

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

AUGUSTO HUBAIDE NOZELLA

Estudo químico das folhas de *Piper fuliginum* e *P. macedoi* por espectrometria de massas combinadas às redes moleculares e avaliação *in silico* da inibição da Mpro de SARS-CoV-2

UBERLÂNDIA

2022

AUGUSTO HUBAIDE NOZELLA

Estudo químico das folhas de Piper fuligineum e P. macedoi por espectrometria de massas combinadas às redes moleculares e avaliação in silico da inibição da Mpro de SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Raquel M. F. de Sousa

Coorientador: Prof. Alberto de Oliveira

UBERLÂNDIA

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

N961 Nozella, Augusto Hubaide, 1994-
2022 Estudo químico das folhas de Piper fuligineum e P.
macedoi por espectrometria de massas combinadas às redes
moleculares e avaliação in silico da inibição da Mpro de
SARS-CoV-2 [recurso eletrônico] / Augusto Hubaide
Nozella. - 2022.

Orientadora: Raquel Maria Ferreira de Sousa.
Coorientadora: Alberto de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.258>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. I. Sousa, Raquel Maria Ferreira de, 1981-,
(Orient.). II. Oliveira, Alberto de, 1979-, (Coorient.).
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação
em Química. IV. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 341, PPGQUI				
Data:	Vinte e nove de abril de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:00
Matrícula do Discente:	11922QMI001				
Nome do Discente:	Augusto Hubaide Nozella				
Título do Trabalho:	Estudo químico das folhas de <i>Piper fuliginum</i> e <i>P. macedoi</i> por espectrometria de massas combinadas às redes moleculares e avaliação <i>in silico</i> da inibição da Mpro de SARS-CoV-2				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudo de metabólitos secundários de espécies vegetais: identificação, isolamento, modificação estrutural e atividade biológica				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Google Meet, link <https://meet.google.com/ner-uahc-upz>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Alan Cesar Pilon, da Universidade de São Paulo (FCFRP); Amanda Danuello Pivatto, da Universidade Federal de Uberlândia e Raquel Maria Ferreira de Sousa, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dr(a). Raquel Maria Ferreira de Sousa, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Danuello Pivatto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 18:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Alan Cesar Pilon, Usuário Externo**, em 02/05/2022, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3505425** e o código CRC **0606E00D**.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora professora Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa pela dedicação, paciência, apoio e todas as ajudas que me forneceu durante o trabalho.

Ao meu coorientador professor Dr. Alberto de Oliveira pela disponibilidade conselhos e ensinamentos e grande ajuda nos trabalhos de campo.

A professora Dra. Micheline Carvalho Silva pela identificação das plantas coletadas durante o projeto e realização da análise molecular do material genético das mesmas.

A professora Dra. Erika Ohta Watanabe e professora Dra. Carla Eponina Hori pelos ensinamentos sobre extração supercrítica e disponibilização da planta piloto de extração supercrítica.

A Me. Ana Carolina Fornereto Soldan e o aluno de IC Rodrigo Carrilho da Cunha pela auxílio na obtenção dos extratos supercríticos.

Ao Dr. Mario Machado e a Dra. Arlene Nossol pela realização das análises de espectrometria de massas realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU e as grandes ajudas na interpretação das análises.

Ao Me Marcus Vinicius de Sá Gonçalves da Silva e ao laboratório NuBBE da Unesp de Araraquara pela realização das análises de espectrometria de massas realizadas e disponibilização dos softwares para análise destes dados.

Ao Dr. Rafael Aparecido de Sousa pela realização dos ensaios de docking molecular dos compostos identificados no trabalho.

Aos meus colegas do NuPPEn por todo auxílio e risadas durante as horas que dividimos lá, e em especial aos pesquisadores Tiara Costa, Diego Godina e Rafael Aparecido e aos professores Alberto de Oliveira e Raquel Sousa pelas grandes ajudas e aventuras nos trabalhos de campo para a coleta das espécies de estudo deste trabalho.

A todos os professores, técnicos do IQ-UFU pelo auxílio e colaboração com o projeto, e a UFU e seus funcionários pela disponibilização do espaço e mantimento do mesmo.

Aos meus pais José Humberto e Heloisa, e minha namorada Laura por serem meus grandes incentivadores e pela imensa paciência que tiveram durante este trabalho.

Aos todos os meus amigos e família que estiveram comigo e me apoiaram e me auxiliaram durante essa grande caminhada.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPQ e pela bolsa de estudos fornecida (Projetos APQ-01612-18; APQ-02342-18 e Ação emergencial, 001).

Por fim, ao Instituto de Química da UFU e ao seu programa de Pós-Graduação em Química que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Devido à alta complexidade para encontrar um tratamento eficaz para o Covid-19, o estudo de produtos naturais se mostra um interessante caminho para encontrar compostos bioativos com potencial atividade para o uso no tratamento dessa doença. *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* são plantas pertencente à família das piperáceas e nativas do Cerrado. O estudo molecular do material genético dessas espécies mostrou um alto grau de similaridade genética entre elas. Afim de avaliar de maneira extensiva os compostos presentes nessas espécies, três métodos de extração foram realizados: maceração, hidrodestilação e extração via CO₂ supercrítico. A identificação desses metabólitos foi realizada via espectrometria de massas resultando em 106 anotações. A comparação dos compostos identificados nas espécies também foi feita utilizando as ferramentas de redes moleculares presentes na plataforma GNPS. Foram observados 204 nodos nas amostras de óleo essencial sendo 45 nodos exclusivos a *P. fuliginum*, 38 exclusivos a *P. macedoi* e 121 divididos entre ambas espécies. A mesma tendência foi observada nas redes geradas pelas amostras dos extratos etanólicos e hexânicos, onde dos 2100 nodos observados 914 são exclusivos a *P. fuliginum*, 182 exclusivos a *P. macedoi* e 1004 comuns as duas. Essa tendência mostra que apesar das espécies avaliadas possuírem 97% de similaridade genética e terem sido coletadas na mesma região, cada espécie é capaz de produzir diferentes metabólitos especiais como resposta aos mesmos estresses impostos pelo meio ambiente. Por fim, o potencial inibitório via “docking molecular” da protease Mpro do vírus SARS-CoV-2 de alguns compostos identificados nas espécies foi avaliado. Os compostos Jangomolide, Benzopyran derivative II e Picrasidine M obtiveram melhores resultados no docking, apresentando energia livre de -10,36; -9,97 e -9,74 kcal mol⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: *Complexo fuliginum*, *espectrometria de massas*, *docking molecular*, *extração supercrítica*, *rede molecular*, *GNPS*.

ABSTRACT

With the struggle to find a proper treatment for the Covid-19 disease, the study of natural products becomes an interesting way to find potential active compounds for treating this disease. *Piper fuliginum* and *Piper macedoi* are plants belonging to the Piperaceae family and native to the Cerrado. The molecular study of the genetic material of both species shows a high degree of similarity between them. To extensively evaluate the compounds present in these species three extraction methods were applied: maceration, hydrodistillation, and supercritical CO₂ extraction. These molecules were identified by mass spectrometry resulting in 106 annotations. They were also compared with the use of molecular networking tools of the GNPS platform. 204 nodes were observed in the samples of essential oils, of which 45 are exclusive to *P. fuliginum*, 38 exclusives to *P. macedoi* and 121 shared between both species, molecular classes exclusive to each species were also found, giving a possible way to identify them by their essential oil composition. The same tendency was observed on the molecular networks created from the ethanolic and hexanoic extracts, in which of 2100 observed nodes, 914 are exclusive to *P. fuliginum* 182 exclusives to *P. macedoi*, and 1004 are shared between both. This tendency shows that despite having 97% of genetic similarity and having been collected in the same region, each species can produce different special metabolites to answer the same environmental threats. Finally, the inhibitory potential by docking molecular of Mpro protease of the SARS-CoV-2 virus of some identified compounds in the species was tested. The metabolites Jangomolide, Benzopyran derivative II and Picrasidine M had the best results in the molecular docking, presenting free energy of -10,36; -9,97, and -9,74 kcal mol⁻¹, respectively.

