

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

KAROLINE VITÓRIA DA CRUZ SOARES

**Estudo da composição química e avaliação da atividade antimicrobiana
de extratos das folhas de *Piper arboreum* e *Piper aduncum***

UBERLÂNDIA-MG

2020

KAROLINE VITÓRIA DA CRUZ SOARES

**Estudo da composição química e avaliação da atividade antimicrobiana
de extratos das folhas de *Piper arboreum* e *Piper aduncum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito do Curso bacharelado em Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de graduado em Química Industrial.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof^ª. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa

Uberlândia

2020

KAROLINE VITÓRIA DA CRUZ SOARES

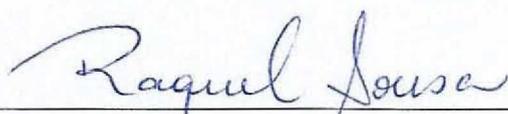
Estudo da composição química e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos das folhas de *Piper arboreum* e *Piper aduncum*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito do Curso bacharelado em Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de graduado em Química Industrial.

Área de concentração: Química Orgânica

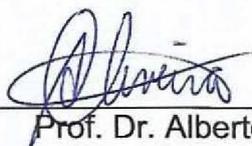
Uberlândia, Minas Gerais, 08 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

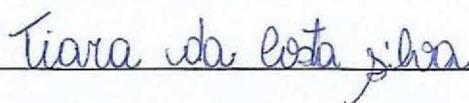


Prof^ª. Dr^ª. Raquel Maria Ferreira de Sousa

(Orientador- UFU)



Prof. Dr. Alberto de Oliveira
(Examinador- UFU)



Profa. Ms. Tiara da Costa Silva
(Examinador- UFU)

Agradecimentos

Acima de tudo gostaria de agradecer a Deus pelas grandes pessoas em minha vida, pela força e saúde.

A Prof^ª. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa por transmitir seu conhecimento, pela dedicação, brandura e paciência como orientadora.

Ao Prof. Dr. Alberto Oliveira por ter permitido o início do projeto e por me despertar o interesse nos estudos de produtos naturais durante a disciplina de orgânica.

A todos do IQ-UFU, que colaboraram durante a minha graduação e a deixaram mais leve e divertida, mesmo em meio a obstáculos, me incentivaram a não desistir e seguir firme, em especial: Gilberto, Tomás, Bárbara, Marina, Hanna e Nayanne.

Aos colegas de laboratório do NuPPEN por toda ajuda.

Ao meu namorado Pablo Vieira, obrigada por todo amor, compreensão e incentivar meu crescimento pessoal desde o ensino médio.

Aos meus amados pais Josina e João Geraldo, por não medir esforços para conquistar meus objetivos, sou eternamente grata em ter vocês em minha vida!

A minha prima Tamires, obrigada pelos conselhos e carinho.

A minha família maravilhosa que sempre esteve presente.

As agências de fomento, FAPEMIG, CAPES (Código de Financiamento 001) e CNPq, pelas bolsas de Iniciação Científica e nos congressos em que participei.

Por último, não menos importante a mim, por ter perseverado até o fim e poder conquistar mais um belo degrau na vida. Toda essa realidade um dia foi sonhada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

- José de Alencar.

RESUMO

As espécies *Piper arboreum* e *P. aduncum*, pertencente à família Piperaceae, são conhecidas popularmente como “pimenta-longa” e “pimenta-de-macaco”, respectivamente. Essas espécies de *Piper* apresentam muita utilização na medicina popular devido as substâncias presentes nos extratos bioativos. Assim, neste trabalho foi realizado extrações de folhas das espécies *Piper* mencionadas com solventes de diferentes polaridades como em hexano, etanol e diclorometano, seguido da prospecção fitoquímica em cromatografia em camada delgada (CCD) e constatando algumas classes de metabólitos secundários com uso de reveladores específicos. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada contra três espécies de fungos causadores da candidíase através da concentração inibitória mínima (CIM) e também para bactérias aeróbias e anaeróbias presentes na cavidade bucal. Os extratos etanólicos de *P. arboreum* (EE01) e *P. aduncum* (EE02), mais o extrato diclorometano para *P. arboreum* (ED01) se mostraram mais efetivos frente aos fungos analisados, em destaque para o fungo *Candida tropicalis* (CIM de 46,7; 187,5; 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Entretanto, para a atividade antibacteriana, a espécie de *P. arboreum* apresentou uma inibição maior na extração hexânica (EH01), tendo ótimos resultados frente as duas bactérias anaeróbia e apenas uma para bactérias aeróbias, todas com valores de CIM iguais a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O extrato EE02 se destacou com maiores inibições para bactérias anaeróbias *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*, ambas com CIM de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE/EM) a fim de identificar compostos bioativos. Através da análise verificou-se, dentre outros compostos, a presença dos flavonoides catequina (m/z 289,0715) e aduncamide (m/z 318,1336), da lactona sequiterpênica laurenobiolide (m/z 291,1591), que são compostos com o potencial de prevenção para agentes microbianos bucais, como as cáries e periodontites tornando estas espécies estudadas promissoras como possíveis fármacos fitoterápicos.

Palavras-chave: *Piper arboreum*, *Piper aduncum*, atividade antifúngica, atividade antibacteriana, CLAE/EM.

ABSTRACT

The species *Piper arboreum* and *P. aduncum*, belonging to the Piperaceae family, are popularly known as "long pepper" and "monkey pepper", respectively. These *Piper* species are widely used in folk due to the substances present in bioactive extracts. Thus, in this work, leaf extractions of the species *Piper* mentioned with solvents of different polarities such as in hexane, ethanol and dichloromethane, followed by phytochemical prospection in Thin Layer Chromatography (TLC) with specific developers for the main classes of secondary metabolites. The antimicrobial activity of the extracts was tested against three species of fungi that cause candidiasis through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and also for aerobic and anaerobic bacteria. The ethanolic extracts of *P. arboreum* (EE01) and *P. aduncum* (EE02), plus the dichloromethane extract for *P. arboreum* (ED01) were more active about the analyzed fungi, especially the fungus *Candida tropicalis* (MIC of 46.7; 187.5; 187.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). However, for antibacterial activity, the species of *P. arboreum* presented a greater inhibition in hexane extraction (EH01), with excellent results against the two anaerobic bacteria and only one for aerobic bacteria, all with MIC values equal to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The leaves of *P. aduncum* stood out in ethanol extraction (EE02), with greater inhibitions for anaerobic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Actinomyces naeslundii*, both with MIC 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to the mass spectrometer (HPLC/EM) to identify bioactive compounds. Through the analysis, it was verified, among other compounds, the presence of the catechin flavonoid (m/z 289.0715) and aduncamide (m/z 318.1336), of the laurenobiolide sequiterenic lactone (m/z 291.1591), which are compounds with the potential to prevent oral microbial agents, such as cavities and periodontitis making these studied species promising in possible phytotherapeutic drugs.

Keywords: *Piper arboreum*, *Piper aduncum*, antifungal activity, antibacterial activity, HPLC/EM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das rotas metabólicas para compostos fenólicos, alcaloides e terpenoides.....	14
Figura 2. Estrutura de alguns terpenos.	15
Figura 3. Estrutura geral de um flavonoide.	16
Figura 4. Exemplo de estruturas de alcaloides.....	16
Figura 5. Fotografia das folhas de espécies a) <i>P. aduncum</i> e b) <i>P. arboreum</i> . 17	
Figura 6. (a-c) <i>Piper aduncum</i> – a. galhos com espiga; b. detalhe de tricomas em veias secundárias; c. detalhe de tricomas em galhos.	18
Figura 7. (d-f) <i>Piper arboreum</i> - d. ramo fértil; e. detalhe face abaxial da folha; f. detalhe da espiga em flor, evidenciando as brácteas florais.	19
Figura 8. Estruturas moleculares de <i>P. arboreum</i> referentes a tabela 1.	23
Figura 9. Estruturas moleculares de <i>P. aduncum</i> referentes a tabela 2.....	26
Figura 10. Exsiccatas das amostras de <i>P. arboreum</i> (a) e <i>P. aduncum</i> (b) depositada no Herbário Uberlandense, respectivamente.....	28
Figura 11. Extração de alcaloides de <i>P. arboreum</i> a) e <i>P. aduncum</i> b) respectivamente.....	30
Figura 12. Fluxograma do processo de técnica de separação ácido/base. 31	
Figura 13. Placas CCD, sem reveladores, das duas FM sob dois comprimentos de onda, a) 254 e b) 365 nm, respectivamente.	38
Figura 14. Cromatogramas de picos base do EH01, EE01 e ED01 (folhas de <i>P. arboreum</i>) obtidos por CLAE-EM nos modos negativos (-) e positivos (+).....	40
Figura 15. Estrutura dos compostos identificados no EH, EE e ED das folhas das folhas de <i>P. arboreum</i>	47
Figura 16. Cromatogramas de picos base do EH02, EE02 e ED02 (folhas de <i>P. aduncum</i>) obtidos por CLAE-EM nos modos negativos (-) e positivos (+).	48
Figura 17. Estrutura dos compostos identificados no EH, EE e ED das folhas de <i>P. aduncum</i>	54

Figura 18. Espectro EM/EM do composto 3 em modo positivo da amostra ED01
..... 55

Figura 19. Proposta de mecanismo de fragmentação para o assimilobina (3)... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos identificados em <i>P. arboreum</i> por espectrometria de massas.....	23
Tabela 2. Compostos identificados em <i>P. aduncum</i> por espectrometria de massas. (continua).....	24
Tabela 3. Equipamentos utilizados com suas respectivas marcas e modelo. ...	27
Tabela 4. Rendimento obtido dos extratos EH01, EH02 e EE01, EE02, ED01 e ED02 das folhas de <i>Piper arboreum</i> e <i>P. aduncum</i>	37
Tabela 5. Estudo fitoquímico de extrato das folhas de <i>P. arboreum</i> e <i>P. aduncum</i>	39
Tabela 6. Proposta de identificação dos compostos em EH01, EE01 e ED01 das folhas de <i>P. arboreum</i> . (continua).....	41
Tabela 7. Proposta de identificação dos compostos em EH02, EE02 e ED02 das folhas de <i>P. aduncum</i> . (continua).....	49
Tabela 8. CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os extratos das folhas <i>P. arboreum</i> e <i>P. aduncum</i>	57
Tabela 9. Atividade antifúngica para os extratos das folhas <i>P. arboreum</i> e <i>P. aduncum</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture collection

CIM: Concentração inibitória mínima

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas

DMSO: Dimetilsulfoxido

EH01: Extrato hexânico de folhas *P. arboreum*

EH02: Extrato hexânico de folhas *P. aduncum*

EE01: Extrato etanólico de folhas *P. arboreum*

EE02: Extrato etanólico de folhas *P. aduncum*

ED01: Extrato diclorometano de folhas *P. arboreum*

ED02: Extrato diclorometano de folhas *P. aduncum*

EM/EM: Espectrometria de massas sequencial

IBTEC-UFU: Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia

IES: Ionização por electrospray

LaPeMa-UNIFRAN: Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Franca

MOPS: 3-N-morfolinopropanosulfônico

MP: Metabolismo primário

MS: Metabolismo secundário

01 *P. a.*: *Piper arboreum*

02 *P. ad.*: *Piper aduncum*

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	PRODUTO NATURAL E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	13
2.2	CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES PIPER ARBOREUM E PIPER ADUNCUM.	17
2.3	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA P. ARBOREUM E P. ADUNCUM	18
2.4	UTILIZAÇÃO NA MEDICINA POPULAR	199
2.5	ATIVIDADE BIOLÓGICA	20
2.6	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES PIPER	22
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	INSTRUMENTAÇÃO	27
4.2	REAGENTE E SOLUÇÕES.	28
4.3	COLETA DE MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATOS	28
4.4	EXTRAÇÕES DE ALCALOIDES	29
4.5	ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS	31
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS	33
4.7	IDENTIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS POR CLAE-EM.	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES	36
5.2	ESTUDO FITOQUÍMICO	37
5.3	IDENTIFICAÇÕES DA COMPOSIÇÃO	39
5.4	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7	REFERÊNCIAS	62
8	APÊNDICE 1	68
9	APÊNDICE 2	79

1 INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais utilizadas na medicina popular ocorre desde a antiguidade e há registros confirmando à sabedoria do homem quanto ao uso para a aplicação destes produtos naturais como fonte de medicamentos (ESTEVAM et al., 2016).

A resistência de microrganismos aos medicamentos existentes no mercado dificulta o tratamento de doenças infecciosas, que são uma das principais causas de morte no mundo. Deste modo, desperta o interesse da busca por novos agentes antimicrobianos, sendo a aplicação de produtos naturais na forma de extrato bruto uma importante fonte de compostos com propriedades terapêuticas, juntamente com uma demanda de menor tempo e baixo custo, tornando assim mais acessível à sociedade.

Neste trabalho foi realizado o estudo das atividades antibacteriana e antifúngica utilizando microrganismos de importância epidemiológica, tais como bactérias aeróbias *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*, bactérias anaeróbias *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*, fungos *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

Embora existam na literatura estudos sobre ambas as espécies, como trabalhos que demonstram bons resultados para atividade antifúngica de extrato metanólico de *P. aduncum* contra *C. albicans* (BRAGA et al., 2007) e do óleo essencial de *P. aduncum* e *P. arboreum* contra *Cladosporium sphaerospermum* (NAVICKIENE et al., 2006), para atividade antibacteriana contra bactérias da cavidade bucal em específico, ainda não foi avaliada. Sendo assim, esse trabalho irá mostrar os resultados obtidos para essas atividades de extratos etanólicos, hexânicos e diclorometano das folhas dessas espécies contra microrganismos citados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

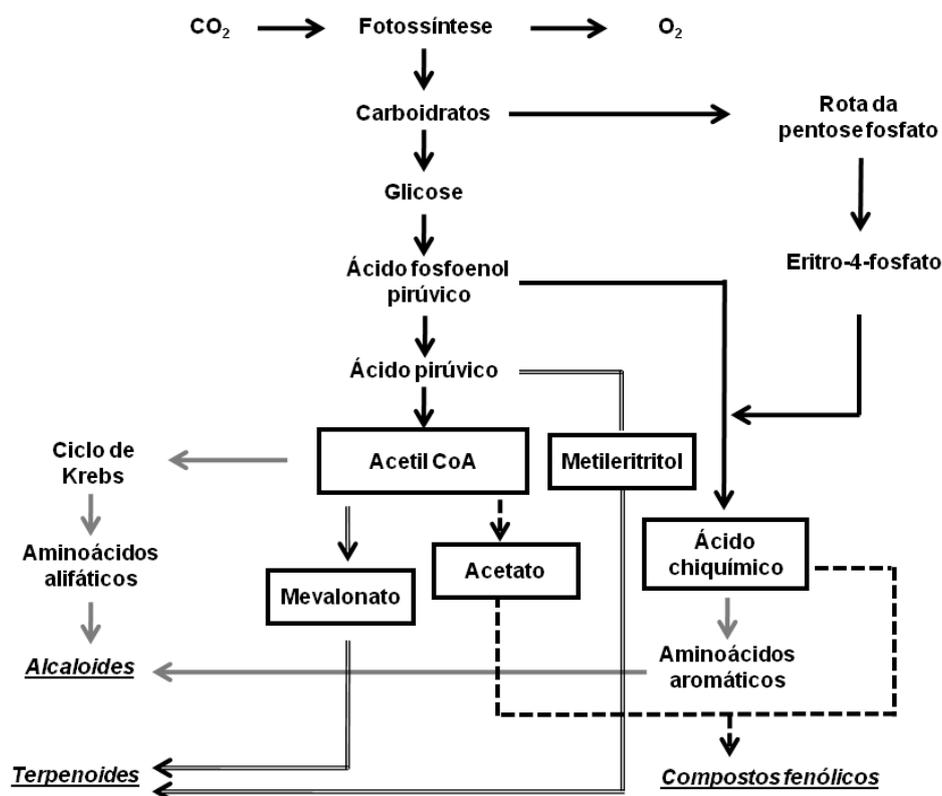
2.1 *Produto natural e metabólitos secundários*

Metabólitos são compostos sintetizados por organismo e são necessários para o desenvolvimento e manutenção da vida. Os metabólitos podem ser classificados em primário e secundário, dependendo da sua especificidade.

Os metabolitos primários são carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucléicos, e que podem ser encontrados em todo organismo. A biossíntese desses compostos em espécies vegetais se dá por um conjunto de reações químicas derivado da fotossíntese de materiais inorgânicos encontrados no meio ambiente (CASTRO et al., 2004, DEWICK, 2002).

Os metabólitos secundários são difundidos de modo restrito na natureza, podendo ser característicos de uma ou mais espécies, podendo até ser uma expressão da individualidade das espécies. Esses metabólitos resultam de um conjunto de reações químicas variadas responsáveis pelos procedimentos de síntese e degradação dos nutrientes na célula (CASTRO et al., 2004, DEWICK, 2002). A biossíntese dos metabólitos secundários em uma espécie vegetal pode sofrer variações, pois é dependente de fatores ambientais no qual a planta se encontra, por exemplo: sazonalidade, índice pluviométrico, radiação UV, altitude, tempo de vida da planta, quantidade de água (produção de micronutrientes e macronutrientes), temperatura do local e aos possíveis ataques de herbívoros e microrganismos (GOBBO-NETO, LOPES, 2007). Isso ocorre porque esses compostos são produzidos para defesa contra predadores, como atrativos voláteis para a mesma ou outra espécie, ou como corantes para atrair ou alertar outras espécies (DEWICK, 2002). A Figura abaixo mostra um fluxograma com as rotas metabólicas para a produção de algumas classes de metabólitos secundários.

Figura 1. Fluxograma das rotas metabólicas para compostos fenólicos, alcaloides e terpenoides

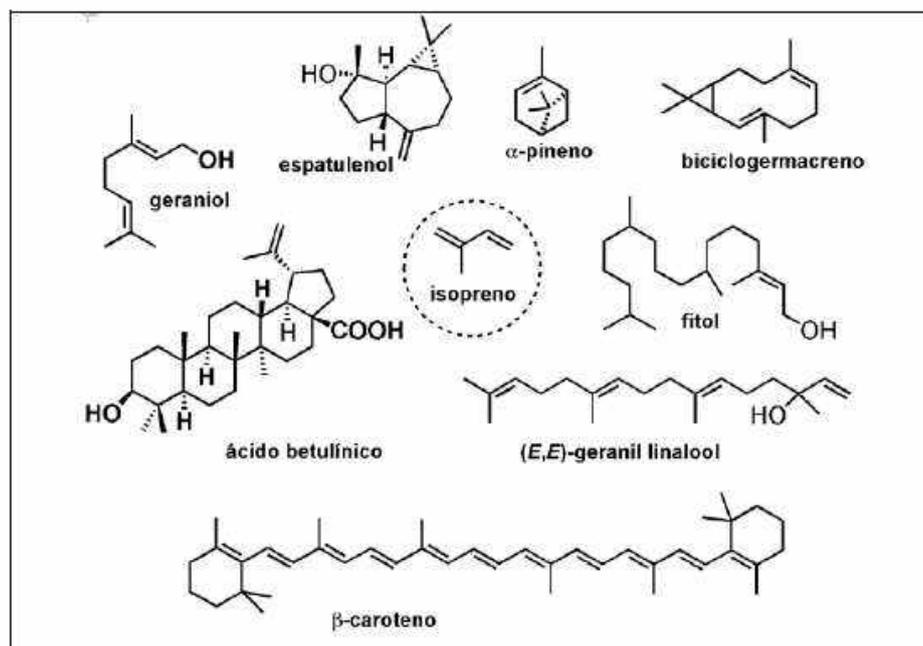


Fonte: CASTRO et al. (2004).

- *Terpenos*

A classe de compostos biossintetizada pelas plantas mais diversificada é representada pelos terpenos. Esses compostos apresentam repetitivas cadeias de 5 carbonos, baseadas em um esqueleto de um isopentano (2-metilbutano) e são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas apresentadas na Figura 2: monoterpenos (C10 – 2 unidades) como: geraniol e pineno, sesquiterpenos (C15 – 3 unidades) como: biciclogermacreno e espatulenol, diterpenos (C20 – 4 unidades) exemplo: Fitol e (*E,E*)-geraniol linalool, triterpenos (C30 – 6 unidades) como os ácido betulínico, esteroides e saponinas, tetraterpenos (C40 – 8 unidades) como os B-carotenos (DEWICK, 2002). Esta classe possui determinadas funções primárias nas plantas, por exemplo: a função de pigmentos fotossintéticos (carotenoides), transportadores de elétrons; exercem funções na glicosilação de proteínas, como lipídios de membranas, entre outras. Os compostos de terpenos voláteis também ajudam nas interações de mutualismo, na atração de polinizadores, assim como na proteção contra predadores, entre diversas funções (THOLL, 2015).

Figura 2. Estrutura de alguns terpenos.



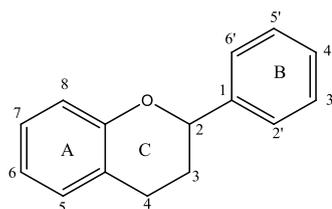
Fonte: Sousa, 2015.

- *Compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático. Esse grupo abrange ampla série de compostos metabolizados por plantas, por exemplo, chalconas, auronas, flavanonas, isoflavonoides, flavanols, antocianinas, entre outros (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Os flavonoides são um importante grupo pertencente aos compostos fenólicos, que são caracterizados por apresentarem 3 anéis de 6 membros, dois fenóis (anel A e B) e um benzopirano (anel C). A Figura 3 apresenta a estrutura geral de um flavonoide. São encontrados nessa classe desde simples fenóis a mais complexos, como lignanas, ligninas, flavonoides, entre outros (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). Estes compostos mencionados possuem várias funções nas plantas, por exemplo, as ligninas reforçam paredes celulares, flavonoides estão relacionados aos pigmentos das plantas com intuito de atrair polinizadores, alguns possuem funções de filtrar radiação UV (ultravioleta), auxílio na proteção contra fungos e bactérias que são prejudiciais em relação à saúde humana, tendo muitos grupos de compostos já testados frente a atividades antioxidante, antifúngica, antialérgica, antiviral (KABERA et al., 2014, DELMULLE; DE MAESENEIRE; DE MEY, 2018).

Figura 3. Estrutura geral de um flavonoide.

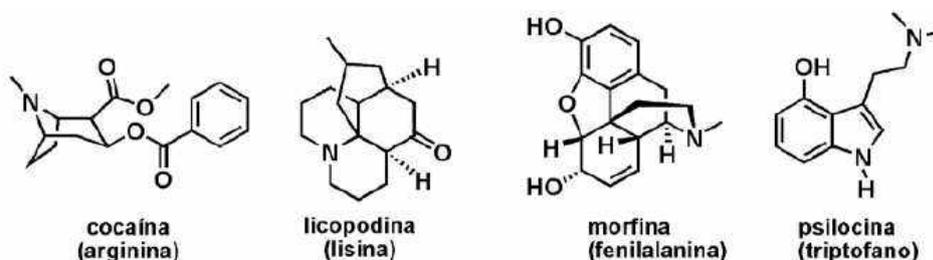


Fonte: a autora.

- *Alcaloides*

Essa classe é caracterizada por possuírem bases nitrogenadas orgânicas, uma ou mais átomos de nitrogênio, que na maioria das vezes são aminas primárias, secundárias ou terciárias, fazendo com que grande parte dos alcaloides tenha caráter básico. São achados principalmente em plantas servindo de proteção contra insetos e herbívoros, mas também podem ser encontrados em alguns microrganismos e animais (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os alcaloides são classificados baseado na estrutura que contém o nitrogênio do composto, por exemplo, arginina, lisina, fenilalanina, triptofano etc, como é apresentado na Figura 4. Esses compostos geralmente são derivados de aminoácidos e na maioria das vezes exibem na estrutura final o esqueleto do aminoácido precursor, apesar do carbono pertencente ao ácido carboxílico acabar sendo perdido na descarboxilação. Os principais aminoácidos precursores na biossíntese de alcaloides são ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histidina (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000, DEWICK, 2002).

Figura 4. Exemplo de estruturas de alcaloides.



Fonte: SOUSA, 2015.

2.2 Características das espécies *Piper arboreum* e *Piper aduncum*.

A família Piperaceae, pertencente à ordem Piperales, é uma das mais primitivas famílias entre as Angiospermas. É uma família que predomina regiões tropicais e abrange atualmente quatro gêneros: *Piper*, *Piperomia*, *Sarchorhachis* e *Ottonia* (MABBERLEY, 1997). Se desenvolve como arbusto, erva e árvores de pequeno porte (CORDOVA et al., 2010).

O maior gênero, *Piper*, inclui mais de 1000 espécies. Neste trabalho, foram estudadas as espécies de *Piper aduncum* e *Piper arboreum* que são popularmente conhecidas como “pimenta-de-macaco” ou “aperta-ruão” (Figura 5-a) e “pimenta-longa” (Figura 5-b), respectivamente (ANDRADE et al., 2009).

Figura 5. Fotografia das folhas de espécies a) *P. aduncum* e b) *P. arboreum*.



Fonte: Filho, 2010.

No Brasil, ambas as espécies possuem ampla distribuição geográfica e ocorrem do norte ao sul do país (SILVA et al., 2016). Portanto, não se classificam como endêmicas, ocorrendo assim em todos os biomas do Brasil.

Ambas as espécies geralmente se destacam por apresentar variadas atividades como anti-inflamatório, anti-hemorrágico, adstringente, diurético e outros, também apresenta atividade inseticida, bactericida e fungicida (SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2016).

Portanto, é importante conhecer a classe de metabólitos secundários responsáveis por essas atividades que apresentaram resultados promissores na medicina popular, como para as atividades antibacterianas e antifúngicas.

2.3 Características morfológicas da *P. arboreum* e *P. aduncum*

A espécie de *P. aduncum* se desenvolve como arbustos ou arvoretas eretas de 3 m de altura, ramos sem saliências, meio nodoso com entrenós variando de 4,9 a 7,7 cm (CHRIST et al., 2016). A haste de sustentação do limbo, também chamada pecíolo possuem 0,22 a 1,05 cm de comprimento, sem sobrepor a base da lâmina de folha. Lâmina foliar simétrica, cartácea, elíptico, escabroso, base assimétrica, um lado 2-4 mm mais curto que o outro, cordado, ápice acuminado e dois lados agudos (MONTEIRO, 2018). Nervura secundária denominada venação eucamptódromo, possuem de 6 a 8 cm, dispostas até ou pouco acima da porção mediana não atingindo o ápice da folha, escabrosa ao longo das veias, glandular e áspero ao tato nos dois lados. A haste de sustentação da flor é denominada como pedúnculo, pode medir de 1 a 2 cm de comprimento e é pubescente. Contem bractéola floral triangular, margem franjada, quatro estames e três estigmas sésseis (FAZOLIN et al., 2006). Caracterização morfológica de *P. aduncum* apresentada na Figura 6.

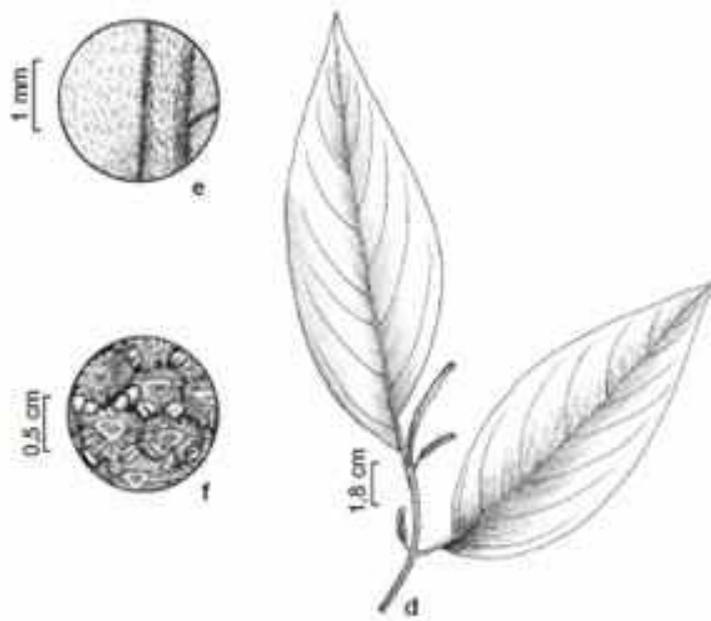
Figura 6. (a-c) *Piper aduncum* – a. galhos com espiga; b. detalhe de tricomas em veias secundárias; c. detalhe de tricomas em galhos.



