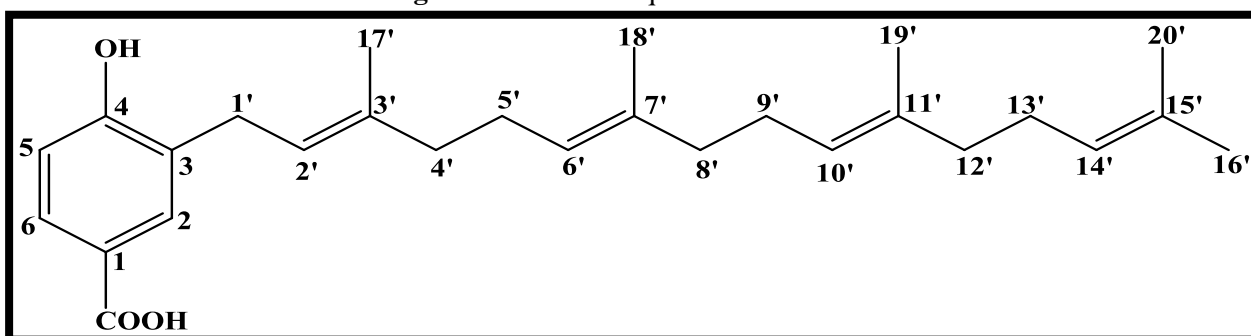
O espectro de RMN¹³C (125 MHz) (**Figura 85**) apresentou 27 sinais para 27 átomos de carbono, sendo 8 não hidrogenados (δ_{C} : 172,12, 159,46, 138,92, 135,50, 134,84, 131,14, 127,19 e 121,45), 7 metínicos (δ_{C} : 132,49, 130,39, 124,40, 124,22, 123,65, 120,90 e 115,54) (**Figura 86**), 6 metilênicos (δ_{C} : 39,66 (2 C), 39,61, 29,25, 26,73, 26,56 e 26,40) e 5 metílicos (δ_{C} : 25,60, 17,59, 16,21, 15,98 e 15,93) (**Figura 87**). O espectro de correlação ¹H x ¹³C-HMBC mostrou as correlações: δ_{H} 2,15-2,08/ δ_{C} 123,65; δ_{C} 120,90; δ_{C} 138,92; δ_{C} 135,50; δ_{C} 16,21; δ_{C} 39,66 e δ_{C} 26,40; δ_{H} 2,00-1,96/ δ_{C} 123,65; δ_{C} 135,50; δ_{C} 134,84 e δ_{C} 124,22; δ_{H} 2,07-2,01/ δ_{C} 134,84; δ_{C} 124,22; δ_{C} 15,93; δ_{C} 124,40; δ_{C} 131,14; δ_{C} 39,61 e δ_{C} 26,56, que permitiram sugerir os sinais de hidrogênio δ_{H} 2,15-2,08, δ_{H} 2,00-1,96 e δ_{H} 2,07-2,01 para as posições 4'/5'; 8'/9' e 12'/13' respectivamente e os sinais de carbono δ_{C} 123,65; δ_{C} 120,90; δ_{C} 138,92; δ_{C} 135,50; δ_{C} 16,21; δ_{C} 39,66; δ_{C} 134,84; δ_{C} 124,22; δ_{C} 15,93; δ_{C} 124,40; δ_{C} 131,14, δ_{C} 39,61, δ_{C} 26,56, δ_{C} 26,40 e δ_{C} 15,93 para as posições 6', 2', 3', 7', Me-17; 4'/8'; 11', 10'; Me-19', 14', 12' e 13', 5' e Me-19'. O espectro HMBC ainda mostrou as correlações δ_{H} 1,78/ δ_{C} 120,90; δ_{C} 138,92; δ_{C} 39,66; δ_{H} 1,68/ δ_{C} 124,40; δ_{C} 131,14; δ_{C} 17,59; δ_{H} 1,61/ δ_{C} 135,50; δ_{C} 123,65; δ_{C} 39,66; δ_{H} 1,59/ δ_{C} 134,84; δ_{C} 124,22; δ_{C} 131,14; δ_{C} 124,40; δ_{C} 25,60 e δ_{C} 39,61, que permitem confirmar os sinais de carbono δ_{C} : 138,92; 135,50; 134,84; 131,14; 124,40; 124,22; 123,65; 120,90; 39,66; 39,61 respectivamente para C-3', C-7', C-11', C-15', C-14', C-10', C-6', C-2', 4'/8', C-12', respectivamente e corroboram com a proposta da presença de um grupo geranyl-geranyl na substância codificada como *Pc-5*, quando comparada com *Pc-4* (**Tabela 16**).

No espectro de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C-HMQC (CDCl₃, 500/ 125 MHz) (**Figura 88**), foi possível observar a correlação do próton em δ_{H} 7,91 com o sinal em δ_{C} 132,49 (**Figura 89**), e, no espectro de correlação heteronuclear indireta ¹H x ¹³C-HMBC (CDCl₃, 500/ 125 MHz) (**Figura 90**), este mesmo hidrogênio apresenta correlações com os sinais em δ_{C} 172,12, δ_{C} 159,46, δ_{C} 130,39 e δ_{C} 29,25, (**Figura 91**), sendo possível concluir que o grupo geranyl-geranyl está ligado ao anel aromático na posição 3 e os sinais em δ_{C} 29,25, δ_{C} 130,39 e δ_{C} 172,12 são referentes às posições C-1', C-6 e à carbonila, na posição C-1 e sugerir a absorção em δ_{C} 159,46 para a posição C-4.

O próton em δ_H 7,89 apresenta correlação direta com δ_C 130,39 (**Figura 89**), e, a longa distância, com os sinais em δ_C 172,12, δ_C 159,46 e δ_C 132,49, o que confirma esses valores de deslocamento para a carbonila (C=O), C-4 e C-2. Analisando-se o HMQC verificou-se a correlação δ_H 6,85/ δ_C 115,54 (**Figura 89**) e o HMBC mostrou correlação de δ_H 6,85/ δ_C 159,46, 127,19 e 121,45 (**Figura 91**), fortalecendo a proposta de que o deslocamento em δ_C 159,47 é referente à posição 4, e assinalar δ_C 127,19 e δ_C 121,45 para as posições C-3 e C-1. Outras correlações podem ser visualizadas com detalhes nas expansões contidas nas **Figuras 92, 93, 94, 95, 96 e 97** e estão descritas na tabela 17 (pág. 152).

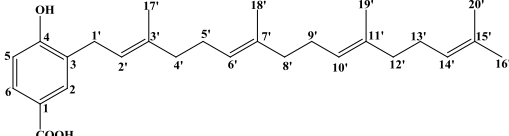
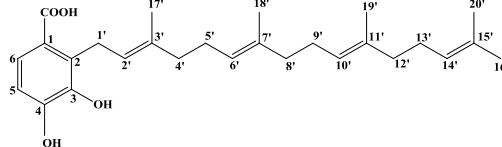
A compilação dos dados espectrais uni e bidimensionais (RMN¹H, RMN¹³C, ¹H x ¹³C-HMQC e ¹H x ¹³C-HMBC) de *Pc-5* aliado a comparações com dados da literatura (MAXELL; RAMPERSAD *et al.*, 1989) (**Tabelas 16 e 17**) nos permitiu propor que a substância codificada como *Pc-5* tratava-se de um derivado prenilado do ácido benzoico, denominado de ácido-3-geranil-4-hidróxidobenzoico (**Figura 80**), que está sendo isolado pela quarta vez no gênero *Piper* e pela segunda vez em *Piper caldense* C.DC.

Figura 80: Estrutura química de *Pc-5*.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 16: Comparação dos dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de *Pc-6* registrados em CDCl_3 com dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de *Pc-4* registrados em CDCl_3 (Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.)

HMQC (<i>Pc-5</i>)			<i>Pc-4</i>	
				
Posição	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	121,45	-	120,55
2	7,91 (sl)	132,49	-	130,46
3	-	127,19	-	142,62
4	-	159,46	-	148,91
5	6,85 (d, $J = 8,0$ Hz)	115,54	6,80 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	112,46
6	7,89 (dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz)	130,39	7,63 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	125,97
1'	3,41 (d, $J = 7,0$ Hz)	29,25	3,91 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H)	26,49
2'	5,35 (t, $J = 7,0$ Hz)	120,90	5,26 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H)	121,55
3'	-	138,92	-	139,25
4'	2,15 – 2,08 (m)	39,66	2,07-2,12 (m, 2H)	39,65
5'	2,15 – 2,08 (m)	26,40	2,07-2,12 (m, 2H)	26,31
6'	5,11 (m)	123,65	5,07 (m, 1H)	123,49
7'	-	135,50	-	135,82
8'	2,00-1,96 (m)	39,66	1,92-1,97 (m, 2H)	39,66
9'	2,00-1,96 (m)	26,73	1,92-1,97 (m, 2H)	26,76
10'	5,11 (m)	124,22	5,07 (m, 1H)	124,12
11'	-	134,84	-	135,02
12'	2,07-2,01 (m)	39,61	2,01-2,06 (m, 2H)	39,69
13'	2,07-2,01 (m)	26,56	2,01-2,06 (m, 2H)	26,57
14'	5,09 (m)	124,40	5,07 (m, 1H)	124,39
15'	-	131,14	-	131,23
16'	1,68 (s)	25,60	1,66 (s, 3H)	25,65
17'	1,78 (s)	16,21	1,83 (s, 3H)	16,27
18'	1,61 (s)	15,98	1,58 (s, 3H)	16,07
19'	1,59 (s)	15,93	1,58 (s, 3H)	17,65
20'	1,59 (s)	17,59	1,56 (s, 3H)	15,97
COOH	-	172,12	-	172,84

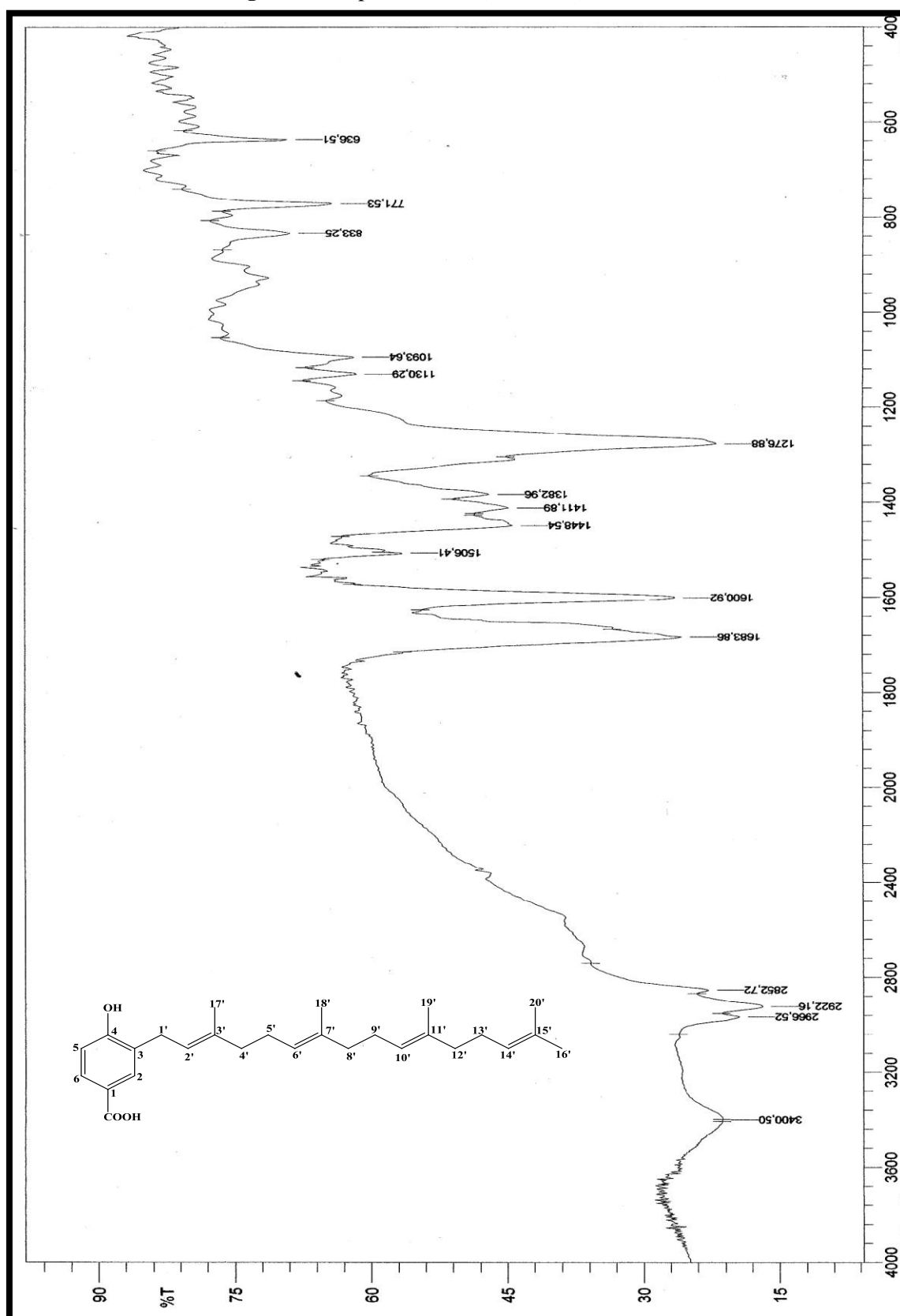
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 17: Dados espectrais de HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de *Pc-5*.

Posição	<i>Pc-5</i>	HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$	
	δ_{H}	2J	3J
1			
2	7,91 (sl)		COOH, C-1', C-4, C-6
3			
4			
5	6,85 (d, $J = 8,0$ Hz)	C-4	C-1, C-3
6	7,89 (dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz)		COOH, C-2, C-4
1'	3,41 (d, $J = 7,0$ Hz)	C-3, C-2'	C-2, C-3', C-4
2'	5,35 (t, $J = 7,0$ Hz)	C-1'	C-3, C-4', C-17'
3'			
4'	2,15 – 2,08 (m)	C-5'	C-2', C-6', C-17'
5'	2,15 – 2,08 (m)	C-4'	C-3', C-7'
6'	5,11 (m)	C-5'	C-4', C-18'
7'			
8'	2,00-1,96 (m)	C-7', C-9'	C-18'
9'	2,00-1,96 (m)		C-7', C-11'
10'	5,11 (m)		C-8', C-19'
11'			
12'	2,07-2,01 (m)	C-13'	
13'	2,07-2,01 (m)	C-12'	C-15'
14'	5,09 (m)	C-13'	C-12', C-16', C-20'
15'			
16'	1,68 (s)	C-15'	C-14', C-20'
17'	1,78 (s)	C-3'	C-2', C-4'
18'	1,61 (s)	C-7'	C-6'
19'	1,59 (s)	C-11'	
20'	1,59 (s)		C-16'
COOH			

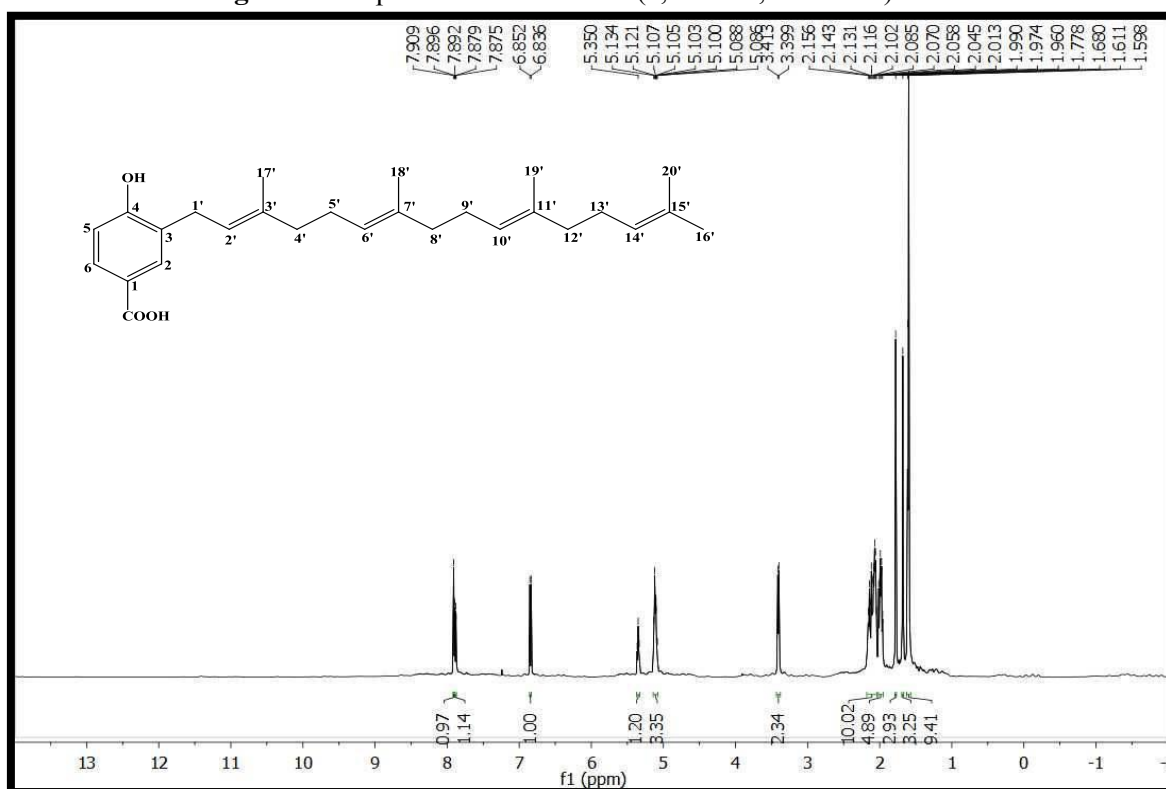
Fonte: Elaboração própria, 2013

Figura 81: Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de *Pc-5*.