Keywords: *Fuliginum* complex, mass spectrometry, molecular docking, supercritical extraction, molecular networking, GNPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Compostos encontrados em plantas medicinais que apresentaram atividade in silico contra o Covid-19.	16
Figura 2: A = <i>Piper fuligineum</i> encontrada na Fazenda Experimental do Campus Glória; B = Nódulos característico do gênero <i>Piper</i> ; C = Espículas características do gênero <i>Piper</i>	17
Figura 3: Ocorrência da família Piperaceae.	18
Figura 4: Moléculas identificadas no extrato etanólico de <i>Piper fuligineum</i> (MAZZEU et al., 2017).	19
Figura 5: Moléculas identificadas no óleo essencial de <i>Piper fuligineum</i> (KRINSKI; FOERSTER; DESCHAMPS, 2018).	19
Figura 6: Algumas moléculas identificadas no óleo essencial de <i>Piper macedoi</i> (BEZERRA et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2021).	20
Figura 7: Folhas de <i>Piper fuligineum</i> (A) e de <i>Piper macedoi</i> (B).....	21
Figura 8: Técnicas de extração: via Soxhlet (esquerda), via Clevenger (direita).....	23
Figura 9: Diagrama de pressão versus entalpia, ilustrando o ponto crítico do CO ₂ ...	24
Figura 10: Similaridade entre os espectros de Stenothricin A e B.....	25
Figura 11: Ilustração da comparação entre os vetores resultantes dos espectros.....	26
Figura 12: Exemplo da formação de clusters entre compostos com valores de cosseno altos.	27
Figura 13: Distância entre os pontos de coleta das espécies.	30
Figura 14: Aparelho clevenger utilizado na extração de óleo essencial 31	31
Figura 15: Folhas de <i>Piper fuligineum</i> frescas (esquerda) e secas (direita).....	32
Figura 16: Unidade de extração supercrítica em que está apresentado o cilindro de CO ₂ , os banhos termostatizados (B1 – resfriamento da bomba, B2 – controle de temperatura do extrator), a bomba (P), o controlador de temperatura da saída do extrator (C), o extrator (E) e as válvulas (V1 a V6).....	33
Figura 17: Foto da unidade de extração supercrítica utilizada para obtenção dos extratos.	34
Figura 18: Esquemática do preenchimento do extrator, os círculos brancos representam as esferas de vidro e os retângulos verdes o material vegetal.....	34
Figura 19: Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas.	38
Figura 20: Parâmetros de conversão dos dados de espectrometria de massas para .mzML.	43
Figura 21: Fragmento da árvore filogenética do complexo fuligineum destacando a comparação entre <i>Piper macedoi</i> coletada (<i>Piper</i> sp) e <i>Piper macedoi</i> presente na literatura.	47
Figura 22: Imagem das placas CCD: extrato hexânico (A) e extrato etanólico (B) aplicados na mesma placa CCD.	49
Figura 23: Cromatograma da análise por GC-MS do óleo essencial e extratos obtidos via condição 1 (40 °C, 250 bar) e condição 2 (60 °C, 180 bar) de CO ₂ supercrítico... 53	53
Figura 24: Cromatogramas sobrepostos da análise por LC-MS (modo negativo) do extrato etanólico e do extrato obtido via CO ₂ supercrítico com cossolvente etanol. .. 55	55
Figura 25: Cromatogramas de LC-MS (modo negativo) dos extratos em CO ₂ supercrítico.....	57

Figura 26: Cromatogramas de LC-MS (modo positivo) em modo negativo e positivo, dos extratos em CO ₂ supercrítico.....	58
Figura 27: Cromatogramas da análise por GC-MS dos óleos essenciais de Piper fuligineum e Piper macedoi.	60
Figura 28: Cromatogramas da análise por LC-MS (modo negativo) dos extratos etanólicos de Piper fuligineum e Piper macedoi.....	62
Figura 29: Cromatogramas da análise por LC-MS (modo positivo) dos extratos etanólicos de Piper fuligineum e Piper macedoi.....	63
Figura 30: Cromatogramas da análise por LC-MS (modo negativo) dos extratos hexânicos de Piper fuligineum e Piper macedoi.....	64
Figura 31: Cromatogramas da análise por LC-MS (modo positivo) dos extratos hexânicos de Piper fuligineum e Piper macedoi.....	65
Figura 32: Cromatograma de GC-MS do óleo essencial de Piper fuligineum e Piper macedoi.....	67
Figura 33: Diagrama ilustrando as diferentes composições dos óleos essenciais de cada uma das espécies.....	71
Figura 34: Diagrama ilustrando as diferentes composições dos extratos etanólicos de cada uma das espécies.....	75
Figura 35: Diagrama ilustrando as diferentes composições dos extratos hexânicos de cada uma das espécies.....	76
Figura 36: Redes moleculares geradas pela plataforma GNPS com os dados de GC-MS.....	77
Figura 37: Redes moleculares geradas pela plataforma GNPS com os dados de LC-MS com ionização em modo positivo.	78
Figura 38: Redes moleculares geradas pela plataforma GNPS com os dados de LC-MS com ionização em modo negativo.....	79
Figura 39: Diagramas de Venn indicando a distribuição dos nodos entre as amostras analisadas.	80
Figura 40: Redes moleculares identificadas.....	81
Figura 41: Sobreposição do inibidor N3 cocristalizado em amarelo e a melhor conformação do inibidor N3 após o re-docking.	83
Figura 42: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 75.....	85
Figura 43: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 59.....	86
Figura 44: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 96.....	87
Figura 45: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 61.....	88
Figura 46: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 47.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições utilizadas para a extração com CO ₂ supercrítico.....	36
Tabela 2: Tempos de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético na análise por GC-MS.	39
Tabela 3: Prospecção fitoquímica dos extratos das folhas de Piper fuliginum.....	49
Tabela 4: Rendimentos de extração dos extratos de P. fuliginum e P. macedoi.....	50
Tabela 5: Compostos identificados via GC-MS no óleo essencial de Piper fuliginum (Pf) e Piper macedoi (Pm). Compostos comuns a ambas espécies estão destacados em negrito	68
Tabela 6: Compostos identificados via LC-MS nos extratos de Piper fuliginum e Piper macedoi.	72
Tabela 7: Estruturas químicas e resultados do docking molecular contra a protease Mpro do SARS CoV-2	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
EC ₅₀	Concentração Efetiva Média
FDA	Food and Drug Administration
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry
GNPS	(Global Natural Products Social Molecular Networking)
HIV	(Human Immunodeficiency Virus)
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
MS	Mass Spectrometry
MS ^E	Mass Spectrometry Engine
NuBBE	Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
SARS	Síndrome Aguda Respiratória
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus 2
UPLC-ESI-QqTOF-MSE	Ultra-Pressure Liquid Chromatography - Electron Spray Ionization - Quadrupole Time of Flight - Mass Spectrometry

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1.1. COVID-19 e os desafios em se encontrar agentes antivirais.	15
2.1.2. Piperáceas, <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i> .	17
2.1.3. Técnicas de extração de metabólitos especiais.	21
2.1.4. Análise de metabólitos secundários através de redes moleculares utilizando a Plataforma GNPS.	24
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVOS GERAIS.	28
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
4.1. INSTRUMENTAÇÃO.	29
4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.	29
4.3. MATERIAL VEGETAL.	30
4.3.1. Coleta e identificação.	30
4.3.2. Obtenção dos óleos essenciais.	31
4.3.3. Obtenção dos extratos hexânicos e etanólicos.	32
4.3.4. Extração com CO ₂ supercrítico.	33
4.4. ANÁLISE DOS EXTRATOS.	36
4.4.1. Prospecção Fitoquímica.	36
4.4.2. Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas dos óleos essenciais.	38
4.4.3. Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas dos extratos hexânicos e etanólicos.	40
4.4.4. Análise dos extratos obtidos via CO ₂ supercrítico.	42
4.4.5. Comparação dos extratos e óleos essenciais de <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i> via a plataforma GNPS.	43
4.4.6. Análise do potencial de inibição da protease Mpro dos compostos encontrados nos extratos de <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i> via <i>docking</i> molecular.	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. Análise molecular do material genético de <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i> .	47
5.2. Prospecção Fitoquímica dos extratos via maceração de <i>Piper fuliginum</i> ...	48