Fonte: adaptado de Christ et al., (2016).

A espécie de *Piper arboreum* apresenta um porte comparativamente maior que as demais da espécie Piper (RUSCHEL, 2004). Consiste em um arbusto ereto, com 1 a 5 m de altura. Folhas com pecíolo glabros, 1,5–2,5 cm de comprimento, canaliculada com bainha alada por toda parte e não sobrepondo a base da folha. Lâmina base assimétrica, arredondado em ambos os lados, às vezes cordados, um lado 1–2 cm mais curto que o outro, ápice agudo a acuminado. As nervuras secundárias que se curvam denominadas venação brochidódromo, contem 8-10 pares de veias secundárias que chegam até o ápice da veia principal e proeminente na face adaxial (MONTEIRO, 2018). O pedúnculo da flor possui de 3 a 8 mm de comprimento, flor não pedicelar, bráctea floral triangular, subpeltada, quatro estames, e três estigmas sesséis e com franjas densas (MELO; GUIMARÃES; ALVES, 2014). Caracterização morfológica de *P. arboreum* apresentada na Figura 7.

Figura 7. (d-f) *Piper arboreum* - d. ramo fértil; e. detalhe face abaxial da folha; f. detalhe da espiga em flor, evidenciando as brácteas florais.



Fonte: adaptado de Melo, Guimarães e Alves (2014).

2.4 Utilização na medicina popular

Por muitos anos, a população tem utilizado as plantas medicinais como tratamento alternativo a fim de suprir as suas necessidades frente aos

medicamentos. Mesmo com toda modernidade nos processos industriais, há uma grande oferta de produtos farmacêuticos comercializados que são à base de produtos naturais. Isso ocorre por serem uma importante fonte de compostos bioativos, possuindo uma ampla variedade de ações farmacológicas para o desenvolvimento de novas drogas (SOUSA et al., 2008).

As folhas da espécie *Piper aduncum* são utilizadas sob a forma de chá contra distúrbios intestinais, dores estomacais e controlador de hemorragias menstruais. São diuréticos e adstringentes, sendo um hemostático importante usados em feridas, tais como: úlceras e leucorréias. As espigas curvas e aromáticas desta planta contêm taninos, essências e resinas. A infusão das folhas é usada como estomáquica, balsâmica, adstringente e desobstruente do fígado (SOUSA et al., 2008).

Sob a forma de chá e banhos aromáticos, a espécie de *Piper arboreum* é empregada para tratamento de reumatismos, bronquites, resfriados e gripes fortes, sendo ainda carminativa e emoliente. As folhas contêm óleo de sabor apimentado, com fragrância semelhante ao hortelã-pimenta, sendo utilizadas como afrodisíacas e sudoríficas. Além disso, são usadas nas dores de garganta e dentes (NASCIMENTO, 2011).

2.5 Atividade biológica

Como pôde ser observado na extensa utilização de espécies de *Piper* na medicina popular, muitos trabalhos têm comprovado as atividades biológicas dessas espécies. Trabalhos sobre *P. arboreum* já evidenciaram atividades do óleo essencial como antifúngica (NAVICKIENE et al., 2006), tripanocida (REGASINI et al., 2009) e antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2015). Enquanto trabalhos com *P. aduncum* demonstraram atividades biológicas como moluscicida, citotóxica, antibacteriana e antifúngica (POHLIT; PINTO; MAUSE, 2006, SOUSA et al., 2008).

Neste contexto, alguns trabalhos de *P. aduncum* e *P. arboreum* foram publicados sobre atividade antifúngica. O óleo essencial de *P. arboreum*, por exemplo, apresentou atividade antifúngica contra *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum* com MIC de 156,25 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (NAVICKIENE et al., 2006). Extrato em hexano e acetato de etila de folhas de *P.*

arboreum mostraram atividade antifúngica contra *Candida krusei* com MIC de 15,6 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (REGASINI et al., 2009). Com relação à atividade antifúngica de *P. aduncum*, alguns trabalhos demonstraram atividade antifúngica para algumas espécies de fungos como: *Cryptococcus neoformans* (MORANDIM-GIANNETTI et al., 2010) através do óleo essencial apresentando MIC de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e espécies de *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (DA SILVA et al., 2016) através do óleo essencial apresentando CIM de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas espécies de fungos; *Trichophyton rubru* e *T. interdigitale* (SANTOS et al., 2013) com extrato etanólico das folhas apresentando CIM de 32,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas espécies de fungos; *Candida albicans* (BRAGA et al., 2007) com extrato metanólico das folhas apresentando MIC de 12,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Considerando as espécies de fungos do gênero *Candida*, essas podem causar infecções quando o hospedeiro se torna debilitado ou imunocomprometido, podendo resultar em até mesmo infecções fúngicas invasivas e fatais, devido à fatores como: diagnósticos ineficientes, terapias antifúngicas iniciais inadequadas e até mesmo resistência fúngica aos medicamentos (SPAMPINATO, LEONARDI, 2013). Sendo assim, a busca de novos alvos terapêuticos antifúngicos se faz necessária, e como já foi destacado, *P. arboreum* e *P. aduncum* têm-se mostrado como uma promissora fonte de antifúngicos.

Considerando os trabalhos já publicados sobre as atividades antibacterianas, o óleo essencial e o extrato etanólico das folhas de *P. arboreum* já demonstraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* com CIM de 62,5 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2015). Com relação à *Piper aduncum* podemos destacar alguns trabalhos como: atividade contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguines* do extrato etanólico das folhas com CIM de 1620 e 310 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (MAGALHÃES et al., 2016); contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* do extrato etanólico das folhas com CIM de 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (RUIZ et al., 2013); *Escherichia coli* do óleo essencial das folhas com CIM de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (DUARTE et al., 2007).

Ainda sobre atividade antibacteriana, doenças bucais como a cárie e periodontites que são promovidas por bactérias, podem ser extremamente perigosas pois quando atingem a corrente sanguínea, desencadeiam outras

doenças como pneumonia e doenças cardiovasculares. Os procedimentos feitos em clínica odontológica (como extrações dentais e cirurgias), infecções bucais e saúde bucal precária são alguns dos principais fatores que promovem a introdução desses microrganismos em nosso organismo. Um dos problemas enfrentados no tratamento de infecções é a resistência bacteriana. Assim, o estudo de compostos de origem natural contra bactérias presentes na cavidade bucal se torna muito interessante como uma alternativa aos já existentes e que podem já ter desenvolvido resistência. Neste trabalho pretende-se avaliar a atividade antibacteriana de extratos (e não de óleo essencial) contra bactérias bucais aeróbicas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, e as anaeróbias *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces naeslundii*, que são bactérias que apresentam elevada resistência a antibiótico (RAMS; DEGENER; VAN WINKELHOFF, 2014).

Ainda sobre as atividades biológicas, alguns estudos correlacionaram a composição química dos extratos dessas espécies vegetais às atividades biológicas. Silva et al. (2007), por exemplo, isolou pirrolidinas de *Piper arboreum* e verificou atividade antifúngica. Regasini et al. (2008) isolou flavonoides desta mesma espécie e observou atividade antioxidante. Em outro estudo, Regasini et al. (2009) isolou alquilamidas pirrolidinas e verificou atividade tripanocida. Portanto, através da identificação da composição química poderá ser realizada uma correlação com os resultados biológicos.

2.6 Composição química das espécies *Piper*

Com relação ao isolamento e a identificação de metabólitos secundários com potenciais de atividades biológicas da espécie *Piper*, foram observados na literatura variadas classes de compostos bioativos apresentados nas Tabelas 1 e 2 e Figuras 8 e 9 para *P. arboreum*. e *P. aduncum*, respectivamente.

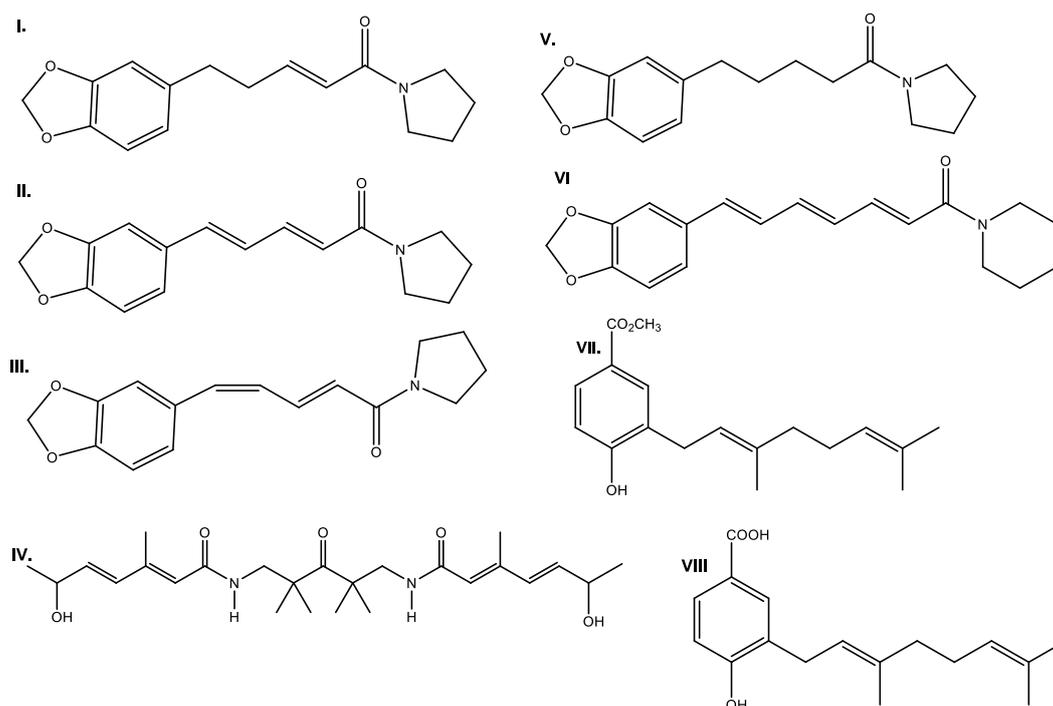
Em suma, alguns compostos que foram identificados majoritariamente são constituídos por fenilpropanoides (BENEVIDES et al., 1999), amidas, flavonoides, alcaloides, chalconas, di-hidrochalconas (FAZOLIN et al., 2006; PARMAR et al., 1997; ORJALA et al., 1994), ligninas e neoligninas (FAZOLIN et al., 2006; CHAURET et al., 1996), ácidos benzoicos prenilados, cromenos

(BALDOQUI et al., 1999; LAGO et al., 2009; ORJALA et al., 1993), terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos (FAZOLIN et al., 2006; PARMAR et al., 1997).

Tabela 1. Compostos identificados em *P. arboreum* por espectrometria de massas.

Compostos identificados	Classe de composto	Fórmula molecular	Massa molecular	Referências
I. N-[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7(<i>E</i>)-pentaenol]-pirrolidina	Amida	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	273,1365	Vasques et al. (2002)
II. N- [10-(13,14-metilenodioxifenil)-7(<i>E</i>), 9(<i>E</i>)-pentadienol] -pirrolidina ou piperilina		C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271,1208	Vasques et al. (2002) Regasini et al. (2009)
III. N- [10-(13,14-metilenodioxifenil) -7 (<i>E</i>), 9(<i>Z</i>)-pentadienol]-pirrolidina ou 4,5-dihidropiperilina		C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271,1208	Vasques et al. (2002) Regasini et al. (2009)
IV. Arboreumine		C ₂₅ H ₄₀ N ₂ O ₅	448,2937	Vasques et al. (2002)
V. Tetrahidropiperina		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	275,1521	Regasini et al. (2009)
VI. Piperetina		C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	311,1521	Nascimento et al. (2015)
VII. 3-geranil-4-hidroxi benzoato de metila	Prenilado de ácido benzóico	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,1725	Ramos et al. (2009)
VIII. Ácido 3-geranil-4-hidroxi benzoico		C ₁₇ H ₂₄ O	244,1827	Ramos et al. (2009)

Figura 8. Estruturas moleculares de *P. arboreum* referentes a tabela 1.



Fonte: a autora.

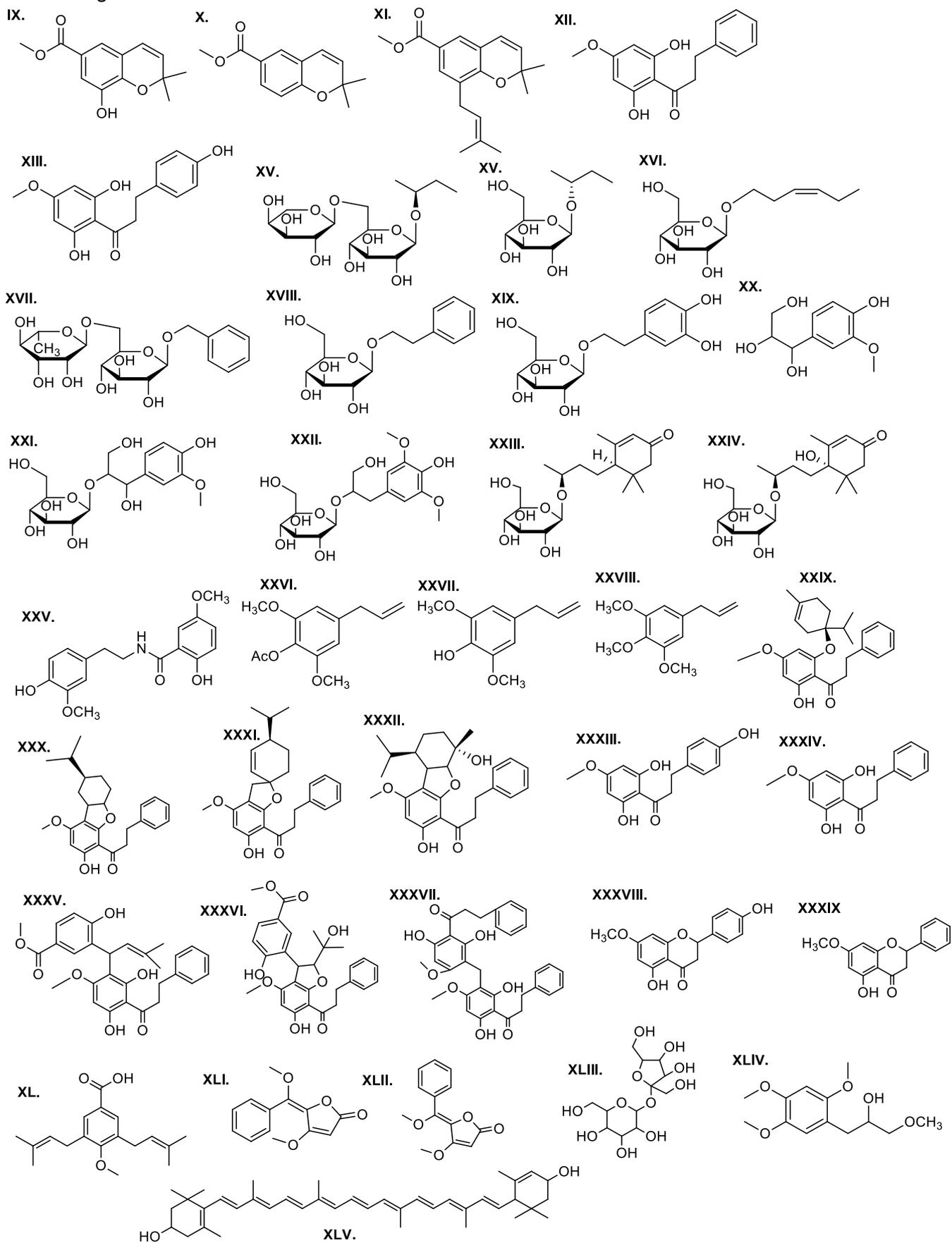
Tabela 2. Compostos identificados em *P. aduncum* por espectrometria de massas.

(continua)

	Molécula	Classe composto	de	Fórmula molecular	Massa molecular	Referencia
IX.	Metil-8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato	Cromenos		C ₁₃ H ₁₄ O ₄	234,0892	Souza et al. (2019)
X.	Metil-2,2-di-metil-2H-1-cromeno-6-carboxilato			C ₁₃ H ₁₄ O ₃	218,0943	Souza et al. (2019)
XI.	Metil-2,2-di-metil-8-(3"-metil-2"-butenil)-2H-1-cromeno-6-carboxilato			C ₁₈ H ₂₂ O ₃	286,1569	Souza et al. (2019)
XII.	2',6'-di-hidroxi-4'-metoxi-di-hidrocalcona	Chalcona		C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272,1049	KARTIKA et al. (2019)
XIII.	2',6',4'-tri-hidroxi-4'-metoxi-di-hidrocalcona (Asebogenina)			C ₁₆ H ₁₆ O ₅	288,0998	KARTIKA et al. (2019)
XIV.	2-(S)-isobutanol-2-O-β-D-arabinopiranosil(1→6)-O-β-D-glucopiranosídeo			C ₁₅ H ₂₈ O ₁₆	368,1682	Luyen et al. (2017)
XV.	(2R)-butilO-β-D-glucopiranosídeo			C ₁₀ H ₂₀ O ₆	236,1260	Luyen et al. (2017)
XVI.	(Z)-3-hexenilO-β-D-glucopiranosídeo			C ₁₂ H ₂₂ O ₆	262,1416	Luyen et al. (2017)
XVII.	1'-O-benzilα-L-Ramnopiranosil- (1"→6')-β-D-glucopiranosídeo			C ₁₉ H ₂₈ O ₁₀	416,1682	Luyen et al. (2017)
XVIII.	2-feniletíl-O-β-D-glucopiranosídeo			C ₁₄ H ₂₀ O ₆	284,1260	Luyen et al. (2017)
XIX.	2-(3,4-di-hidroxi) feniletílO-β-D-glucopiranosídeo			C ₁₄ H ₂₀ O ₈	316,1158	Luyen et al. (2017)
XX.	Guaiacilglicerol			C ₁₀ H ₁₄ O ₅	214,0841	Luyen et al. (2017)
XXI.	guaiacilglicerol 8-O-βD-glucopiranosídeo			C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376,1369	Luyen et al. (2017)
XXII.	xilocosídeo-β-[1-hidroxi-3-(4-hidroxi-3,5-di-metoxifenil)- prop-2-il-β-glucopiranosídeo]			C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	390,1526	Luyen et al. (2017)
XXIII.	(6S, 9S) -roseosídeo			C ₁₉ H ₃₂ O ₇	372,2148	Luyen et al. (2017)
XXIV.	(6R, 9S)-9-hidroximegastigman4-en-3-ona-9-O-β-D-glucopiranosídeos			C ₁₉ H ₃₂ O ₈	388,2097	Luyen et al. (2017)
XXV.	Aduncamida	Amida/alcaloide		C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	317,1263	Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1993)
XXVI.	1,3-Di-metoxi-2-acetoxi-5-alilbenzeno			C ₁₃ H ₁₆ O ₄	236,1049	Parmar et al. (1997)
XXVII.	2,6-Di-metoxi-4-alilfenol			C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194,0943	Parmar et al. (1997)
l.	Elemicina			C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208,1099	Parmar et al. (1997)

**Tabela2. Compostos identificados em *P. aduncum* por espectrometria de massas.
(conclusão)**

	Molécula	Classe de composto	Fórmula molecular	Massa molecular	Referencia
XXIX.	Adunctina A	Chalconas	C ₂₆ H ₃₂ O ₄	408,2301	Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1993)
XXX.	Adunctina B		C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394,2144	Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1993)
XXXI.	Adunctina C e AdunctinaD		C ₂₆ H ₃₂ O ₄	406,2144	Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1993)
XXXII.	Adunctina E		C ₂₆ H ₃₂ O ₅	424,2250	Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1993)
XXXIII.	Asebogenina		C ₁₆ H ₁₆ O ₅	288,0998	Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1994)
XXXIV.	2', 6'-Di-hidroxi-4'-metoxi-di-drochalcona		C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272,1049	Parmar V. S, et al. (1997) e Nair M. G, et al. (1986)
XXXV.	Piperadunina A		C ₂₉ H ₃₀ O ₇	490,1992	Parmar et al. (1997) e Orjala J, et al. (1994)
XXXVI.	Piperadunina B		C ₂₉ H ₃₀ O ₈	506,1941	Parmar et al. (1997) e Orjala J, et al. (1994)
XXXVII.	Piperadunina C		C ₃₃ H ₃₂ O ₈	556,2097	Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1994)
XXXVIII.	Sakuranetina	Flavononas	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286,0841	Parmar et al. (1997) e Dutta (1978)
XXXIX.	Pinostrobina		C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270,0892	Parmar et al. (1997) e Nair et al. (1986)
XL.	Ácido 3,5-bis-(3-metil-2-butenil)-4-metoxibenzoico	Ácido benzóico	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,1725	Parmar et al. (1997)
XLI.	(5Z, 6Z)-Fadienolida		C ₁₃ H ₁₂ O ₄	232,0736	Parmar et al. (1997) e Nair et al. (1986)
XLII.	(5E, 6E)-Fadienolida		C ₁₃ H ₁₂ O ₄	232,0736	Parmar et al. (1997) e Nair et al. (1986)
XLIII.	Luteína		C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	Parmar et al. (1997) e Dutta (1978)
XLIV.	Sacarose		C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,1162	Parmar et al. (1997)
XLV.	α -Tocoferol		C ₁₃ H ₂₀ O ₅	256,1311	Parmar et al. (1997)

Figura 9. Estruturas moleculares de *P. aduncum* referentes a tabela 2.

Fonte: a autora.

3 OBJETIVOS

– *Objetivo geral:*

Avaliar a composição química e atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *Piper arboreum* e *Piper aduncum*.

– *Objetivos específicos:*

- Preparar a exsicata das folhas coletadas para a identificação das espécies;
- Realizar um levantamento bibliográfico sobre as espécies a serem estudadas;
- Preparar os extratos hexânicos, etanólicos e diclorometanos de *P. arboreum* e *P. adundum* por maceração;
- Analisar as classes de compostos dos extratos através de prospecção fitoquímica utilizando reagentes colorimétricos;
- Avaliar as atividades antimicrobianas dos extratos;
- Analisar a composição química dos extratos através cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

Na tabela a seguir estão apresentados os equipamentos utilizados neste trabalho.

Tabela 3. Equipamentos utilizados com suas respectivas marcas e modelo.

Equipamento	Marca	Modelo
Banho de aquecimento	Fisatom	550
Balança analítica	Shimadzu	AUW220D
Balança de luz infravermelha (umidade)	Kett	FD-600
Espectrometria de massas	Agilent®	6520 B
Rotaevaporador	IVA	RV 10

4.2 Reagente e soluções.

Os solventes químicos usados foram de grau analítico, adquiridos da Vetec Química Fina LTDA.

4.3 Coleta de material vegetal e preparo dos extratos

Folhas de *Piper arboreum* e *P. aduncum* foram coletadas no Parque Municipal Victório Siquierolli no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no mês de novembro/2016 pelo Prof^o Dr. Alberto de Oliveira e transportadas para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPEN) da UFU.

Em seguida, uma exsicata de cada espécime coletada foi preparada e, com o auxílio da profa. Micheline Carvalho Silva (Universidade de Brasília), as espécies foram identificadas e depositadas no Herbário Uberlandenses da UFU com o número HUFU78.606 - *Piper arboreum* Aubl. e HUFU78607 - *Piper aduncum* L. Na Figura 10 é mostrada a fotografia da exsicata obtida.

Figura 10. Exsicatas das amostras de *P. arboreum* (a) e *P. aduncum* (b) depositada no Herbário Uberlandense, respectivamente.



Fonte: a autora.

A preparação dos extratos das folhas de espécies da família *Piperaceae*, assim como, as investigações dos metabólitos secundários foram realizadas no

Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPPeN) do Instituto de Química da UFU em Uberlândia.

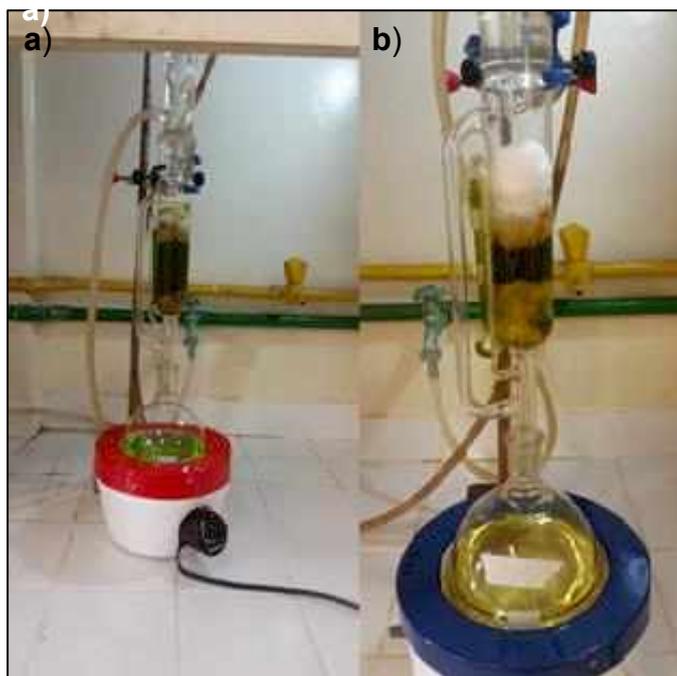
Inicialmente, as folhas de *Piper arboreum* (numerada por 01) foram desidratadas em estufa com ar circulante a temperatura média de 40 °C até umidade menor que 10 % (o valor médio obtido foi igual a 7,3 %). A umidade foi medida em balança de umidade de luz ultravioleta. Em seguida, as folhas foram trituradas utilizando um liquidificador obtendo uma massa de 44,73 g. Na sequência, uma quantidade de 34,51 g de folhas trituradas foi macerada com 200 mL de hexano (C₆H₁₄) a temperatura ambiente, por 7 dias e protegido de luz. Após esse período, o material foi filtrado e o solvente do extrato foi concentrado pelo aparelho de evaporador rotatório à pressão reduzida com banho de 40 °C, o processo foi repetido por quatro vezes. Ao final, os extratos em hexano foram reunidos obtendo um valor total de 1,380 g, essa amostra foi denominada de **EH01**. Para as folhas de *Piper aduncum* (numerada por 02) foi realizado o mesmo procedimento, porém partiu-se de 8,680 g de folhas trituradas, obtendo um valor total 0,5340 g de extrato em hexano, essa amostra foi denominada de **EH02**.

Posteriormente o processo foi repetido com as folhas restantes das extrações em hexano, para obtenção do extrato etanólico. Foram adicionadas as folhas em 200 mL de solvente etanólico por um intervalo de 7 dias, sendo o processo repetido 4 vezes. Ao final, os extratos em etanol foram reunidos e após a concentração do solvente em evaporador rotatório obteve-se 5,340 g do extrato, sendo essa amostra denominada **EE01**. Para as folhas de *P. aduncum* foi realizado o mesmo procedimento, porém foram obtido um valor total 1,571 g de extrato em etanol, essa amostra foi denominada de **EE02**.

4.4 Extrações de alcaloides

A extração de alcaloides foi realizada pelo método descrito por Zuanazzi et al. (2001). As folhas secas de *Piper arboreum* e *Piper aduncum*, 10,2 g e 5,0 g respectivamente, foram deixadas em maceração com 60 mL de NH₄OH aquoso por 24 horas a temperatura ambiente. Na sequência, filtraram-se as folhas, adicionadas em um aparelho Soxhlet e deixadas sob-refluxo com 200 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) por aproximadamente por 30 h (Figura 11).