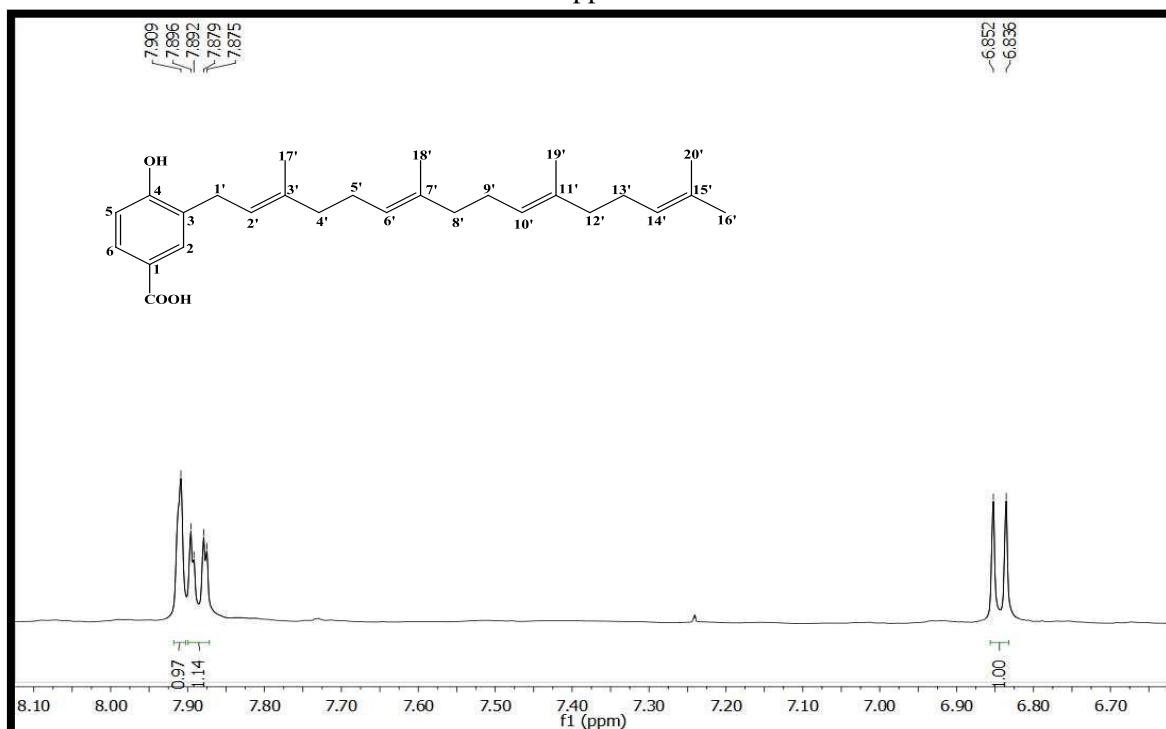
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 82: Espectro de de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de Pc-5.



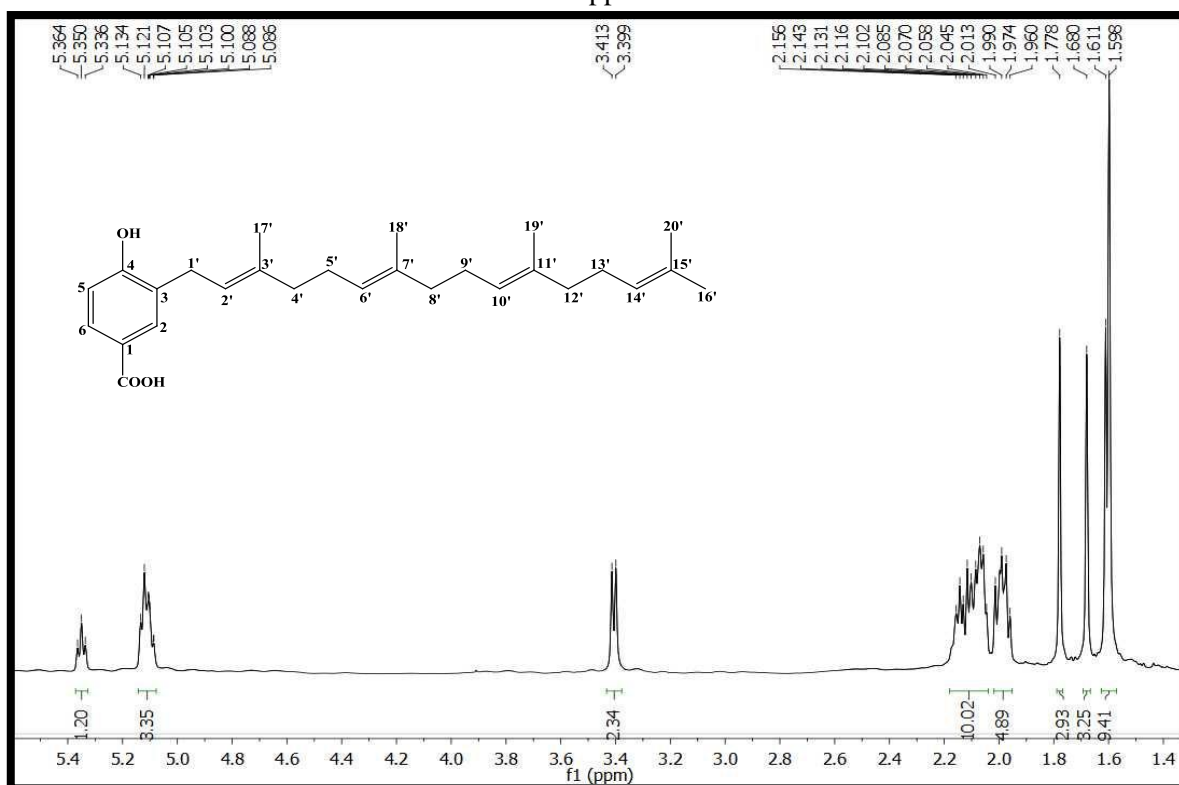
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 83: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de Pc-5 na região de 8,10-4,70 ppm.



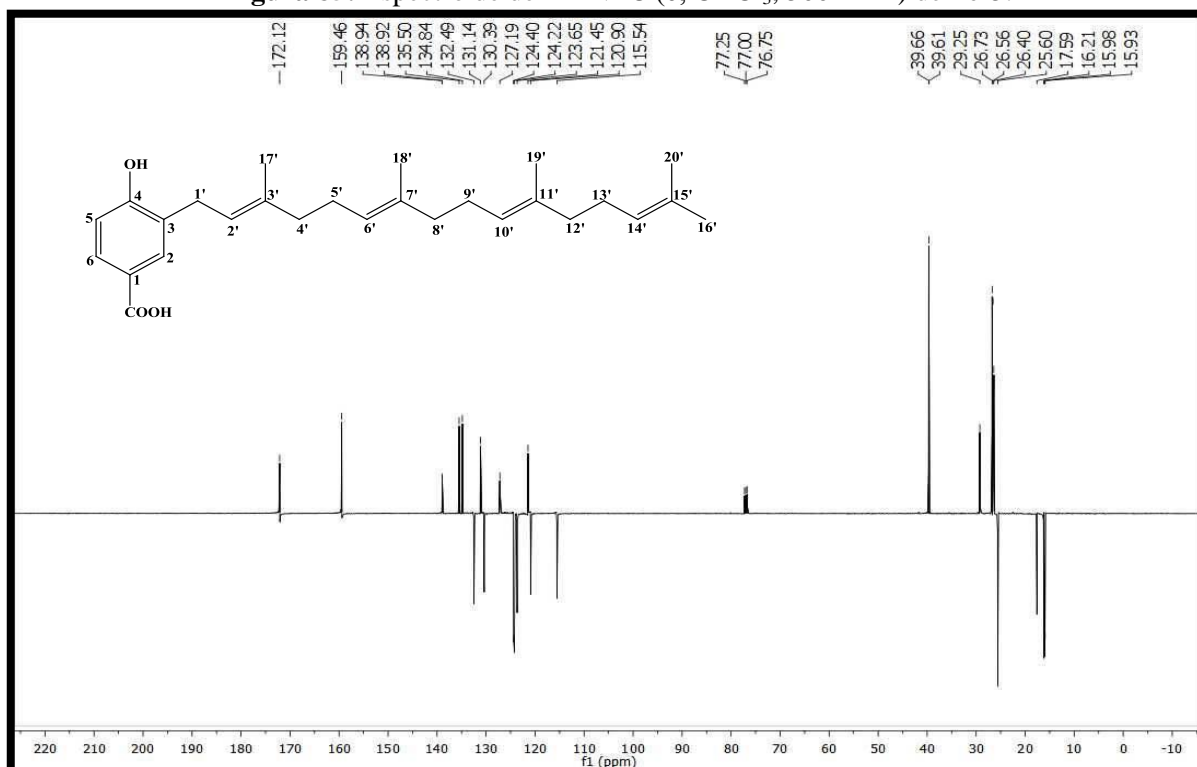
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 84: Expansão do espectro de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-5* na região de 5,40-1,40 ppm.



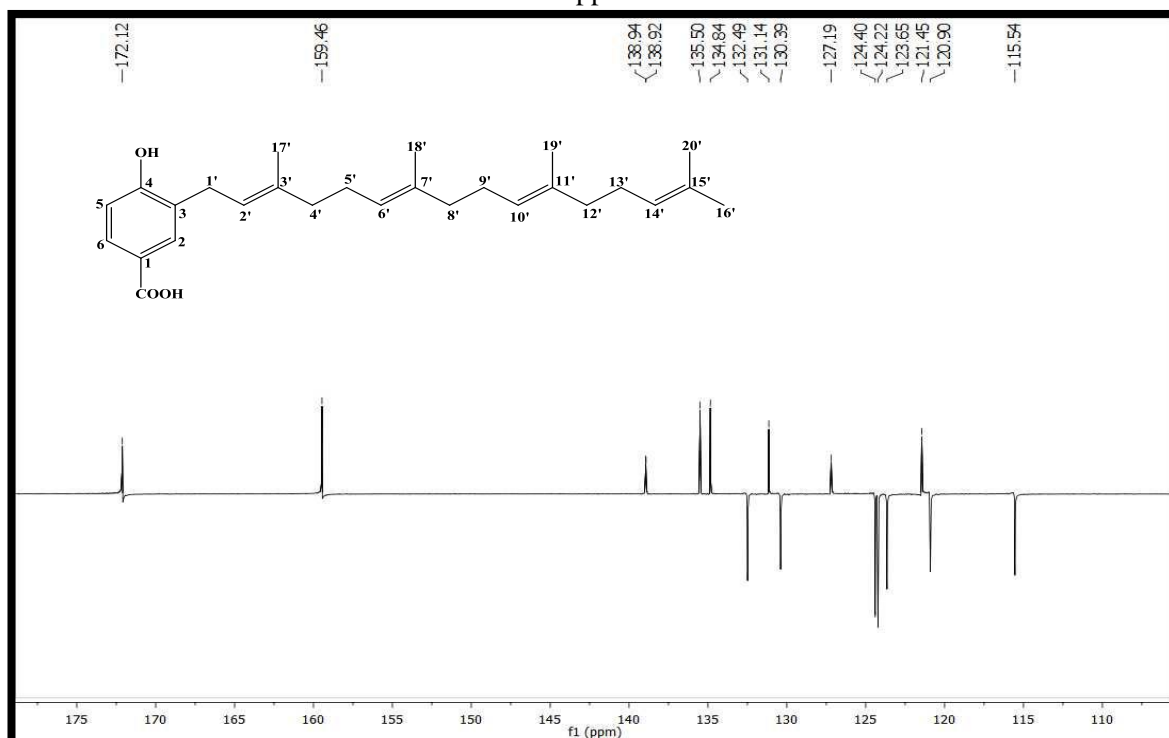
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 85: Espectro de de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-5*.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 86: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-5* na região de 115,0-175,0 ppm.



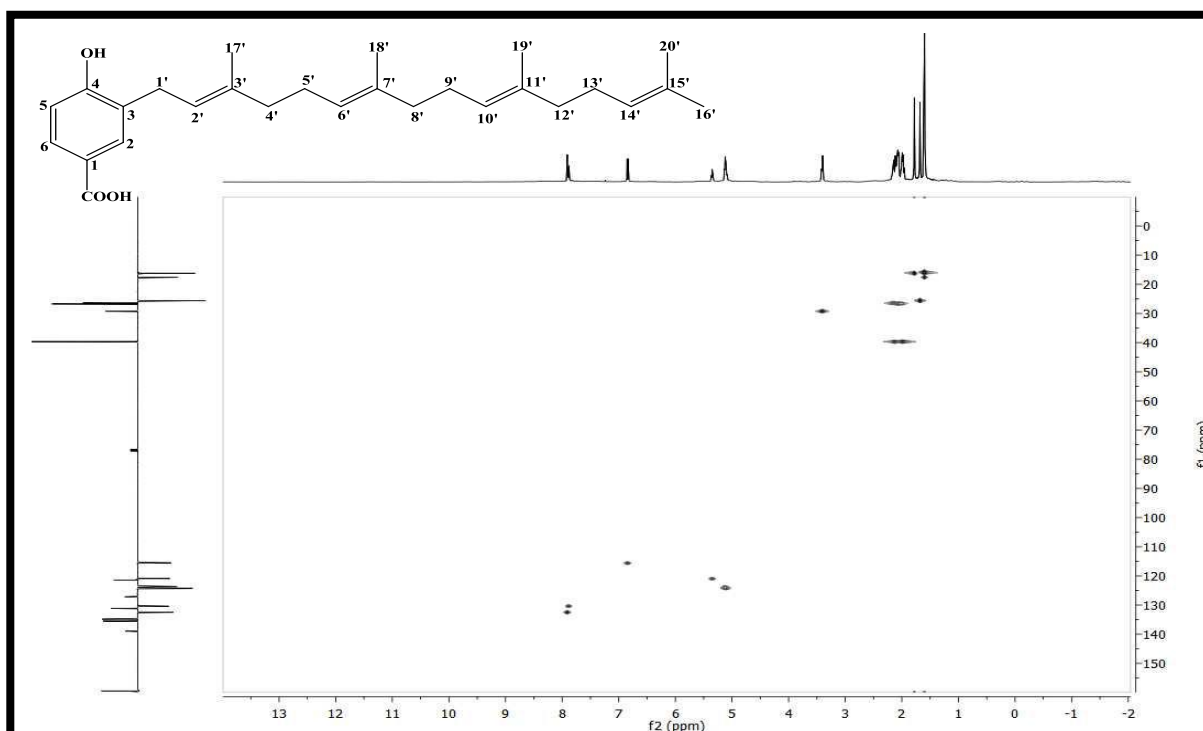
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 87: Expansão do espectro de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-5* na região de 15,0-41,0 ppm.



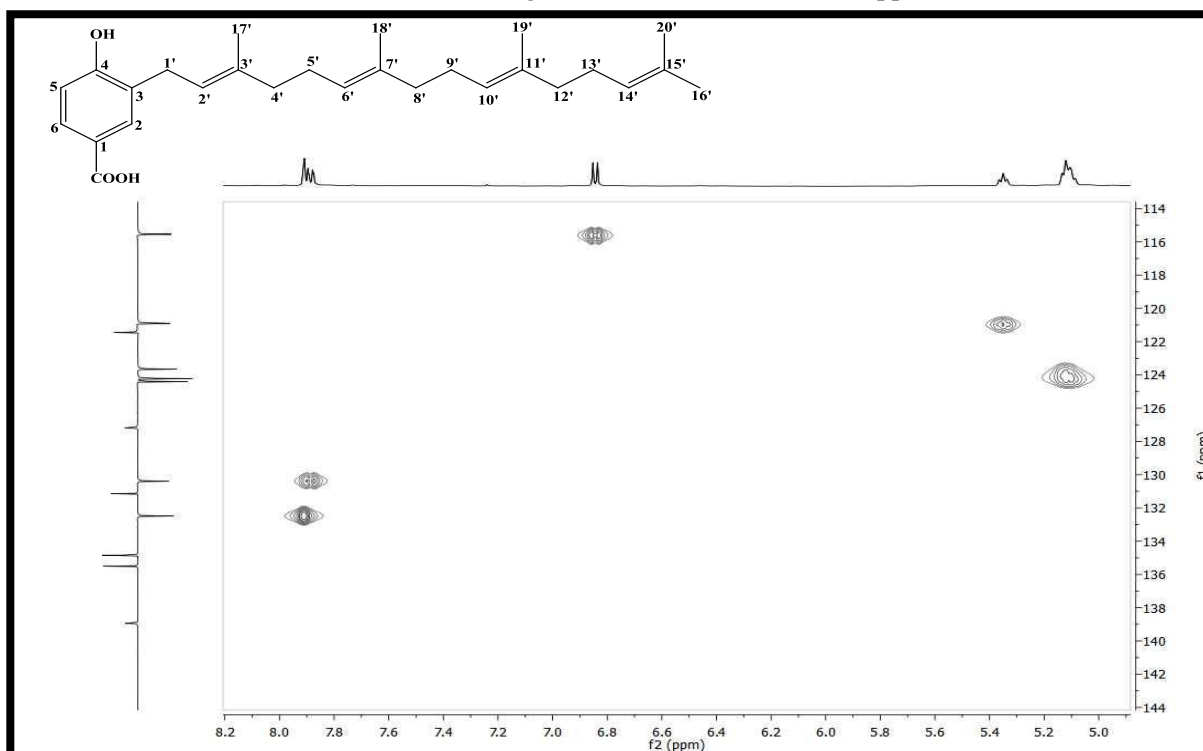
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 88: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-5*.