5.3. Comparação entre os rendimentos de extração de <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i>	50
5.3.1. Estudo comparativo dos métodos de extração de <i>Piper fuliginum</i>	51
5.3.2. Estudo comparativo entre as espécies: <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i> . 59	
5.4. Identificação dos compostos presentes nos extratos.	66
5.4.1. Identificação via GC-MS.	66
5.4.2. Identificação via LC-MS.	72
5.5. Redes moleculares GNPS.	77
5.6. Avaliação do potencial de inibição da protease Mpro dos compostos anotados nos extratos de <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i> via <i>docking</i> molecular.	82
6. CONCLUSÕES	90
7. REFERÊNCIAS	91
ANEXO 1 – Espectros de Fragmentação em LC-MS/MS dos compostos identificados	99

1. INTRODUÇÃO

A pandemia causada pelo surgimento de um novo vírus pertencente à família Coronaviridae, SARS-CoV-2, (síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2) causou grande número de mortes e crise econômica em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde, definiu o nome da doença de COVID-19, que significa *coronavirus disease 19*. Outras espécies de vírus da família Coronaviridae também já foram responsáveis por outras duas pandemias, como a SARS em 2002 e MERS em 2012. O primeiro caso de COVID-19 foi relatado na província de Wuhan na China e segundo os dados divulgados na mídia (em 09/04/2022) já ultrapassamos 6 milhões de mortos no mundo e 661 mil mortos no Brasil nos colocando como segundo país com mais mortes no mundo (DONG; DU; GARDNER, 2020). Apesar das vacinas estarem se provando eficazes a descoberta de um tratamento para essa doença é de extrema importância.

Atualmente, ainda não existe um medicamento específico para a contenção desse vírus de maneira eficiente em nosso corpo, porém medicamentos como o Molnupiravir e o Paxlovid que se encontram em fase final de testes estão se mostrando muito promissores para o controle da replicação do vírus em humanos. A protease Mpro (também chamada de 3CLpro) do vírus SARS-CoV-2 desempenha um papel essencial na mediação da replicação e transcrição viral, tornando-a um alvo promissor para a obtenção de fármacos contra SARS-CoV-19. O medicamento Paxlovid desenvolvido pela Pfizer, atua diretamente sobre essa protease inibindo sua ação. Testes clínicos recentes mostram que ele foi capaz de reduzir o risco de hospitalização e morte em 89% em pacientes que fizeram o uso do fármaco em até 3 dias após o aparecimento dos sintomas (PFIZER, 2021). Logo, o estudo de compostos e medicamentos com capacidade de inibir a ação da protease Mpro se tornam promissores.

A natureza é responsável pela síntese de muito dos compostos orgânicos bioativos conhecidos, dentre as possíveis fontes de produtos naturais destacam-se as plantas que são capazes de produzir uma enorme diversidade de moléculas bioativas. Tal diversidade de compostos é difícil de se alcançar via síntese em laboratórios, logo os produtos naturais tornam-se uma ótima alternativa para a descobertas de moléculas que sejam capazes de tratar novas doenças como o COVID-19. Um estudo realizado por Newman e Cragg (2020) mostra que 67,7% de todos os fármacos

aprovados pela Food and Drug Administration entre os anos de 1981 a 2019, são produtos naturais ou inspirados em conhecimentos advindos da química de produtos naturais.

A área territorial do Brasil possui 8,5 milhões de quilômetros quadrados apresentando diversos biomas: Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga. Dentre esses biomas, o Cerrado é o segundo maior, ocupando cerca de 23% do território nacional, apresentando cerca de 10.000 espécies de plantas, das quais 4.400 são endêmicas. Dentre as espécies presentes neste bioma, destacam-se as pertencentes a família Piperaceae. Esta família apresenta 10 gêneros e cerca de 1400 a 2000 espécies. No Brasil existem cerca de 450 espécies distribuídas entre os seguintes gêneros: Ottonia, Peperomia, Piper, Pothomorphe e Sarcorrhachis. Os gêneros Piper e Peperomia apresentam o maior número de espécies, 265 e 166 espécies, respectivamente (BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008).

Na medicina popular as espécies de Piper são utilizadas para variadas finalidades como redução de inflamação, antitérmico, tratar diarreia, dores de cabeça, dores de dente e até mesmo transtornos de ansiedade, convulsões e epilepsia (SALEHI et al., 2019). *Piper tuberculatum*, por exemplo, é utilizada como analgésico, sedativo e para distúrbios digestivos (BEZERRA et al., 2014; NAVICKIENE et al., 2006). *Piper aduncum* é tradicionalmente usado para tratar dores de estômago, vaginite, gripe, reumatismo, tosse, febre e infecções em geral (VALADEAU et al., 2009).

Piper fuliginum e *Piper macedoi*, que, embora ainda não tenham sido muito exploradas, existem alguns estudos sobre o potencial fitoquímico dessas espécies. Em um dos trabalhos envolvendo o extrato etanólico das folhas de *Piper fuliginum* foram isoladas algumas moléculas até então inéditas na literatura, pertencendo a classe das kavalactonas e derivados de ácido benzoico (MAZZEU, 2014). O extrato etanólico apresentou, em outro estudo, promissora atividade anti-inflamatória (FINATO et al., 2018) e uma das kavalactonas isoladas dessa espécie apresentou atividade antiviral contra Hepatite C (GONZALEZ et al., 2009). Para *Piper macedoi* existem dois estudos envolvendo o óleo essencial extraído de suas folhas frescas, um deles relata sua atividade larvicida contra larvas de acaro da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (BEZERRA et al., 2022), e o outro estudo relata sua atividade leishmanicida (DOS SANTOS et al., 2021).

Afim de possibilitar a análise dos compostos bioativos presentes nessas espécies é necessária a utilização de uma etapa de extração, dentre os vários métodos existentes, três foram escolhidos neste trabalho: hidrodestilação, maceração em etanol e hexano e extração via fluido supercrítico. Os métodos convencionais de extração necessitam normalmente de uma grande quantidade de solventes. Tal necessidade aporta um alto custo para o processo bem como uma preocupação com a saúde, visto que boa parte dos solventes utilizados apresentam altos teores de toxicidade tanto para os seres humanos quanto ao meio ambiente se descartados de maneira inadequada (NOBRE et al., 2013).

Diante disso, o uso de solventes em condição supercrítica, como o dióxido de carbono, apresenta uma alternativa atraente para extração, pois nenhum processo adicional é necessário para se remover o solvente supercrítico do produto final (PIMENTEL-MORAL et al., 2019). O fluido em condições supercríticas possui alta densidade e baixa viscosidade, o que aumenta a solubilidade de compostos e sua penetração na matriz sólida (SMITH, 1999). O dióxido de carbono (CO₂) é o composto mais utilizado como solvente supercrítico devido ao seu ponto crítico apresentar uma baixa temperatura (31,1°C) e uma pressão moderada (72,9 bar), permitindo um custo menor na compressão do fluido bem como a possibilidade de extrair compostos termicamente sensíveis devido à sua baixa temperatura crítica. Além disso, ele possui baixa reatividade, toxicidade e inflamabilidade, o que torna o processo em todo mais seguro (SANTANA et al., 2012).