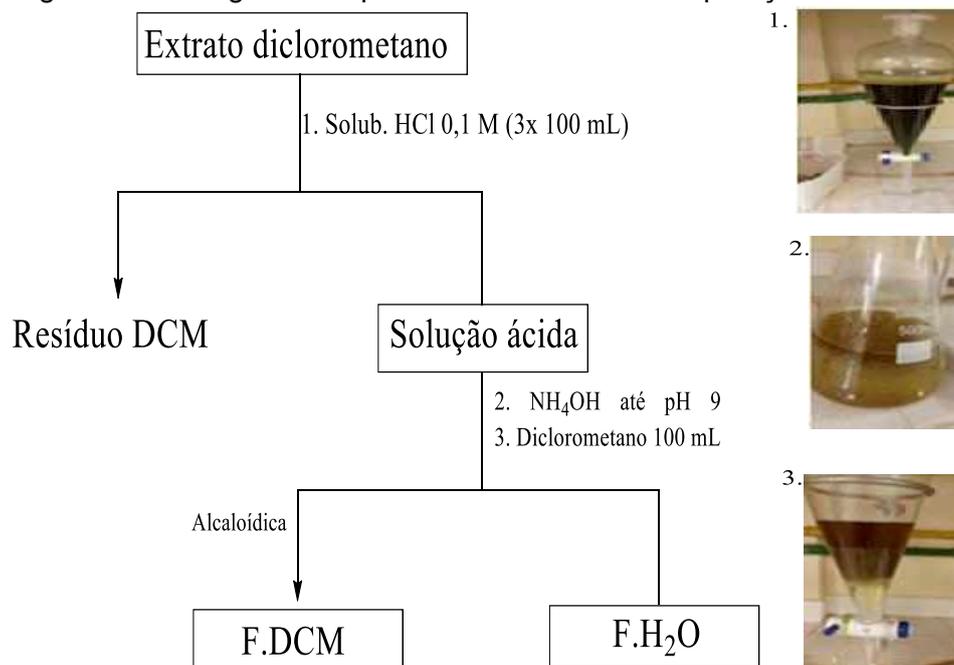
Figura 11. Extração de alcaloides de *P. arboreum* a) e *P. aduncum* b) respectivamente.



Fonte: a autora.

Em seguida, foi realizado o método de extração ácido-base de Stas-Otto descrito por Zuanazzi et al. (2001). O extrato em diclorometano foi colocado em funil de extração de 500 mL e acidificado com 100 mL HCl diluído (0,1 M). A fase aquosa foi removida e separada, sendo o processo repetido por 3 vezes, para protonar os possíveis compostos presentes. As fases aquosas foram reunidas e o pH ajustado para pH 9 com a solução de NH_4OH a 25%, a fim de desprotonar os alcaloides tornando mais solúvel na extração. Na sequência, essa fase aquosa foi colocada em funil de extração e extraída com diclorometano por 3 vezes (Figura 12). Por fim, recolhendo a fase orgânica alcaloídica com diclorometano, o solvente foi em um rota evaporador sob pressão reduzida adquirindo uma massa de 0,1431 g da extração em diclorometano da folha *P. arboreum* (denominado **ED01**) e 0,1272 g da folha *P. aduncum* (denominado **ED02**).

Figura 12. Fluxograma do processo de técnica de separação ácido/base.



Fonte: a autora.

4.5 Análise fitoquímica dos extratos

Na identificação das classes dos metabólitos secundários presentes nas folhas da espécie *Piper* trabalhadas, foram preparadas soluções das frações de acordo com o solvente usado na extração em uma concentração de 1 mg mL^{-1} . Em seguida, realizou o método que é baseado na observação de aspecto da alteração de cor após a adição de reagentes específicos (reveladores). O método foi feito utilizando o uso da cromatografia da camada delgada (CCD).

Foram utilizadas as seguintes fases estacionárias (FE) e fases móveis (FM).

- **FE:** placas de alumínio revestidas com sílica gel (SiO_2) da marca Alugram
- **FM: 1)** Acetato de etila (AcOEt); Ácido acético ($\text{H}_3\text{CCO}_2\text{H}$); Ácido fórmico (CH_2O_2) e H_2O (10:1,1:1,1:2,6) e

2) Diclorometano (CH_2Cl_2); Metanol (MeOH) e hidróxido de amônio (NH_4OH) (10:1:0,25).

Em seguida as placas foram reveladas com os reveladores que estão descritos abaixo, estes preparados segundo a metodologia proposta por Wagner e Bladt (2001).

- **Detecção de flavonoides:**

- **Revelador NP/ PEG:**

- Solução A: Solução metanólica a 1 % (m/v) de NP

- Solução B: Solução etanólica a 5 % (m/v) de PEG.

- Solução estoque: Misturar A e B (10:8)

- Solução final para o teste: Misturar a solução estoque.

- Análise: Após a eluição das placas, essas foram visualizadas na luz ultravioleta e os compostos de interesse separados.

- **Revelador Cloreto de alumínio:**

- Solução contendo $AlCl_3$ 1% (m v-1) em metanol.

- Análise: A placa CCD foi borrifada com o revelador e observada na câmara de luz UV.

- **Detecção de alcaloides:**

- **Revelador de iodocloroplatinato**

- Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatínico (IV) ($H_2(PtCl_6).6H_2O$).

- Solução B: Solução aquosa a 10% (m/m), de iodeto de potássio (KI).

- Solução final para o teste: Misturar solução A, solução B e H_2O (1:9:10)

- Análise: A placa foi borrifada e observada a coloração marrom na presença de alcaloides.

- **Detectores universais: detecção de terpenos e esteroides:**

- **Revelador Libermann-Buchard:**

- Solução na seguinte proporção de reagentes: $C_4H_6O_3$: H_2SO_4 : EtOH (5:5:50) adicionados nessa mesma ordem e em banho de gelo.

- Análise: A placa foi borrifada com a solução e aquecida a 80 °C de 5 a 10 minutos.

4.6 Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Franca (LaPeMa-UNIFRAN), com a colaboração do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. As cepas padrão utilizadas no ensaio foram da “American Type Culture collection”(ATCC).

- *Microrganismos utilizados*

Bactérias do procedimento realizado foram obtidas de padrões de cepas provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC). As bactérias aeróbicas utilizadas foram: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). As bactérias anaeróbicas utilizadas foram: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039).

As cepas utilizadas para análise antifúngica foram: *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126).

- *Procedimento de análise da atividade antibacteriana*

A atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada pelo método da microdiluição em caldo em microplacas. Neste método foi determinada a menor quantidade de amostra necessária para inibir o crescimento bacteriano, conhecida como “Concentração Inibitória Mínima” (CIM) (CARVALHO et al., 2011, PETROLINI et al., 2013).

O meio de cultura utilizado com as bactérias aeróbicas foi o caldo triptona de soja (TSB) (CLSI, 2012b) e com as bactérias anaeróbicas foi o caldo Schaedler suplementado com hemina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e menadiona ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (CLSI, 2012a). A análise da atividade antimicrobiana foi realizada em uma microplaca contendo 96 poços. O inóculo, o caldo e a amostra (frações) foram adicionados em cada orifício, obtendo-se um volume final de 100 μL para as bactérias aeróbicas e 200 μL para as anaeróbicas. O volume de inóculo adicionado nos orifícios da microplaca foi de 20 μL para os testes com bactérias aeróbicas e 40 μL para os testes com bactérias anaeróbicas. O volume de

amostra ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de caldo variou conforme a concentração de amostra desejada no orifício. As amostras foram inicialmente preparadas com concentração de $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas para $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando o caldo. A faixa de concentração de amostras utilizada nos experimentos foi de $0,195$ a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle positivo para as bactérias aeróbias foi utilizado a clorexidina (com faixa de $0,115$ - $59 \mu\text{g mL}^{-1}$). O controle positivo para as bactérias anaeróbias utilizou-se metronidazol (com faixa de $0,0115 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Para os microrganismos aeróbios, as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas em microaerofilia pelo sistema chama/vela a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados $30 \mu\text{L}$ do indicador resazurina ($0,01\%$, em água) em cada orifício. Os microrganismos anaeróbios foram incubados por 72 horas em câmara de anaerobiose (atmosfera contendo: 5 - 10% de H_2 , 10% CO_2 , 80 - 85% N_2) a 36°C , sendo revelado com o mesmo indicador. A coloração azul após a adição do indicador representa a ausência de crescimento bacteriano, sendo a coloração vermelha a presença do crescimento bacteriano (SOUSA, 2015).

- Procedimento de análise da atividade antifúngica

Primeiramente soluções de estoque foram preparadas dissolvendo os extratos em DMSO na concentração de $192\ 000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, foram feitas diluições com as soluções de estoque usando o caldo RPMI tamponado em pH $7,2$ com ácido 3 - N -morfolinopropanosulfônico (MOPS) até a concentração de $12\ 000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A resolução da CIM para as leveduras foi obtida em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas as diluições seriadas com concentrações $1,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos. O meio de cultura utilizado foi o caldo RPMI tamponado com MOPS. Cada poço recebeu $100,0 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo sendo o volume final de cada poço foi de $200 \mu\text{L}$. Para o controle positivo utilizou Anfotericina B (faixa de concentração $0,031 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $16 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Controles de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), do inóculo, dos extratos e partições e do solvente (DMSO) também foram realizados. O controle do solvente foi preparado nas concentrações de 1% a 5% em v v^{-1} e não

influenciou no crescimento das leveduras. Para validação dos ensaios, o controle positivo anfotericina B foi testado frente às cepas de referência *Candida krusei* (ATCC6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC22019) com concentrações entre 0,25 a 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Valores de CIM dentro deste intervalo para estas leveduras validam a metodologia e os resultados para as demais leveduras segundo o CLSIM27-A3 (CLINICAL; INSTITUTE, 2008). Após a montagem das microplacas, estas foram incubadas por 48 h a 37 °C, e posteriormente foi determinada a CIM utilizando o revelador resazurina (0,02 % mv^{-1}). A leitura foi realizada a partir da mudança de coloração da resazurina que apresenta coloração azul para coloração vermelha se houver crescimento das leveduras. A CIM correspondeu a menor concentração dos extratos capaz de inibir o crescimento das leveduras (KOCH et al., 2019).

-Preparo do inóculo

Foi realizada a preparação do inóculo conforme os procedimentos segundo a referência CLSI M27-A3 (CLINICAL; INSTITUTE, 2008). Inicialmente as leveduras foram cultivadas em placas de petri contendo ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C. Com auxílio de alça de platina esterilizada, colônias das leveduras foram transferidas para tubos contendo 2,0 mL de solução salina 0,85%. O inóculo foi preparado usando método espectrofotométrico (530 nm) e conferido por comparações com a escala de McFarland 0,5 para obter o valor de 6×10^6 UFC mL^{-1} . Em seguida, foram realizadas diluições em caldo RPMI até que o inóculo atingisse $5,0 \times 10^5$ UFC mL^{-1} (PRADO, 2018).

4.7 Identificações dos compostos por CLAE-EM.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM), foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU) em um CLAE (marca Agilent modelo Infinity 1260), acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 2.1 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 μm , a fase móvel:

água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v-1) (A) e metanol (B), com o gradiente: 2% de B (0 min), 98% de B (0-10 min); 100% de B (10-11 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L/min a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KV.

Para as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) as energias de colisões foram ajustadas de acordo com cada íon molecular. Através da m/z (razão massa carga) obtida nos espectros em alta resolução foi possível identificar os compostos. Utilizando o Software MassHunter® foi obtido a fórmula molecular proposta de cada composto, seguindo a menor diferença entre a massa experimental e a massa teórica, erro em ppm, (Equação 1) equivalência de ligações dupla e regra do nitrogênio. As possíveis estruturas, fragmentos e classe de metabólitos foram propostos de acordo com outros trabalhos na literatura, biblioteca Metlin e bancos de dados (Chempider, Pubchem e Massbank), analisando sistema de solventes, tempos de retenção e espectro de massas.

$$E_{\text{ppm}} = \left[\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] 10^6 \quad \text{Equação 1}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Rendimento das extrações*

As técnicas realizadas das extrações líquido-líquido e sólido-líquido são partes relevantes em um estudo de química de produtos naturais, pois os extratos serão responsáveis por fornecer as substâncias a serem estudadas tornando assim o trabalho de caracterização e possíveis isolamentos mais fáceis, por separar as substâncias de acordo com a afinidade em relação aos solventes utilizados. Logo, é considerado para o andamento do trabalho conter um bom rendimento nessas etapas.

O procedimento empregado para a extração sólido-líquido foi por maceração, realizado primeiro o extrato hexânico a fim de se retirar substâncias com caráter apolar como exemplo as clorofilas. Em seguida, foi utilizado o

solvente etanol que possui polaridade intermediária, permitindo assim, uma extração de mais variadas classes de compostos (MEDEIROS; KANIS, 2010).

Para os extratos diclorometano foi empregado a técnica de extração sólido-líquido, realizado procedimentos de extração por aparelho Soxhlet em seguida a extração líquido-líquido ácido-base com o objetivo de obter frações contendo compostos nitrogenados (alcaloides, glucosinolatos e cianidrininas). A Tabela 4 apresenta os rendimentos obtidos para os extratos.

Tabela 4. Rendimento obtido dos extratos EH01, EH02 e EE01, EE02, ED01 e ED02 das folhas de *Piper arboreum* e *P. aduncum*.

Espécie	Massa das folhas (g)	Extrato	Massa obtida de extrato (g)	Rendimento (%)
<i>P. arboreum</i>	34,51	Hexânico (EH01)	1,381	4,0
	34,51	Etanólico (EE01)	5,324	15,43
	10,22	Diclorometano (ED01)	0,1431	1,118
<i>P. aduncum</i>	8,680	Hexânico (EH02)	0,5343	6,156
	8,680	Etanólico (EE02)	1,572	18,11
	5,0	Diclorometano (ED02)	0,1272	2,544

Fonte: a autora.

Observa-se que os extratos etanolicos apresentaram rendimentos maiores seguido por hexano. Nessas extrações para esses dois diferentes solventes foram realizadas a mesma técnica de extração, porem a de solvente hexanica foi primeiro a fim de diminuir compostos apolares, intensificando assim os polares na extração em etanol.

Já os extratos em diclorometano não são possíveis comparar com os demais já que o método de extração foi diferente, voltado para extração em alcaloides, submetendo a várias etapas o que pode ter interferido no baixo rendimento.

5.2 Estudo fitoquímico

O objetivo do estudo fitoquímico foi de identificar as classes de metabolitos secundários, ou seja, de compostos presentes nos extratos.

Dessa forma, foi realizado a prospecção fitoquímica dos extratos utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), como descrito

no item 4.5. A Figura 13 apresenta as placas cromatográficas antes de serem reveladas sob luz UV de comprimento de onda de 254 e 365 nm.

Figura 13. Placas CCD, sem reveladores, das duas FM sob dois comprimentos de onda, a) 254 e b) 365 nm, respectivamente.



Fonte: a autora.

Sem serem reveladores, foi possível observar características de uma cor alaranjada na placa sob a luz de infravermelho de comprimento de onda 365nm, indicando a presença de flavonoides. Para confirmação, foi empregado o revelador **NP/PEG** que intensificaria tal fluorescência dos possíveis compostos fenólicos, pois o difenilboriloxietilamina (NP) do revelador NP/PEG depende da existência da carbonila no carbono C-4 da estrutura de um flavonoide para poder formar o complexos fluorescentes em UV₃₆₅ de cores características, alaranjado e amarelo, conforme presenciadas (WAGNER; BLADT, 2001). Logo, apresentaram resultados positivos para EH01, EE01 e EE02.

O fato dos extratos em diclorometano de ambas espécies terem dado resultados de baixa intensidade se dá pela característica mais polar desse composto frente à fase móvel utilizada (item 4.5). Porém, na aplicação do revelador universal **Liebermann Buchard**, foi observada formações de manchas com coloração azul-esverdeado depois de alguns minutos após a aplicação, indicando a presença de classes de compostos como terpenos, fenóis, açúcar, esteroides e flavonoides nestes extratos (WAGNER; BLADT, 2001). Este último revelador apresentou sinais intensos para os extratos em hexano de ambas folhas estudadas.

Enquanto que para o **iodocloroplatinado**, os alcaloides são detectados pelo surgimento de manchas de coloração marrom, formadas pela complexação entre a platina e os compostos nitrogenados (WAGNER; BLADT, 2001). Assim, foi possível verificar a presença desses compostos para todos os extratos, sendo os extratos etanólicos de sinal mais intenso.

A Tabela 5 mostra as observações feitas pelo experimento realizado usando a técnica CCD após os reveladores.

Tabela 5. Estudo fitoquímico de extrato das folhas de *P. arboreum* e *P. aduncum*.

Extratos	Espécies	Amostras	Flavonoides	Alcaloides	Terpenos, fenóis, Esteroides, açúcares e flavonoides Liebermann Buchard
			NP/PEG	Iodocloroplatinado	
Hexano	<i>P. arboreum</i>	EH01	+	+	++
	<i>P. aduncum</i>	EH02	-	+	++
Etanol	<i>P. arboreum</i>	EE01	++	+	+
	<i>P. aduncum</i>	EE02	++	++	-
Diclorometano	<i>P. arboreum</i>	ED01	-	+	+
	<i>P. aduncum</i>	ED02	-	+	+

Nota: - não observado; + observado; ++ observado intensamente.

Portanto, todos os extratos apresentaram resultados satisfatórios para continuar os estudos de identificação de compostos utilizando a técnica da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS ou CLAE-EM).

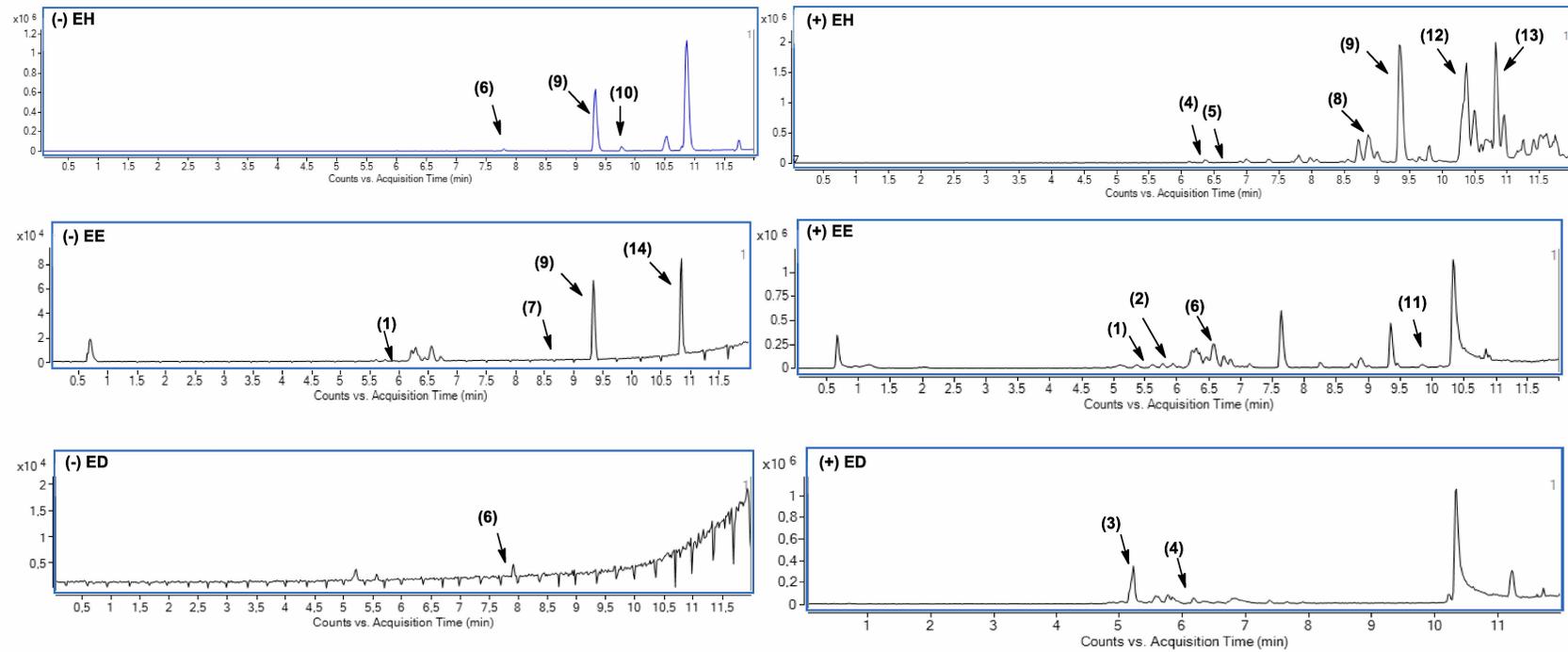
5.3 Identificações da composição

As amostras extraídas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM), com sistema de ionização por electrospray (IES), no modo positivo e negativo para identificação dos constituintes químicos.

As Figuras 14 e 15 mostram os cromatogramas de pico base (BPC) obtidos nas análises de cada extração de modos positivos e negativos das folhas de *P. arboreum* e *P. aduncum* respectivamente, nele está indicado a numeração das estruturas dos compostos orgânicos.

Encontra-se nas Tabelas 6 e 7 as propostas de identificações que foram realizadas calculando-se a fórmula molecular a partir da massa experimental em alta resolução, o erro em ppm (Equação 1) e comparando os espectros de massa EM/EM obtidos, com dados da literatura, da biblioteca online Metlin, GNPS e outras. Os espectros EM/EM dos compostos encontram-se no Apêndice. As Figuras 16 e 17 apresentam as estruturas dos compostos encontrados nas extrações de ambas espécies.

Figura 14. Cromatogramas de picos base do EH01, EE01 e ED01 (folhas de *P. arboreum*) obtidos por CLAE-EM nos modos negativos (-) e positivos (+).



Fonte: a autora.

Tabela 6. Proposta de identificação dos compostos em EH01, EE01 e ED01 das folhas de *P. arboreum*. (continua)

<i>t_R</i> (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classe de compostos	EH	EE	ED	Referências
0,697	-	387,1175	-	-	-	[M-H] ⁻ 341, 247, 210, 179, 132, 100 10eV	-	-		X		-
0,849	180,1035	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 163, 151, 145 , 137, 127, 117, 107 20eV	-	-		X		-
1,206	-	178,0922	-	-	-	[M-H] ⁻ 163, 149 , 135, 129, 104 30eV	-	-		X		-
0,847	316,1406	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 298, 263, 246, 220, 203, 178, 137, 113 30eV	-	-		X		-
5,673	291,0867	289,0721	291,0863 /289,0718	290,0790	1,04/ 1,4	[M+H] ⁺ 238, 188, 164, 139 , 117, 108 30eV / [M-H] ⁻ 274, 247, 223, 205, 183, 161, 145, 109 20eV	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ (1)	(epi)catequina (Flavonol)		X		Abu-Reidah et al., (2015a), Da Costa Silva et al. (2019)
5,756	-	447,0940	447,0933	448,1006	1,5	[M-H] ⁻ 401, 387, 311, 269, 233, 180, 161, 125 30eV	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ (2)	Astragalina (Flavonol)		X		Pikulski, e Brodbelt (2003), Abu-Reidah et al. (2015b), Da Costa Silva et al. (2019)

Tabela 6. Proposta de identificação dos compostos em EH01, EE01 e ED01 das folhas de *P. arboreum*. (continuação)

<i>t_R</i> (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classe de compostos	EH	EE	ED	Referências
5,782	268,1333	-	268,1332	267,1259	0,4	[M+H] ⁺ 251, 219, 191, 180, 151, 119 30 eV	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂ (3)	Asimilobina (Alcadoide aporfina)			X	De Lima et al. (2020)
5,847	387,2003	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 298, 285, 252, 234, 209, 179, 149, 119, 107 30 eV	-	-	X			-
6,389	197,1173	-	197,1172	196,1099	0,51	[M+H] ⁺ 179, 161, 133, 121, 107, 105 25 eV	C ₁₁ H ₁₆ O ₃ (4)	Loliolida (monoterpene lactone)	X		X	GNPS-Wang et al. (2016) Calixto et al. (2017) Kimura e Maki (2002) Neergaard et al. (2010)
6,615	565,1558	-	565,1552	564,1479	1,0	[M+H] ⁺ 511, 469, 433, 415, 337, 313, 243, 171, 121 30 eV	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄ (5)	Isoshaftoside (flavonol)	X			Abu-Reidah et al. (2015a), Chemspider - Ayers et al. (2012) Pubchem-Kim et al. (2016)
6,749	535,1482	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 499, 481, 409, 379, 361, 307, 167 30 eV	-	-	X			-

Tabela 6. Proposta de identificação dos compostos em EH01, EE01 e ED01 das folhas de *P. arboreum*. (continuação)

<i>t_R</i> (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classe de compostos	EH	EE	ED	Referências
6,814	267,1738	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 253, 202, 165, 117, 25eV	-	-			X	-
7,831	-	235,0979	235,0976	236,1049	1,3	[M-H] ⁻ 217, 201, 187, 177, 158, 149, 144, 132, 118, 106 20eV	C ₁₃ H ₁₆ O ₄ (6)	1,3-dimetoxi-2-acetoxi-5-alilbenzeno	X		X	Parmar et al., (1997)
8,785	-	327,2178	327,2177	328,2250	0,3	[M-H] ⁻ 291, 211, 208, 194, 171, 110 15eV	C ₁₈ H ₃₂ O ₅ (7)	Ácido trihidroxiocetadecadienóico (Ácido graxo)			X	Gómez et al. (2010) Silva et al. (2019)
9,105	272,1281	-	272,1281	271,1208	0,0	[M+H] ⁺ 201, 171, 25eV	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃ (8)	Piperilina (alcaloide)	X			Regasini et al. (2009) GNPS-Wang et al. (2016) FRIEDMAN et al. (2008). GAMES et al., (1984)

Tabela 6. Proposta de identificação dos compostos em EH01, EE01 e ED01 das folhas de *P. arboreum*. (continuação)

<i>t_R</i> (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classe de compostos	EH	EE	ED	Referências
9,313	221,1172	219,1035	221,1172	220,1099	0,0/ 3,5	[M+H] ⁺ 203, 189, 179, 165 , 161, 153, 133, 121, 105 20eV /[M-H] ⁻ 204, 186, 175, 164 , 160, 149, 134, 117, 105 20eV	C ₁₃ H ₁₆ O ₃ (9)	Etil-2- benzilacetoacet ato	X	X		Pubchem-Kim at al. (2016), Metlin- Abecasis at al. (2002)
9,828	-	303,1629	303,0510	304,0583	0,37	[M-H] ⁻ 285 , 247, 215, 188, 177, 164, 118, 105 20eV	C ₁₅ H ₁₂ O ₇ (10)	Taxifolina (flavanol)	X			CHEN et al. (2016).
9,899	287,1646	-	287,1642	287,1642	1,4	[M+H] ⁺ 269, 245, 231, 227, 217, 204, 189, 165 , 145, 137, 121, 119, 109, 105 20eV	C ₁₈ H ₂₂ O ₃ (11)	Ácido 4-metoxi- 3-[(E)-3-metil- 1,3-butadien-1- il]-5-(3-metil-2- buten-1-il)- benzoico	X			REGIANE et al.(2015), MoNA (2020)

Tabela 6. Proposta de identificação dos compostos em EH01, EE01 e ED01 das folhas de *P. arboreum*. (continuação)