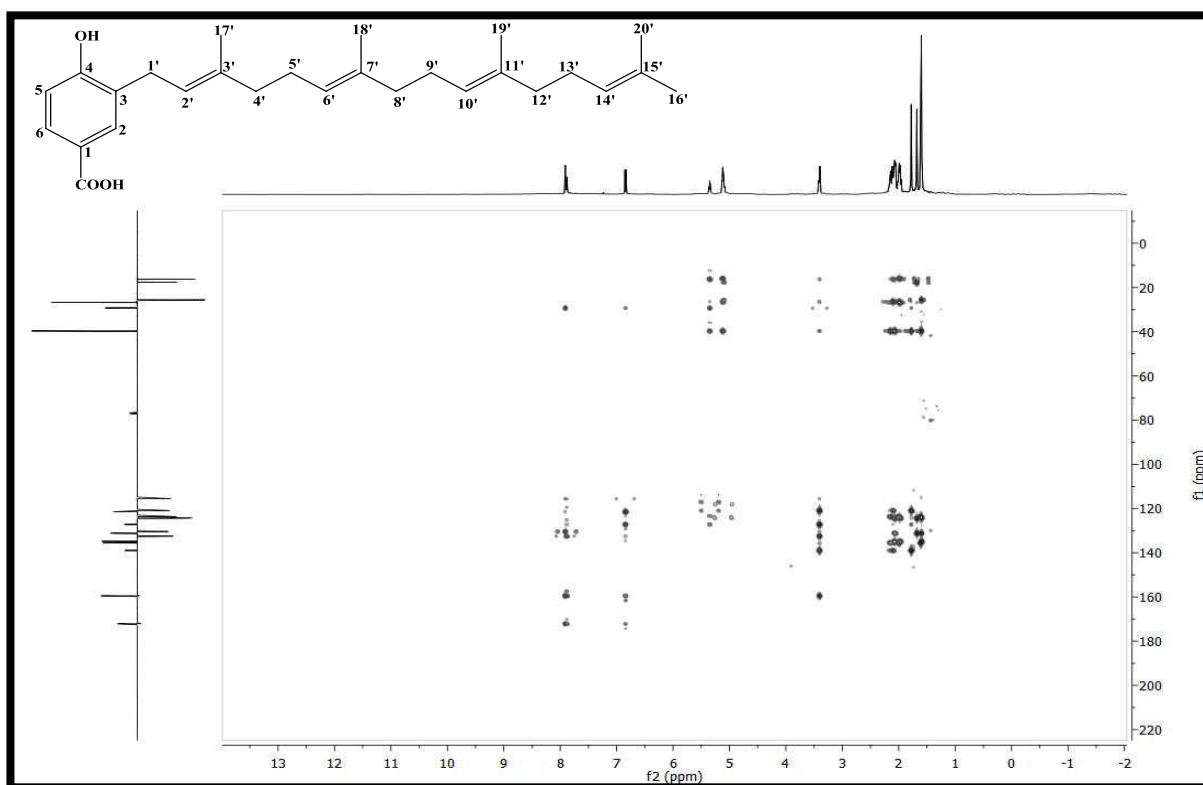
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 89: 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 5,0-8,2 e 114,0-144,0 ppm.



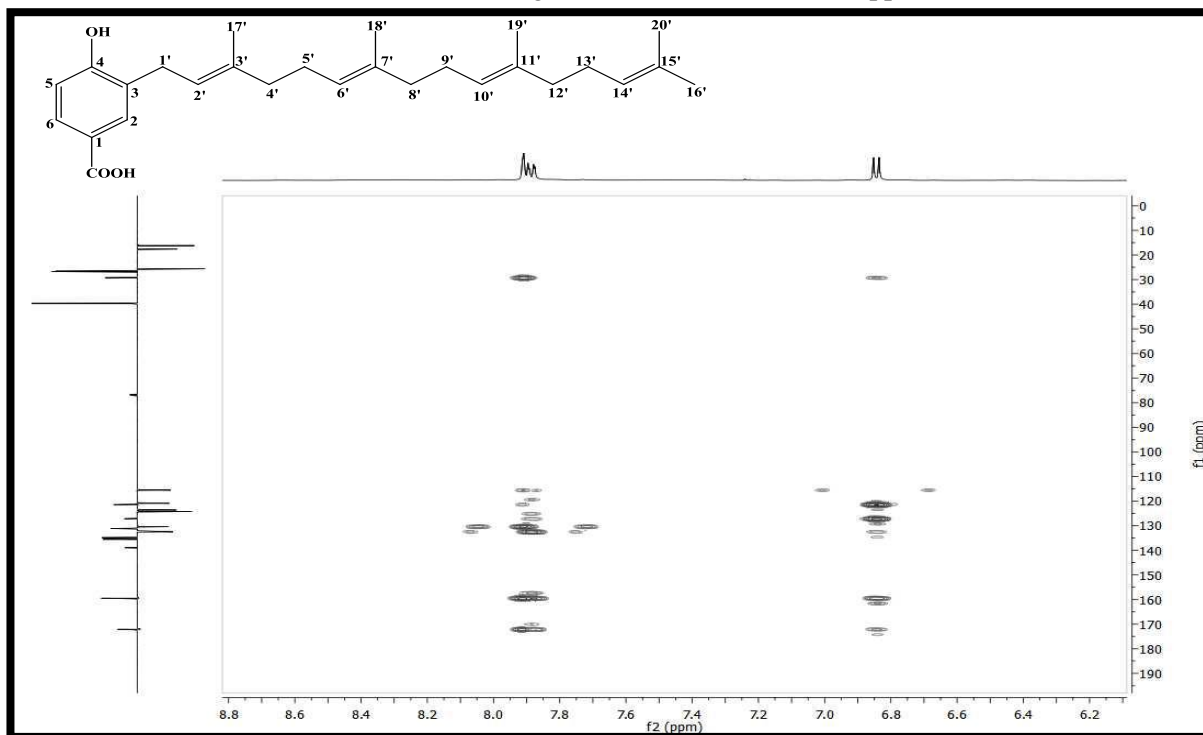
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 90: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-5*.



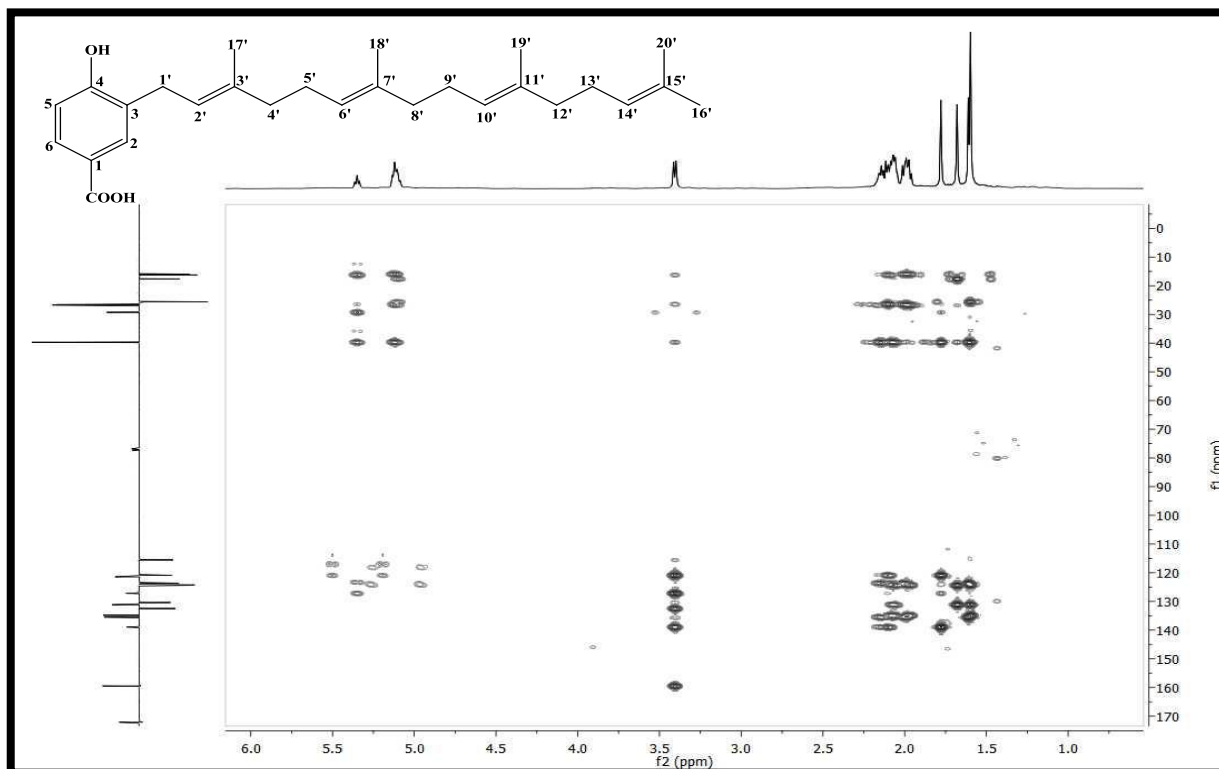
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 91: 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 6,2-8,8 e 10,0-190,0 ppm.



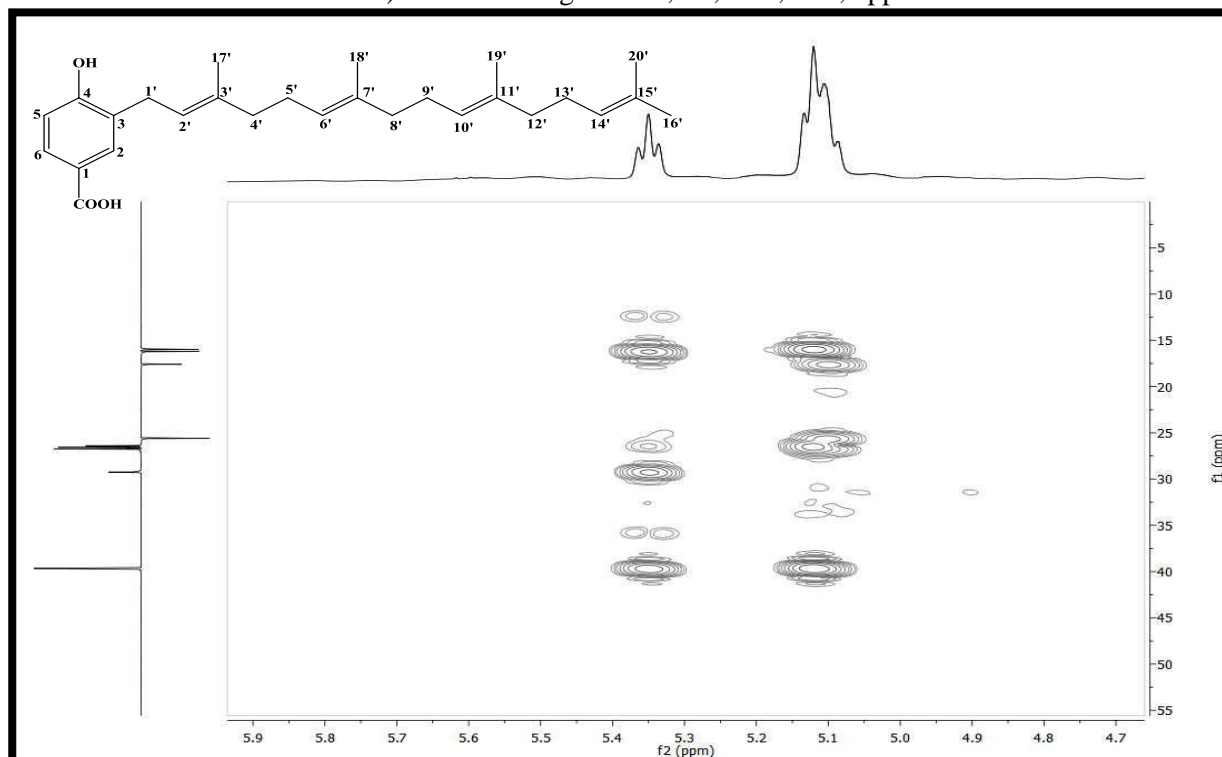
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 92: 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 1,0-6,0 e 10,0-170,0 ppm.



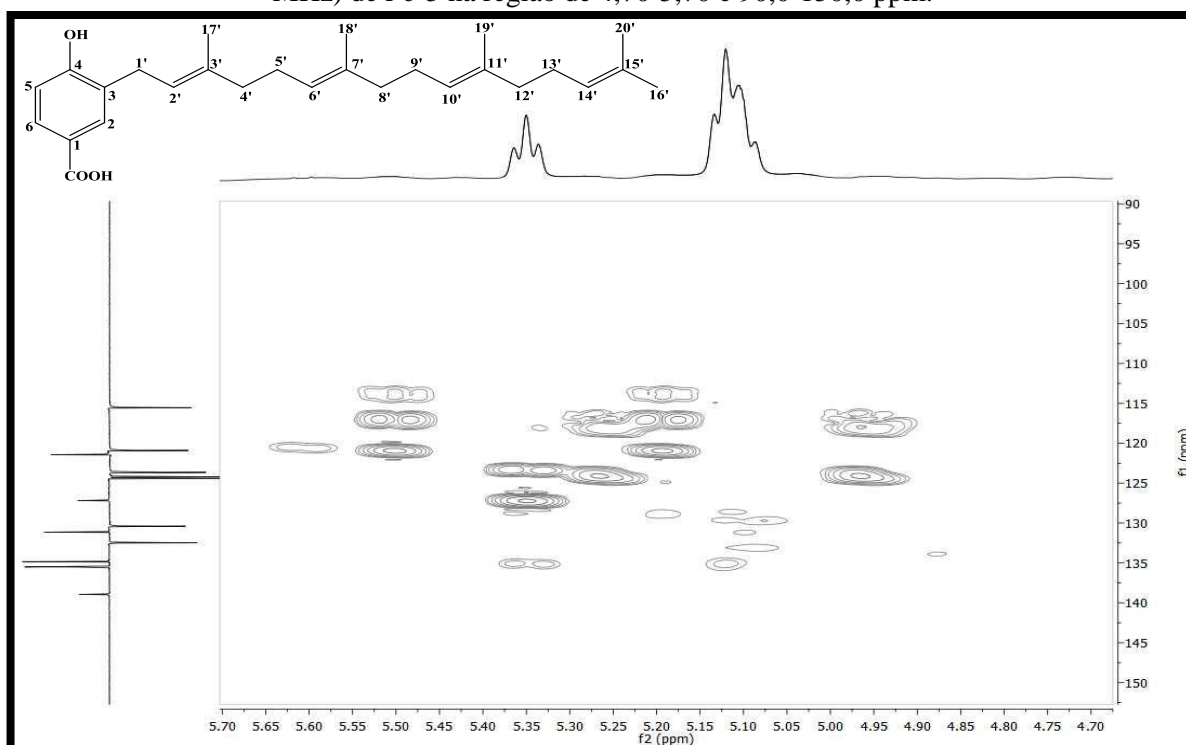
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 93: 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 4,7-5,9 e 5,0-55,0 ppm.



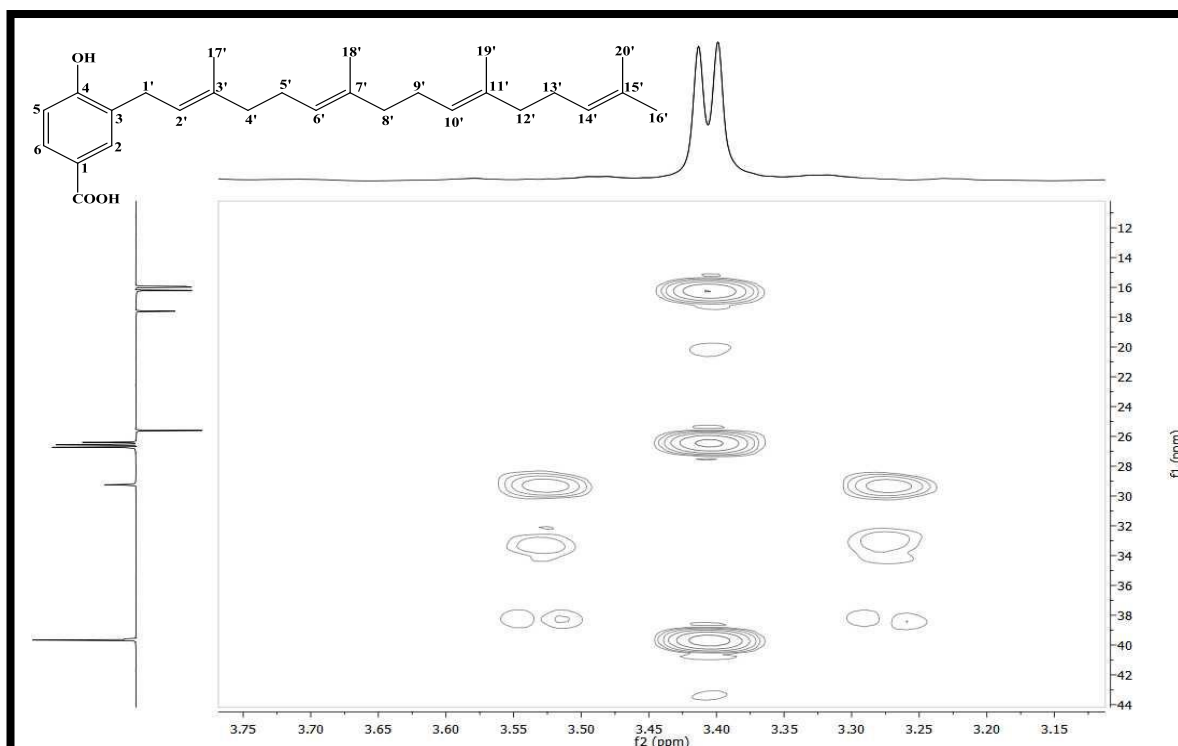
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 94: 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 4,70-5,70 e 90,0-150,0 ppm.