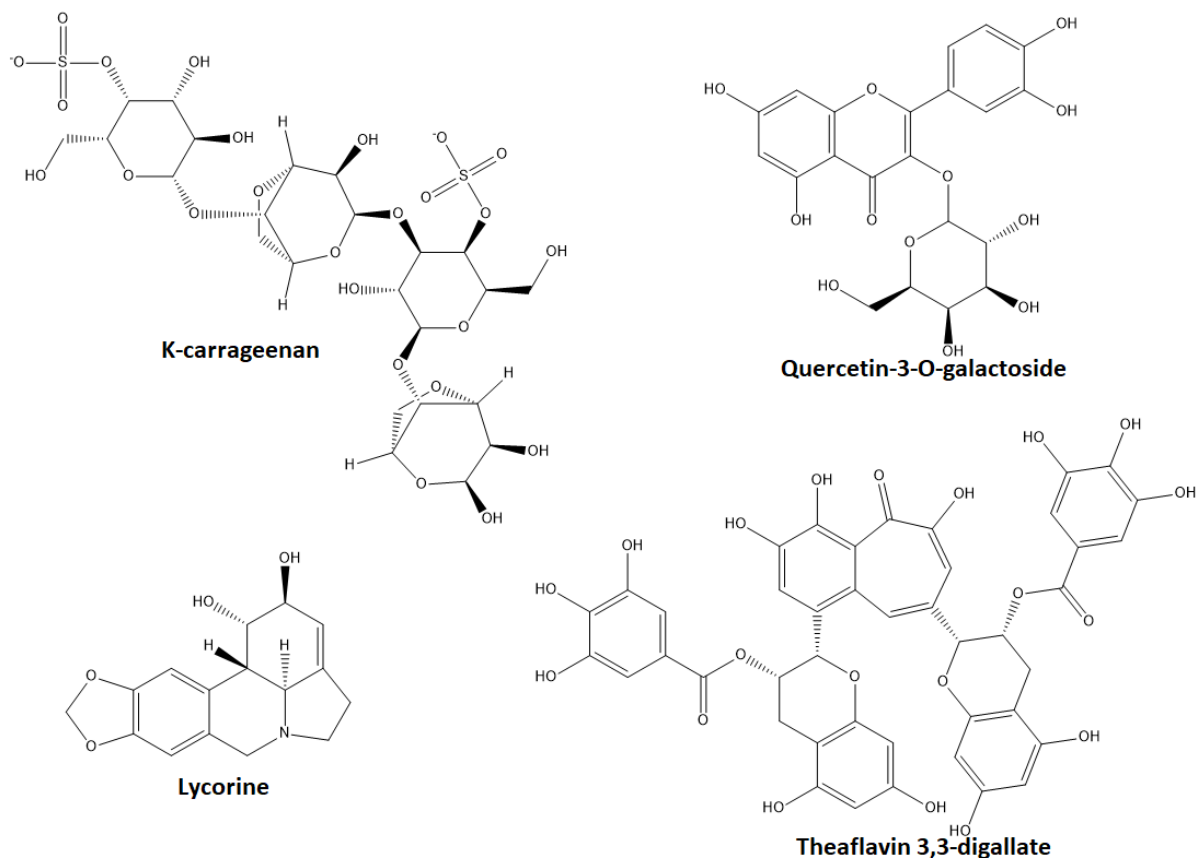
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1. COVID-19 e os desafios em se encontrar agentes antivirais.

Os produtos naturais têm sido uma fonte de estudos de moléculas bioativas para o tratamento da COVID-19. Dentre eles, um estudo sobre modelagem molecular de ancoragem da protease Mpro com diversas espécies vegetais da medicina chinesa destacou que muitas delas se mostraram promissoras pelo fato de seus metabólitos serem capazes de interagir de maneira inibitória contra a protease Mpro durante os estudos *in silico* (TAHIR UL QAMAR et al., 2020; WU et al., 2020).

Um estudo com o flavonoide theaflavin-3,3'-digallate (Figura 1) isolado de chá preto mostrou promissora inibição da protease Mpro ($IC_{50} = 7 \mu M$) responsável pela SARS (CHEN et al., 2005). Em outro trabalho, o extrato etanólico de *Lycoris radiata*, comumente utilizada na medicina chinesa, mostrou uma EC_{50} de 2,4 $\mu g/mL$ na inibição do crescimento do vírus SARS-COV, apresentando como principal componente presente no extrato a lycorine (LI et al., 2005). Um outro flavonoide que também teve sua atividade avaliada e comprovada inibição da protease Mpro foi a quercetina-3- β -galactosídeo (Figura 1) ($IC_{50} = 42,79 \mu M$) (CHEN et al., 2006). Outra classe de compostos relevantes são as carrageninas extraídas de algas vermelhas pertencentes a espécie *Kappaphycus alvarezii* que são comumente usadas como corante alimentício. Esses compostos se apresentaram eficazes no tratamento de infecções causadas por outros vírus pertencentes a família Coronaviridae no passado como o coronavírus, influenza e rinovírus (KOENIGHOFER et al., 2014).

Figura 1: Compostos encontrados em plantas medicinais que apresentaram atividade *in silico* contra o Covid-19.



Fonte: O autor.

Apesar de não existirem estudos sobre a atividade de piperáceas contra o COVID-19, um artigo publicado em 2021 sobre como a comunidade indígena Shuar, situada na floresta amazônica entre o Equador e o Peru, enfrentou a pandemia, relata que na falta de auxílio e apoio dos governos de ambos países para enfrentar o vírus foi necessário se apoiar no uso de plantas medicinais e na medicina tradicional para o tratamento dos infectados, tendo que recorrer aos hospitais somente em último caso. A tribo destaca o uso de espécies vegetais da família Piperaceae como uma das famílias de plantas medicinais mais importantes da Amazonia sendo seu uso indispensável para o tratamento dos enfermos (COLLECTIVE, 2021). Destaca-se também a atividade contra Hepatite C observada no extrato de *Piper fuliginum*, um estudo publicado em 2020 realizado pelo instituto Oswaldo Cruz aponta que medicamentos utilizados para o tratamento dessa doença possuem atividade potencial *in vitro* contra o vírus da Covid-19.

2.1.2. Piperáceas, *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.

O gênero *Piper*, pertence à família Piperaceae, é o mais populoso da família, apresentando mais de 2000 espécies, colocando-o como um dos 20 gêneros mais populosos de angiospermas. As espécies pertencentes a esse gênero são arbustos, ervas ou árvores de pequeno a médio porte, caracterizadas pela presença de nódulos em seus ramos onde brotam outros ramos, folhas ou espículas. Apresentam inflorescência organizada em espículas, os frutos são organizados em forma de baga ou drupa e as folhas são inteiras, dorsiventrals, alternas, pecioladas com ou sem estípulas (YUNKER, 1982). Tais características morfológicas podem ser observadas na Figura 2 ilustrando um exemplar de *Piper fuliginum* encontrado na reserva presente na fazenda experimental da UFU (campus glória).

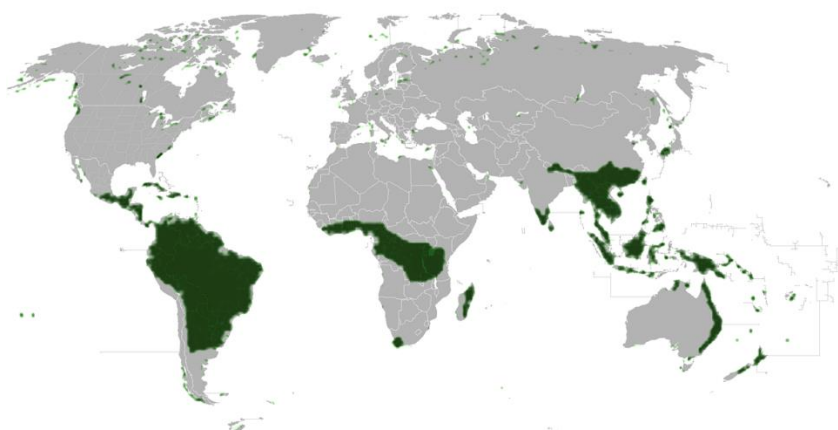
Figura 2: A = *Piper fuliginum* encontrada na Fazenda Experimental do Campus Glória; B = Nódulos característico do gênero *Piper* ; C = Espículas características do gênero *Piper*.