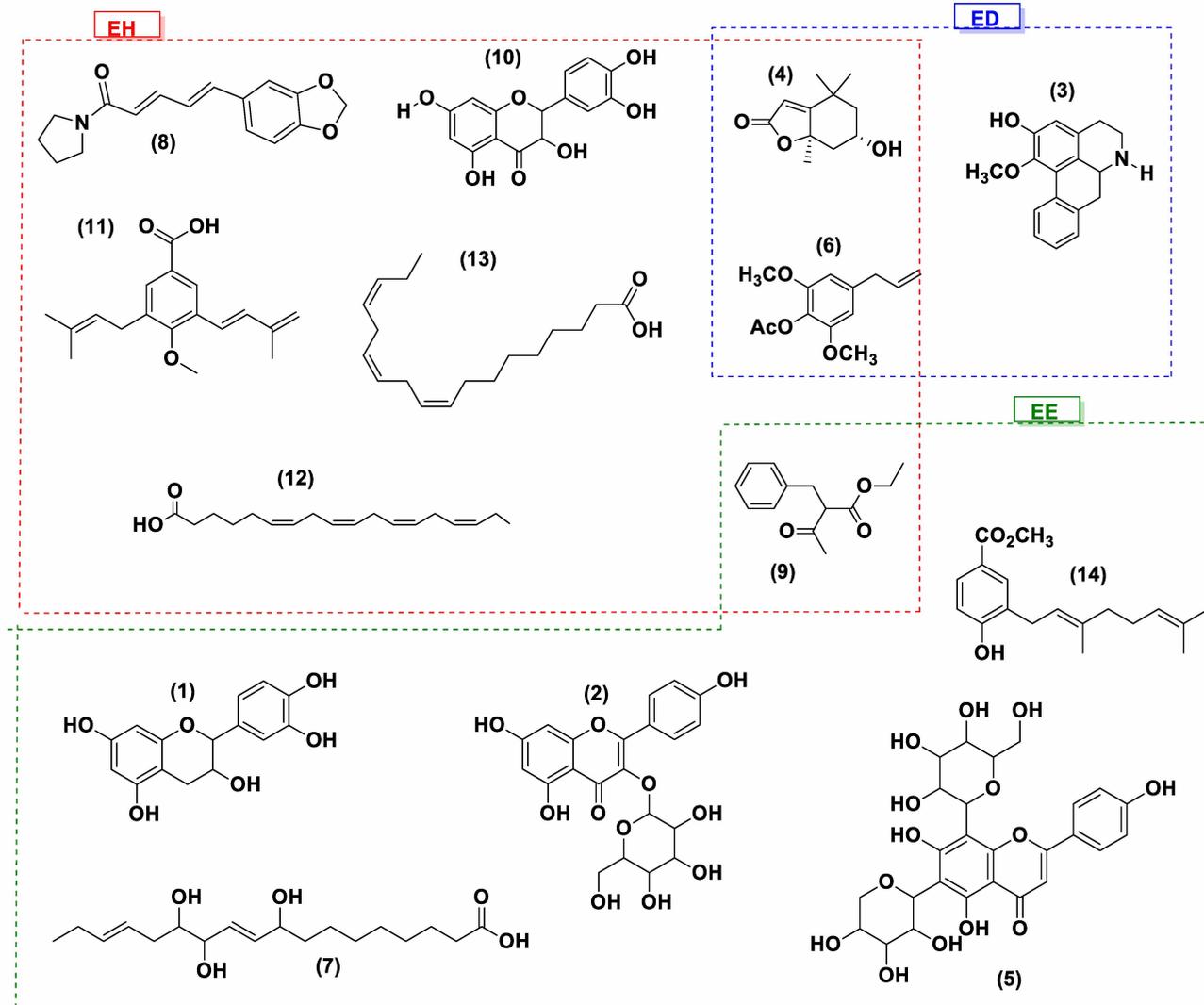
<i>t_R</i> (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classe de compostos	EH	EE	ED	Referências
10,217	-	273,1509	-	-	-	[M-H] ⁻ 229, 174, 119, 106 25eV	-	-		X		-
10,330	452,3250	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 317, 250 , 163, 107 30eV	-	-				-
10,553	277,2164	-	277,2162	276,2089	0,72	[M+H] ⁺ 259, 235, 221, 199, 173, 159, 149, 135, 121 , 107 20eV	C ₁₈ H ₂₈ O ₂ (12)	Ácido estearidônico (Ácido graxo)	X			Da Costa Silva et al. (2019) Metlin-Abecasis et al. (2002) MassHunter
10,828	279,2324	-	279,2319	278,2246	1,8	[M+H] ⁺ 249, 221, 205, 187, 173, 149, 135 , 121, 109 25 eV	C ₁₈ H ₃₀ O ₂ (13)	α-Ácido linolênico (Ácido graxo)	X			Abu-Reidah et al., (2015a) Leite, Afonso e Aquino (2010)
10,893	-	287,1658	287,1653	288,125	1,7	[M-H] ⁻ 250, 227, 203, 187, 164, 149 , 118, 105 30 eV	C ₁₈ H ₂₄ O ₃ (14)	3-geranil-4-hidroxi-benzoato de metila	X	X		Ramos et al. (2009)
10,956	517,3099	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 446, 347, 324, 298, 272 , 246, 201, 178, 137, 133 25 eV	-	-		X		-

Tabela 6. Proposta de identificação dos compostos em EH01, EE01 e ED01 das folhas de *P. arboreum*. (conclusão)

<i>t_R</i> (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classe de compostos	EH	EE	ED	Referências
10,983	289,1800	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 259, 241, 213, 199, 185, 163, 149, 135 , 121, 107 15 eV	-	-	X			-
11,226	634, 4548	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 617, 535, 291, 133 30 eV	-	-			X	-
11,824	-	277,2111	-	-	-	[M-H] ⁻ 259, 236, 188 , 146, 124 25 eV	-	-	X			-

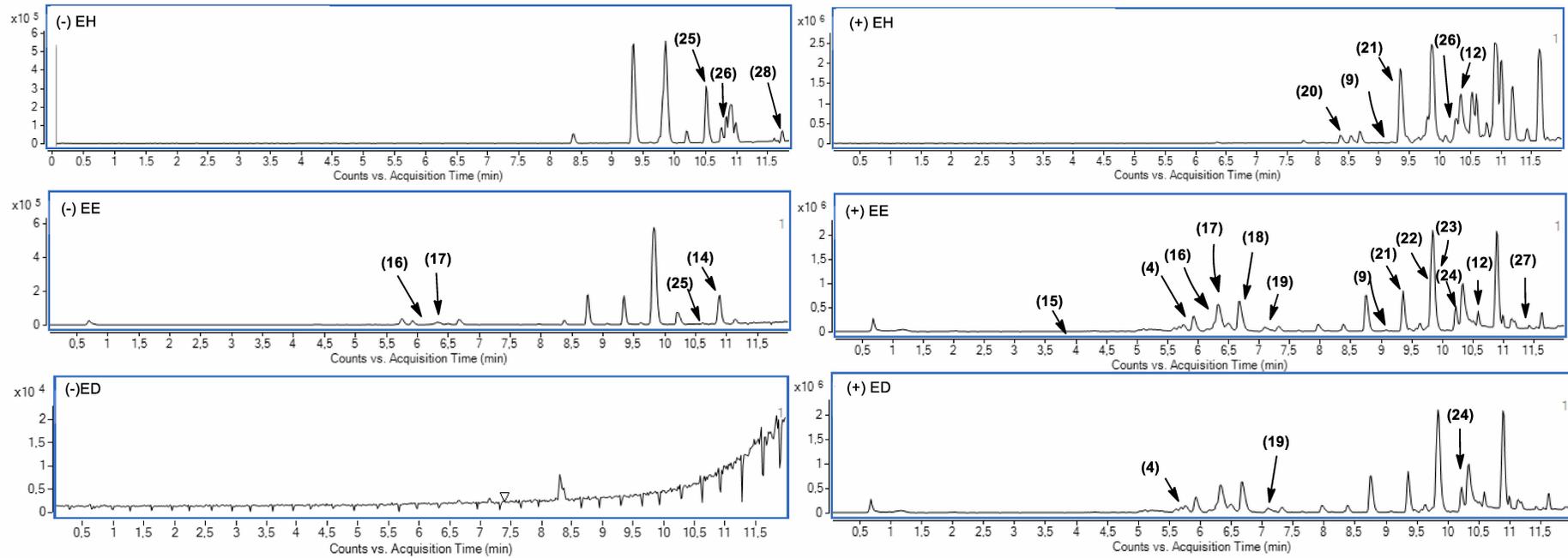
Nota: Tr: Tempo de retenção (min); não identificado: - ; x: indicada que o composto está presente na respectiva amostra.

Figura 15. Estrutura dos compostos identificados no EH, EE e ED das folhas das folhas de *P. arboreum*.



Fonte: a autora.

Figura 16. Cromatogramas de picos base do EH02, EE02 e ED02 (folhas de *P. aduncum*) obtidos por CLAE-EM nos modos negativos (-) e positivos (+).



Fonte: a autora.

Tabela 7. Proposta de identificação dos compostos em EH02, EE02 e ED02 das folhas de *P. aduncum*. (continua)

tr(min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classes de compostos	EH	EE	ED	Referências
0,671	180,1029	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 163, 151, 145, 137, 127, 117, 109 20eV	-	-		X		-
3,817	318,1336	-	318,1336	317,1263	0,0	[M+H] ⁺ 291, 255, 219, 195, 167, 150, 146, 133, 107 30eV	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅ (15)	Aduncamida <i>(Alcaloide)</i>		X		Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1993)
5,099	234,1499	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 217, 199, 189, 175, 161, 157, 137, 149, 129 25eV	-	-		X		
5,752	-	431,1924	-	-	-	[M-H] ⁻ 195, 160, 153, 135 30eV	-	-			X	-
5,815	387,2025	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 372, 270, 228, 209, 191, 149, 125 20eV	-	-		X		-
6,315	611,1602	609,1462	611,1607 / 609,1461	610,1534	-0.8/ 0,2	[M+H] ⁺ 557, 497, 449, 395, 287, 263 30eV /[M-H] ⁻ 519, 489, 447, 429, 400, 369, 327, 219, 197, 135 30eV	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ (16)	Luteolina-6,8-di-C-hexosídeo ou lucenina-2 <i>(flavonol)</i>		X		Pubchem-Kim et al. (2016) Breiterl et al. (2011) e Abu-Reidah et al. (2015a)

Tabela 7. Proposta de identificação dos compostos em EH02, EE02 e ED02 das folhas de *P. aduncum*. (continuação)

t_R (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classes de compostos	EH	EE	ED	Referências	
6,395	197,1172	-	197,1172	196,1099	0	[M+H] ⁺ 179, 161, 133, 121, 107, 105 25eV	C ₁₁ H ₁₆ O ₃ (4)	Loliolida (monoterpene lactone)			X	GNPS-Wang et al. (2016) Calixto et al. (2017) Kimura et al. (2002) NEERGAARD et al. (2010)	
6,499	449,1079	447,0928	449,1078 / 447,0933	448,1006	-1,1 / 0,2	[M+H] ⁺ 413, 383, 357, 329, 299, 149, 103 20eV [M-H] ⁻ 429, 357, 327, 297, 223, 194, 133 30eV	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ (17)	Luteolina-6-C-glucosídeo (flavonol)			X	Abu-Reidah et al. (2015a) El-Desouky et al. (2007)	
6,747	433,1131	-	433,1128	432,1056	0,7	[M+H] ⁺ 415, 379, 337, 313, 287, 283, 165, 121 30eV	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ (18)	canferol-3-O-ramnosídeo (flavonol)			X	Wojtanowski; Mroczek (2018) e Da Silva et al. (2019)	
7,163	373,2224	-	373,2221	372,2148	0,8	[M+H] ⁺ 314, 227, 193, 177, 135, 109 25eV	C ₁₉ H ₃₂ O ₇ (19)	(6S,9S)-roseosídeo (Chalcona)			X	X	Luyen et al. (2017)

Tabela 7. Proposta de identificação dos compostos em EH02, EE02 e ED02 das folhas de *P. aduncum*. (continuação)

t_R (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classes de compostos	EH	EE	ED	Referências
8,260	336,1812	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 285, 241, 185, 173, 157, 129 25eV	-	-			X	-
9,209	271,1319	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 253, 227, 185, 171, 107 20eV	-	-			X	-
9,352	221,1180	-	221,1172	220,1099	3,62	[M+H] ⁺ 208, 189, 182, 165, 153, 147, 133, 121, 109, 105 20eV	C ₁₃ H ₁₆ O ₃ (9)	Etil-2-Benzilacetoacetato	X	X		Chemspider-Ayers et al. (2012)
9,461	291,1591	-	291,1591	290,1591	0,0	[M+H] ⁺ 276, 217, 199, 165, 151, 107 30eV	C ₁₇ H ₂₂ O ₄ (21)	Laurenobiolida (lactona sesquiterpênica)	X	X		FUKUYAMA et al., 2011.
9,777	287,1644	-	287,1642	286,1569	0,7	[M+H] ⁺ 269, 231, 187, 165, 135, 109 20eV	C ₁₈ H ₂₂ O ₃ (22)	metil 2,2-dimetil-8-(3"-metil-2"-butenil)-2H-1-chomeno-6-carboxilato (cromeno)		X		Souza et al. (2019)

Tabela 7. Proposta de identificação dos compostos em EH02, EE02 e ED02 das folhas de *P. aduncum*. (continuação)

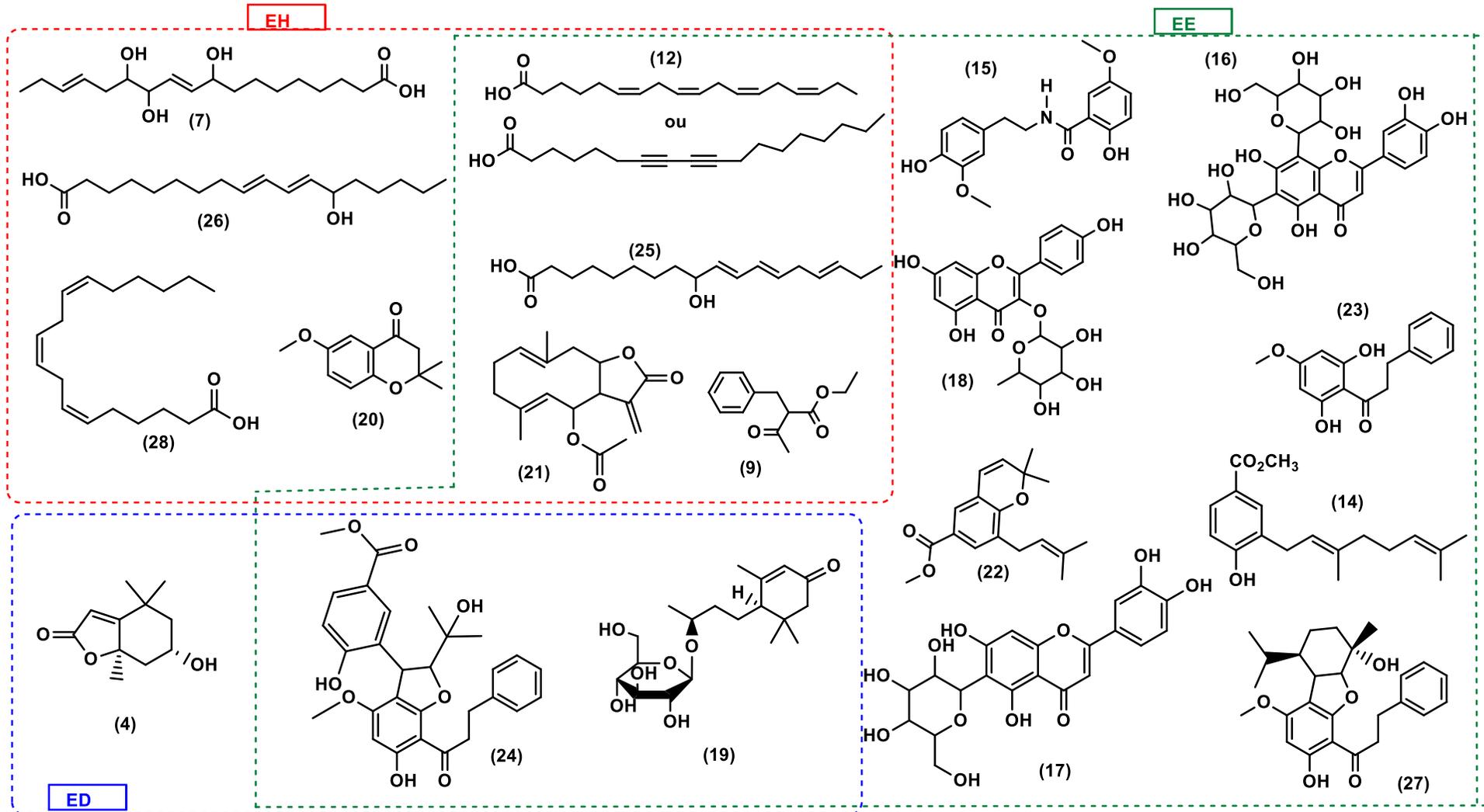
t_R (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classes de compostos	EH	EE	ED	Referências
9,778	273,1120	-	273,1121	272,1049	-0,4	[M+H] ⁺ 255, 219, 177, 163, 105 25eV	C ₁₆ H ₁₆ O ₄ (23)	2',6'-dihidroxi-4'-metoxi dihidrochalcona (Chalcona)		X		KARTIKA et al. (2019)
9,828	-	271,1005	-	-	-	[M-H] ⁻ 238, 210, 165, 152 , 124, 103 25eV	-	-		X		-
10,108	507,2014		507,2013	506,1941	0,2	[M+H] ⁺ 457, 433 , 327, 285, 249, 187, 105 25eV	C ₂₉ H ₃₀ O ₈ (24)	Piperaduncina B (chalconas)		X	X	Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1994)
10,343	267,1741	-	-	-	-	[M+H] ⁺ 226, 190, 155, 117, 100 25eV	-	-	X	X		-
10,513	-	293,2140	293,2132	294,2195	2,73	[M-H] ⁻ 275, 239, 223, 195 , 167, 121, 109 30eV	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ (25)	Ácido hidroxioctadecatri enóico (ácido graxo)	X	X		Gómez-Romer et al. (2010)

Tabela 7. Proposta de identificação dos compostos em EH02, EE02 e ED02 das folhas de *P. aduncum*. (conclusão)

t_R (min)	Íon molecular [M+H] ⁺	Íon molecular [M-H] ⁻	Massa exata	Massa molecular	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS +/- energia (eV)	Fórmula Molecular	Compostos identificados / classes de compostos	EH	EE	ED	Referências
10,559	277,2165	-	277,2162	276,2089	1,0	[M+H] ⁺ 249, 214, 185, 135, 121, 107 20eV	C ₁₈ H ₂₈ O ₂ (12)	Ácido estearidônico (ácido graxo)	X	X		Da Costa Silva et al. (2019) Metlin- Abecasis et al. (2002)
10,579	-	587,1985	-	-	-	[M-H] ⁻ 442, 350, 287, 181 20eV	-	-			X	-
11,060	-	287,1667	287,1653	288,1725	4,8	[M-H] ⁻ 193, 181, 149 15eV	C ₁₈ H ₂₄ O ₃ (14)	Metil-3-geraniil-4-hidroxi-benzoato		X		Ramos et al. (2009)
11,425	425,2322	-	425,2323	424,2250	-0,2	[M+H] ⁺ 363, 301, 195, 153, 107 30eV	C ₂₆ H ₃₂ O ₅ (27)	Adunctina E (chalconas)		X		Parmar et al. (1997) e Orjala et al. (1993)
11,812	-	277,2188	277,2173	278,2246	5,41	[M-H] ⁻ 268, 182, 139 5eV	C ₁₈ H ₂₉ O ₂ (28)	Ácido linolênico (Ácido graxo)	X			Gómez-Romero et al. (2010)

Nota: Tr: Tempo de retenção (min); não identificado: - ; x: indicada que o composto está presente na respectiva amostra.

Figura 17. Estrutura dos compostos identificados no EH, EE e ED das folhas de *P. aduncum*.



Fonte: a autora.

As prospecções fitoquímicas realizadas indicavam uma prevalência de flavonoides, alcaloides e ácidos graxos mesmo que de baixa intensidade para alguns extratos, presença essa que foi confirmada pela técnica de espectrometria de massas. Assim, pode ser identificado nos amostras EH01, EE01, EE02 e ED02, alguns flavonoides, como os flavonóis : (epi)catequina (1), isoshaftoside (5), taxifolina (10), lucenina-2 (16), luteolina-6-C-glucosídeo (17), canferol-3-O-ramnosídeo (18), as chalconas: 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi dihidrochalcona (23), piperaduncina B (24) e a adunctina E (27).

Os ácidos graxos foram identificados apenas nas extrações de hexano e etanol para ambas espécies, os compostos foram: ácido trihidroxioctadecadienóico (7), ácido estearidônico (12), ácido α -Linolênico (13), ácido hidroxioctadecatrienóico (25), ácido 13-hidroxi-9,11-octadecadienóico (26) e ácido octadecatrienóico (28).

Compostos de terpenos foram encontrados nas amostras EH01, EH02, EE02, ED01 e ED02, como as lactonas de monoterpene: loliolide (4) e a de sesquiterpene: laurenobiolida (21) e (6*S*,9*S*)-roseosídeo (19).

Por fim, também foram identificados nas amostras EH01, EE01, EE02, ED01 e ED02 os compostos de alcaloides, como as amidas: piperilina (8), aduncamida (15), e a aporfina: assimilobina (3). Esses compostos correspondem a classe de compostos com mais sinais apresentados na Tabela 5 que aborda os estudos fitoquímicos dos extratos analisados.

Para exemplificar a identificação da composição por espectrometria de massas, a Figura 18 mostra o espectro de massas de fragmentação no modo positivo da assimilobina (3) e a Figura 19 apresenta uma proposta de fragmentação para esse composto baseada em De Lima et al. (2020).

Figura 18. Espectro EM/EM do composto 3 em modo positivo da amostra ED01

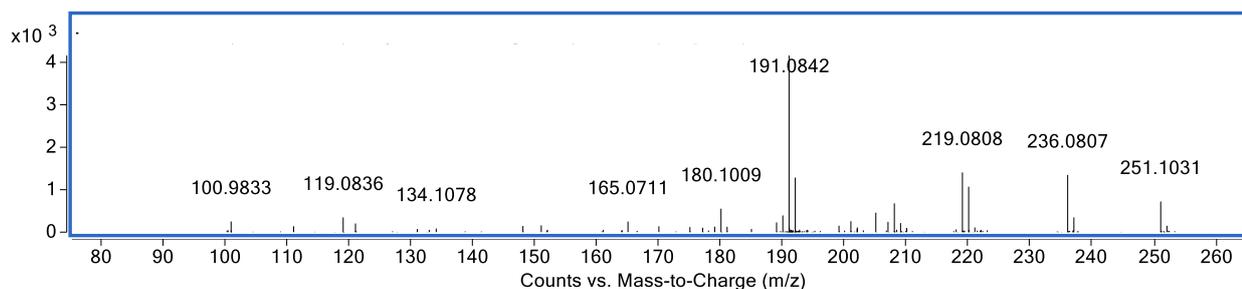
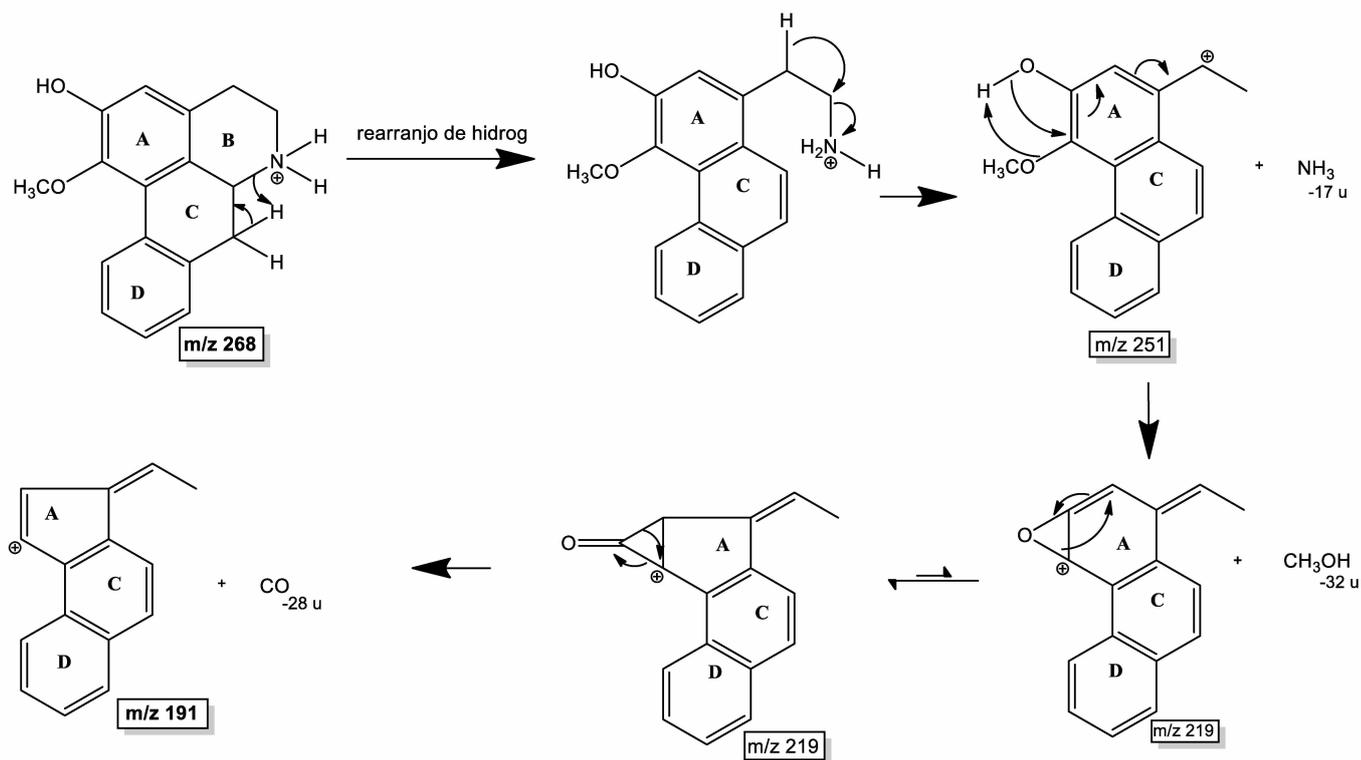


Figura 19. Proposta de mecanismo de fragmentação para o assimilobina (3).



Fonte: adaptado de De Lima et al. (2020).

A fragmentação do composto 3 de m/z 268 no modo positivo, sofre um rearranjo do hidrogênio no carbono β do anel C para o nitrogênio do anel B, ocorrendo uma ruptura do anel B que favorece no mecanismo da clivagem indutiva simples na molécula de nitrogênio (-17u de massas), gerando o primeiro íon de fragmento m/z 251.

O segundo íon fragmentado m/z 219 ocorre devido a protonação do éter ao capturar o H da hidroxila, que se torna um bom grupo de partida formando um álcool metílico, logo o oxigênio se liga ao anel A formando um epóxido. Neste íon, ocorre a quebra do epóxido formando uma carbonila.

Por último, que é o íon precursor fragmentado m/z 191, ele se forma com a eliminação da molécula de monóxido de carbono da carbonila cíclica por uma reação de deslocamento de elétrons. Assim, vemos no espectro que ele é o correspondente do pico base do composto.

5.4 Análise da atividade antimicrobiana

Neste trabalho a atividade antimicrobiana foi determinada através da concentração inibitória mínima (CIM). O método de concentração utilizado na análise foi o da microdiluição em caldo, como descrito no item 4.6. Os extratos foram avaliados frente às atividades antibacteriana e antifúngica.

-Análise de atividade antibacteriana.

Os extratos estudados foram avaliados quanto à atividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias da cavidade bucal. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 8. CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os extratos das folhas *P. arboreum* e *P. aduncum*.

Bactérias	Hexano		Etanol		Diclorometano	
	<i>P. a.</i> (EH01)	<i>P. ad.</i> (EH02)	<i>P. a.</i> (EE01)	<i>P. ad.</i> (EE02)	<i>P. a.</i> (ED01)	<i>P. ad.</i> (ED02)
Aeróbias						
<i>S. Mutans</i>	>400	400	>400	>400	>400	>400
<i>S. mitis</i>	400	200	>400	>400	>400	>400
<i>S. sanguinis</i>	100	200	>400	100	>400	>400
Anaeróbias						
<i>P. gingivalis</i>	100	200	>400	50	>400	>400
<i>F. nucleatum</i>	200	400	400	200	>400	>400
<i>A. naeslundii</i>	100	100	>400	50	>400	>400

Nota: *P. a.*: *P. arboreum*, *P. ad.*: *P. aduncum*; Controle positivo: Clorexidina e Metronidazol.

Segundo Holetz e outros (2002), quanto menor o valor de CIM, melhor atividade antimicrobiana das amostras. Assim, um extrato é considerado com atividade antimicrobiana promissora quando a CIM é menor que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, valores entre 100 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ é moderada, entre 500 a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ é fraca e acima de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ é considerada inativa.

A análise do **extrato hexânico** nas duas espécies *Piper* mostraram serem de maior atividade para as bactérias anaeróbias (*P. gingivalis* e *A. naeslundii*) e somente uma bactéria aeróbia (*S. Sanguinis*) com valores de CIM iguais a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, as demais bactérias de atividades moderadas. Esses resultados promissores podem ser atribuídos à intensa presença de classes de terpenos, ácidos graxos, fenóis, açúcares, flavonoides e esteroides, como verificado anteriormente na Tabela 5. Na busca por compostos para esses extratos, foi encontrado o composto (21) uma lactona sequiterpenica que também é

estudada no trabalho de FUKUYAMA e outros (2011), mostrando efeito de inibição do crescimento contra outros tipos de patógenos periodontais testados para diferentes espécies de folhas, concluindo assim um composto promissor frente a tais bactérias.