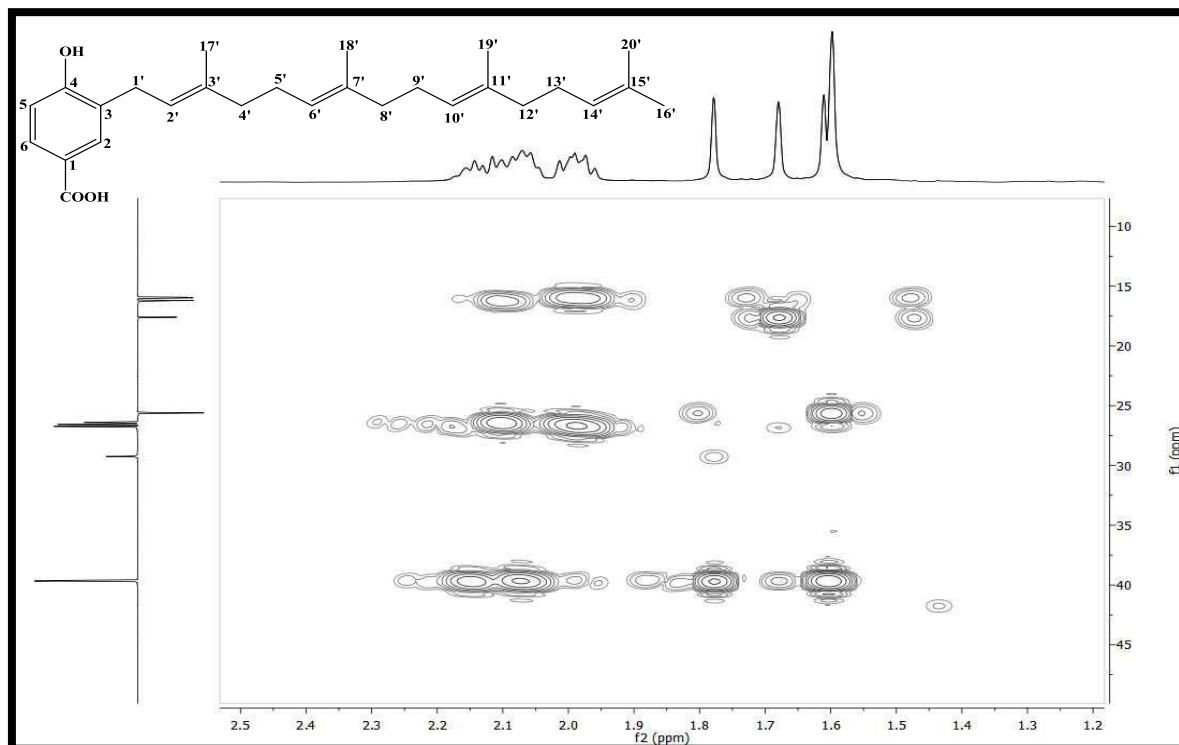
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 95: 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 3,15-3,75 e 12,0-44,0 ppm.



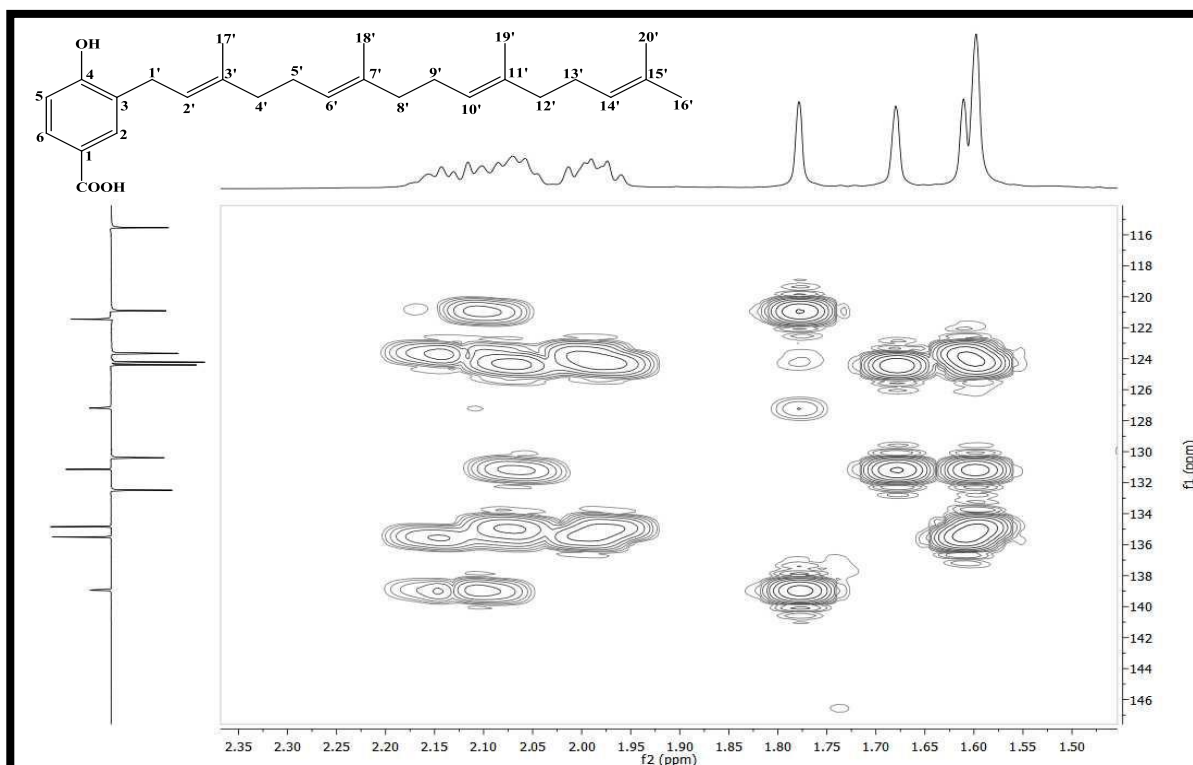
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 96: 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 1,20-2,50 e 10,0-45,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 97: 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 1,50-2,35 e 116,0-146,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

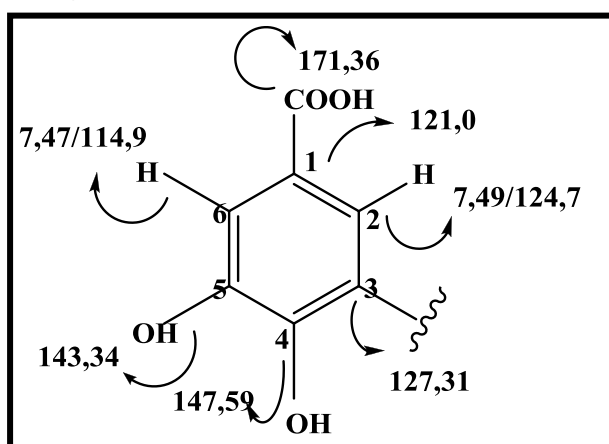
5.1.6 Caracterização estrutural de *Pc-6*

A substância codificada como *Pc-6*, assim como *Pc-4* e *Pc-5* apresentou-se com um aspecto oleoso, de cor amarelada e 100 % solúvel em clorofórmio, possuindo massa de 25,9 mg, que corresponde a 0,012 % em relação ao peso bruto do pó dos frutos e 0,52 % em relação ao extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC.

O espectro de IV de *Pc-6* (**Figura 100**) revelou bandas de absorção semelhantes às aquelas observadas em *Pc-4* destacando-se entre elas as absorções em: 1685 cm^{-1} , característica de carbonila ácido; duas bandas em 1604 e 1442 cm^{-1} , referentes a estiramento C=C de aromáticos e uma banda larga de média intensidade em 3433 sugestiva da presença de hidroxila fenólica na molécula. É importante destacar a presença de uma banda de absorção em 775,35 cm^{-1} , sugestivo de anel tetrassubstituído (**Figura 98**).

O espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) (**Figura 101**) na região de aromáticos revelou dois dubletos, um em δ_{H} 7,49 ($J = 1,9$ Hz) e outro em 7,47 ($J = 1,9$ Hz), acoplando meta entre si e fortalecendo a proposta dada pelo espectro de IV da presença de um anel aromático tetrassubstituído (**Figura 102**). Também foi possível observar absorções características do grupo geranyl geranyl, semelhantes a *Pc-4* e *Pc-5*: δ_{H} 5,32 (tl, $J = 7,25$ Hz), δ_{H} 5,08 (m), δ_{H} 3,38 (d, $J = 7,25$ Hz), δ_{H} 2,12-2,07 (m), δ_{H} 2,04-2,03 (m), δ_{H} 1,97 – 1,92 (m), δ_{H} 1,75 (s), δ_{H} 1,65 (s), δ_{H} 1,58 (s), δ_{H} 1,57 (s) e δ_{H} 1,56 (s) (**Figura 103**).

Figura 98: Anel tetrassubstituído de *Pc-6*.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

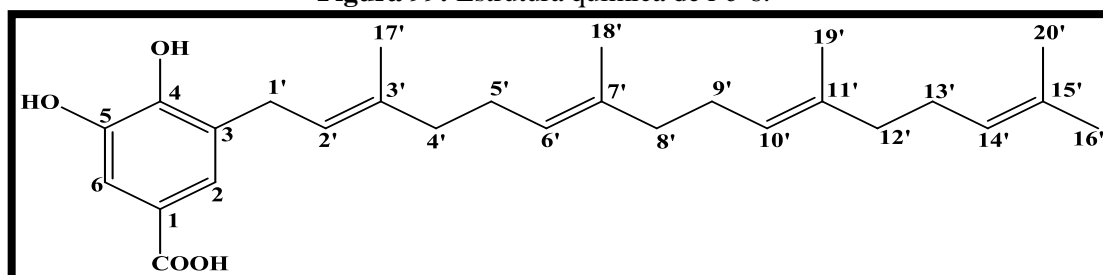
O espectro de RMN¹³C (125 MHz) (**Figura 104**) apresentou 25 sinais para 27 átomos de carbono, sendo 9 não hidrogenados (δ_{C} : 171,36, 147,59, 143,34, 138,99, 135,62, 134,99,

131,25, 127,31 e 121,00), 6 metínicos (δ_C : 124,71, 124,42, 124,20, 123,68, 121,03 e 114,95) (**Figura 105**), 7 metilênicos (δ_C : 39,72 (3 C), 29,24, 26,78, 26,62 e 26,44) e 5 metílicos (δ_C : 25,67, 17,67, 16,28, 16,07 e 16,00). Os sinais em δ_C 29,24 (C-1'), δ_C 121,03 (C-2'), δ_C 138,99 (C-3'), δ_C 39,72 (C-4'), δ_C 26,44 (C-5'), δ_C 123,68 (C-6'), δ_C 135,62 (C-7'), δ_C 39,72 (C-8'), δ_C 26,78 (C-9'), δ_C 124,20 (C-10'), δ_C 134,99 (C-11'), δ_C 39,72 (C-12'), δ_C 26,62 (C-13'), δ_C 124,42 (C-14'), δ_C 131,25 (C-15'), δ_C 25,67 (C-16'), δ_C 16,28 (C-17'), δ_C 16,07 (C-18'), δ_C 16,00 (C-19') e δ_C 17,67 (C-20) (**Figura 106**), quando comparados com *Pc-4* e *Pc-5*, corroboram com a proposta da presença de um grupo geranil-geranil na substância codificada como *Pc-6*.

No espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) (**Figura 102**) foi possível observar a correlação do próton em δ_H 7,49 com o sinal em δ_C 124,71 (**Figura 103**) e, no espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) (**Figura 105**), este mesmo hidrogênio apresenta correlações com os sinais em δ_C 171,36, δ_C 147,59, δ_C 114,95 e δ_C 29,24 (**Figura 106**), sendo possível concluir que o grupo geranil-geranil está ligado ao anel aromático na posição 3 e os sinais em δ_C 29,24, δ_C 124,71 e δ_C 171,36 são referentes, respectivamente, às posições C-1', C-2, e, à carbonila, na posição C-1, e sugerir as absorções em δ_C 147,59 e δ_C 114,95 para as posições C-4 e C-6.

O próton com sinal em δ_H 7,47 apresenta correlação direta (**Figura 103**) com δ_C 114,95 e, a longa distância (**Figura 106**), com os sinais em δ_C 171,36, δ_C 147,59, δ_C 143,34 e δ_C 124,71, fortalecendo a proposta de que os deslocamentos em δ_C 171,36, δ_C 147,59, δ_C 124,71 e δ_C 114,95 são referentes à carbonila e às posições C-4, C-2 e C-6, respectivamente, e δ_C 143,34 foi atribuído à posição 5. Os sinais em δ_C 127,31 e δ_C 121,00 foram assinalados para as posições C-3 e C-1, respectivamente, quando comparados com a literatura (MAXELL; RAMPERSAD *et al.*, 1989) e com *Pc-4* e *Pc-5*.

A compilação dos dados espectrais uni e bidimensionais (RMN ^1H , RMN ^{13}C , $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC e $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) de *Pc-6* aliado a comparações com dados da literatura (MAXELL; RAMPERSAD *et al.*, 1989) (**Tabelas 18 e 19**) nos permitiu propor que a substância codificada como *Pc-6* tratava-se de um derivado prenilado do ácido benzoico, denominado de ácido-3-geranil-5,4-di-hidróxibenzoico (**Figura 99**) que está sendo isolado pela quarta vez no gênero *Piper* e pela primeira vez em *Piper caldense* C.DC. Os três ácidos aqui isolados foram relatados pela primeira vez nas partes aéreas de *Piper saltuum* (MAXELL; RAMPERSAD, 1989).

Figura 99: Estrutura química de *Pc-6*.

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 18: Comparação dos dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de *Pc-6* registrados em CDCl_3 com dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de *Pc-4* registrados em CDCl_3 . Deslocamento químico (δ) em ppm, constante de acoplamento (J) em Hz.