Fonte: O autor.

Piperaceae é uma família Pantropical, o que significa que ela ocorre nas regiões tropicais presentes nos maiores continentes: América, África e Ásia, como indicado no mapa da Figura 3. No Brasil ela é encontrada na Mata Atlântica, na Floresta Amazônica e no Cerrado. *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* em específico possuem preferência por ambientes úmidos e com sombra, sendo as veredas seu principal habitat (JARAMILLO et al., 2008; STEVENS, 2001).

Figura 3: Ocorrência da família Piperaceae.

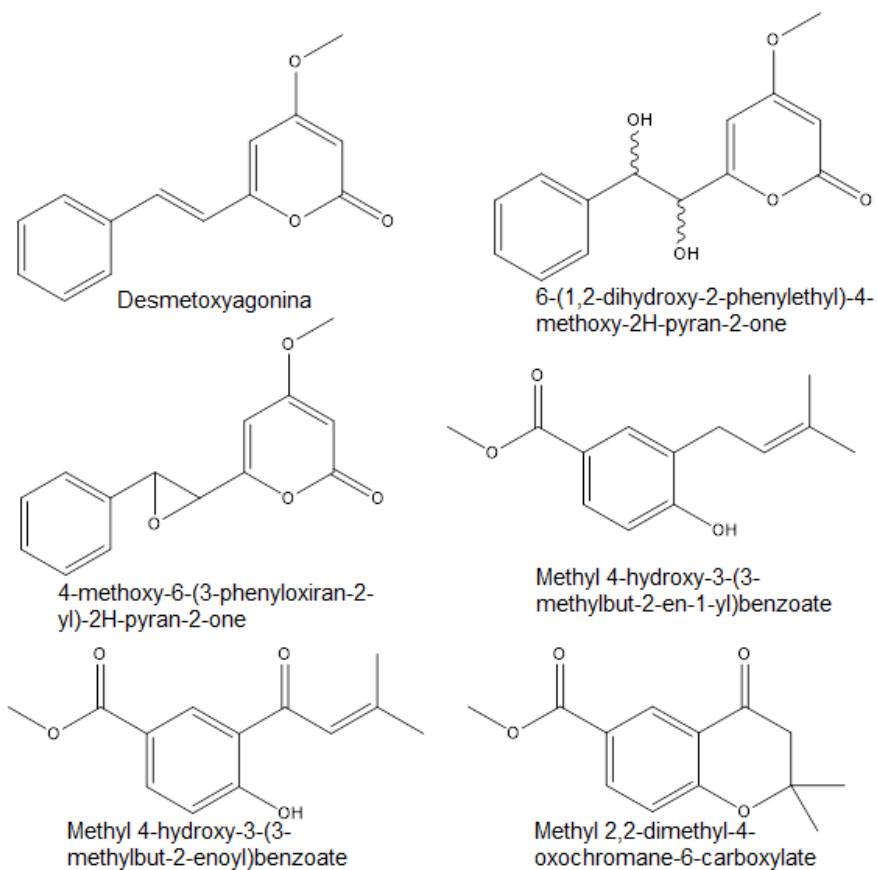


Fonte: Adaptado de Stevens (2001).

Estudos químicos sobre o gênero *Piper* já identificaram variadas classes de metabólitos como: alcaloides, amidas, neolignanos, lignanos, chromenos, terpenos, derivados de ácidos benzoicos e kavalactonas, e que apresentam variadas atividades biológicas como: antivirais, anti-inflamatórias, antiparasitas, antioxidantes, anticoagulantes, antitumorais e tripanocida (GAÍNZA et al., 2016; LIMA et al., 2019; MAZZEU et al., 2017).

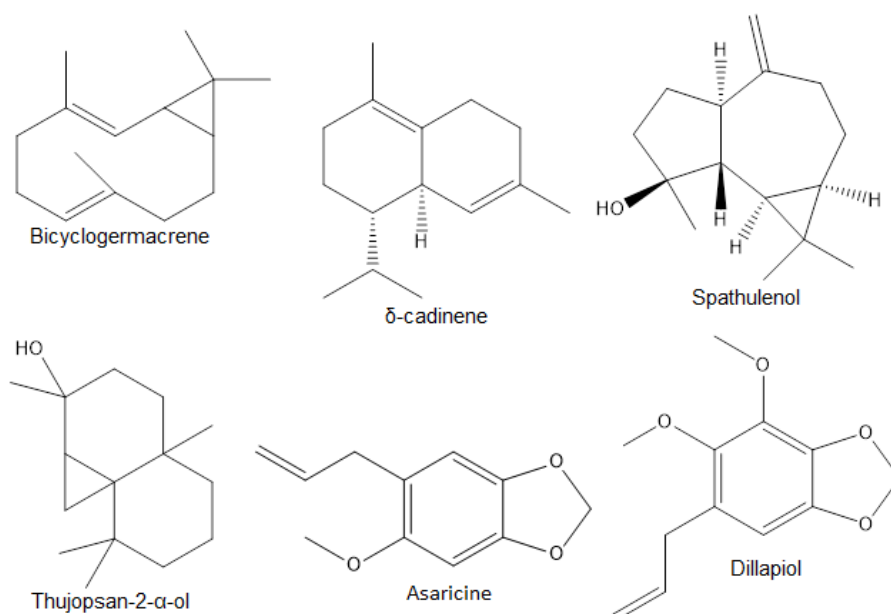
Para o presente trabalho foram selecionadas as espécies *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* que, apesar de possuírem poucos estudos fitoquímicos, são espécies promissoras devido ao amplo espectro de atividades biológicas encontradas no gênero. Nos estudos envolvendo *Piper fuliginum*, Mazzeu et al. (2017) isolou e identificou alguns dos metabólitos presentes no extrato etanólico obtido das folhas secas e outro estudo realizado por Krinsky et al. (2018) foi capaz de identificar algumas das moléculas presentes no óleo essencial. As moléculas encontradas por ambos autores se encontram nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4: Moléculas identificadas no extrato etanólico de *Piper fuliginum* (MAZZEU et al., 2017).



Fonte: O autor.

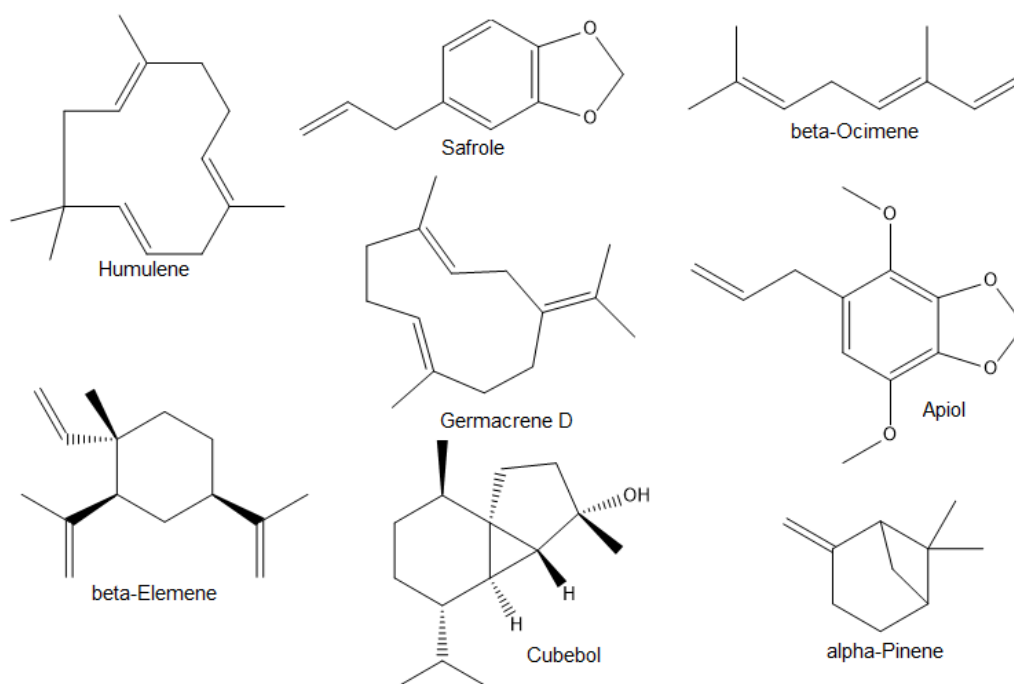
Figura 5: Moléculas identificadas no óleo essencial de *Piper fuliginum* (KRINSKI; FOERSTER; DESCHAMPS, 2018).