Entretanto, **os extratos etanólicos** só foram observados resultados mais ativos para espécie *P. aduncum*, no qual as mesmas bactérias anaeróbias se destacaram também, com valores excelentes de CIM de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, e inibição evidente para apenas uma bactéria aeróbia, *S. Sanguinis* (CIM $100\mu\text{g mL}^{-1}$). Pela prospecção fitoquímica, item 5.2, essa amostra se destacou na Tabela 5 por possuir mais quantidades de sinais nas classes de compostos, em ênfase para as classes como flavonoides e alcaloides. Um exemplo de identificação nesses extratos foi o composto (15) (Tabela 7) da classe de alcaloides que também constataram em Orjala e outros (1993), como promissor para a atividade antibacteriana utilizando o extrato de óleo essencial de *P. aduncum*.

Os resultados demonstram que os **extratos diclorometano** de ambas espécies não conseguiu inibir o crescimento bacteriano em concentração menor que $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram previstos baixos sinais para compostos das classes analisadas na Tabela 5.

Os mecanismos pelos quais os produtos naturais podem inibir o crescimento de microrganismos são diversos, alguns estudos apontam que a ação antimicrobiana dos extratos estaria ligada ao caráter hidrofílico dos grupos funcionais e o caráter lipofílico do esqueleto de hidrocarboneto dos compostos presentes (SOUSA, 2015).

Portanto, foi possível verificar que a amostra mais ativa frente à bactéria anaeróbia foi a extração em etanol da espécie *P. aduncum* (EE02). Para as bactérias aeróbias, os extratos em hexano de ambas espécies se mostraram serem mais ativas na inibição.

Dessa forma, essas amostras possuem grande potencial de prevenção de bactérias bucais, como as caries e periodontites citado no item 2.4.

-Análise da atividade antifúngica

Os resultados de CIM para os extratos avaliados frente atividade antifúngica está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade antifúngica para os extratos das folhas *P. arboreum* e *P. aduncum*.

Fungos	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Hexano		Etanol		Diclorometano	
	P.a. (EH01)	P.ad. (EH02)	P.a. (EE01)	P.ad. (EE02)	P.a. (ED01)	P. ad. (ED02)
<i>C. albicans</i>	3000	>3000	187,5	375	375	>3000
<i>C. tropicalis</i>	750	>3000	46,75	187,5	187,5	>3000
<i>C. glabrata</i>	>3000	>3000	93,75	375	>3000	>3000

Nota: P.a.: *P. arboreum*; P.ad.: *P. aduncum*; Controle positivo: Anfotericina ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Segundo Kuete (2010), a atividade antifúngica de extratos de vegetais pode ser classificada como significantes quando o valor da CIM é inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; moderados para CIM entre 100 a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$ e fracos quando CIM é superior a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Observando os resultados mostrados na Tabela 9, verifica-se que, para ambas as espécies, o **extrato etanólico** apresentou melhores resultados, sendo que a espécie *P. arboreum* se destacou para as três cândidas: atividade mais significativa para *C. Tropicalis* (CIM $46,74 \mu\text{g mL}^{-1}$), *C. Glabrata* (CIM $93,74 \mu\text{g mL}^{-1}$) e moderado para *C. albicans* (CIM $187,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Enquanto a espécie *P. aduncum* apresentou atividade moderada para os três fungos, sendo *C. Tropicalis* menos resistente a inibição (CIM $187,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Essa boa atividade pode ser atribuída a presença de flavonoides. Há na literatura trabalhos como o de Martins et al. (2015) que verificaram a atividade antifúngica de flavonoides como a catequina contra *C. albicans* e *C. glabrata*.

Para o **extrato em diclorometano**, somente a espécie *P. arboreum* apresentou inibição com valores moderados para as *C. albicans* (CIM $375 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. tropicalis* (CIM $187,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo esta última de valor mais satisfatório. Este extrato para ambas as folhas *Piper*, foi indicado nas prospecções fitoquímicas a presença de alcaloides e terpenos.

Em **extrato hexânico**, não foi alcançado resultados aceitáveis de inibições frente a cepas de fungo trabalhadas, apesar de ter apresentado classes de compostos variados, com sinal significativo a terpenos conforme visto anteriormente.

Portanto, dentre as três espécies de *Candida* analisadas, a que mostrou ter melhor concentração inibitória mínima frente aos extratos foi a *C. tropicalis*, com valores excelentes para EE01 e moderados para EE02 e ED01. Esses resultados mostraram que diferentes metabolitos secundários presentes nos extratos, como: terpenos, alcaloides, fenóis e flavonoides, são ativos com maior potencial antifúngico (NEGRI et al., 2014, TEODORO et al., 2015).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostra a potencialidade dos extratos obtidos das folhas das duas espécies *P. arboreum* e *P. aduncum*, como fonte natural de compostos com atividade antimicrobiana frente às bactérias relacionadas as doenças bucais e fungos obtendo resultados promissores de inibições.

Na prospecção fitoquímica foi observada a presença de várias classes de compostos as quais foram confirmadas pela espectrometria de massas (CLAE-EM/EM). No extrato em hexano, a prospecção fitoquímica indicou a presença de alcaloides e terpenos, no extrato em etanol observamos a presença de alcaloides e flavonoides, e o extrato em diclorometano apresentou poucos indícios de terpenos e ácidos graxos.

Para a atividade antibacteriana, a espécie de *P. arboreum* apresentou uma inibição maior no extrato hexânico, tendo ótimos resultados frente as três bactérias anaeróbia e apenas uma para bactérias aeróbias. Já a espécie *P. aduncum* apresentou resultados de inibição para o extrato hexânico e etanólico sendo que o etanólico se destacou com menores valores de CIM para bactérias anaeróbias. Para ambos extratos mencionados, foram identificados compostos em comum como alcaloides e terpenos, tornando os possíveis responsáveis pelo resultado adquirido da atividade antibacteriana.

Na atividade antifúngica as amostras EE01 e EE02 apresentaram melhores resultados, sendo que *P. arboreum* exibiu atividade mais significativa que *P. aduncum*. Sugere-se que os flavonoides encontrados, sejam os

responsáveis pelo resultado da atividade antifúngica observada para as três espécies de *Candidas*, com destaque para *C. tropicalis* que apresentou menores valores de CIM para três extratos conforme visto na tabela 9.

Logo, pode considerar que as folhas do gênero *Piper* estudadas neste trabalho são fonte de compostos com o potencial antimicrobiano, tornando comercialmente promissoras como possíveis fármacos fitoterápicos.

7 REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURACARRETERO, A. Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 70, p. 74-86, 2015a.
- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURACARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015b.
- ANDRADE, H.E.A. et al. Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de *Piper* da Amazônia. FEC/ UFPA, Belém, 448p, 2009.
- BALDOQUI, D.C. et al. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 899-902, 1999.
- BENEVIDES, P.J.C.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnelli*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 339-343, 1999.
- BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.
- BREITER, T. et al. A. Biodisponibilidade e potencial antioxidante de flavonóides de rooibos em humanos após o consumo de diferentes formulações de rooibos. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 338-347, 2011.
- BUCHANAN, B. B. et al. Biochemistry & molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists Rockville, MD**, 2000.
- CALIXTO, N. O. et al. Chemical constituents of *Psychotria nemorosa* Gardner and antinociceptive activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 707-723, 2017.
- CARVALHO, T. C. et al. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 543-551, 2011.
- CASTRO, HG de et al. Contribuição ao estudo das plantas medicinais–metabólitos secundários. 2ª. Ed. **Visconde do Rio Branco: Gráfica Suprema e Editora**, 2004.
- CHAURET, D. C.; BERNARD, C.B.; ARNASON, J.T.; DURST, T.; KRISHNAMURTY, H.G.; SANCHEZ-VINDAS, P.; MORENO, N.; SAN ROMAN, L.; POVEDA, L. Inseticidal neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 152-155, 1996.
- CHEMSPIDER (Ayers, M. (2012), "ChemSpider: The Free Chemical Database", *Reference Reviews*, Vol. 26 No. 7, pp. 45-46. Disponível em: <https://doi.org/10.1108/09504121211271059>. Acesso em: jun 2019.
- CHEN, Guilin et al. Analysis of flavonoids in *Rhamnus davurica* and its antiproliferative activities. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1275, 2016.
- CHRIST, Jheniffer Abeldt et al. The genus *Piper* (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 4, p. 1031-1046, 2016.
- CLINICAL; INSTITUTE, L. S. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **Approved Standard-Third Edition M27-A3**, v. 28, 2008.
- CLSI **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria**: CLSI document M11-A8. 8. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, p. 39, 2012a.

CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: CLSI document M7-A9. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, p. 63, 2012b.

CORDOVA, S. M. et al. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 4, p. 241-4, 2010.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B. et al. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists. cap. 24, p. 1250-1318. 2000.

DA SILVA, J. K. R. et al. Phenylpropanoid-rich essential oils of *Piper* species from the amazon and their antifungal and anti-cholinesterase activities. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 12, p. 1907-1911, 2016.

DA COSTA SILVA, T. et al. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of α -amylase, α -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, in vitro, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111641, 2019.

DELMULLE, T.; DE MAESENEIRE, S. L.; DE MEY, M. Challenges in the microbial production of flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 2, p. 229-247, 2018.

DEWICK, P. M. **Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms**. In: DEWICK, P. M. (Ed.). **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: John Wiley & Sons, LTD, 2002. cap. 2, p.507.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

DUTTA, CP et al. Ácido tuberósico, um triterpeno pentacíclico de *Nephrolepis tuberosa*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 1, pág. 240-242, 1993.

ESTEVAM, E. B. B., et al. Avaliação das atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica do extrato hidroalcolólico das raízes de *Tradescantia sillamontana* Matuda (Veludo Branco) (Commelinaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.18, n. 2, p. 415-422, 2016.

El-Desouky, S. K. et al. Um novo alcalóide pirrólico isolado de *Arum palaestinum* Boiss. e suas atividades biológicas. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 8, p. 927–931, 2007.

FAZOLIN, M. et al. Potencialidades da pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): características gerais e resultados de pesquisa. **Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

FILHO, P. J. S. S. "Imagens: Flora Digital da família Piperaceae." (2010). Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php>. Acesso: Nov 2017.

FRIEDMAN, M. et al. Analysis by HPLC and LC/MS of pungent piperamides in commercial black, white, green, and red whole and ground peppercorns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3028-3036, 2008.

FUKUYAMA, Noriaki et al. Antimicrobial sesquiterpenoids from *Laurus nobilis* L. **Natural product research**, v. 25, n. 14, p. 1295-1303, 2011.

GAMES, DAVID E. et al. Analysis of pepper and *Capsicum oleoresins* by high-performance liquid chromatography—Mass spectrometry and field desorption mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 294, p. 269-279, 1984.

GNPS (Wang, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v.34, n. 8, p. 828-837, 2016).

- GÓMEZ-ROMERO, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, v. 71, n. 16, p. 1848-1864, 2010.
- GÓMEZ, J. G. et al. *Candidemias nosocomiales*: nuevos retos de un problema emergente. *Revista Española de Quimioterapia*, v. 23, n. 4, p. 158-168, 2010.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- 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.
- KABERA, J. N. et al. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacol*, v. 2, p. 377-392, 2014.
- KARTIKA, R. et al. Hydrochalcone compounds from indonesian medicinal plant, "Sirih Hutan", *Piper aduncum* (Piperaceae). *Rasayan Journal of Chemistry*, v. 12, n. 3, p. 1022-1026, 2019.
- KIMURA, Junji; MAKI, Noritsugu. New loliolide derivatives from the brown alga *Undaria pinnatifida*. *Journal of natural products*, v. 65, n. 1, p. 57-58, 2002.
- KOCH, G. A. et al. **Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antifúngica da partição acetato de etila das folhas de *Cassia bakeriana Craib***. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Química Industrial) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- KUETE, VICTOR. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta medica*, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010.
- LAGO, J.H.G. et al. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *Piper hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, v. 2, p. 96-98, 2009.
- LEITE, G. D. S. et al. Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução. *Química nova*, v. 33, n. 3, p. 734-738, 2010.
- DE LIMA, B. R. et al. Integrative Approach Based on Leaf Spray Mass Spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for Comprehensive Characterization of Isoquinoline-Derived Alkaloids in Leaves of *Onychopetalum amazonicum* RE Fr. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 1, p. 79-89, 2020.
- LUYEN, B. T. T. et al. Chemical constituents of *Piper aduncum* and their inhibitory effects on soluble epoxide hydrolase and tyrosinase. *Medicinal Chemistry Research*, v. 26, n. 1, p. 220-226, 2017.
- MARTINS, N. et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, v. 74, p. 648- 670, 2015.
- MELO, ALINE. et al. Piperaceae do Parque Nacional do Viruá, Caracarái, Roraima, Brasil. *Rodriguésia*, v. 65, n. 2, p. 455-470, 2014.
- MABBERLEY, D. J. The Plant-book. A portable dictionary of the higher plants. **Cambridge University**. Press. New York, 1997.
- MAGALHÃES, C. F. et al. Antimicrobial activity of *Piper aduncum* leaf extracts against the dental plaque bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 10, n. 23, p. 331-337, 2016

MEDEIROS, J. D.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 796-802, 2010.

METLIN (Abecasis G. R. et al. Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. **Nature Genetics**, v. 30, p. 97-101, 2002)

MONA MoNA – Mass Bank of North America, 2016. MoNA MassBank of North America. < Disponível em: <http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/> > (Acesso em: 04 jul 2019).

MONTEIRO, D. Flora of the canga of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Piperaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1285-1309, 2018.

MORANDIM-GIANNETTI, A. A. et al. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1810-1814, 2010.

NAIR, M. G. et al. Insecticidal properties of some metabolites of Jamaican *Piper* spp., and the amides synthesized from 5, 6-Z and E-butenolides of *Piper fadyenii*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3053-3058, 1986.

NASCIMENTO, K. M. **Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de Piper frente a cepas de Candida spp.** 2011. Dissertação (Mestrado) PósGraduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

NASCIMENTO, S. A. et al. Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (Piperaceae). **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 60, n. 1, p. 2837-2839, 2015.

NAVICKIENE, H. M. Debonsi et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NEERGAARD, J. S. et al. Serotonin transporter affinity of (-)-loliolide, a monoterpene lactone from *Mondia whitei*. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 593-596, 2010.

NEGRI, M. et al. Early State Research on Antifungal Natural Products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925-2956, 2014.

ORJALA, J. et al. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 813-818, 1993.

ORJALA, J. et al. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 18-26, 1994.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n.4, p. 597-673, 1997.

PETROLINI, F. V. B. et al. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 829-834, 2013.

PIKULSKI, M.; BRODBELT, J. S. Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 12, p. 1437-1453, 2003.

POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; MAUSE, R. *Piper aduncum* L.: planta pluripotente e fonte de substâncias fitoquímicas importantes. **Revista Fitos**, v. 2, n. 01, p. 7-18, 2006.

PRADO, D. G. **Estudo químico dos extratos das folhas de *Cassia bakeriana* biomonitorado pela atividade antifúngica.** 2018. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

PUBCHEM (Kim, S. et al. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202–D1213.

RAMS, T. E.; DEGENER, J. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *Journal of Periodontology*, v. 85, n. 1, p. 160-169, 2014.

RAMOS, C. S.; KATO, M. J. Hydrolysis of methyl benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus picipes* beetle. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 3, p. 560-563, 2009.

REGASINI, L. O. et al. Atividade tripanocida de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognia*, v.19, p. 199-203, 2009.

REGASINI, L. O. et al. Radical Scavenging Capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Latin American Journal Pharmacy*, v. 27, n. 6, p.900-903, 2008.

REGIANE, B. de L. et al. A new benzoic acid derivative from *Piper diospyrifolium* and its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. *Phytochemistry Letters*, v. 11, p. 18-23, 2015.

RUSCHEL, Daniel. **O gênero *Piper* (Piperaceae) no Rio Grande do Sul.** 2004. 136 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SANTOS, M. L. et al. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1275-1278, 2013.

SILVA, R. J. F. et al. Caracterização farmacognóstica de *Piper arboreum* var. *arboreum* e *P. tuberculatum* (Piperaceae). *Acta Amazonica*, v. 46, n. 2, p. 195-208, 2016.

SILVA, T. C. et al. **Estudo químico e avaliação do potencial biológico das folhas de *Cassia bakeriana* Craib.** 2019. 168f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química, Uberlândia, 2019.

SILVA, W. C. et al. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. *Acta Amazonica*, v. 37, n. 2, p. 293-298, June 2007.

SOUZA, A. A. et al. Combined use of tandem mass spectrometry and computational chemistry to study 2H-chromenes from *Piper aduncum*. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 54, n. 7, p. 634-642, 2019.

SOUSA, P.J.C.; BARROS, C.A.L.; ROCHA, J.C.S.; LIRA, D.S.; MONTEIRO, G.M.; MAIA, J.G.S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p. 217-221, 2008.

SOUSA, Raquel Maria Ferreira de et al. **Estudo químico de *Eugenia calycina* Cambess e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfa-amilase.** 2015. 220f. Dissertação (doutorado) - Programa de Pós - Graduação em Química, Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 204237, 2013

TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; KOGA-ITO, C. Y. Potential Use of Phenolic Acids as Anti-Candida Agents: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1420, 2015.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In: (Ed.). **Biotechnology of isoprenoids: Springer**, p.63-106, 2015.

VASQUES, R. S. et al. Amidas antifúngicas de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.

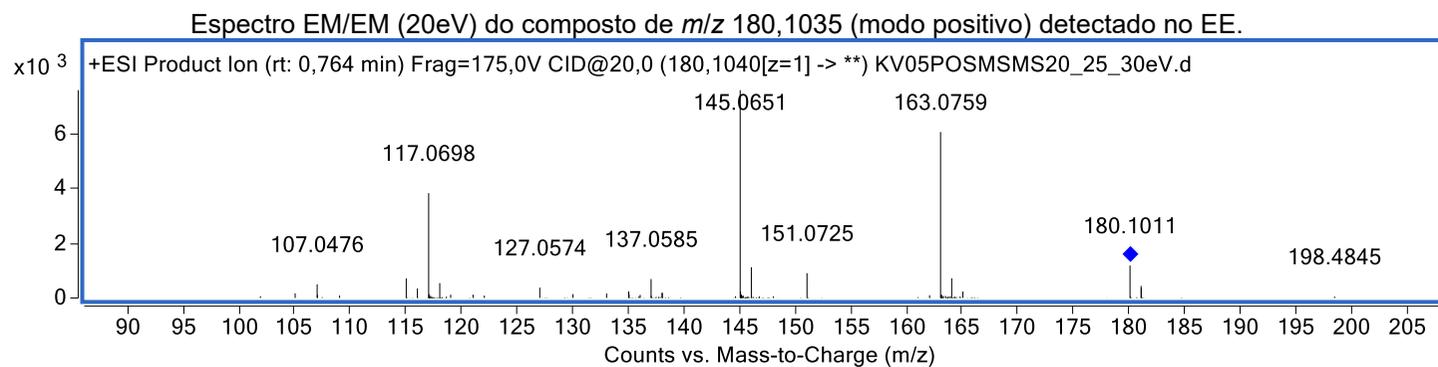
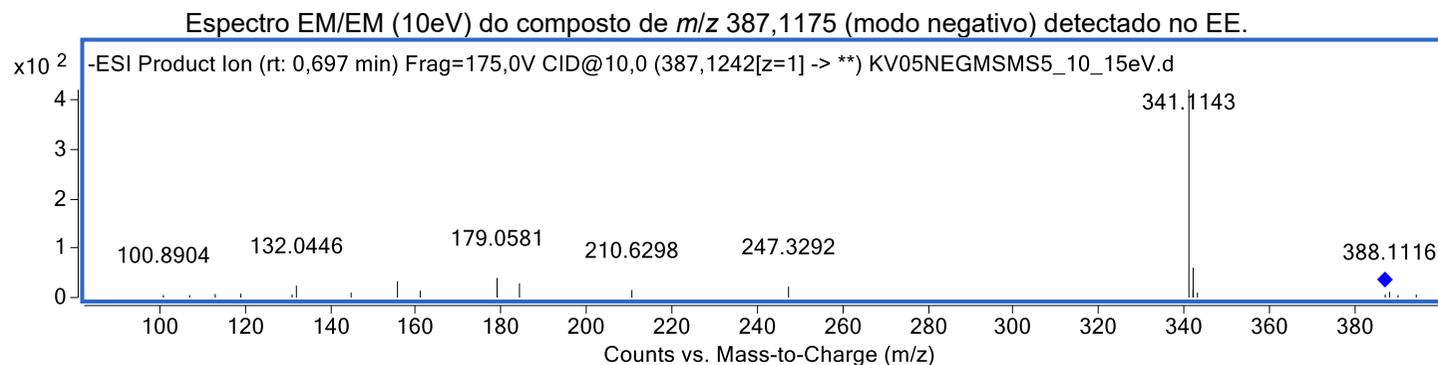
WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Springer Science & Business Media**, 1996, ISBN 3540586768.

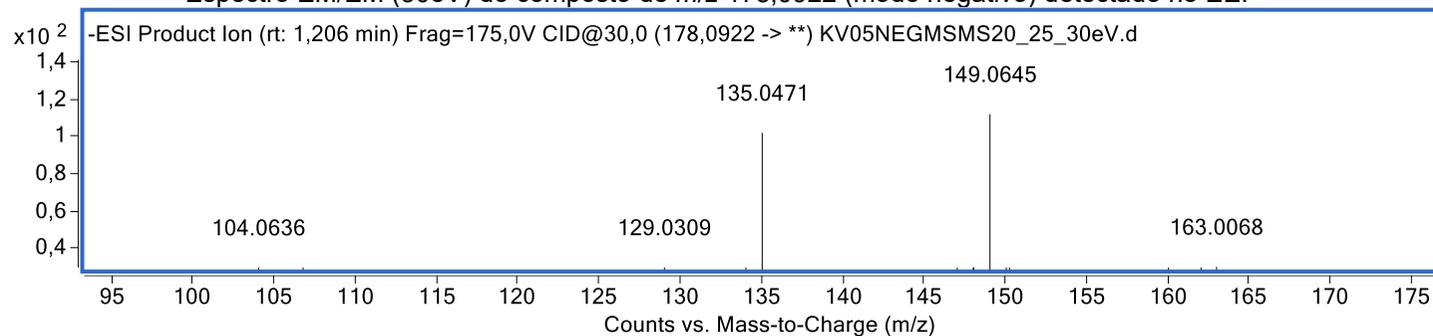
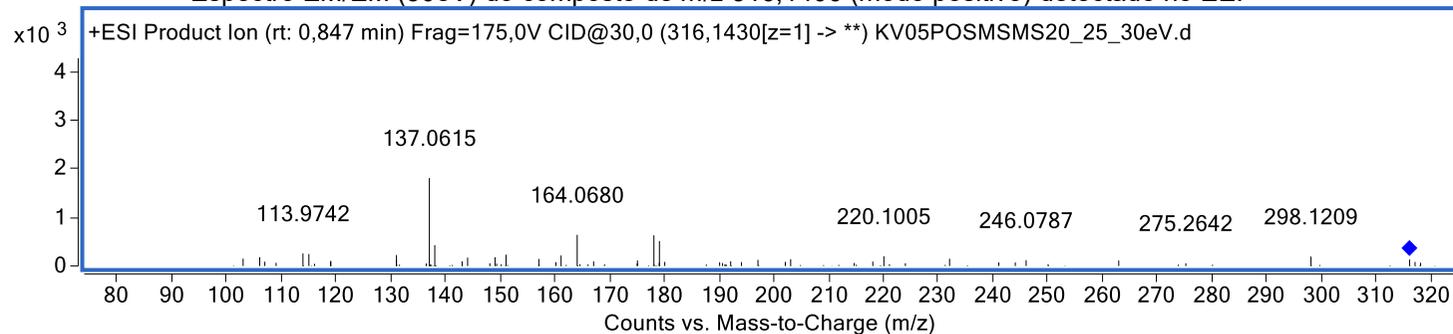
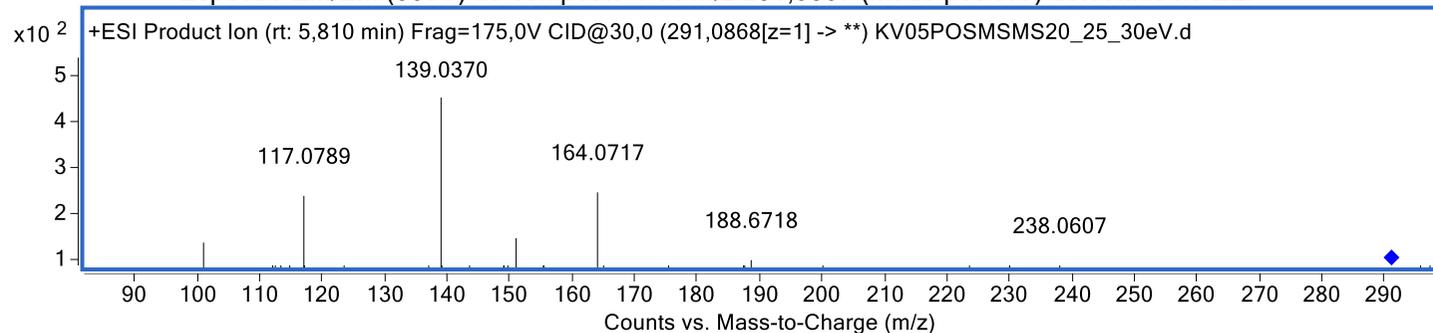
WOJTANOWSKI, K. K.; MROCZEK, T. Study of a complex secondary metabolites with potent antiradical activity by two dimensional TLC/HPLC coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and bioautography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1029, p. 104-115, 2018.