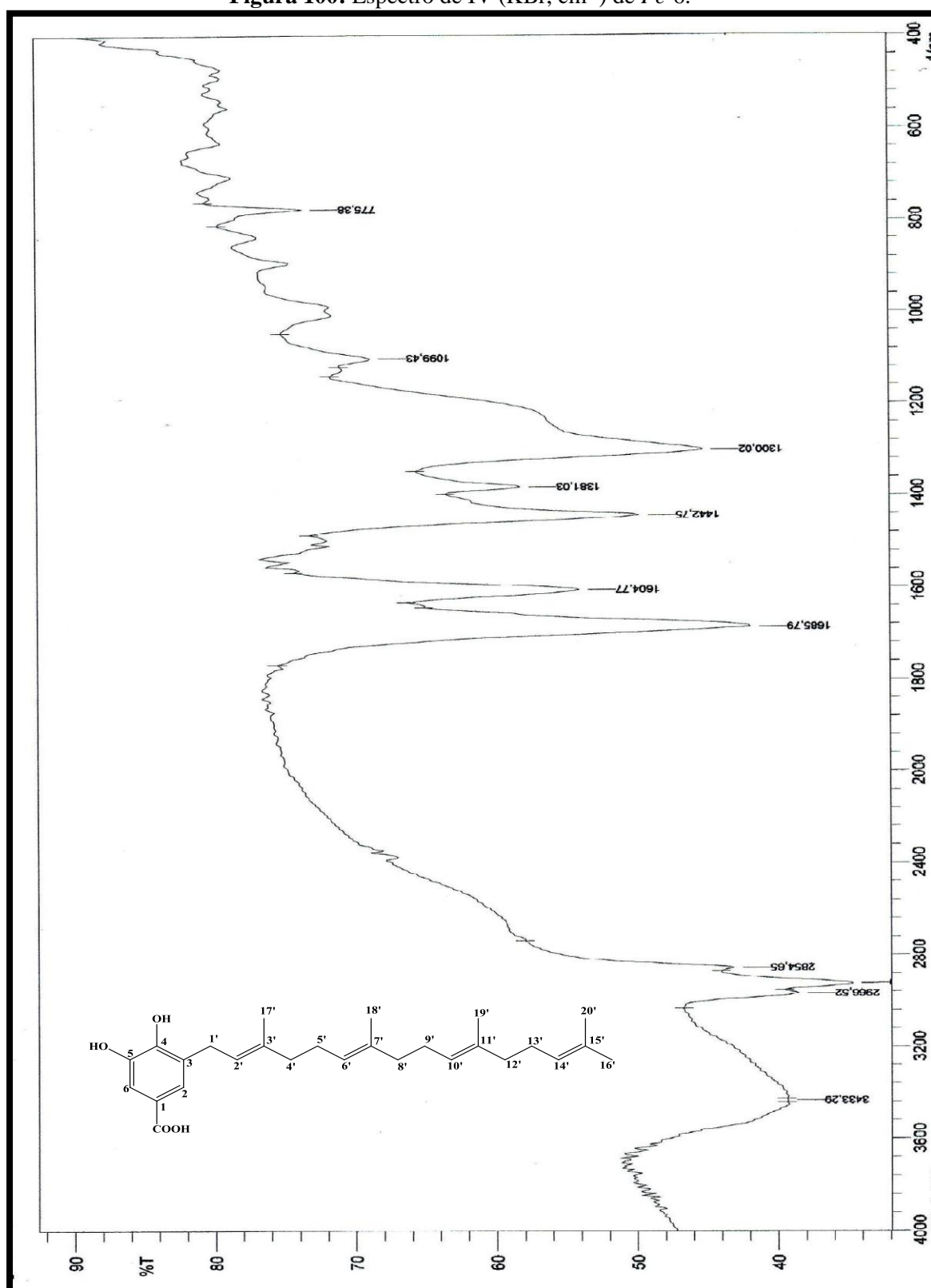
Posição	HMQC (<i>Pc-6</i>)		<i>Pc-4</i>	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	121,00	-	120,55
2	7,49 (d, $J = 1,90$ Hz)	124,71	-	130,46
3	-	127,31	-	142,62
4	-	147,59	-	148,91
5	-	143,34	6,80 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	112,46
6	7,47 (d, $J = 1,90$ Hz)	114,95	7,63 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	125,97
1'	3,38 (d, $J = 7,25$ Hz)	29,24	3,91 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H)	26,49
2'	5,32 (tl, $J = 7,25$ Hz)	121,03	5,26 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H)	121,55
3'	-	138,99	-	139,25
4'	2,12 – 2,07 (m)	39,72	2,07-2,12 (m, 2H)	39,65
5'	2,12 – 2,07 (m)	26,44	2,07-2,12 (m, 2H)	26,31
6'	5,08 (m)	123,68	5,07 (m, 1H)	123,49
7'	-	135,62	-	135,82
8'	1,97-1,92 (m)	39,72	1,92-1,97 (m, 2H)	39,66
9'	1,97-1,92 (m)	26,78	1,92-1,97 (m, 2H)	26,76
10'	5,08 (m)	124,20	5,07 (m, 1H)	124,12
11'	-	134,99	-	135,02
12'	2,04-2,03 (m)	39,72	2,01-2,06 (m, 2H)	39,69
13'	2,04-2,03 (m)	26,62	2,01-2,06 (m, 2H)	26,57
14'	5,08 (m)	124,42	5,07 (m, 1H)	124,39
15'	-	131,25	-	131,23
16'	1,65 (s)	25,67	1,66 (s, 3H)	25,65
17'	1,75 (s)	16,28	1,83 (s, 3H)	16,27
18'	1,58 (s)	16,07	1,58 (s, 3H)	16,07
19'	1,56 (s)	16,00	1,58 (s, 3H)	17,65
20'	1,57 (s)	17,67	1,56 (s, 3H)	15,97
COOH	-	171,36	-	172,84

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Tabela 19: Dados espectrais de HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de *Pc-6*.

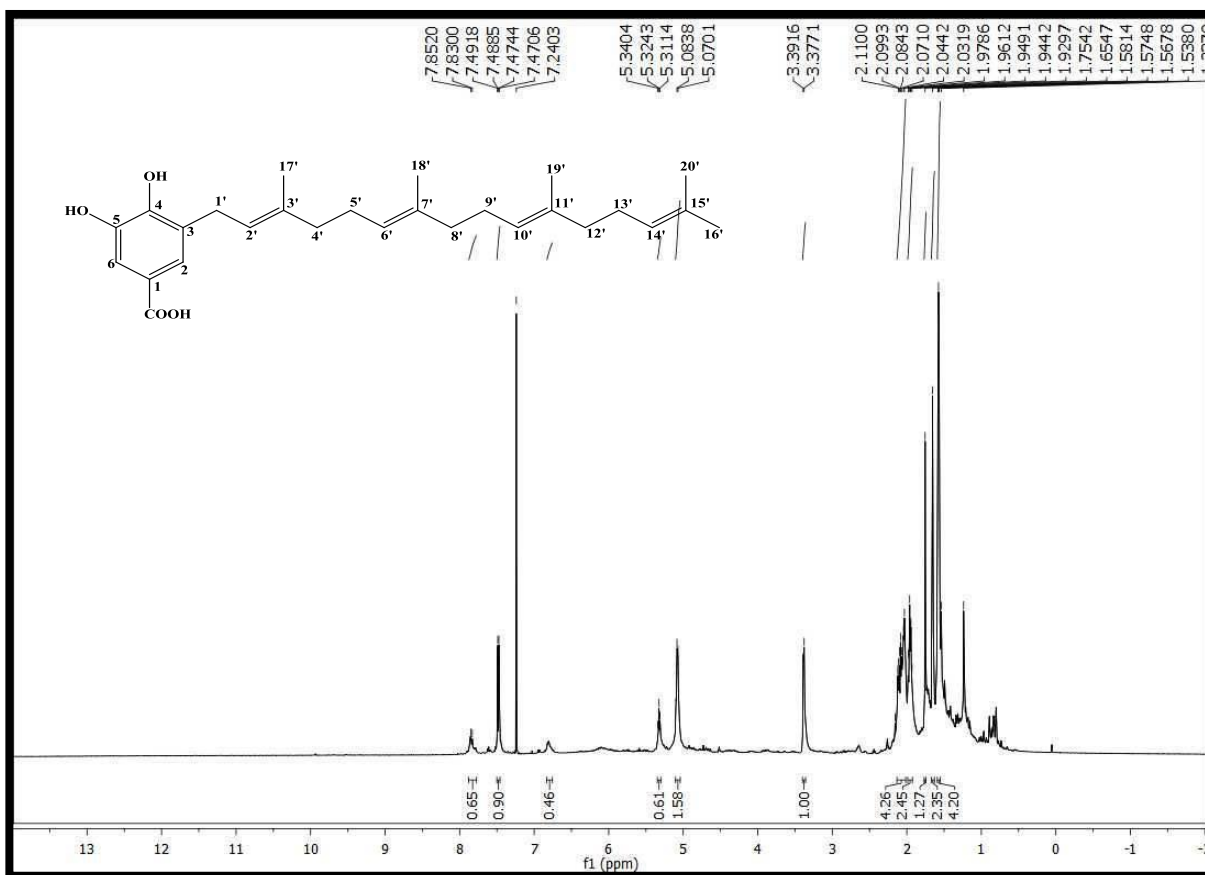
Posição	<i>Pc-6</i>	HMBC $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$	
	δ_{H}	2J	3J
1			
2	7,49 (d, $J = 1,90$ Hz, 1 H)	C-1	COOH, C-4, C-6
3	-		
4	-		
5	-		
6	7,47 (d, $J = 1,90$ Hz, 1 H)	C-5	C-2, C-4, COOH
1'	3,38 (d, $J = 7,25$ Hz)	C-3, C-2'	C-2, C-4, C-3'
2'	5,32 (tl, $J = 7,25$ Hz)	C-1'	C-4', C-17'
3'	-		
4'	2,12 – 2,07 (m)	C-5'	C-6', C-17'
5'	2,12 – 2,07 (m)	C-6', C-4'	
6'	5,08 (m)	C-5'	C-18', C-8', C-4'
7'	-		
8'	1,97-1,92 (m)	C-7', C-9'	C-6', C-10'
9'	1,97-1,92 (m)	C-10'	C-7'
10'	5,08 (m)	C-9'	C-8', C-19'
11'	-		
12'	2,04-2,03 (m)	C-13'	C-10'
13'	2,04-2,03 (m)	C-14'	C-15'
14'	5,08 (m)	C-13'	C-16'
15'	-		
16'	1,65 (s)		C-14', C-20'
17'	1,75 (s)	C-3'	C-2', C-4'
18'	1,58 (s)	C-7'	C-8'
19'	1,56 (s)	C-11'	C-12'
20'	1,57 (s)	C-15'	C-14', C-16'
COOH	-		

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 100: Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Pc-6.

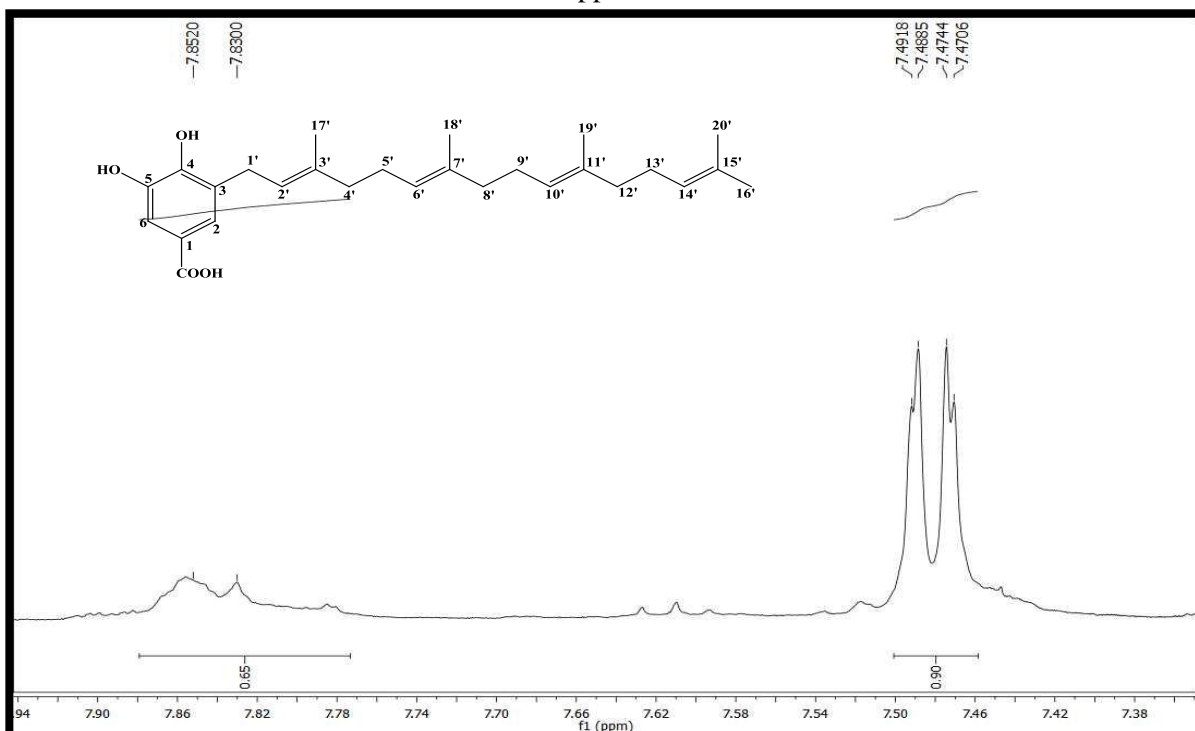
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 101: Espectro de de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-6*.



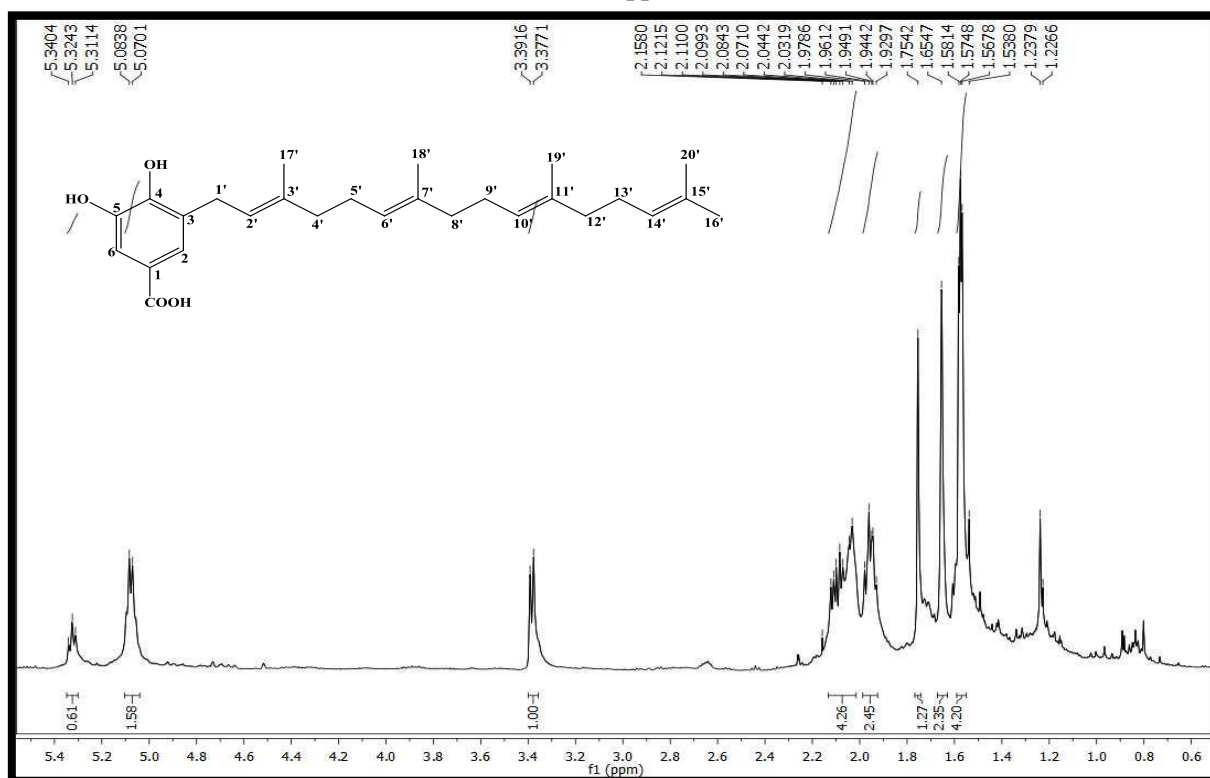
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 102: Expansão do espectro de de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-6* na região 7,38-7,90 ppm.



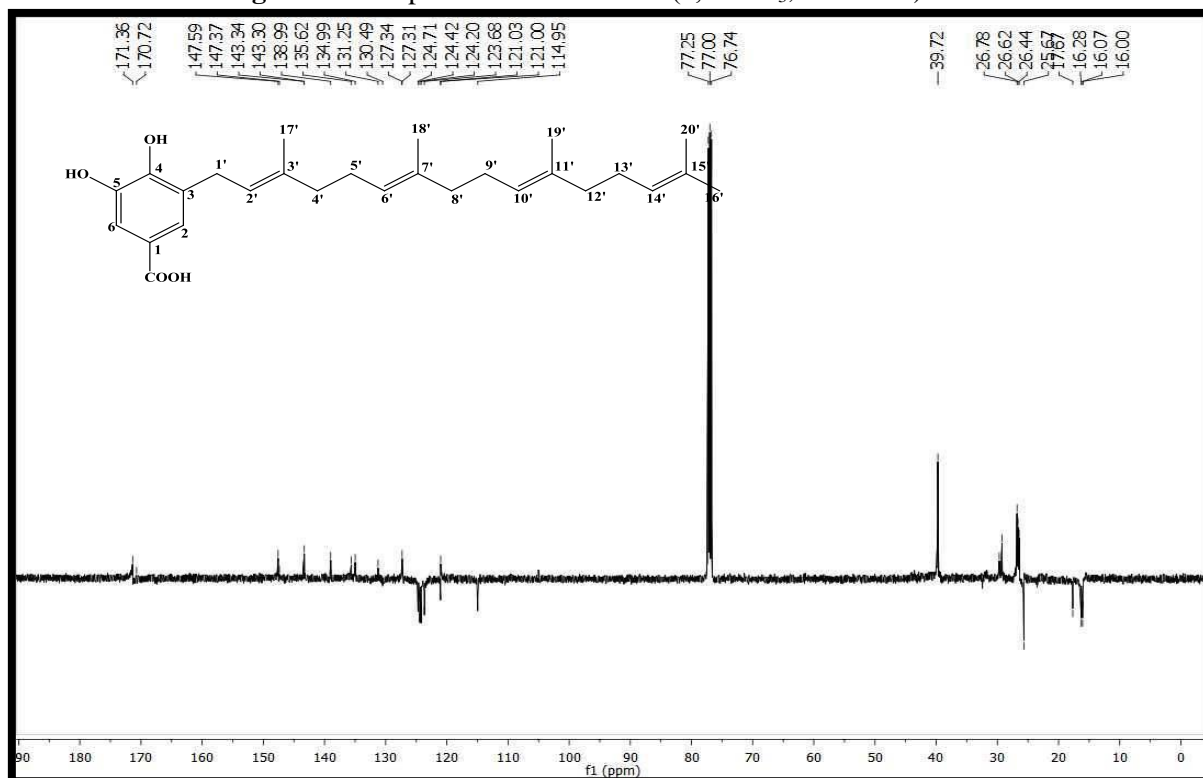
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 103: Expansão do espectro de de RMN¹H (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-6* na região de 7,38 a 7,90 ppm.