Fonte: O autor.

Piper macedoi possui somente estudos sobre o potencial fitoquímico de seu óleo essencial, um deles avaliando sua capacidade leishmanicida e um segundo avaliando o seu potencial acaricida (BEZERRA et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2021). Os compostos identificados por ambos autores se encontram na Figura 6 abaixo.

Figura 6: Algumas moléculas identificadas no óleo essencial de *Piper macedoi* (BEZERRA et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2021).



Fonte: O autor.

Dentro do gênero *Piper* existe um grupo de espécies denominado até o momento de complexo fuligineum, que agrupa as espécies *Piper flavicans*, *Piper fuligineum* e *Piper macedoi*. Essas três espécies, além de possuírem poucas diferenças morfológicas, geneticamente elas também são muito similares, possuindo 97% de similaridade em seu material genético, segundo as análises realizadas nesse trabalho (ver item 4.1). Apesar dessa alta similaridade, as espécies são capazes de produzir metabólitos especiais exclusivos a cada uma.

Piper fuligineum e *Piper macedoi* apresentam algumas diferenças morfológicas como no formato e no tamanho de suas folhas (Figura 7), e na pilosidade de suas nervuras. *Piper fuligineum* apresenta folhas mais largas e arredondadas, e indumento viloso (tricomas longos sem orientação), enquanto que *Piper macedoi* apresenta

folhas mais finas e alongadas com tricomas adpressos nas nervuras (tricomas orientados em um único sentido) (CHRIST, 2016).

Figura 7: Folhas de *Piper fuliginum* (A) e de *Piper macedoi* (B).



Fonte: O autor.

2.1.3. Técnicas de extração de metabólitos especiais.

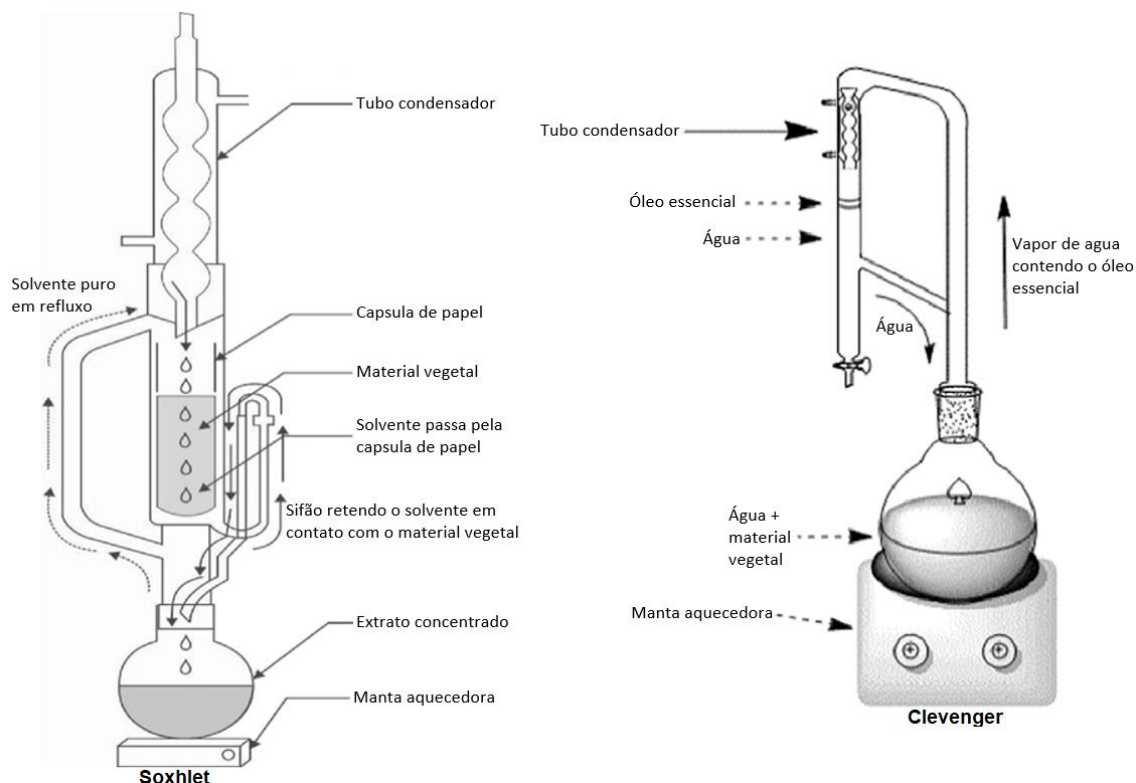
O processo de extração dos metabólitos especiais (ou secundários) é a primeira etapa no processo de estudo dos produtos naturais. Para isso existem diversas técnicas de extração com diferentes parâmetros, vantagens e desvantagens. Alguns tipos comuns de extração são: maceração, percolação, decocção, extração via soxhlet, extração com fluido supercrítico, hidrodestilação entre vários outros métodos (ZHANG; LIN; YE, 2018).

A percolação e decocção, apesar de possuírem nomes diferentes, são métodos de extração utilizados por grande parte da população em suas casas diariamente no processo de preparação do café e de chás, respectivamente. O termo percolação vem do latim *percolare* que pode ser traduzido como filtrar, na química esse processo consiste na passagem de um solvente, aquecido ou não, por um material poroso extraindo os compostos desejados durante o processo. O termo também é utilizado no campo da geografia para descrever o modo com que a água transpassa a terra após a chuva extraindo dela sais minerais e outros compostos levando-os para os lençóis freáticos. Já a decocção consiste em aquecer a mistura do material vegetal e o solvente à temperatura de ebulição durante determinado tempo seguido de filtração

do material insolúvel da mistura, sendo um método comumente empregado para extração de raízes e cascas (ZHANG; LIN; YE, 2018).

A maceração, a extração via soxhlet e hidrodestilação são modos de extração mais comumente empregados em laboratórios para o estudo de produtos naturais. A maceração é a mais simples delas, consistindo em adicionar o material vegetal ao solvente extrator em um recipiente fechado, e mantido à temperatura ambiente durante um longo período de tempo, normalmente acima de 24h. Por ser um processo a temperatura ambiente ele permite a extração com segurança de compostos termossensíveis. A extração via soxhlet é um processo um pouco mais complexo onde o extrator tipo Soxhlet (Figura 8) utiliza um sistema de refluxo e sifonagem para realizar a extração do material vegetal com solvente limpo, afim de maximizar a solubilidade dos metabólitos no solvente. Apesar dessa técnica ser muito eficiente, a necessidade de aquecer o solvente de extração para que ele entre em refluxo impossibilita a extração de compostos termossensíveis, pois eles podem ser degradados ao longo processo. Já a hidrodestilação é um processo de extração de óleos essenciais utilizando uma vidraria específica chamada Clevenger (Figura 8), na qual o material vegetal fresco é fervido em água e, devido a volatilidade dos compostos presentes nos óleos essenciais, eles são facilmente arrastados pelo vapor de água e condensados no Clevenger, onde serão coletados ao final do processo.