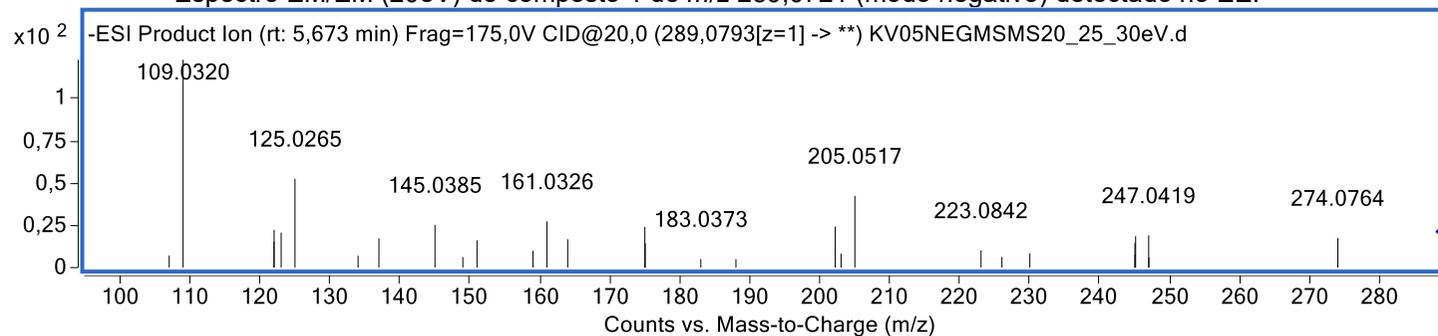
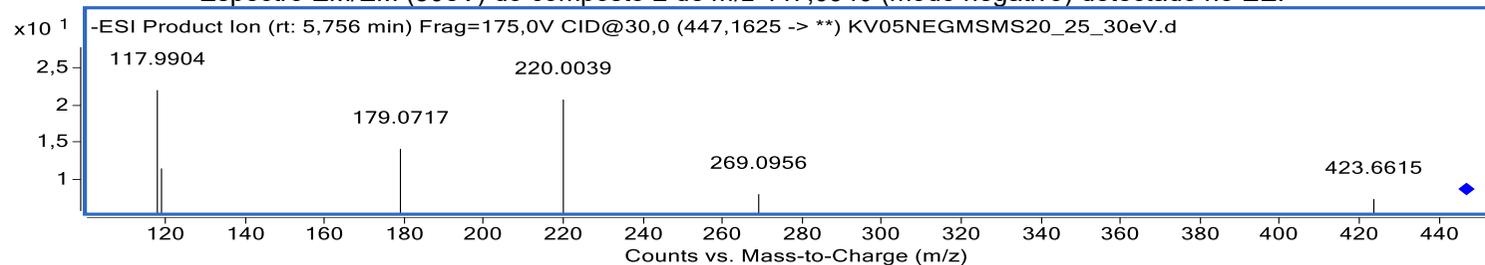
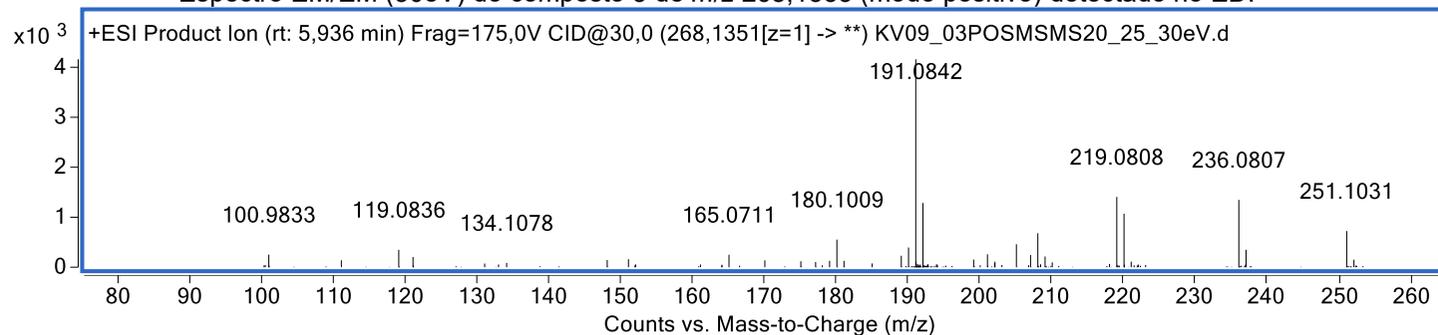
ZUANAZZI, J.A.S. et al. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**; n. 29, p. 819-825, 2001

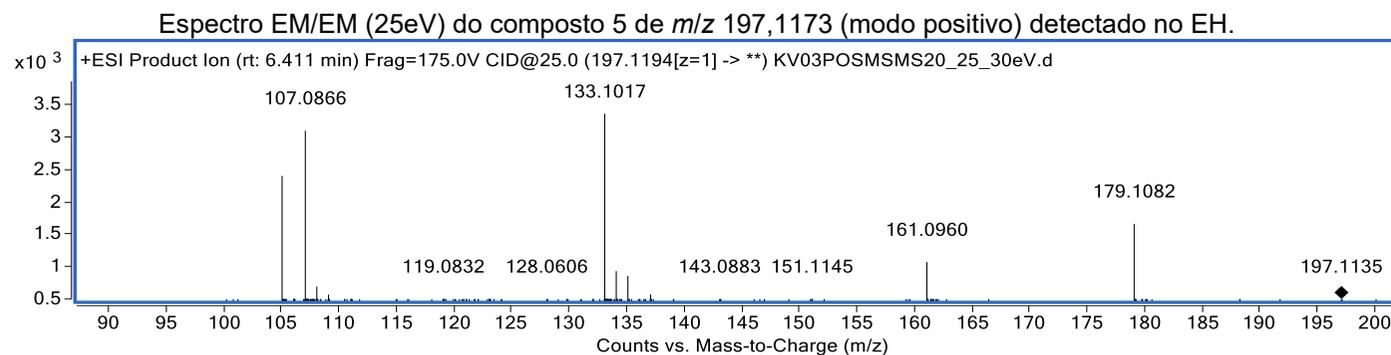
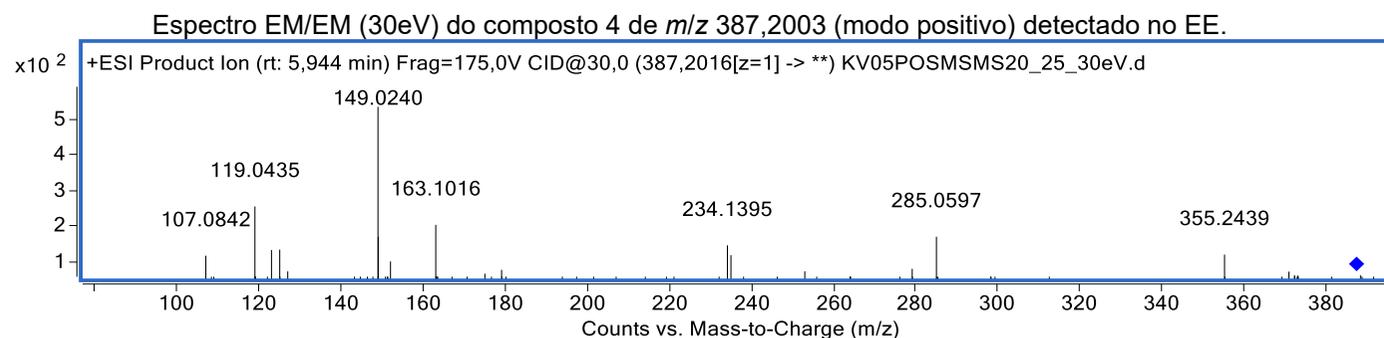
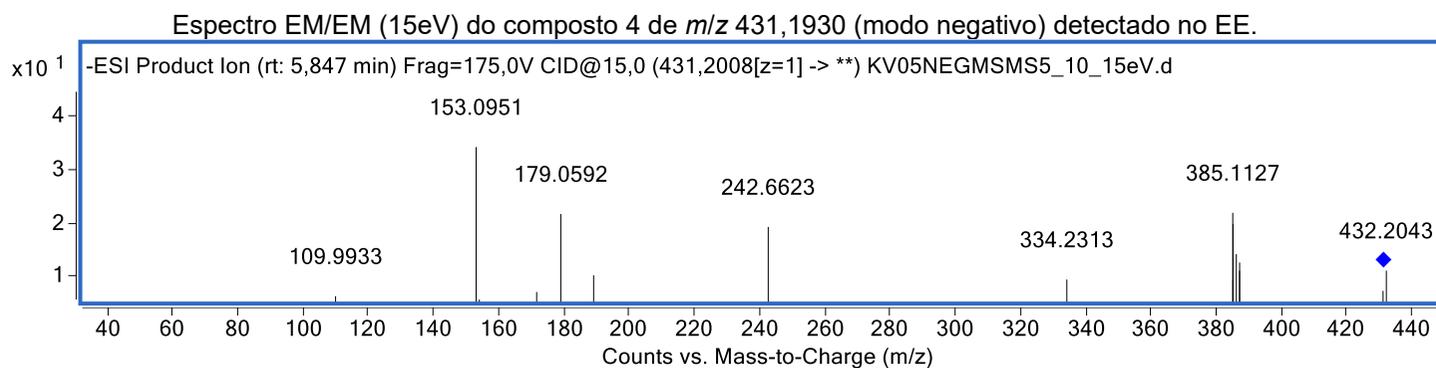
8 APÊNDICE 1

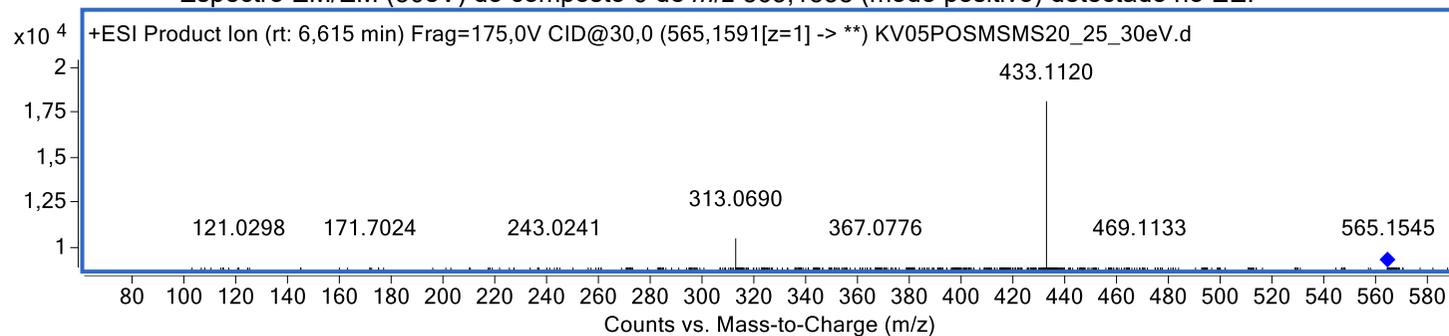
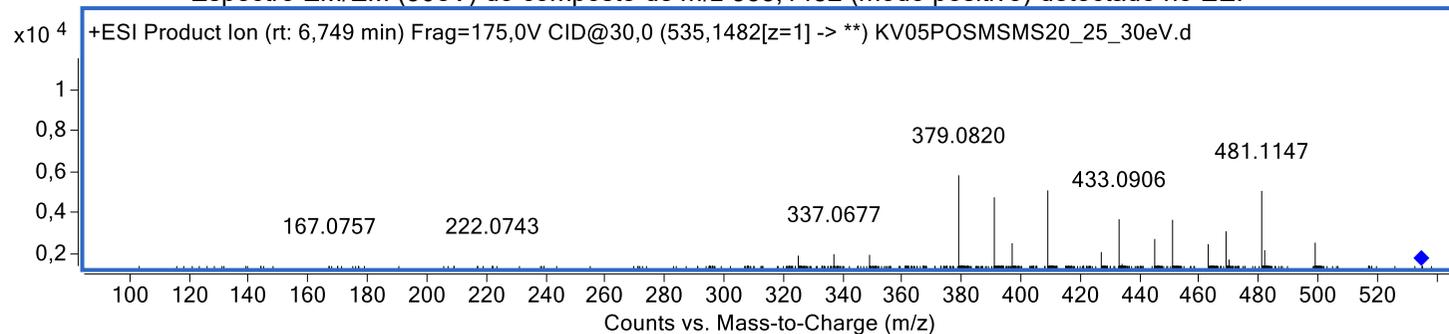
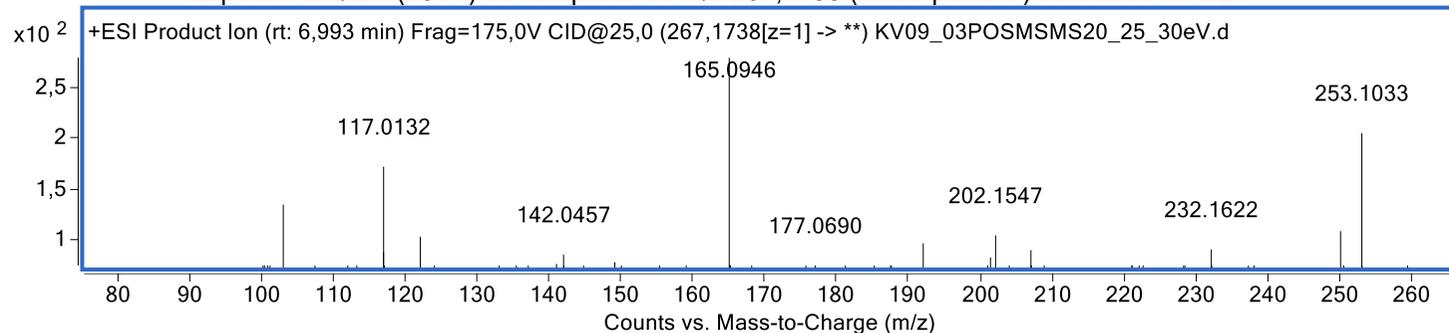
Espectros de fragmentações dos íons moleculares encontrados no extrato das folhas de *P. arboreum*.

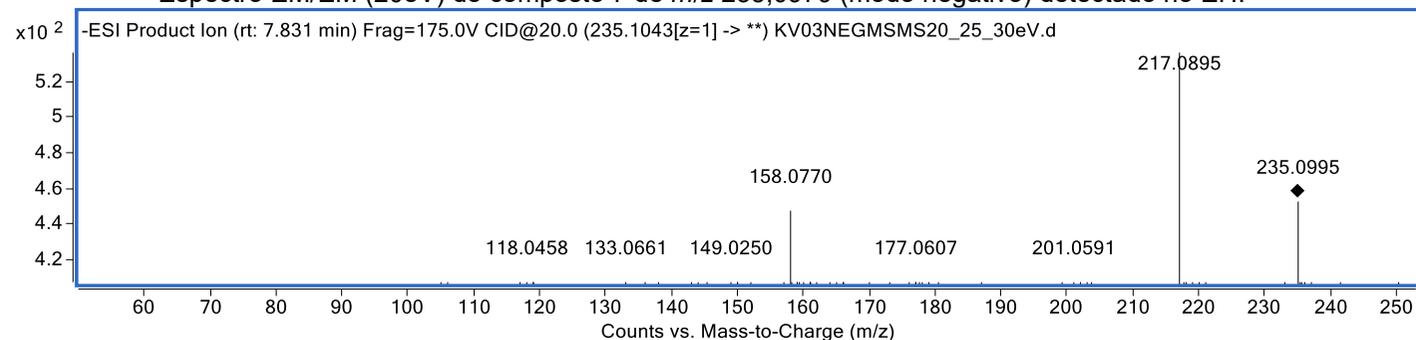
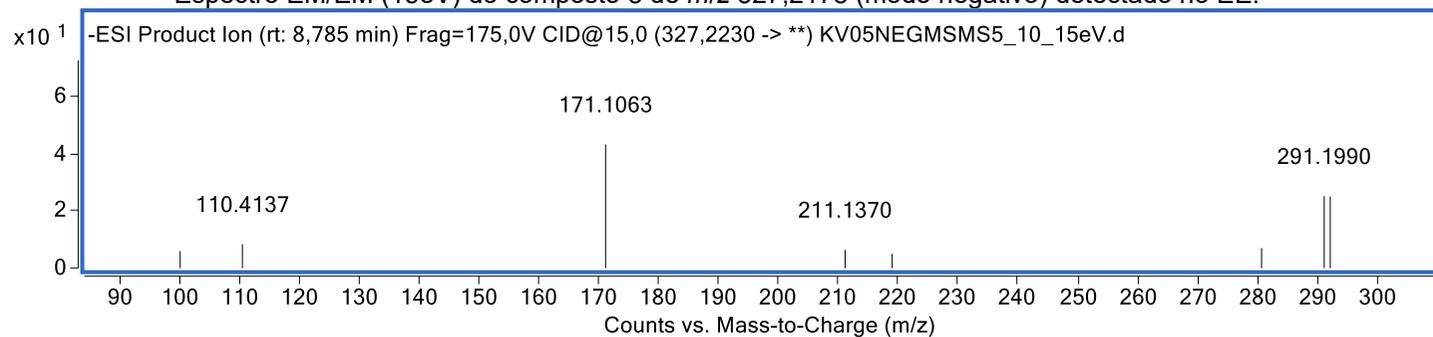
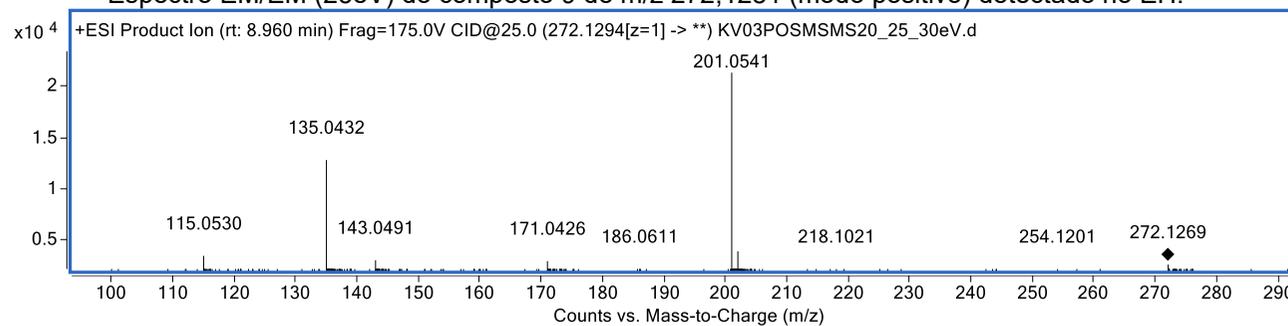


Espectro EM/EM (30eV) do composto de m/z 178,0922 (modo negativo) detectado no EE.Espectro EM/EM (30eV) do composto de m/z 316,1406 (modo positivo) detectado no EE.Espectro EM/EM (30eV) do composto 1 de m/z 291,0867 (modo positivo) detectado no EE.

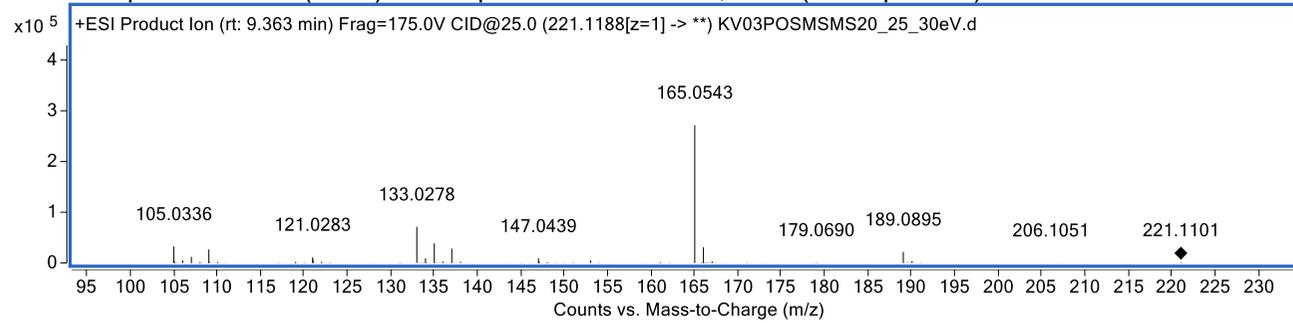
Espectro EM/EM (20eV) do composto 1 de m/z 289,0721 (modo negativo) detectado no EE.Espectro EM/EM (30eV) do composto 2 de m/z 447,0940 (modo negativo) detectado no EE.Espectro EM/EM (30eV) do composto 3 de m/z 268,1333 (modo positivo) detectado no ED.



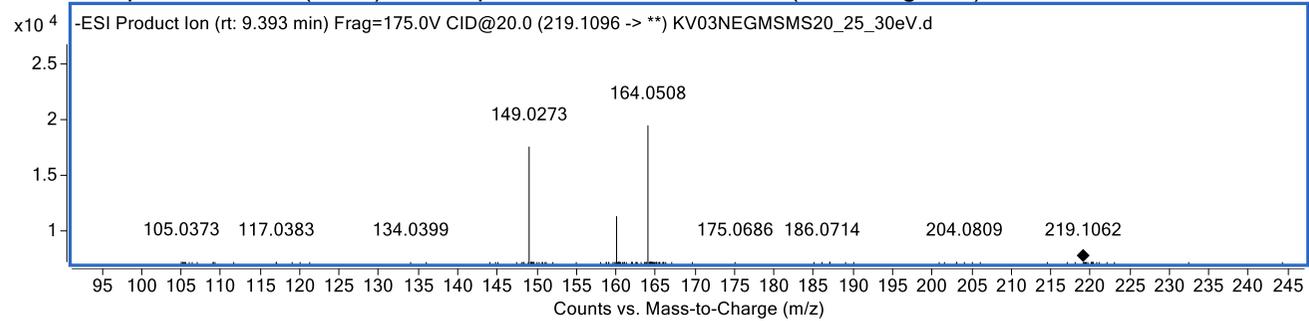
Espectro EM/EM (30eV) do composto 6 de m/z 565,1558 (modo positivo) detectado no EE.Espectro EM/EM (30eV) do composto de m/z 535,1482 (modo positivo) detectado no EE.Espectro EM/EM (25eV) do composto de m/z 267,1738 (modo positivo) detectado no ED.

Espectro EM/EM (20eV) do composto 7 de m/z 235,0979 (modo negativo) detectado no EH.Espectro EM/EM (15eV) do composto 8 de m/z 327,2178 (modo negativo) detectado no EE.Espectro EM/EM (25eV) do composto 9 de m/z 272,1281 (modo positivo) detectado no EH.

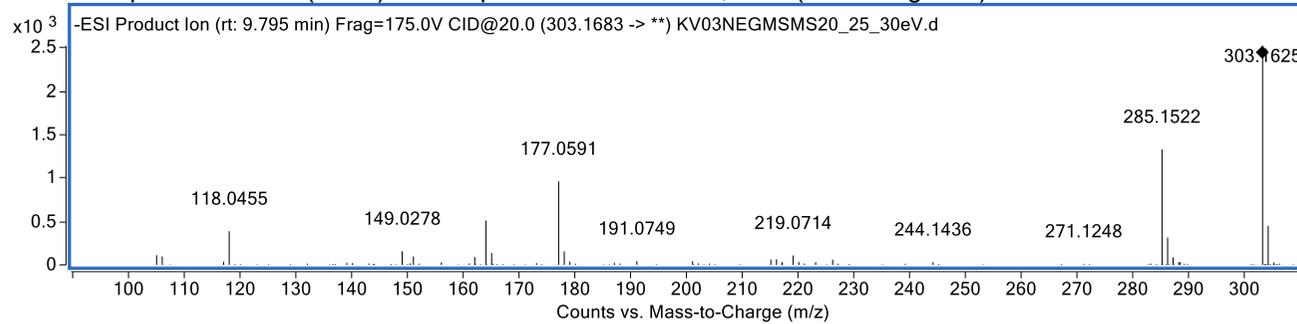
Espectro EM/EM (25eV) do composto 10 de m/z 221, 1172 (modo positivo) detectado no EH.



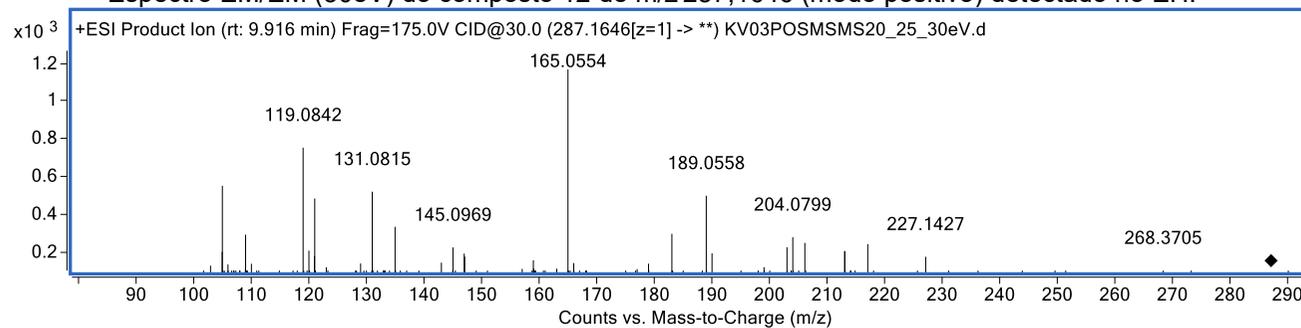
Espectro EM/EM (20eV) do composto 10 de m/z 219,1035 (modo negativo) detectado no EH.



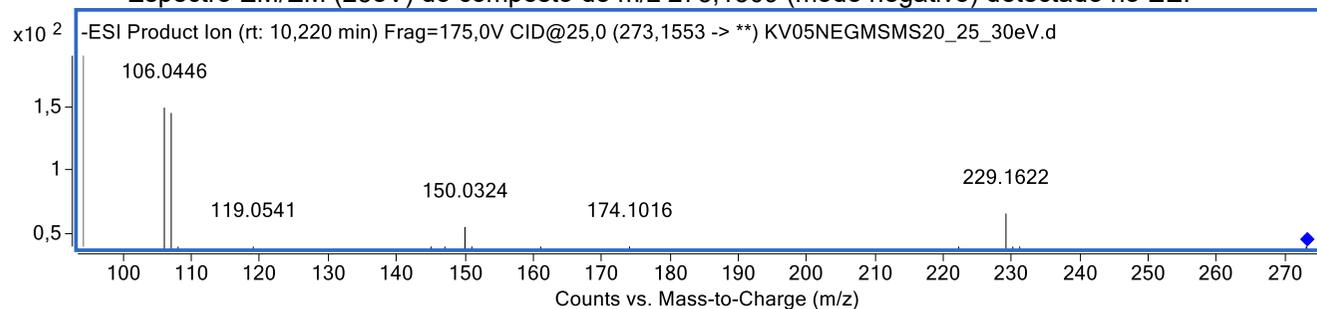
Espectro EM/EM (20eV) do composto 11 de m/z 303,1629 (modo negativo) detectado no EH.



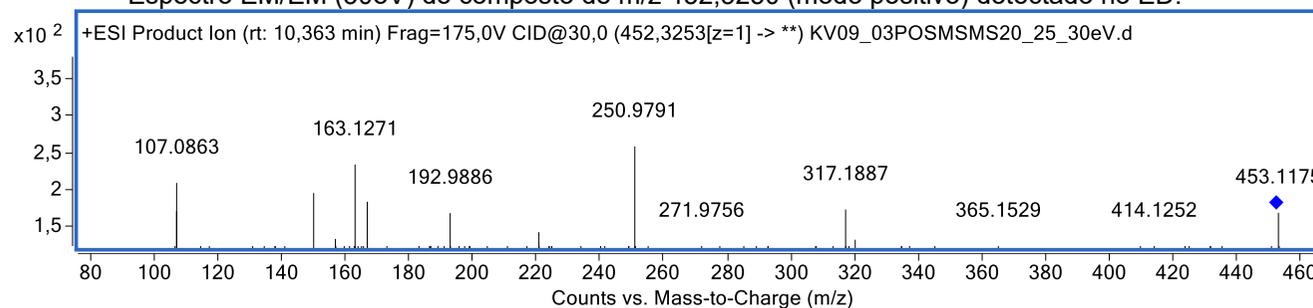
Espectro EM/EM (30eV) do composto 12 de m/z 287,1646 (modo positivo) detectado no EH.



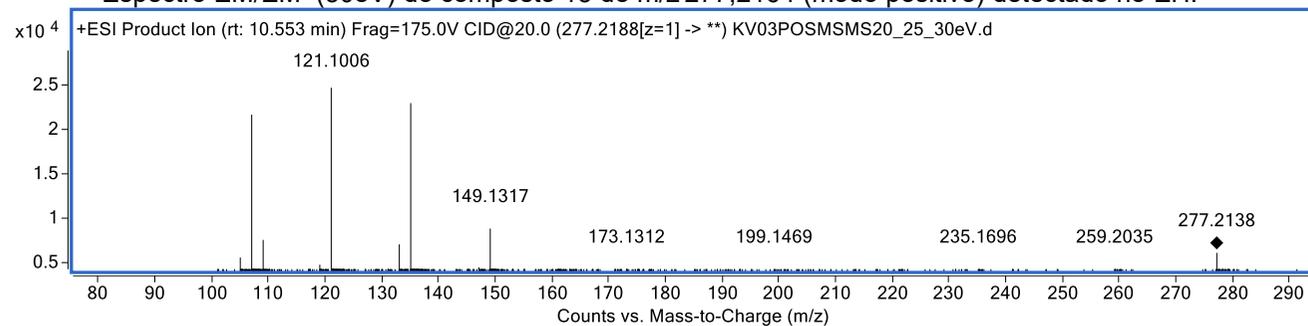
Espectro EM/EM (25eV) do composto de m/z 273,1509 (modo negativo) detectado no EE.



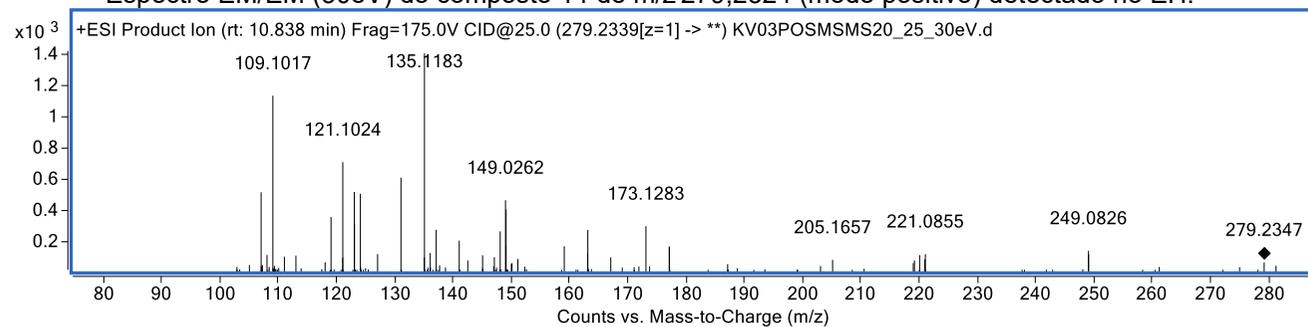
Espectro EM/EM (30eV) do composto de m/z 452,3250 (modo positivo) detectado no ED.