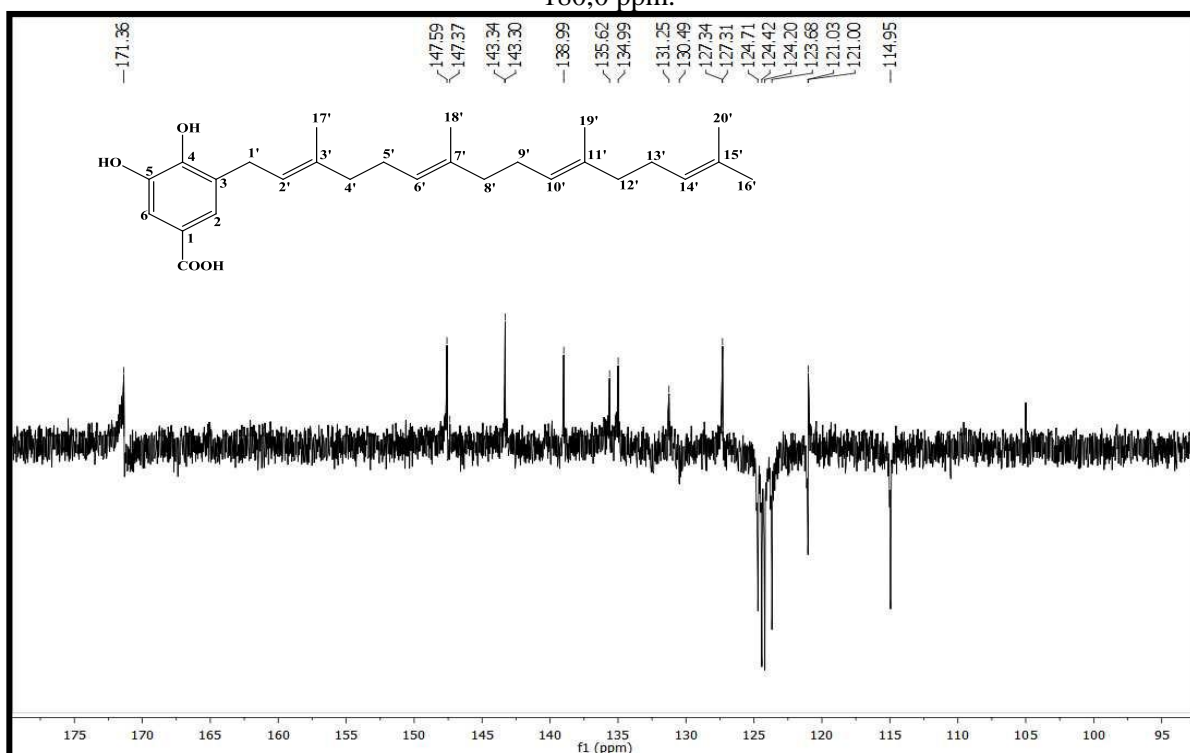
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 104: Espectro de de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-6*.



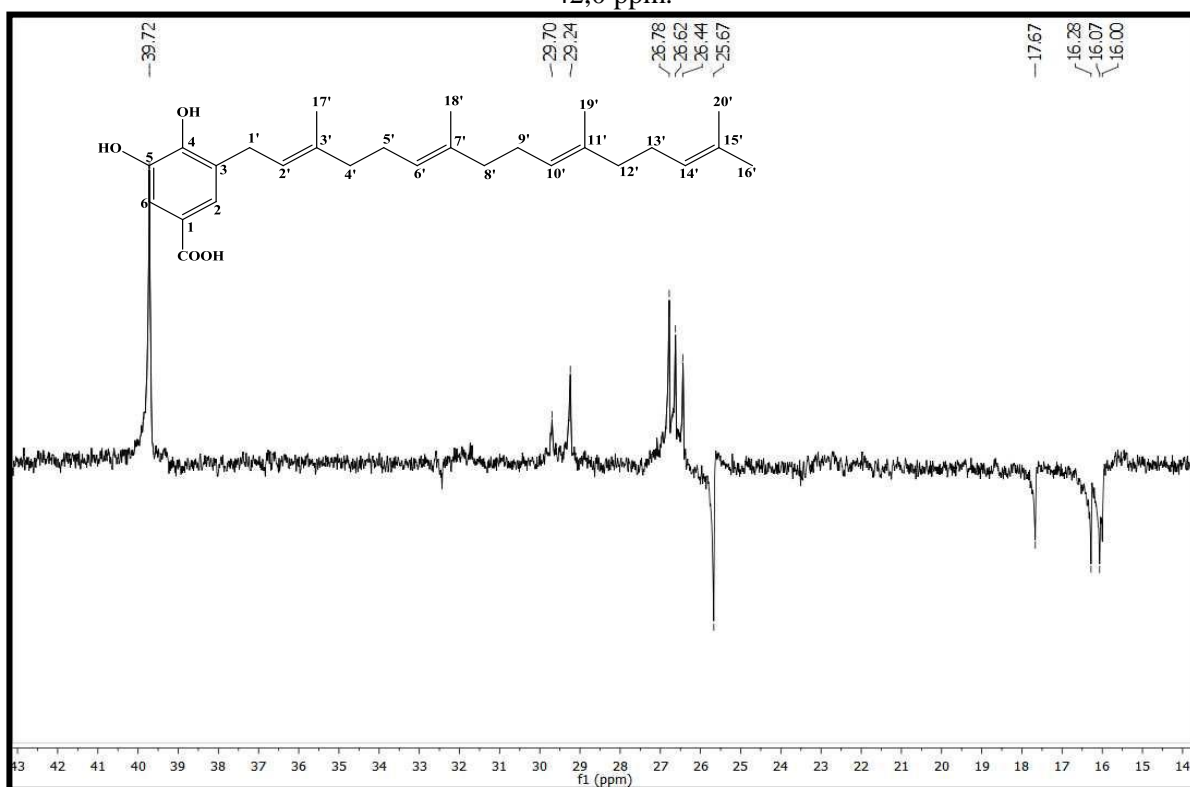
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 105: Expansão do espectro de de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-6* na região de 95,0 a 180,0 ppm.



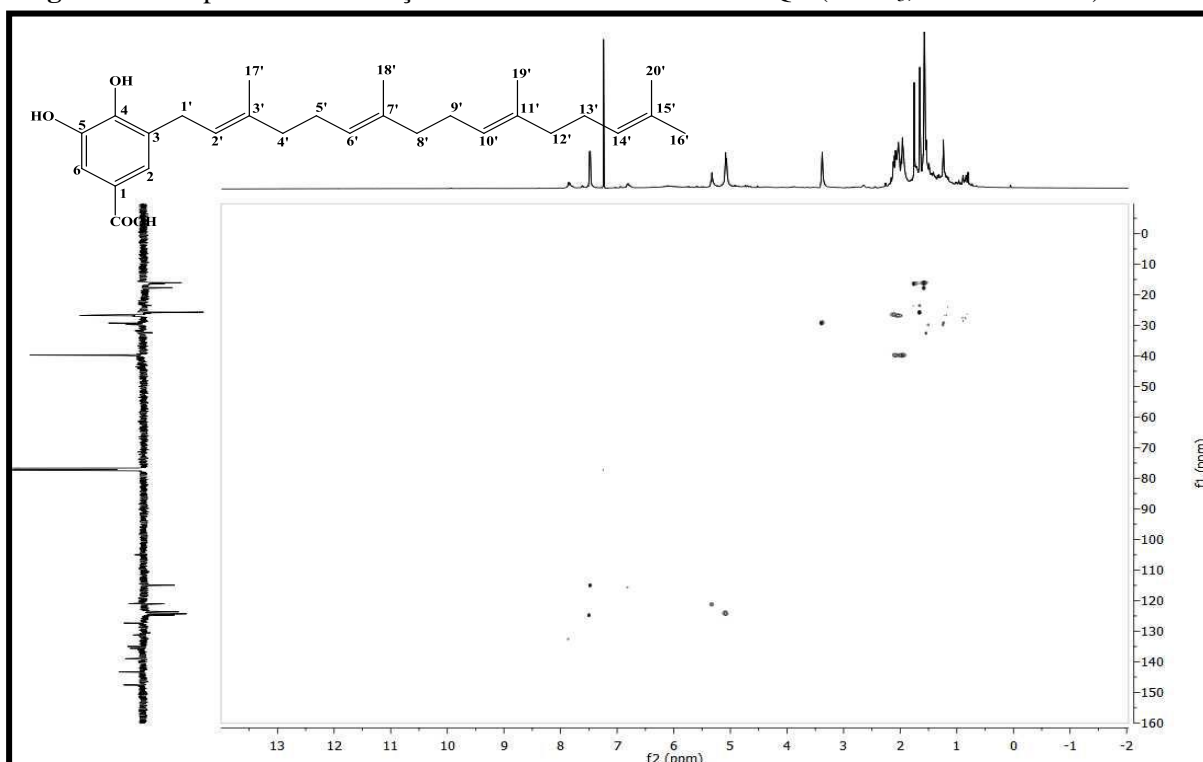
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 106: Expansão do espectro de de RMN¹³C (δ , CDCl₃, 500 MHz) de *Pc-6* na região de 14,0 a 42,0 ppm.



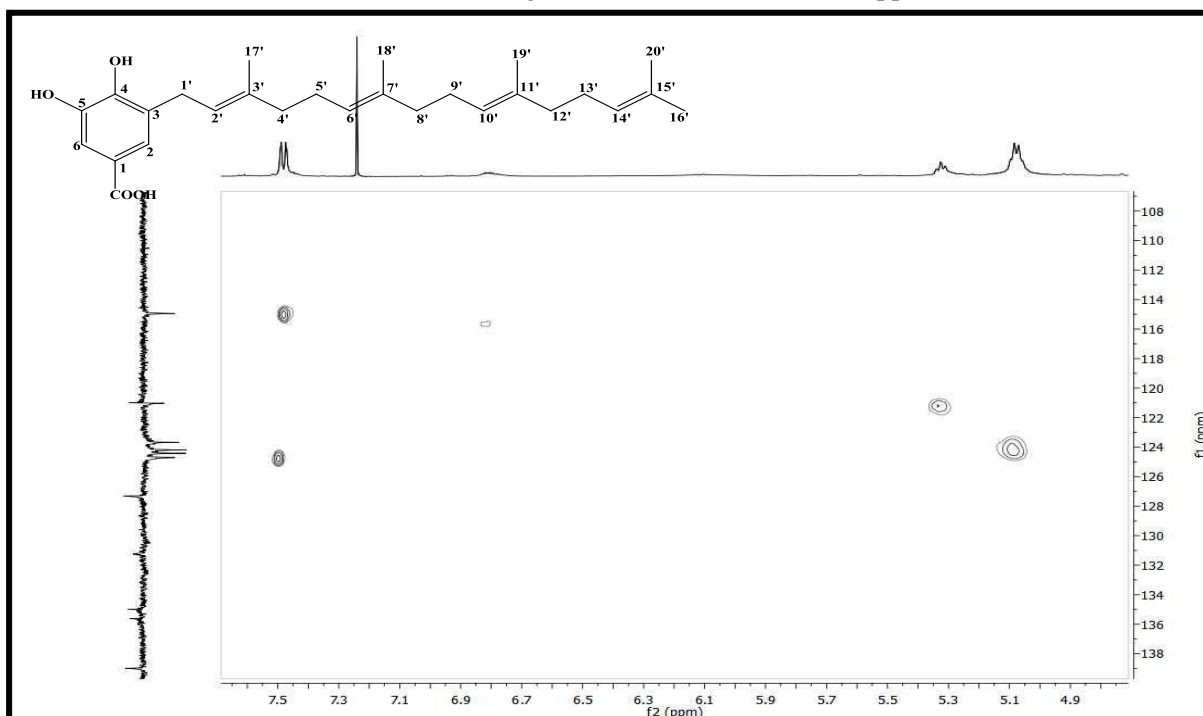
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 107: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-6*.



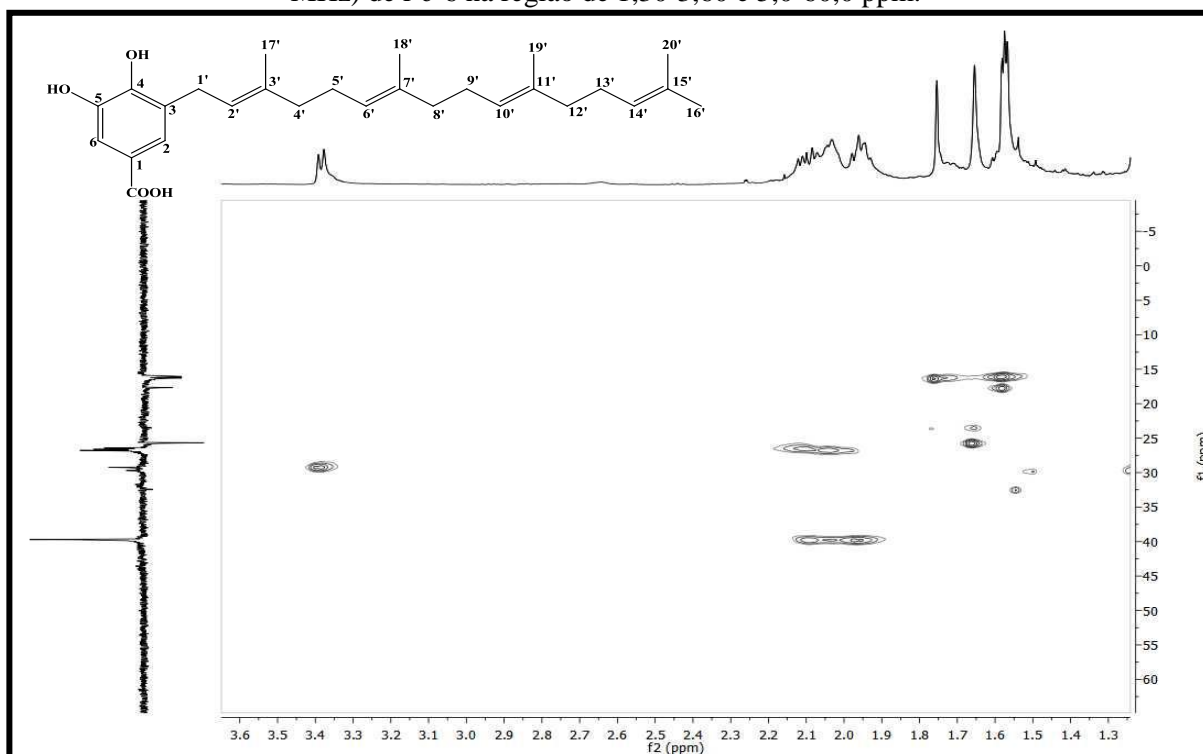
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 108: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-6* na região de 4,9-7,5 e 108,0-138,0 ppm.



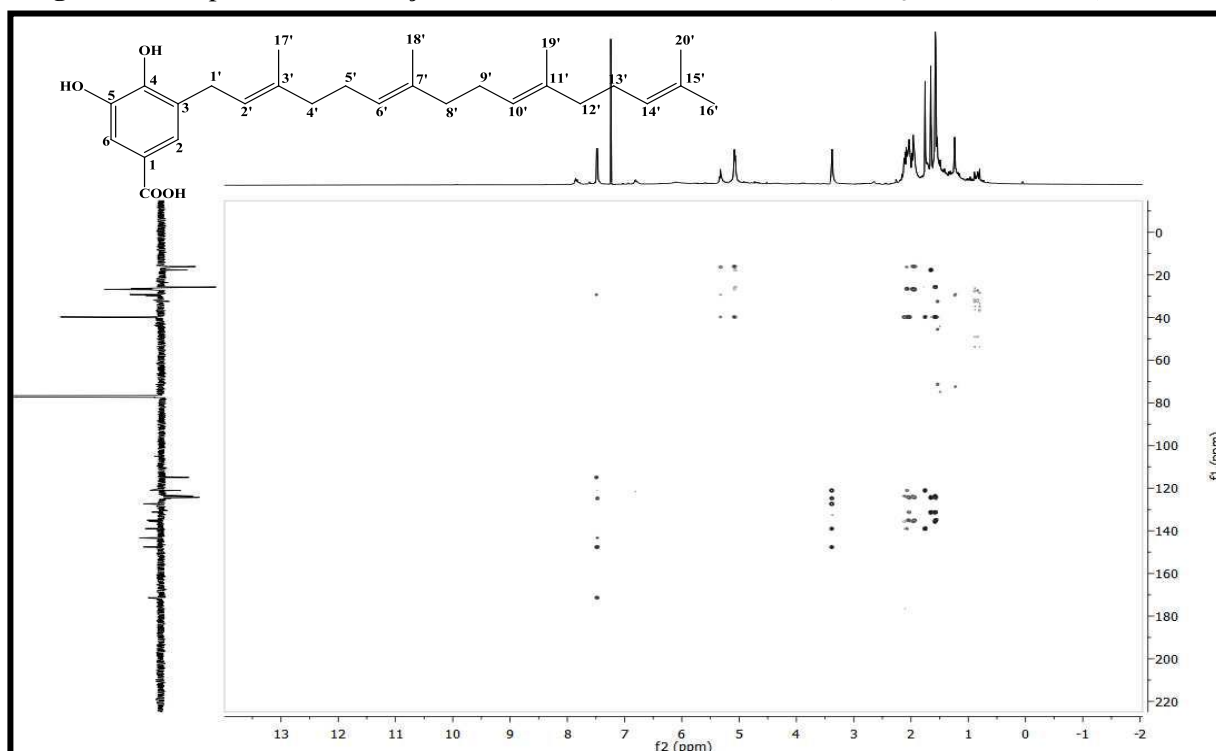
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 109: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-6* na região de 1,30-3,60 e 5,0-60,0 ppm.