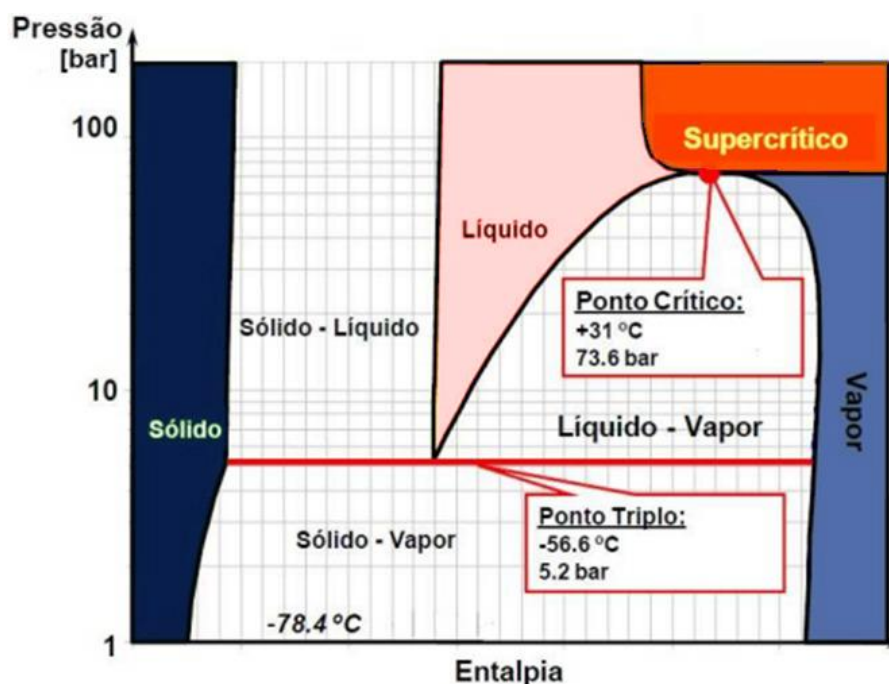
Figura 8: Técnicas de extração: via Soxhlet (esquerda), via Clevenger (direita).



Fonte: Adaptado de (ADITYAN et al., 2021; SAMADI et al., 2017).

Já a extração com fluido supercrítico é uma técnica mais complexa e avançada que diferente das técnicas discutidas anteriormente, não faz uso de solventes convencionais e sim de solventes em estado supercrítico. Um fluido supercrítico é um fluido que está acima de sua temperatura crítica e pressão crítica, ou seja, acima de seu ponto crítico (Figura 9). Quando um composto atinge esse estado, as propriedades físicas mudam drasticamente, adquirindo alta densidade e baixa viscosidade. Em um processo de extração essas características adquiridas pelo estado supercrítico aumentam a permeação na matriz sólida (parece celular de folhas, por exemplo), elevando a capacidade de dissolver os compostos presentes na matriz (SMITH, 1999). O fluido mais utilizado para essa aplicação é o dióxido de carbono (CO_2), devido à sua baixa temperatura crítica e pressão moderada e também à facilidade de removê-lo do extrato final. Apesar do CO_2 ser apolar, essa técnica permite também a adição de cossolventes à extração com o objetivo de aumentar a polaridade da mistura resultante e extrair compostos de característica polar.

Figura 9: Diagrama de pressão *versus* entalpia, ilustrando o ponto crítico do CO₂



Fonte: Adaptado de SOUZA e FILHO, (2011)

Para o escopo desse projeto foram selecionados três métodos de extração diferentes: maceração, hidrodestilação e extração com fluido supercrítico, dos quais serão analisadas as respectivas eficiências de extração, bem como os compostos extraídos em cada uma delas.

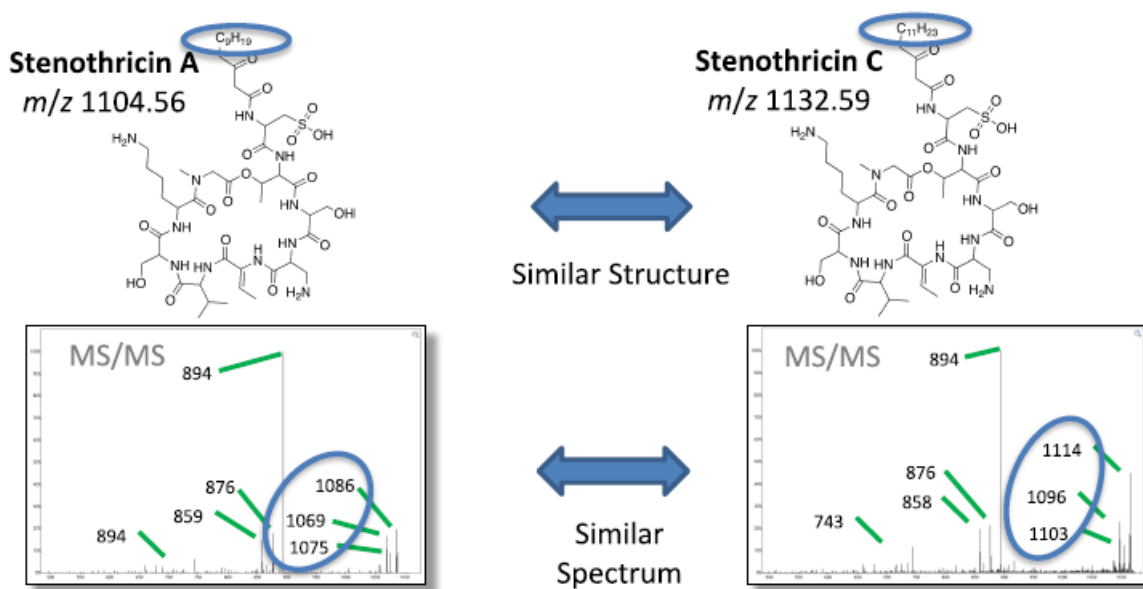
2.1.4. Análise de metabólitos secundários através de redes moleculares utilizando a Plataforma GNPS.

O GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) é um ecossistema on-line de acesso aberto para o compartilhamento de espectros MS/MS brutos, processados ou identificados, com o objetivo de auxiliar na identificação, interpretação e elucidação estrutural de dados de espectrometria de massas.

A plataforma possui inúmeras ferramentas para identificação e tratamento de espectros de massas, dentre elas se encontram desde simples comparações com a biblioteca aberta, disponibilizada e alimentada pelos próprios usuários, quanto análises mais complexas como a criação de redes moleculares para um estudo mais aprofundado dos dados fornecidos à plataforma.

Para realizar a comparação entre os espectros, a plataforma se baseia na similaridade entre os espectros. Moléculas de uma mesma família química possuem um padrão de fragmentação similar, ou seja, quanto mais similar é um espectro de outro presente na amostra, ou de algum composto presente na sua biblioteca interna, maior a probabilidade desses compostos pertencerem à uma mesma família química. Um exemplo desse princípio fornecido pela própria plataforma em sua documentação é o caso da Stenothricin A e a Stenothricin C, ilustrados na Figura 10. É possível perceber que pelo fato delas pertencerem a mesma família de compostos e possuírem uma grande similaridade em suas estruturas, seus espectros refletem isso, possuindo um mesmo padrão de fragmentação.

Figura 10: Similaridade entre os espectros de Stenothricin A e B.

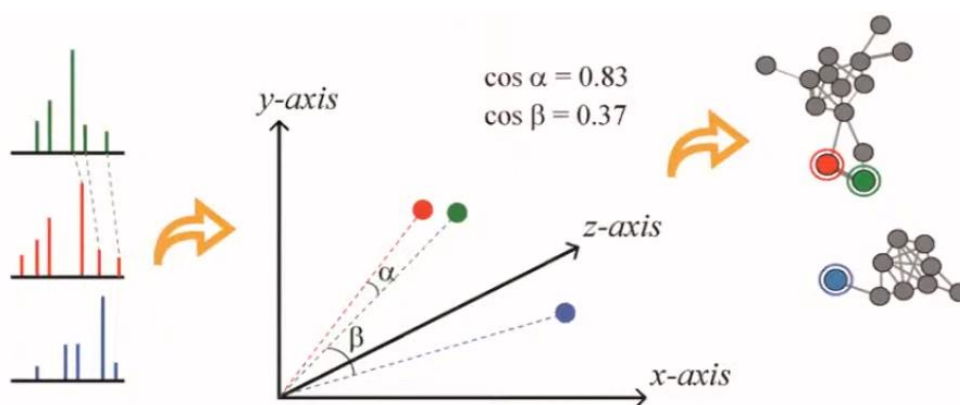


Fonte: Wang et al. (2016).