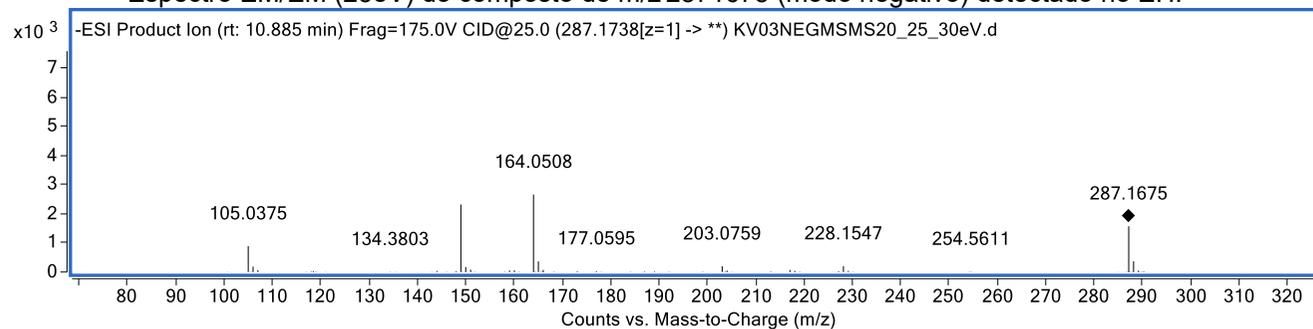
Espectro EM/EM (30eV) do composto 13 de m/z 277,2164 (modo positivo) detectado no EH.



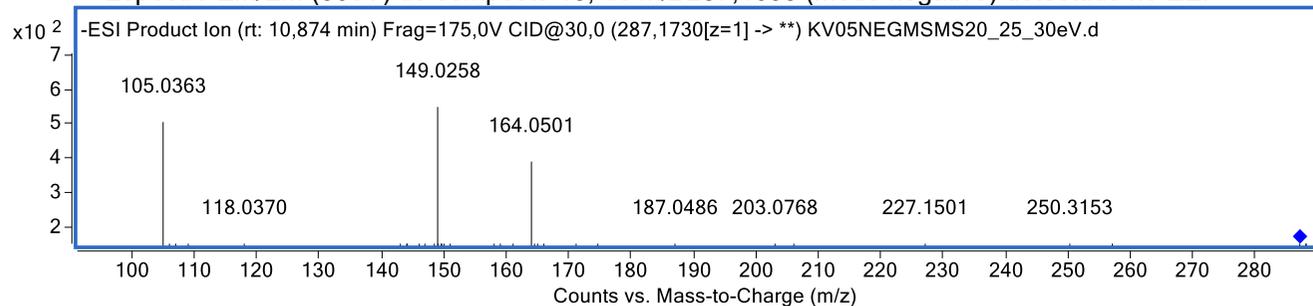
Espectro EM/EM (30eV) do composto 14 de m/z 279,2324 (modo positivo) detectado no EH.



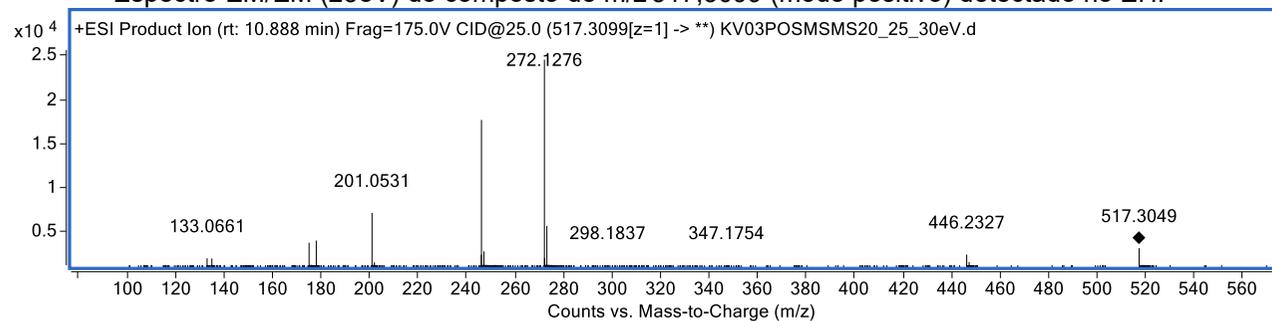
Espectro EM/EM (25eV) do composto de m/z 2871678 (modo negativo) detectado no EH.



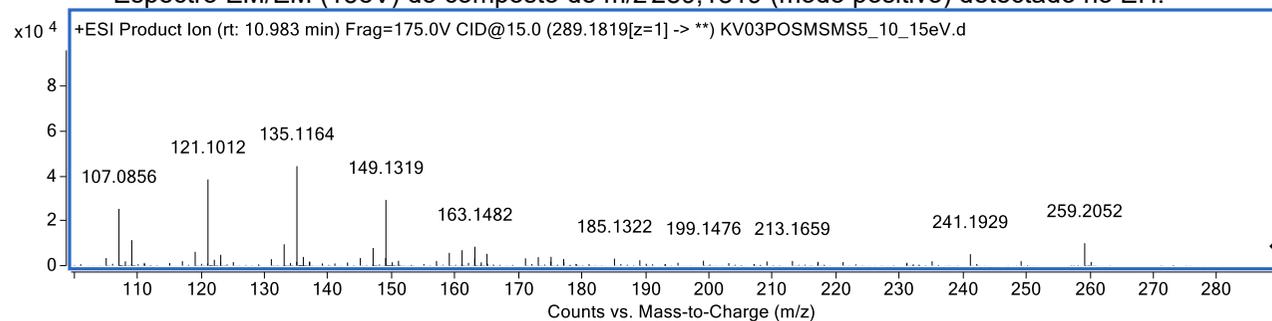
Espectro EM/EM (30eV) do composto 15, de m/z 287,1658 (modo negativo) detectado no EE.



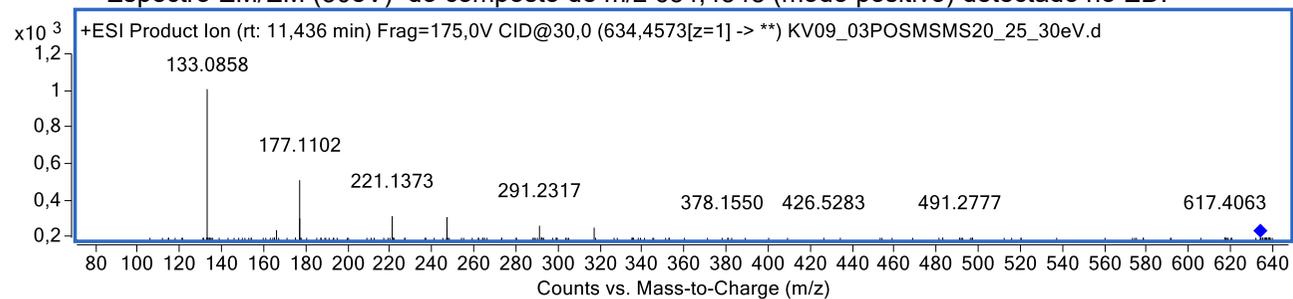
Espectro EM/EM (25eV) do composto de m/z 517,3099 (modo positivo) detectado no EH.



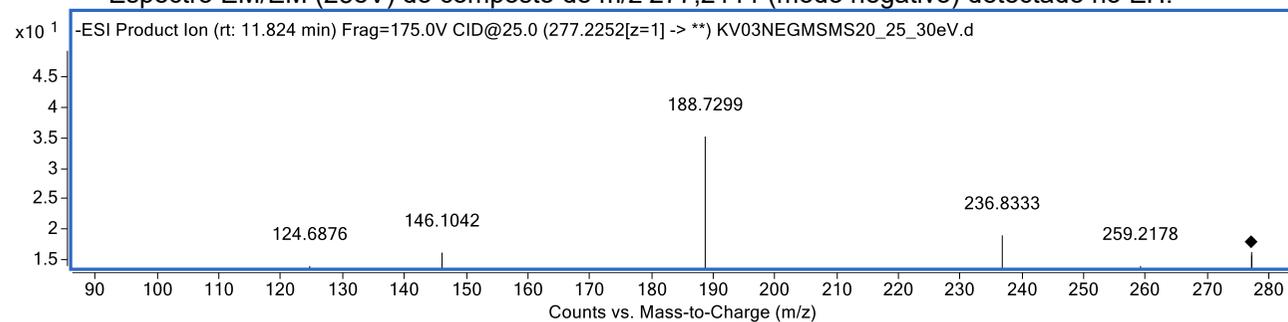
Espectro EM/EM (15eV) do composto de m/z 289,1819 (modo positivo) detectado no EH.



Espectro EM/EM (30eV) do composto de m/z 634,4548 (modo positivo) detectado no ED.

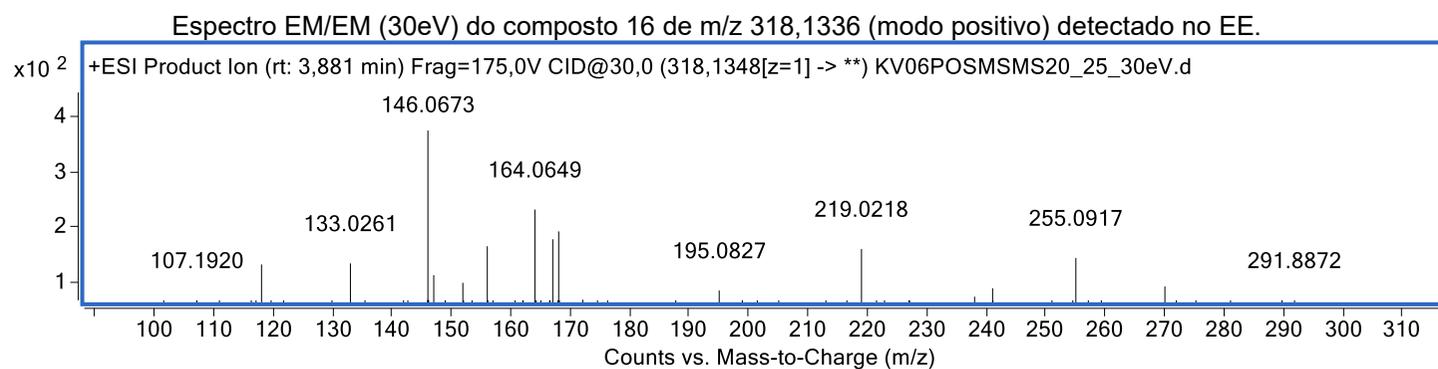
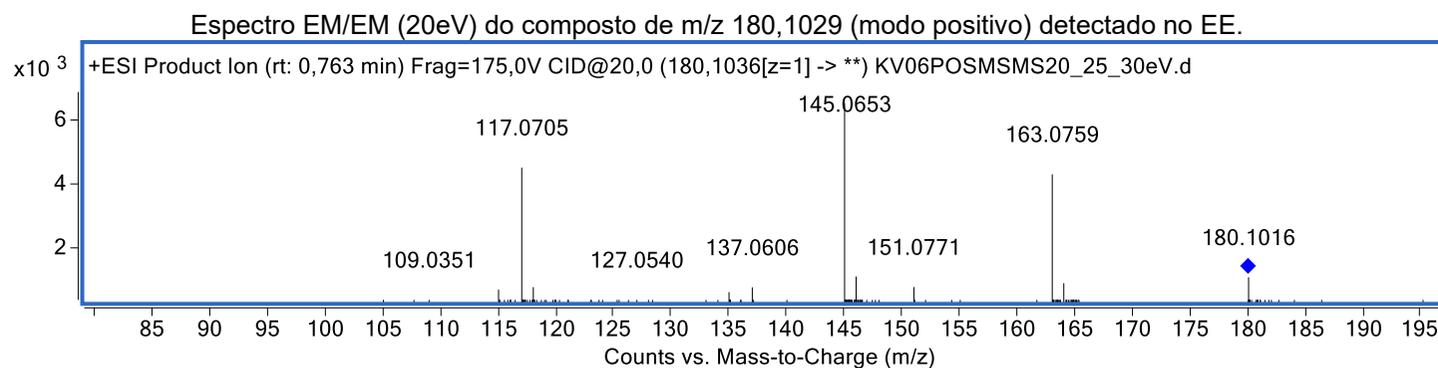


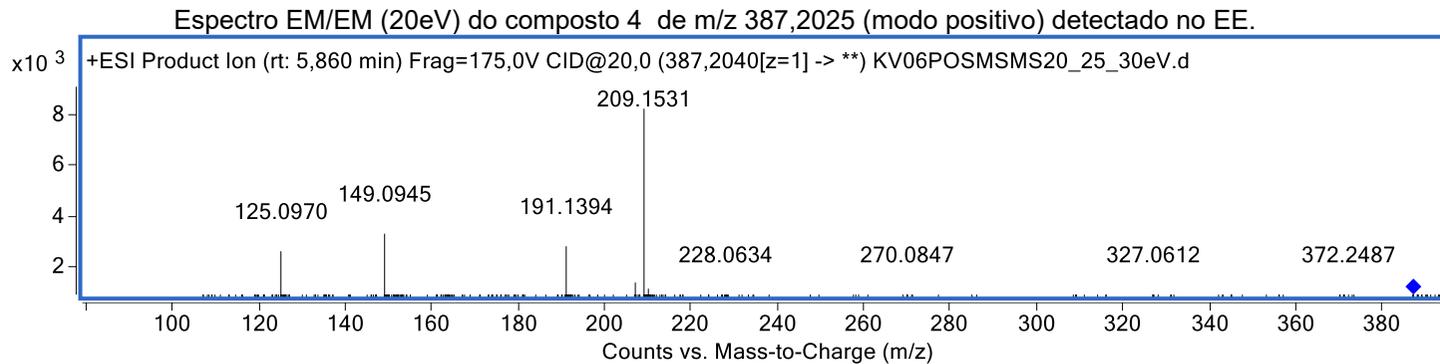
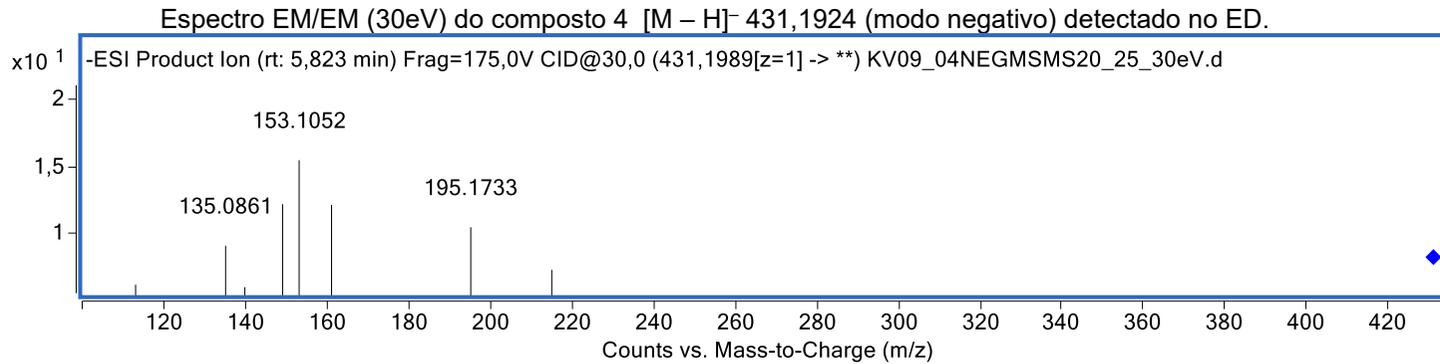
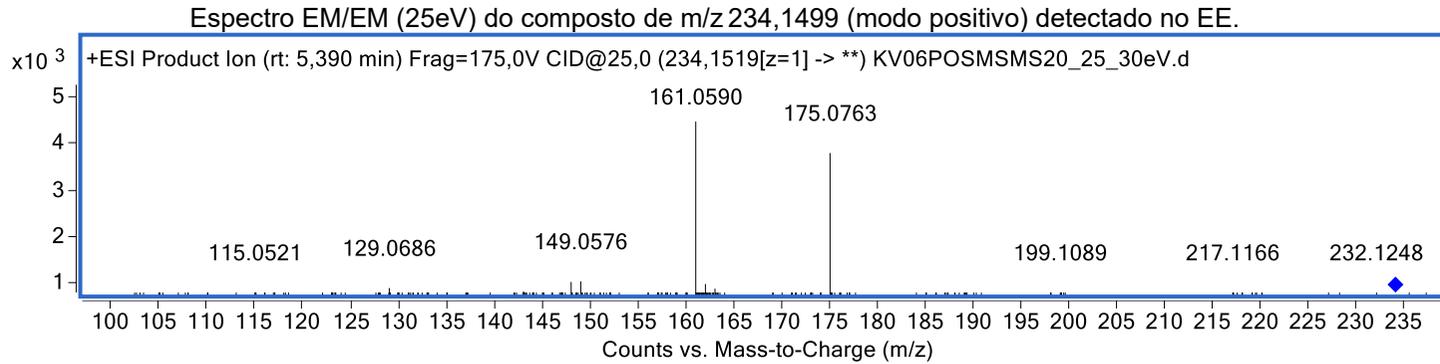
Espectro EM/EM (25eV) do composto de m/z 277,2111 (modo negativo) detectado no EH.

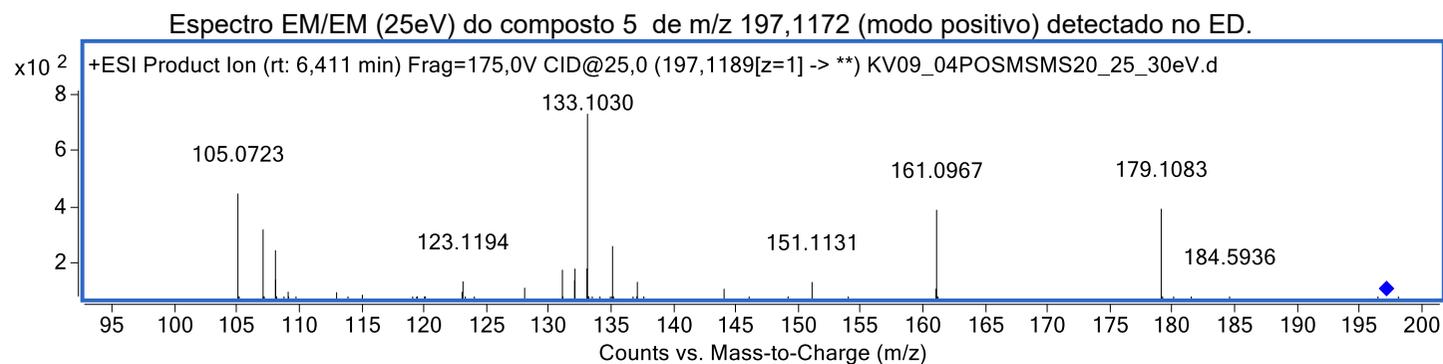
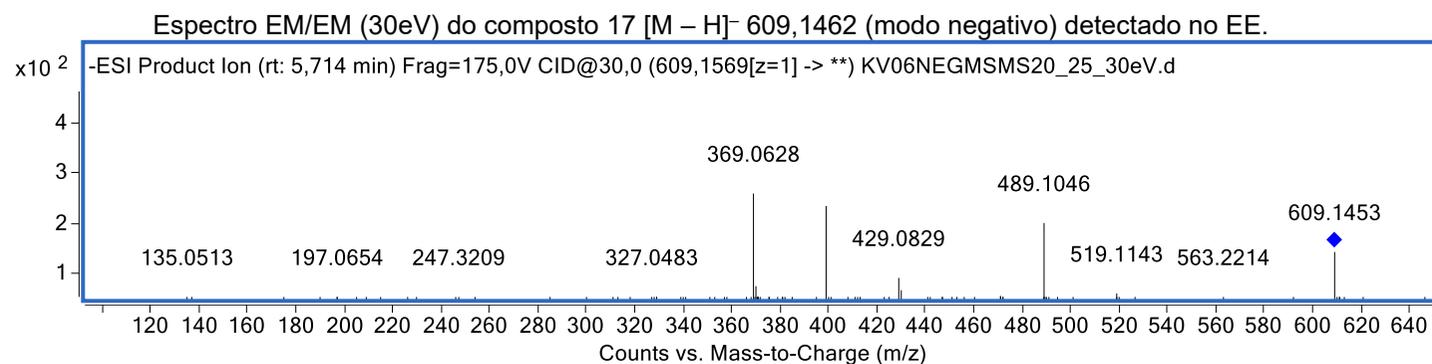
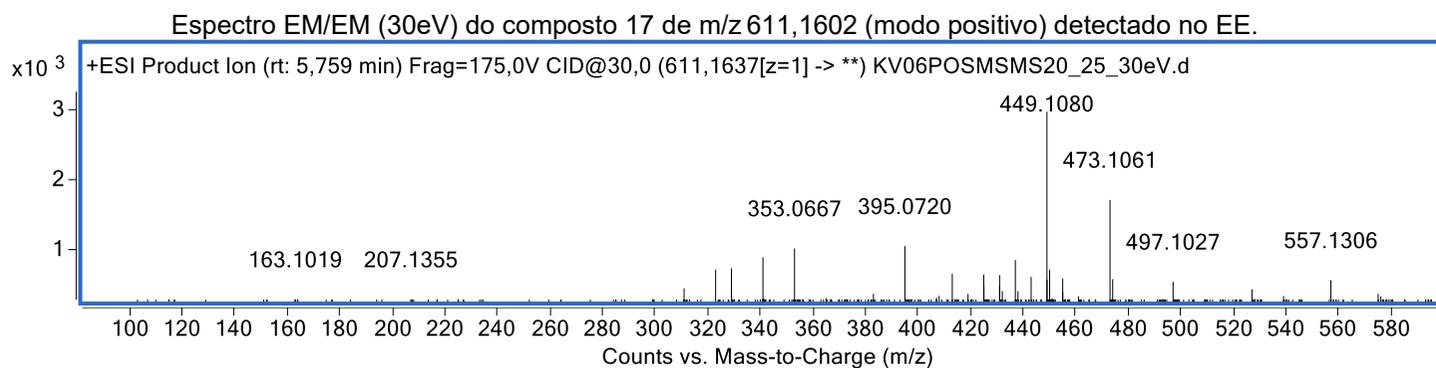


9 APÊNDICE 2

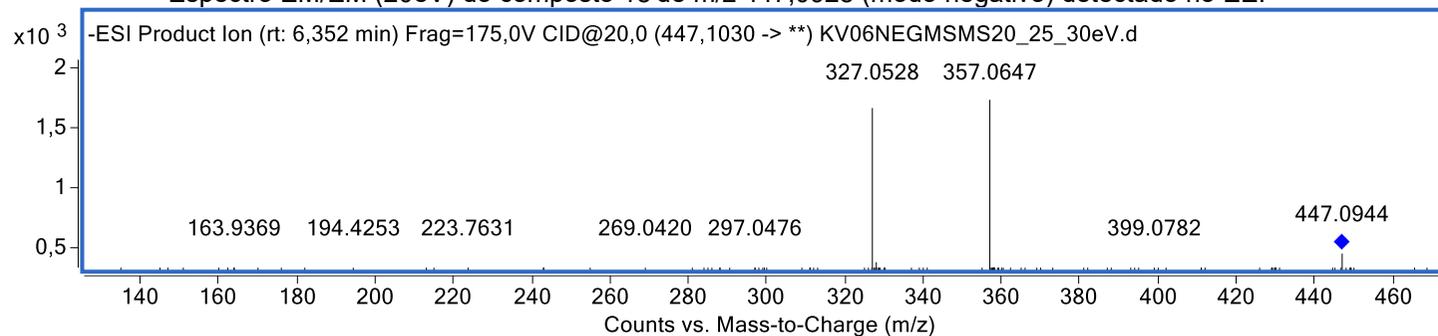
Espectros de fragmentações dos íons moleculares encontrados no extrato das folhas de *P. aduncum*.



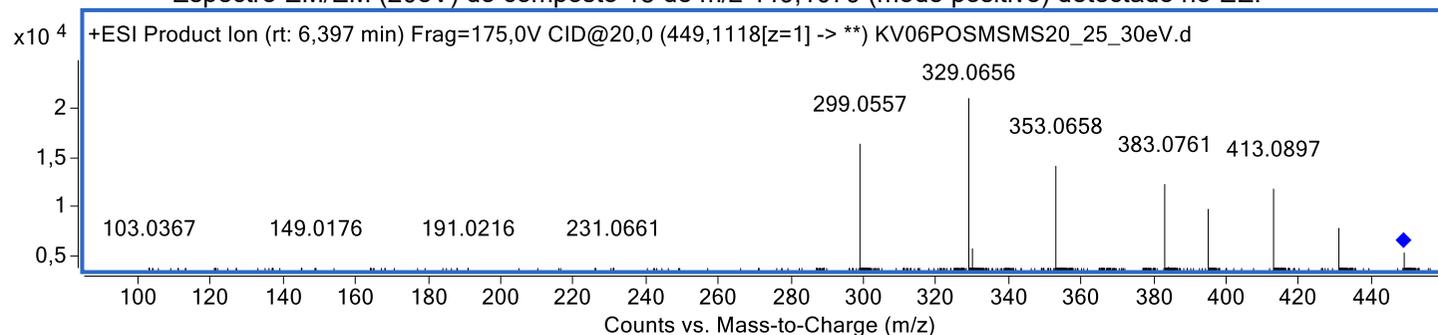




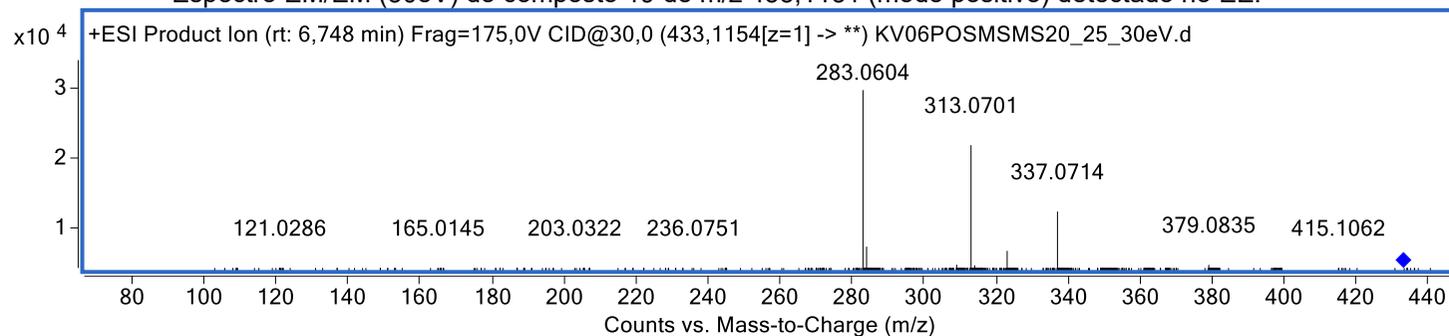
Espectro EM/EM (20eV) do composto 18 de m/z 447,0928 (modo negativo) detectado no EE.