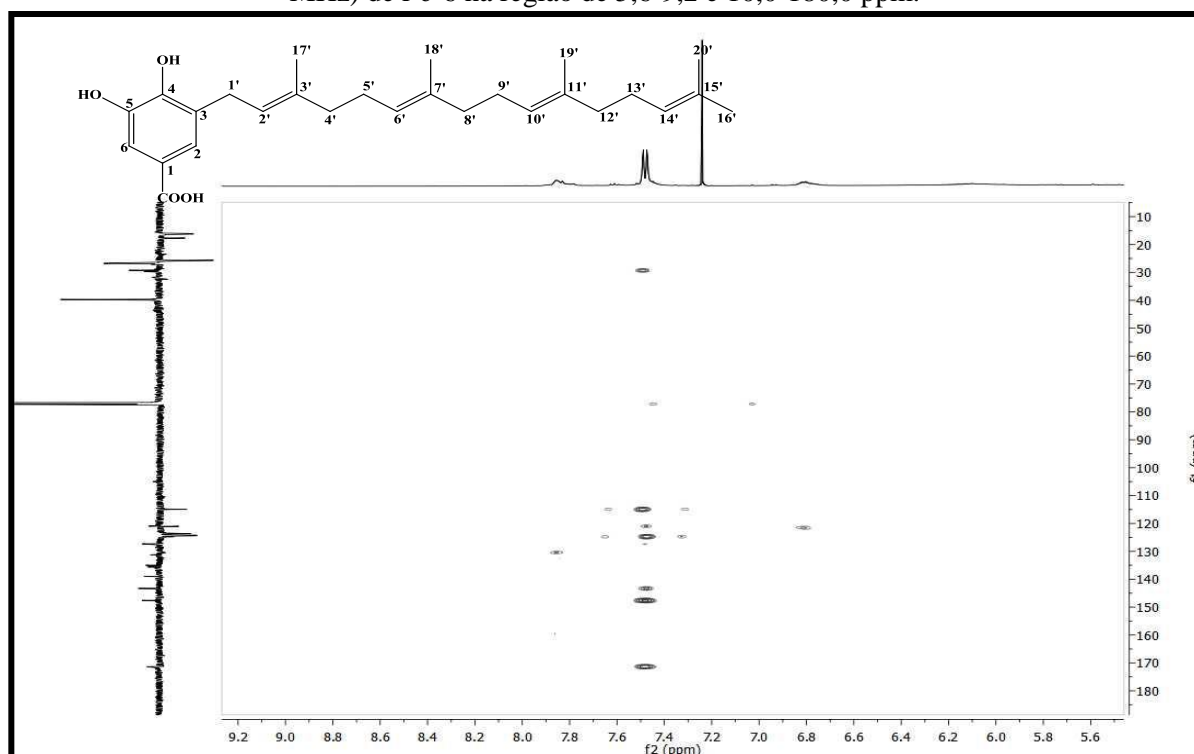
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 110: Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-6*.



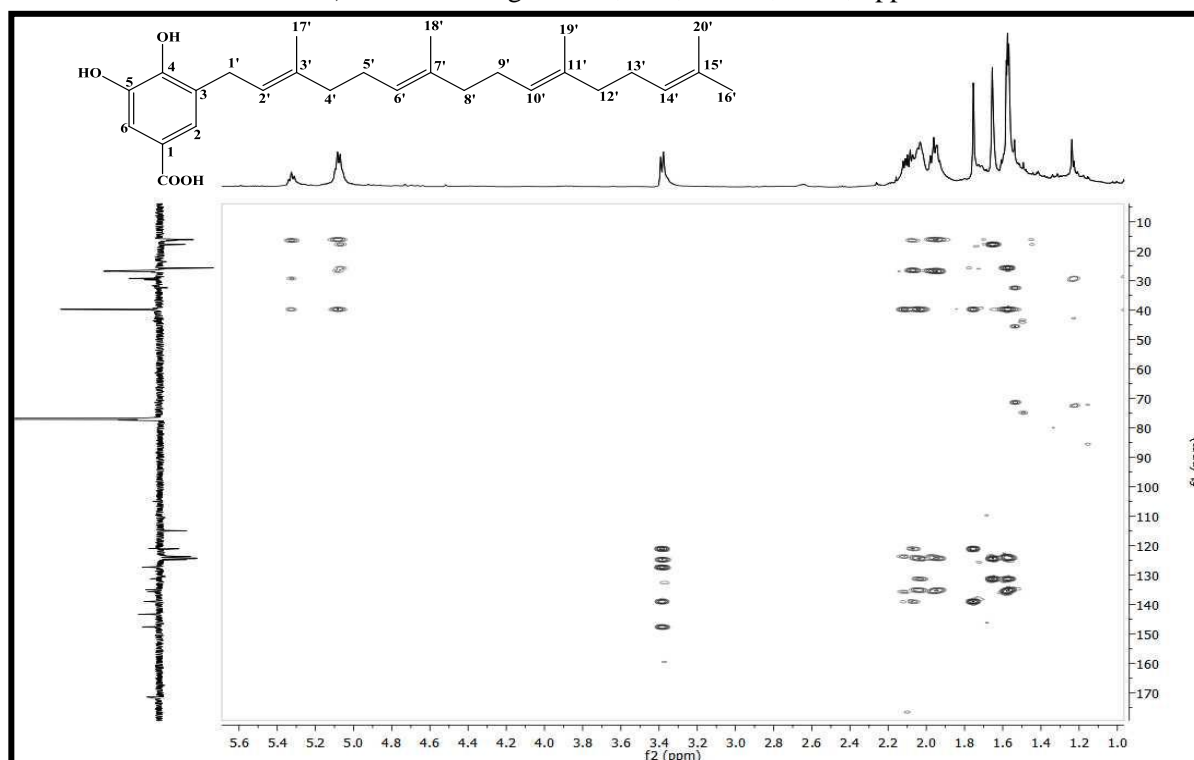
Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 11: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-6* na região de 5,6-9,2 e 10,0-180,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

Figura 12: Expansão do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (CDCl_3 , 500/ 125 MHz) de *Pc-6* na região de 1,00-5,60 e 10,0-170,0 ppm.



Fonte: Elaboração própria, 2013.

6 Estudo Microbiológico

Utilizando critérios de quantidade e dados na literatura algumas frações oriundas do extrato etanólico bruto das folhas e do extrato hexânico dos frutos de *Piper caldense* C.DC. foram selecionadas para realização de avaliação da atividade antimicrobiana contra patógenos conhecidos. As amostras foram testadas no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (Centro de Ciências da Saúde), Universidade Federal da Paraíba, contando com a colaboração da Professora Edeltrudes de Oliveira Lima.

6.1 PRODUTOS TESTADOS

Os produtos analisados foram os compostos codificados como *Pc-1*, *Pc-4*, *Pc-5*, *Pc-6*, isolados das folhas e frutos de *Piper caldense* C.DC, além de uma alíquota dos extratos hexânico e diclorometânico dos frutos, codificados como *EHF_{Pc}* e *EDF_{Pc}*, respectivamente e, o extrato hexânico das raízes da espécie botânica estudada, *EHR_{Pc}*. As amostras foram testadas na concentração 1024 até 32 ug/mL e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO da Sigma Chemical), numa proporção de até 10%, para não interferir sobre os microrganismos.

6.2 ANTIFÚNGICO PADRÃO

Para o controle de atividade antifúngica foi utilizado nistatina (Sigma) numa concentração correspondente a 100 UI/mL.

6.3 MICRORGANISMOS

As linhagens bacterianas utilizadas no estudo foram: *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC-9027, P-03; *Staphylococcus aureus* – ATCC - 25923, ATCC - 13150 e *Staphylococcus epidermidis* – ATCC – 12228, além das espécies fúngicas: *Candida albicans* – ATCC-76645, LM-86, LM-111, *Candida tropicalis* – ATCC-13803, LM-18; LM-20 e *Candida krusei* LM-08, LM-13.

As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal da Paraíba. As cepas bacterianas foram mantidas em Agar Nutriente (AN) e as leveduras em Agar Sabourand Dextrose – ASD (DIFCOLABORATORIES/France/USA) e conservadas a 4°C e a 35°C.

A suspensão dos microrganismos foi preparada em solução salina 0,9% conforme o tubo 0.5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10^6 UFC/mL (NCCLS 2000; HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS 200; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

6.4 MEIOS DE CULTURA

Os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados em Caldo Nutriente (DIFCOLABORATORIES/France/USA) para bactérias, e em Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (DIFCOLABORATORIES/France/USA) para leveduras. Os mesmos foram preparados e usados conforme as instruções do fabricante.

6.5 TRIAGEM MICROBIOLÓGICA

Inicialmente foi realizada uma triagem microbiológica com os compostos *Pc-1*, *Pc-4*, *Pc-5*, *Pc-6*, *EHFPc* e *EDFPc* obtidos da espécie *Piper caldense* C.DC. frente a cepas biológicas bacterianas e de leveduras do gênero *Candida* sp para verificar se alguma atividade farmacológica estava presente. As bactérias foram resistentes às amostras testadas e a maioria mostrou-se sensível em relação às leveduras, apresentando ação fungicida (**Tabelas 20 e 21**). Aquelas que foram consideradas sensíveis foram posteriormente submetidas à determinação da concentração inibitória mínima, e os resultados encontram-se expressos nas **Tabelas 22 a 26**.

6.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM dos produtos testados foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata. Em cada orifício da placa foi adicionado 100 µL do meio líquido CH (bactérias) e CSD (leveduras). Posteriormente, 100 µL da solução dos produtos, na concentração inicial de 1024 mg/ µL, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Foi feita a diluição seriada a uma razão de dois, sendo obtidas as concentrações de 1024 µg/mL até 64 µg/mL. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo dos microrganismos nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se, especificamente, a uma cepa.

Foi feito controle de crescimento do microrganismo e do antifúngico nistatina a 100 UI/mL. As placas foram então seladas e incubadas a 35 °C durante 24 - 72 horas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento dos microrganismos verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA *et al.*, 2007).

A atividade biológica dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os parâmetros descritos a seguir: 50-100 µg/mL = excelente/ótima atividade; 100-500 µg/mL moderada atividade; 500-1000 µg/mL = baixa atividade; > 1000 µg/mL = produto inativo (MITCHER *et al.*, 1972; ALLIGIANAIS *et al.*, 2001; HOLETZ *et al.*, 2002; HOUGHTON *et al.*, 2007).

7 Resultados

Os resultados da triagem microbiológica realizada com as amostras de *Piper caldense* C.DC encontram-se expressos nas **Tabelas 20 e 21** seguintes.

Tabela 20: Triagem dos compostos testados sobre as espécies do gênero *Staphylococcus* e *Pseudomonas*.

Compostos	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 13150	<i>S. epidermidis</i> ATCC - 2228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC – 9027	<i>P. aeruginosa</i> P-03
<i>Pc-1</i>	+	+	+	+	+
<i>Pc-4</i>	+	+	+	+	+
<i>Pc-5</i>	+	+	+	+	+
<i>Pc-6</i>	+	+	+	+	+
EHF<i>Pc</i>	+	+	+	+	+
EDF<i>Pc</i>	+	+	+	+	+
EHR<i>Pc</i>	+	+	+	+	+
Nistatina a 100 UI	+	+	+	+	+

+: *crescimento do microrganismo*

_ : *não crescimento do microrganismo*

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Na tabela 20 observou-se que todas as bactérias foram resistentes às amostras testadas, não apresentando, portanto, ação antibacteriana.

Tabela 21: Triagem dos compostos testados sobre as espécies do gênero *Candida*.

Compostos	<i>C. albicans</i> ATCC 76645	<i>C. albicans</i> LM 86	<i>C. albicans</i> LM 11	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	<i>C. tropicalis</i> LM 18
<i>Pc-1</i>	+	+	+	+	+
<i>Pc-4</i>	-	-	-	+	+
<i>Pc-5</i>	-	-	-	-	-
<i>Pc-6</i>	-	-	-	-	-
EHF<i>Pc</i>	-	-	-	-	-
EDF<i>Pc</i>	-	-	-	-	-
EHR<i>Pc</i>	+	-	-	+	+
Nistatina a 100 UI	+	+	+	+	+

+: crescimento do microrganismo

_ : não crescimento do microrganismo

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Pela análise da tabela 21 verificou-se que *Pc-4*, *Pc-5*, *Pc-6*, EHF*Pc* e EDF*Pc* exerceram atividade fungicida sobre as leveduras do gênero *Candida*, sendo, submetidas à avaliação da concentração inibitória mínima (ver item 6.7) e os resultados encontram-se expressos nas tabelas 22 a 26.

Tabela 22: Determinação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do composto *Pc-4* sobre cepas do gênero *Candida*.

Microrganismos	<i>Pc-4</i> (Diluições)							Controle Levedura	Controle Nistatina
	1024	512	256	128	64	32	16		
<i>C. albicans</i> 76645	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> LM-86	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. albicans</i> LM-111	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC- 13803	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-18	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C.tropicalis</i> LM-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i> LM-13	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+: crescimento do microrganismo

_: não crescimento do microrganismo

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Na tabela 22, a substância codificada como *Pc-4*, na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$, produziu inibição sobre o crescimento de cinco (62,5%,) cepas de *Candida* dentre as oito utilizadas nos ensaios para modulação da atividade biológica.

Tabela 23: Determinação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do composto *Pc-5* sobre cepas do gênero *Candida*.

Microrganismos	<i>Pc-5</i> (Diluições)							Controle Levedura	Controle Nistatina
	1024	512	256	128	64	32	16		
<i>C. albicans</i> 76645	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> LM-86	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. albicans</i> LM-111	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. tropicalis</i> LM-18	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM-08	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM-13	-	+	+	+	+	+	+	+	+

+: crescimento do microrganismo

_: não crescimento do microrganismo

Fonte: Elaboração própria, 2013.

A tabela 23 mostrou que *Pc-5* foi ainda capaz de inibir a proliferação de 62,5 % das leveduras na concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$, atuando de forma inibitória sobre cinco cepas testadas, enquadrando-se, dessa forma, no nível de atividade moderada, segundo os parâmetros estabelecidos por Mitcher *et al.* (1972), Alligianais *et al.* (2001), Holetz *et al.* (2002) e Houghton *et al.* (2007).

Tabela 24: Determinação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do composto *Pc-6* sobre cepas do gênero *Candida*.

Microrganismos	<i>Pc-6</i> (Diluições)							Controle Levedura	Controle Nistatina
	1024	512	256	128	64	32	16		
<i>C. albicans</i> 76645	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> LM-86	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> LM-111	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM-08	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: crescimento do microrganismo

_ : não crescimento do microrganismo

Fonte: Elaboração própria, 2013.

De acordo com a tabela 24 o composto *Pc-6* não revelou, nas concentrações testadas, nenhuma inibição sobre o crescimento das leveduras do gênero *Candida*, sendo, então, descartada ação fungicida.

Tabela 25: Determinação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do composto EHF P_c sobre cepas do gênero *Candida*.

Microrganismos	EHF P_c (Diluições)							Controle Levedura	Controle Nistatina
	1024	512	256	128	64	32	16		
<i>C. albicans</i> 76645	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> LM-86	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans</i> LM-111	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-18	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. tropicalis</i> LM-20	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. krusei</i> LM-08	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: crescimento do microrganismo

- : não crescimento do microrganismo

Fonte: Elaboração própria, 2013.

A **Tabela 25** demonstrou que o composto codificado como EHF P_c apresentou maior número de inibições quando comparado às demais amostras, apresentando modulação biológica positiva sobre a metade (50%) das cepas analisadas e na maioria das concentrações testadas (512, 256, 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$), possuindo CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$, inserindo EHF P_c na classificação de composto com excelente/ótima atividade de acordo com a literatura.

Tabela 26: Determinação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do composto EHD*Pc* sobre cepas do gênero *Candida*.

Microrganismos	EDF <i>Pc</i> (Diluições)							Controle Levedura	Controle Nistatina
	1024	512	256	128	64	32	16		
<i>C. albicans</i> 76645	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> LM-86	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> LM-111	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM-08	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: crescimento do microrganismo

_ : não crescimento do microrganismo

Fonte: Elaboração própria, 2013.

Pela análise da tabela 26 verificou-se que o composto EDF*Pc* foi inativo frente ao crescimento de leveduras do gênero *Candida*, não apresentando, assim, atividade fungicida frente às cepas testadas. Dessa forma, dentre todos os compostos testados, pôde-se destacar a atividade microbiológica de *Pc-4*, *Pc-5* e EHF*Pc*, bem como enquadrá-los como agentes promissores na investigação desta e de outras atividades farmacológicas futuras.

8 Conclusões e Perspectivas

O estudo Fitoquímico das folhas e frutos de *Piper caldense* C.DC. (Piperaceae) realizado por meio de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV, RMN¹H e ¹³C uni e bidimensionais permitiu isolar e identificar sete substâncias, sendo elas dois esteroides: β-sitosterol (**Pc-1a**), estigmasterol (**Pc-1b**), duas substâncias porfirínicas: 15'-hidroxi-porfirinolactona **a** (**Pc-2**), feofitina **a** (**Pc-3**) e três derivados do ácido benzoico: 3,4-dihidroxi-2-((2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il) ácido benzóico (**Pc-4**), 4-hidroxi-3-((2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il) ácido benzóico (**Pc-5**) e 3,4-dihidroxi-5-((2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il) ácido benzóico (**Pc-6**), contribuindo, dessa forma, para o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Piper* L. e da espécie botânica investigada, uma vez que há muito poucos relatos de estudos referentes a *Piper caldense* C.DC.

O estudo dos frutos de *Piper caldense* C.DC. está sendo descrito pela primeira vez neste trabalho.

Todos os compostos isolados estão sendo relatados pela primeira vez na espécie *Piper caldense* C.DC, tendo sido já isolados em outras espécies botânicas do gênero *Piper* L., excetuando-se o composto codificado como *Pc-2*, que é inédito na família Piperaceae.

Extratos e frações selecionados para modulação de atividade microbiológica demonstraram atividade fungicida contra leveduras do gênero *Candida* sp, mais uma vez, ratificando a importância em 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.

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.

ALLIGIANAIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, H. S. **Novos flavonóides monoterpênicos e outros constituintes químicos isolados de espécies de *Piper* (Piperaceae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

_____; CHAVES, M. C. O.; SOUZA, M. F. V. Three new compounds from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1610-1615, 2011.

_____. Caldensinic acid, a benzoic acid derivative and others compounds from *Piper carniconnectivum*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, 2010.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, suppl. 1, p. 5-16, 2001.

ANNAMALAI, A. R.; MANAVALAN, R. Effects of 'trikatu' and its individual components and piperine on gastro intestinal tracts:trikatu-A bioavailable enhancer. **Indian Drugs**, v. 27, n. 12, p. 595-604, 1990.

ARAÚJO, M. J. C. **Potencial acaricida de óleos essenciais de espécies do gênero piper sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* koch (Acari: Tetranychidae)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, João Pessoa, 2011.

ARAÚJO JÚNIOR, J. X. **Elucidação estrutural dos constituintes químicos isolados de *Piper tuberculatum* Jacq. var *tuberculatum* e avaliação sobre o sistema cardiovascular de uma mistura contendo duas alcaloides: Piperina e Piperdardina**. 1996. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1996.

_____. *et al.* Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 559-561, 1997.

_____. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 27, n. 3, p. 325-327, 1999.

BALDOQUI, D. C. *et al.* A chromene an prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 899-902, 1999.

_____. Flavones, Lignans and Terpene from *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 1107-1109, 2009.

BARKER, R. **Organic Chemistry of Biological Compounds**. New Jersey: FMB, 1977.

BASTOS, D. H. M.; OLIVEIRA, D. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, p. 1051-1056, 2011.

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.

BILIA, A. R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. Kava–kava and anxiety: growing knowledge about the efficacy and safety. **Life Sci**, v. 70, p. 2581-2597, 2002.

BODIWALA, H. S. *et al.* Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **J. Nat. Med.**, v. 61, p. 418-421, 2007.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica & plantas medicinales**. 2. ed. Acribia, 2001.

CABRAL, A. G. S. *et al.* Phaeophytins from *Thyrsacanthus ramosissimus* Moric. with inhibitory activity on human dna topoisomerase II-a#. **Química Nova**, v. 35, n. 11, 2222-2225, 2012.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

CARDOZO JUNIOR, E. L. **Elucidação estrutural de constituintes químicos das raízes de *Piper tuberculatum* JACQ. Var. *Tuberculatum* e *Piper caldense* C. DC. e screening farmacológico do extrato de *Piper caldense* C. DC.** 1998. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1998.

_____; CHAVES, M. C. O. Caldensin, a new N-methylaristolactam alkaloid from *Piper caldense*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 3, p. 216-218, 2003.

CARVALHO, J. C. T. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999.

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

CHAVES, M. C. O.; SANTOS, B. V. O. Constituents from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 547-549, 2002.

_____; DE OLIVEIRA, A. H. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 75-77, 2006.

_____. H. 1-Cinnamoyl pyrrolidide from *Piper marginatum*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 31, p. 1213-1214, 2003a.

_____; FIGUEIREDO-JÚNIOR, A. G. Amides from *Piper tuberculatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 74, p. 181-183, 2003b.

CHEN, Y. C.; LIAO, C. H.; CHEN, I. S. Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2101-2111, 2007.

CHENG, H. *et al.* Cytotoxic pheophorbide-related compounds from *Clerodendrum calamitosum* and *C. cyrtophyllum*. **Journal Product Natural**, v. 64, p. 915-919, 2001.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animals infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Willkins, 1991. p. 739-788.

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

COTINGUIBA, F. *et al.* Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med. Chem. Res.**, v. 18, p. 703-711, 2009.

DA CUNHA, E. V. L.; CHAVES, M. C. O. Two amides from *Piper tuberculatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 72, n. 2, p. 197-199, 2001.

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.

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.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. **Europe Journal Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 109-126, 2001.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. 3. ed. West Sussex: John Wiley & Sons LTD, 2008.

DIAZ, P. P.; ARIAS, T.; JOSEPH-NATHAN, P.: A chromene, an isoprenylated methyl hydroxybenzoate and C-methyl flavonone from the bark *Piper hostmannianum*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 809-811, 1987.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DOMINGUEZ, X. A.; ALCORN, J. B. Screening of medicinal plants used by huastec mayans of northeast México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, p. 157-163, 1985.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHARA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v. 28, p. 637, 2003.

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. **Piper**: a model genus for studies of phytochemistry, ecology 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, 1978.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico de frações obtidas das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 61-66, jan./mar. 2006.

FLORES, N. *et al.* Antiparasitic Activity of Prenylated Benzoic Acid Derivatives from Piper Species. **Phytochemistry**. v. 70, p. 621-627, 2009.

FREITAS, G. C. *et al.* Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. **Phytochem. Lett**, v. 2, p. 119-122, 2009.

GANDUL-ROJAS, B.; ROCA, M.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. J. Chlorophyll and carotenoid degradation mediated by thylakoid-associated peroxidative activity in olives (*Olea europaea*) cv. Hojiblanca. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 499-507, 2004.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E.; Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biologia). Série Fisiologia Vegetal**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GARTNER, B. L. Breakage and regrowth of Piper species in rain forest understory. **Biotropica**, St. Louis, v. 21, p. 303-307, 1989.

GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. San Francisco: Freeman, Cooper, 1969. p. 92-181.

GREEN, T. P.; TREADWELL, E. M.; WIEMER, D. F. Arieianal, a Prenylated Benzoic Acid from *Piper arieianum*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 367-368, 1999.

GREGORY, R. P. F. **Biochemistry of Photosynthesis**. 2. ed. London: John Wiley & Sons LTD, 1978.

GREIG, N. Regeneration mode in neotropical Piper: habitat and species comparisons. **Ecology**, Tempe, v. 74, p. 2125-2135, 1993.

_____; MAUSETH, J. D. Structure and function of dimorphic prop roots *Piper auritum* L. B. **Torrey Bot. Club**, New York, v. 118, p. 176-183, 1991.

GUBERT, C. *et al.* Composição do óleo essencial de *Piper caldense* C.D.C. e *Piper solmsianum* C. D.C. provenientes da mata atlântica do litoral do Paraná. In: SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, 5., 2010, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2010.

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.

_____; ICHASO, C. L. F.; MAUTONE, L. *Peperomia* Ruiz e Pav. do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. **Boletim do Museu Botânico Kuhlmann**, v. 8, p. 15-50, 1985.

_____; MATTOS FILHO, A. Considerações sobre a Floresta Pluvial Baixo-Montana. **Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza**, v. 23, p. 45-54, 1988.

_____; VALENTE M. C. *Piper*. In: REITZ, R.; KLEIN, R. M. (Eds.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2001.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

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.

HARBONE, J. B. **Methods in plant biochemistry: Plant phenolics**. London: Academic Press, 1989.

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Foods Science & Technology**, v. 7, n. 1, p. 8-15, 1996.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdFSCAR, 2003.

HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing and elephant. **Journal of Etnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

HUANG, X. Proteasome and NF- κ B inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**, v. 3, p. 582-592, 2007.

HYVÄRINEN, K.; HINNYNEN, P. H. Liquid chromatographic separation and mass spectrometric identification of chlorophyll b allomers. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 107-116, 1999.

ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F. Piperaceae do município do Rio de Janeiro – II. *Peperomia* RUIZ ET PAVON. **Rodriguésia**, v. 36, n. 59, p. 47-60, 1984.

_____.; COSTA, C. G. 19. Piperaceae do município do Rio de Janeiro I. O gênero *Piper* L. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 20, p. 145-188, 1977.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **Am. J. Bot.**, v. 88, p. 706-716, 2001.

JUDD, W. S. *et al.* **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

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*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1783-1788, 2004.

_____. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. Lhotzkyanum* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, 2007.

_____. Prenylated Benzoic Acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 96-98, 2009.

_____. Secondary metabolites isolated from *Piper chimonantifolium* and their antifungal activity. **Natural Product Research**, v. 26, n. 8., p. 770-773, 2012.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Rima, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2005.

_____. **Princípios de bioquímica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

LIN, H. Y.; CHIU, H. L.; LU, T. L.; TZENG, C. Y.; Lee, T. H.; Lee, C. K.; Shao, Y. Y.; Chen, C. R.; Chang, C. I.; Kuo, Y. H. Ficusmicrochlorin A-C, two new methoxy lactone chlorins and an anhydride chlorin from the leaves of *Ficus microcarpa*. **Chemical&Pharmaceutical Bulletin**. V. 59 (1), p. 113-116; 2011. Publisher: (Pharmaceutical Society of Japan,) CODEN:CPBTAL ISSN:0009-2363.

LINCOLN, T.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 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.

LOPEZ, A.; MING, D. S; TOWERS, G. H. N. Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaefolium*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 62-64, 2002.

MABBERLEY, D. J. **The plant book**: a portable dictionary of the higher plants. New York: Cambridge Univ. Press, 1997.

MAESTRIN, A. P. J. Extração e purificação de clorofila *a*, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, 2009.

MALAMI, I. Prenylated benzoic acid derivatives from piper species as source of anti-infective agents. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 6, p. 1554-1559, 2012.

MARQUES, J. V. Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 2036-2039, 2007.

MARTINS, R. C. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.

_____; SILVA, C. L. M. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*. L.). **International Journal of Refrigeration**, v. 25, n. 7, p. 966-974, 2002.

MATA, R. *et al.* Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1961-1968, 2004.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MATSUO, A. *et al.* Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 427-430, 1996.

MAXWELL, A.; RAMPERSAD, D. Novel Prenylated Hydroxybenzoic acid Derivatives from *Piper Saltuum*. **J. Nat. Prod.**, v. 52, n. 3, p. 614-618, 1989.

MELLO, J. C. P. *et al.* **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999.

MIQUEL, E. A. W. Piperaceae. **C.EP. Martius (Ed.), Flora Brasiliensis. Typographia Regia, Monachii**, v. 4, n. 1, p. 1-76.

MIRANDA, R. P. Methyl 4-Hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoate, Major Insecticidal Principle from *Piper guanacastensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 282-284, 1997.

MITSCHER, L. A. *et al.* Antimicrobial agents from higher plants I: Introduction, rationale and methodology. **Llodya**, v. 35, n. 2, p. 157-166, 1972.

MONTES, R. C. **Estudo fitoquímico da alga marinha *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula (Sargassaceae) do litoral paraibano**. 2012. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

NAKAMURA, C. V. *et al.* Antibacterial, antifungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 62, n. 3, p. 221-228, 1991.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 7. ed. Villanova. PA: NCCIS, 2000.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007.

NOGUEIRA, T. B. S. S. **Primeiras substâncias de *Cordia exaltata Lam.*** - uma contribuição para quimiotaxonomia da família Boraginaceae. 2009. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

NUNES, J. D. *et al.* Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 1049-1052, 2007.

NUNES, X. P. *et al.* Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 718-723, 2008.

OCAMPO, R.; REPETA, D. J. 132(S)-OH methyl bacteriopheophorbide a allomer in sedimentary organic matter. **Organic Geochemistry**, v. 35, p. 209-214, 2004.

OLIVEIRA, J. H. G. *et al.* Estruturas de reprodução de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 59-66, 2005.

ORJALA, J. *et al.* Five New Prenylated p-Hydroxybenzoic Acid Derivatives with Antimicrobial and Molluscidal Activity from *Piper aduncum* Leaves. **Planta Med.**, v. 59, p. 546-551, 1993a.

_____. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 813-818, 1993b.

_____. Cytotoxic and Antibacterial Dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 18-26, 1994.

PARMAR, V. S. *et al.* Phytochemistry of genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-676, 1997.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3. ed. Thomson Learning, 2001.

_____. *et al.* **Introdução à espectrometria**. São Paulo: CENGAGE, 2010.

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 (GMR)**, v. 7, p. 772-781, 2008.

REGASINI, L. O. *et al.* Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, 2009.

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2007. DIAS, C. S. *et al.* **Novas Feofitinas de *Anisacanthus brasiliensis* Lindau (Acanthaceae)**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2007.

_____, 31., 2008. FREITAS, G. C.; KATO, M. J. **Flavona em folhas de *Piper caldense* C. DC. (PIPERACEAE)**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2008.

ROBBERS, J. E. *et al.* Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, p. 2389-2395, 2009.

ROHDICH, F. *et al.* The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reaction catalyzed by ISPG and protein. **Proceeding National Academic Science**, v. 100, n. 4, p. 1568-1591, 2003.

ROSA, S. M.; SOUZA, L. A. Estruturas de reprodução de *Piper amalago* var. *medium* Liannaeus (Piperaceae). **Acta Científica Venezuelana**, v. 55, p. 27-34, 2004.

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.

SANTOS, B. V. O.; CHAVES, M. C. O. 2,4,5-Trimethoxypropiophenone from *Piper marginatum*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 27, n. 1, p. 113-114, 1999.

_____. *et al.* Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1381-1384, 1998.

SANTOS, F. P. **Chalconas e Flavanonas isoladas das partes aéreas de *Piper glandulosissimum* Yuncker (Piperaceae)**. 2004. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, 2004.

SANTOS, P. R. D. *et al.* Essential oil of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest, **Phytochemistry**, v. 58, p. 547-551, 2001.

SCODRO, R. B. L. Anti-Mycobacterium tuberculosis activity of extracts with a new benzoic acid derivative from *Piper diospyrifolium* by supercritical carbon dioxide. **Planta Médica**, v. 78, p. 1187-1187, 2012.

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.

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

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.

SILVEIRA, J. H. Uso da biodiversidade para produção de medicamentos. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 2003.

SILVERSTEIN, F. X.; WEBSTER, D. J. K. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

SOARES, R. R. S. **Estudo de propriedades da clorofila a e da feofitina a visando a terapia fotodinâmica**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Maringá, Maringá, 2006.

SOUZA, F. H. T. **Farmacocímica e Farmacobotânica de *Richardia brasiliensis* Gomes (RUBIACEAE)**. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

SOUZA, L. A. **Morfologia e anatomia vegetal (célula, tecidos, órgãos e plântula)**. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2003.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, 1998.

STREIT, N. M. *et al.* As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

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

TOMAZ, A. C. A. *et al.* Chemical constituents from *Richardia grandiflora* 173 (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n. 1. p. 47-52, 2008.

_____. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1. p. 47-52, 2008.

TYLER, E. V. **Farmacognosia, Farmacobiocotecnologia**. Editorial Premier, 1997.

UNICEF *et al.* Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Strategic Direction for research: Tuberculosis. In: FERRO, V. O.; FUNARI, C. S. Uso ético da

biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, 2002a.

_____. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Strategic Direction for research: Malaria. In: FERRO, V. O.; FUNARI, C. S. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, 2002b.

_____. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Strategic Direction for research: Chagas disease. In: FERRO, V. O.; FUNARI, C. S. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, 2002c.

_____. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Strategic Direction for research: Schistosomiasis. In: FERRO, V. O.; FUNARI, C. S. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, 2002d.

_____. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Strategic Direction for research: Leishmaniasis. In: FERRO, V. O.; FUNARI, C. S. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, 200e.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 519-528, 2005.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WAGNER, J. D. A. A importância dos produtos de origem natural no atendimento à saúde. **Fórum de Debates – Fitomedicamentos e Produtos Naturais**. São Paulo, Brasil, 2002.

WETTSTEIN, D. V.; GOUGH, S.; KANNANGARA, C. G. Chlorophyll Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1039-1057, 1995.

WHITE, R. C.; JONES, I. D.; GIBBS, E. Determination of Chlorophylls, Chlorophyllides, Pheophytins, and Pheophorbides in Plant Material. **Journal of Food Science**, v. 28, n. 4, p. 431-436, 1963.

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

WHO – World Health Organization. **WHO police perspectives on medicines**. Geneva: World Health Organization, 2002.

WOLTERS B. Jahrtausend vor Kolumbus: Indianische kulturpflanzen und Arzneidrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 40, p. 1-10, 1992.

WOUNG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hon-Kong plants used in chinese medicine. **Fitoterapia**, v. 69, n. 1, p. 11-16, 1988.

XUAN, T. D. *et al.* 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.

YUNCKER, T. G. Flora do Panamá, Part IV. Fascicule 1. Piperaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 37, p. 1-120, 1950.

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

_____. The Piperaceae of Brazil. II. *Piper*-Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorrhachis*. **Hoehnea**, v. 3, p. 29-284, 1973.

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

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.