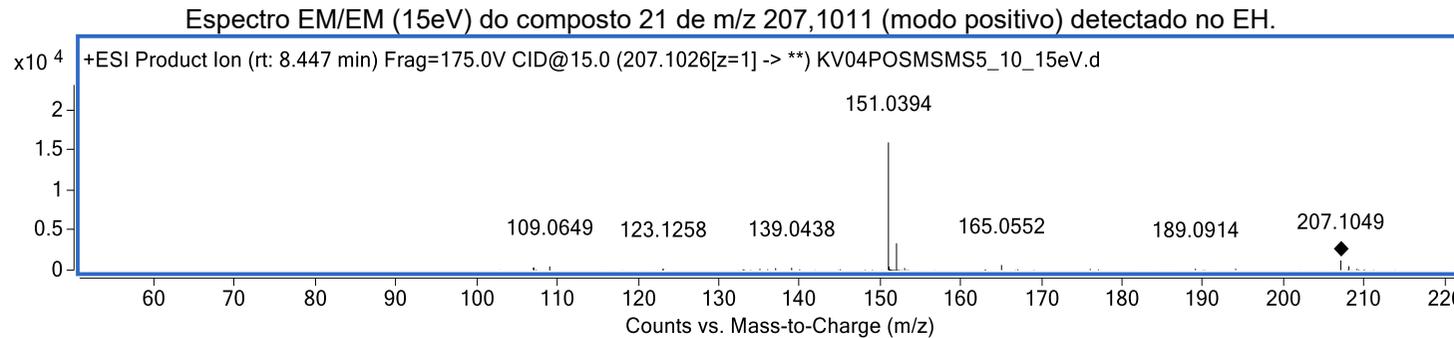
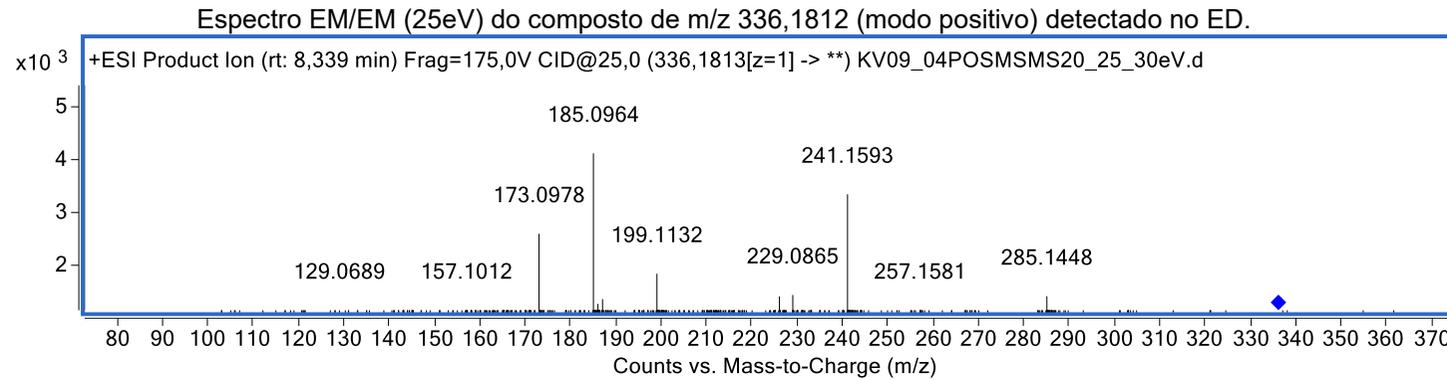
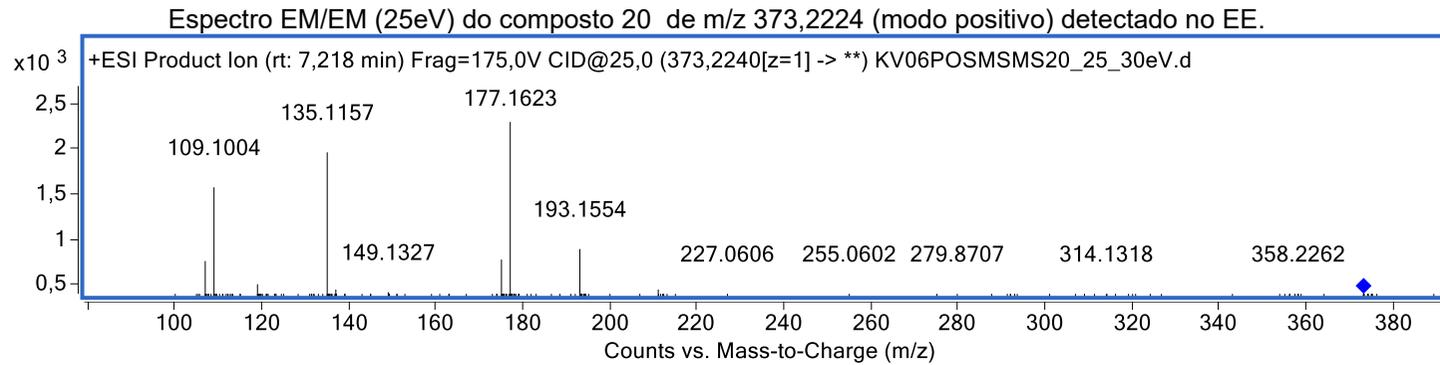


Espectro EM/EM (20eV) do composto 18 de m/z 449,1079 (modo positivo) detectado no EE.

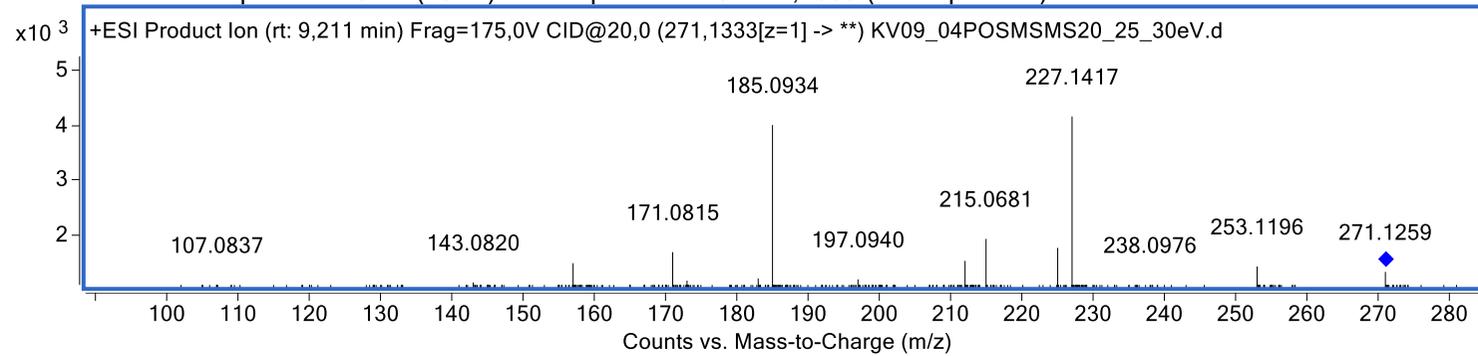


Espectro EM/EM (30eV) do composto 19 de m/z 433,1131 (modo positivo) detectado no EE.

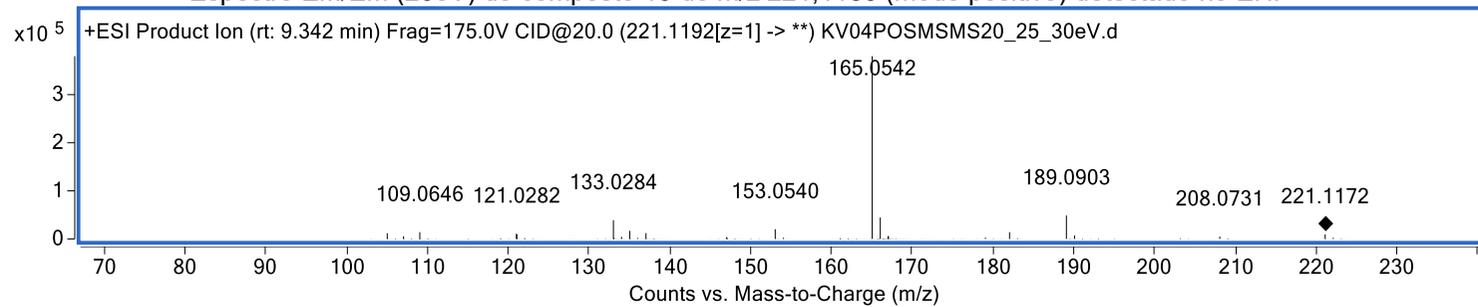




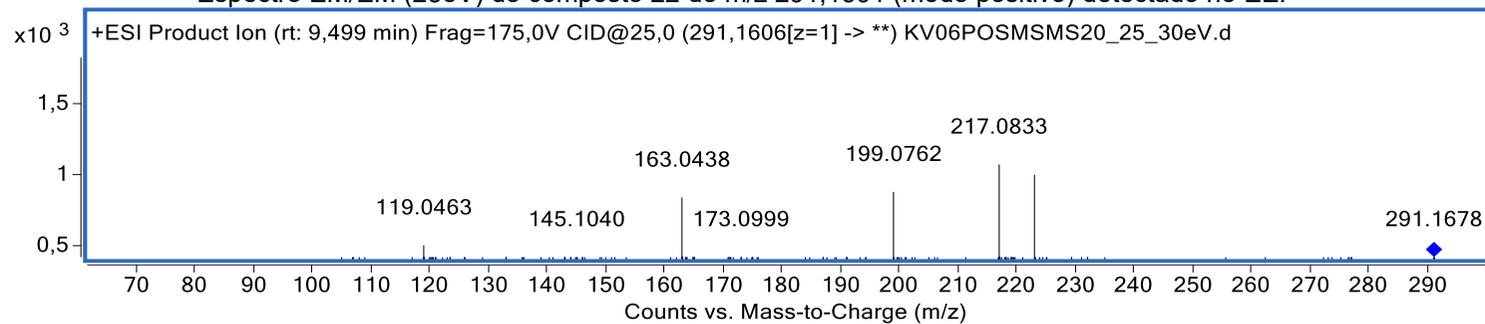
Espectro EM/EM (20eV) do composto de m/z 271,1309 (modo positivo) detectado no ED.

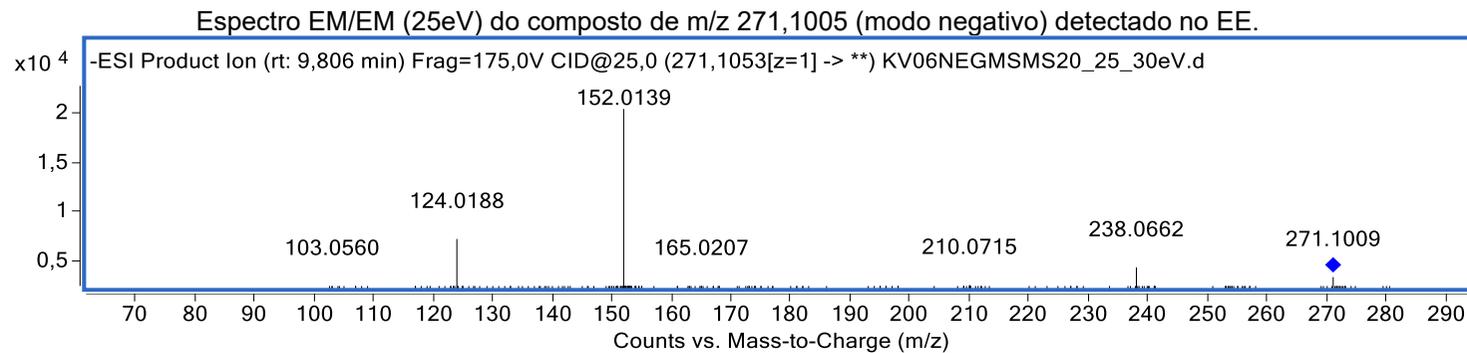
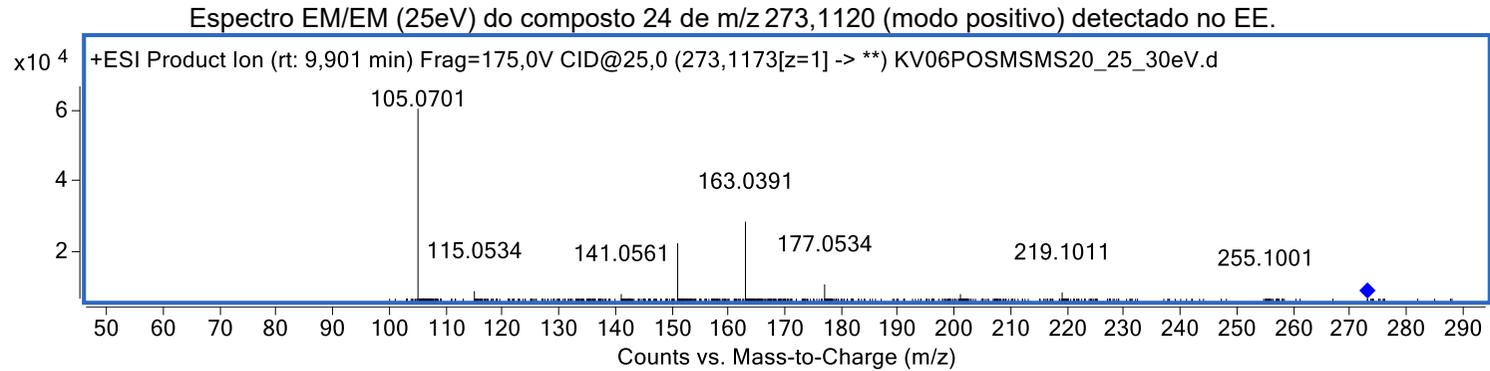
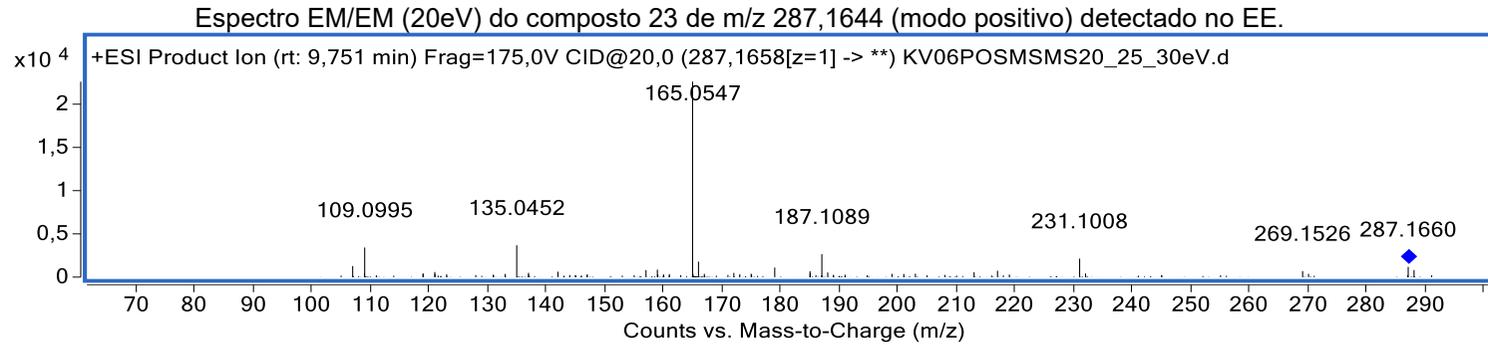


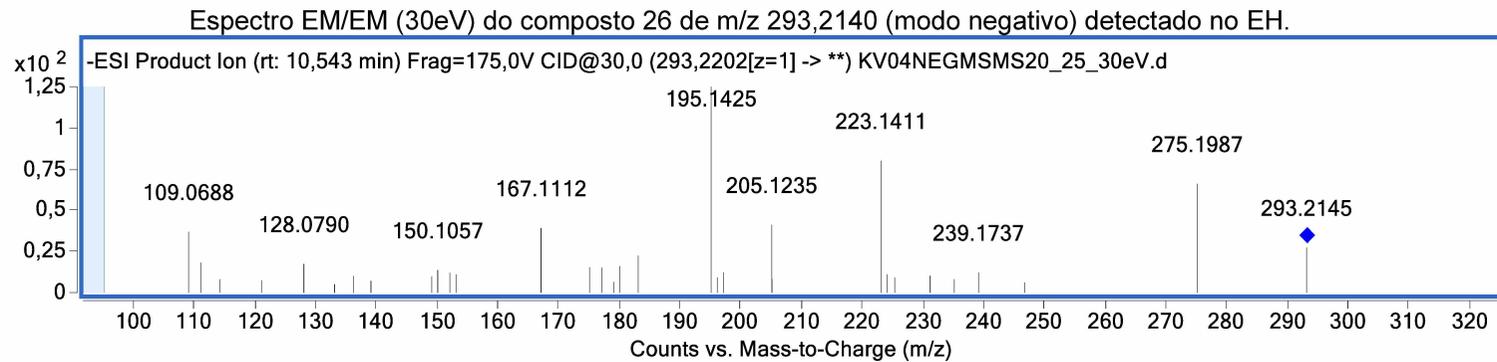
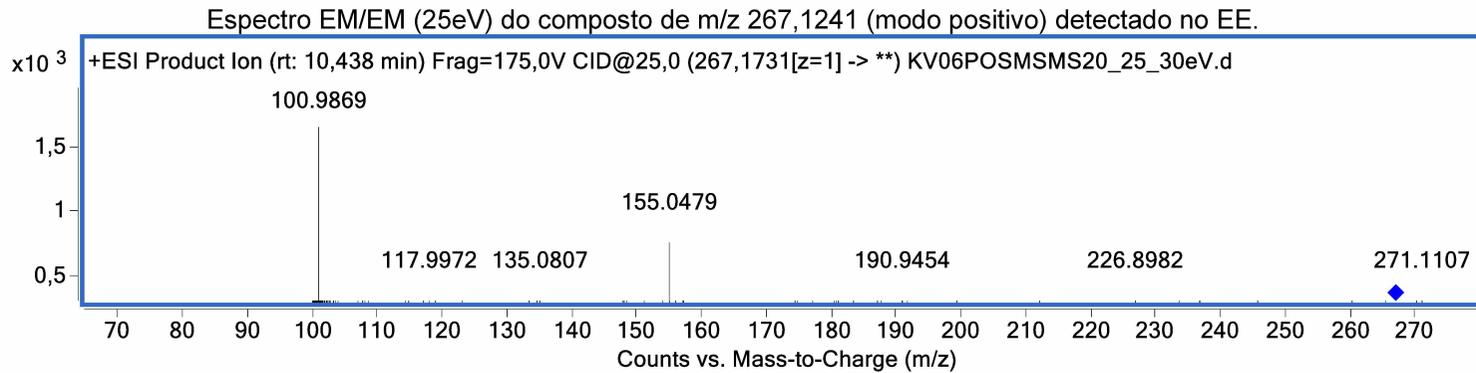
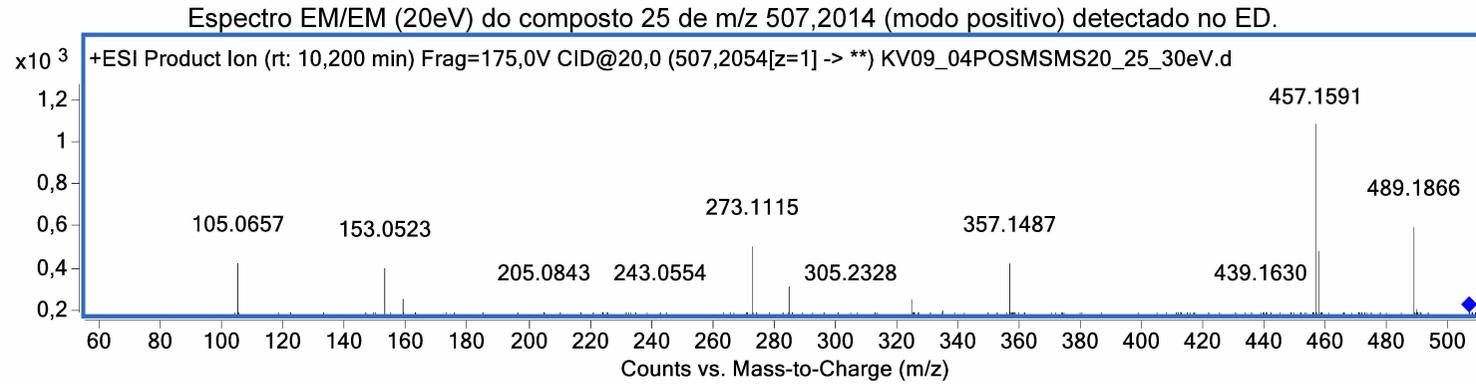
Espectro EM/EM (20eV) do composto 10 de m/z 221,1180 (modo positivo) detectado no EH.

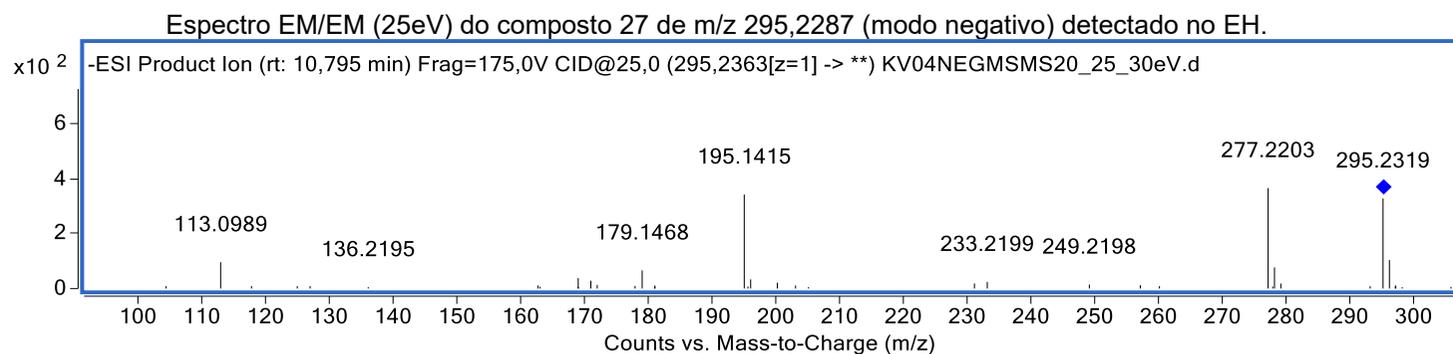
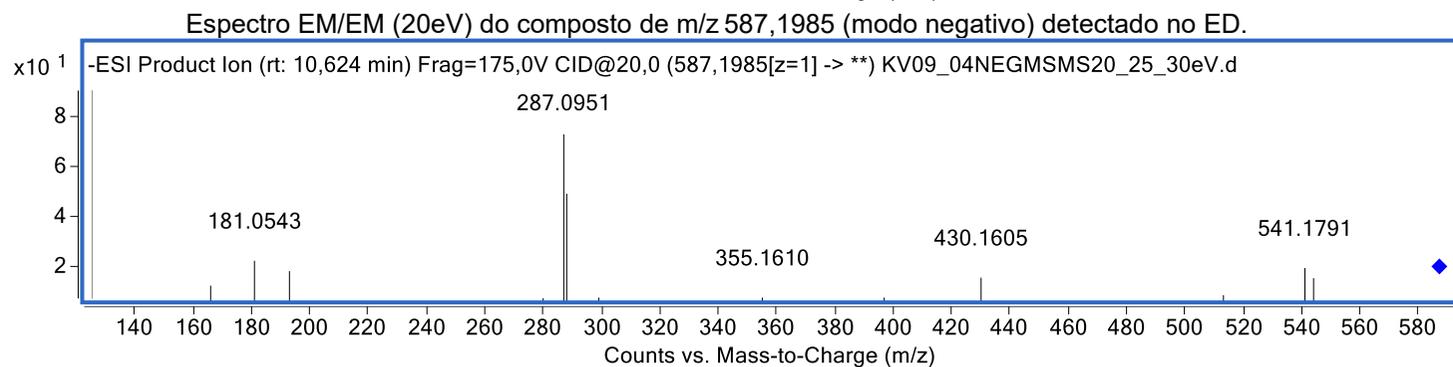
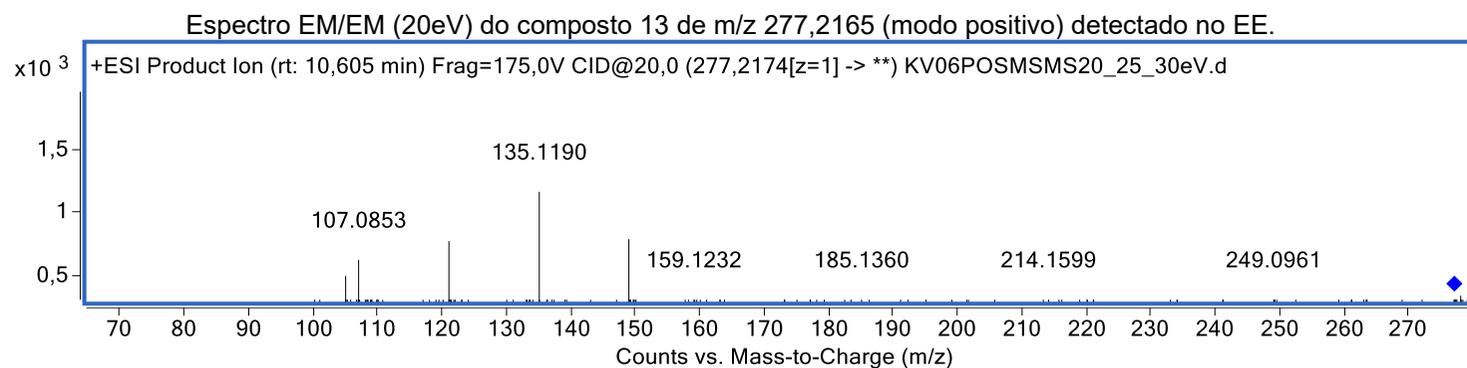


Espectro EM/EM (25eV) do composto 22 de m/z 291,1591 (modo positivo) detectado no EE.

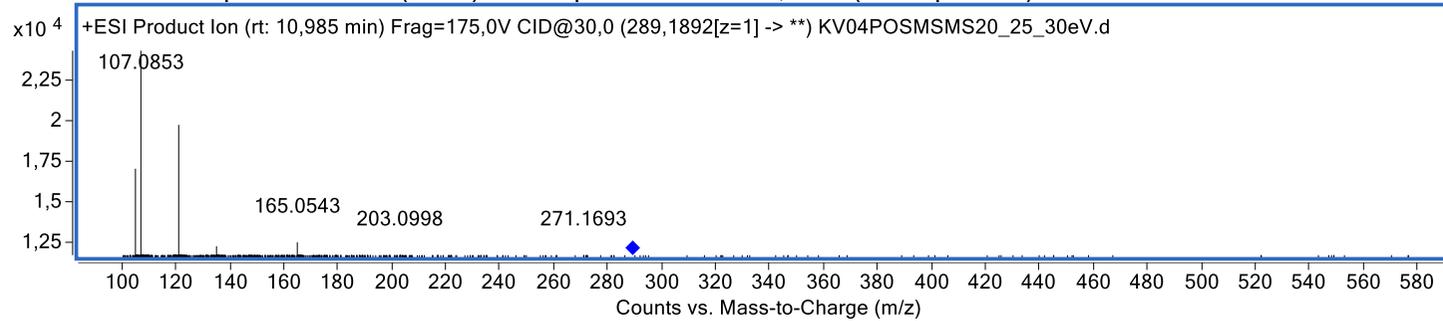




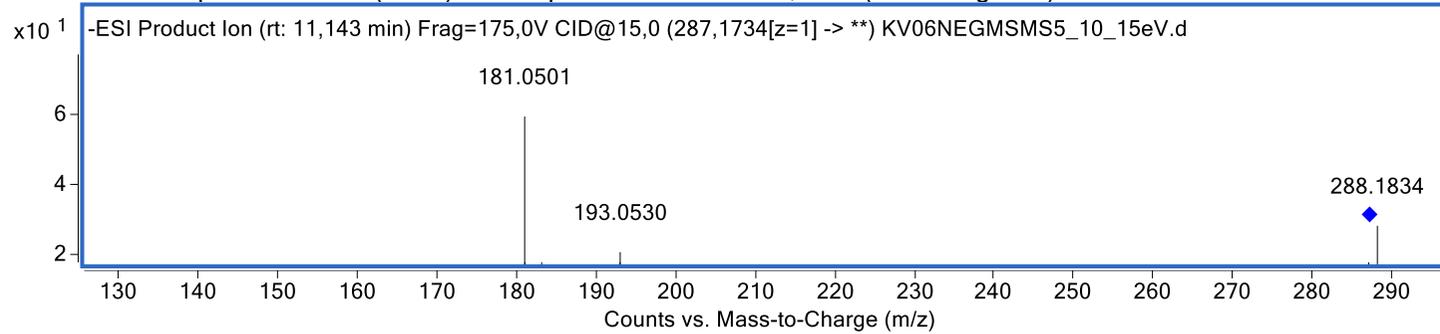




Espectro EM/EM (30eV) do composto de m/z 289,1890 (modo positivo) detectado no EH.



Espectro EM/EM (15eV) do composto 15 de m/z 287,1667 (modo negativo) detectado no EE.



Espectro EM/EM (30eV) do composto 28 de m/z 425,2322 (modo positivo) detectado no EE.