Para que o software responsável pela montagem das redes moleculares interprete essa informação e seja capaz de comparar os espectros de maneira eficiente, é necessária a conversão dos espectros da análise em um vetor. Tal conversão é feita transformando cada pico presente no espectro de massas de um composto em um vetor utilizando seus valores de intensidade e m/z como parâmetros de X e Y, da seguinte forma: $V = (\text{intensidade}; m/z)$, em seguida é realizada a soma vetorial de todos os vetores presentes no espectro e o vetor resultante representará o espectro de fragmentação do composto. Os vetores resultantes são plotados em um gráfico e a comparação é feita utilizando o valor do cosseno do ângulo entre dois vetores para determinar o grau de similaridade entre eles. Se o valor de cosseno é 1

os dois vetores estão sobrepostos (ângulo de 0°), logo os compostos são idênticos, se o valor é 0 os dois vetores estão a uma distância de 90° e não existe similaridade entre eles. Na Figura 11, o composto vermelho e o composto verde possuem espectros de fragmentação similares, logo seus vetores possuem uma inclinação similar resultando em um valor de cosseno próximo de 1, colocando-os em um mesmo cluster ou família molecular. Já o composto azul não possui espectro muito similar ao espectro verde e vermelho, logo seu vetor resultante é bem diferente deles bem como o cosseno calculado entre eles está longe de 1, indicando que esse composto não pertence ao mesmo cluster ou família molecular que os compostos verde e vermelho.

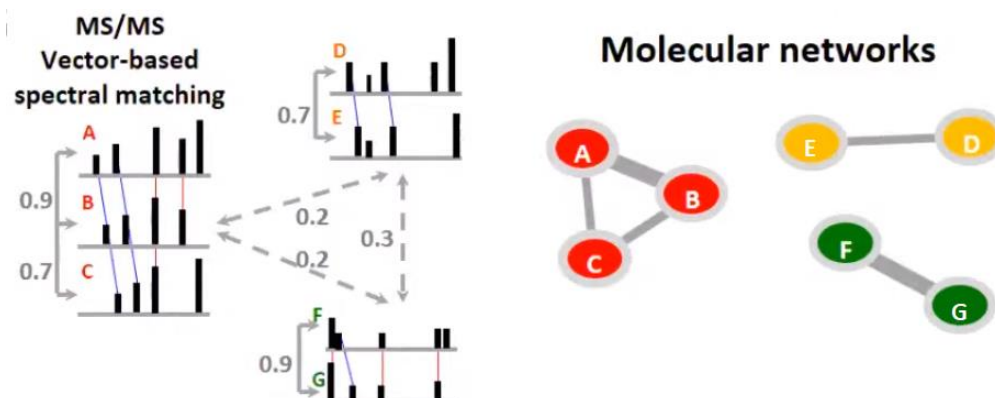
Figura 11: Ilustração da comparação entre os vetores resultantes dos espectros.



Fonte: Wang et al. (2016).

Dessa forma, os clusters ou famílias moleculares são formados pelos valores de cosseno entre cada um de seus integrantes, sendo que compostos similares possuem valores de cosseno altos e conseqüentemente são agrupados, já valores de cosseno muito baixos indicam que os dois compostos não pertencem à mesma família como ilustra a Figura 12. Os valores de cosseno para formação de clusters, limite de metabólitos para formação de um cluster e vários outros parâmetros são alteráveis para melhor adaptação as amostras que estão sendo estudadas.

Figura 12: Exemplo da formação de clusters entre compostos com valores de cosseno altos.



Fonte: Wang et al. (2016) <https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>.

Apesar da biblioteca presente no GNPS não ser extensiva, ela pode fornecer informações cruciais para a elucidação estrutural dos compostos presentes na amostra. Se pelo menos um dos compostos presentes em um cluster é identificado, isso fornece informações sobre parte das estruturas presentes no cluster, devido ao fato deles possuírem fragmentos em comum e um padrão de fragmentação similar.

A tecnologia de redes moleculares também é interessante na comparação dos metabólitos produzidos por diferentes espécies, facilitando a análise e a comparação da composição de cada uma das diferentes amostras ou espécies (BAUERMEISTER et al., 2018). Tais aplicações dessa ferramenta ilustram a importância dessa técnica para o estudo e comparação de espécies, servindo de grande ajuda para a interpretação das diferenças presente no metabolismo das duas espécies de estudo desse trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a composição química dos extratos e óleo essencial de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*, e avaliar a potencial atividade antiviral *in silico* dos compostos majoritários contra COVID-19.

Comparar a composição química e o rendimento de extratos obtidos pelos seguintes métodos de extração: maceração, hidrodestilação e extração com fluido supercrítico.

Analisar as diferenças nos metabólitos produzidos por ambas espécies e evidenciar a capacidade das duas espécies de responderem diferentemente aos estresses aplicados pelo mesmo ecossistema.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTAÇÃO

- Balança analítica SHIMADZU modelo ATX224.
- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade Quimis modelo Kett FD-600.
- Agitador magnético com aquecimento IKA modelo C-MAG HS 7.
- Banho de aquecimento Fisatom modelo 550.
- Cromatógrafo Gasoso acoplado à espectrômetro de massas Agilent Technologies modelo 7890B GC System/5977B GC/MSD.
- Evaporador rotatório IKA modelo RV 10.
- Liofilizador TERRONI modelo LS3000.
- Lavadora ultrassônica Unique, modelo USC-750.
- Cromatógrafo líquido acoplado à espectrômetro de massas de alta resolução UPLC-ESI-QqTOF-MS^E Agilent Technologies modelo 1220 Infinity II.
- Unidade piloto de extração via CO₂ supercrítico.

4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

- Solventes utilizados para as extrações e cromatografias: hexano, etanol, diclorometano, metanol de diversas marcas: Merck, Labsynth, Vetec, Neon. O hexano e o etanol foram destilados duas vezes para aumentar o grau de pureza.
- Solventes utilizados na extração supercrítica: dióxido de carbono, White Martins 99%, etanol (Neon).
- Derivatização dos extratos obtidos via CO₂ supercrítico: hidróxido de potássio (Dinâmica), metanol (Merck), heptano (Synth).
- Placa de alumínio com sílica gel 60, para cromatografia em camada delgada (CCD) contendo indicador de fluorescência da marca Macherey-Nagel.
- Reveladores utilizados na prospecção fitoquímica: vanilina sulfúrica, sulfato cérico, reagente de Lieberman – Burchard, NP-PEG, Dragendorff, ninhydrina, KOH e KI+I preparados segundo Wagner e Bladt (1996).

4.3. MATERIAL VEGETAL

4.3.1. Coleta e identificação.

A coleta das folhas frutos e galhos da espécie *Piper fuliginum* e sua variante foi realizada na reserva ecológica localizada na Fazenda Experimental do Glória pertencente à Universidade Federal de Uberlândia (18°57'23.0"S 48°12'30.5"W) no dia 3 de novembro de 2020. Ambos indivíduos foram coletados a poucos metros de distância (Figura 13), próximos às margens de um lago, sob condições similares de solo e incidência solar, favorecendo assim uma melhor comparação entre os metabólitos especiais produzidos por eles.

Figura 13: Distância entre os pontos de coleta das espécies.



Fonte: O Autor.

As plantas foram identificadas pela Professora Doutora Micheline Carvalho Silva da Universidade de Brasília especialista no estudo de Piperáceas e depositadas no Herbário da Universidade de Brasília sob o código 311774 para *Piper fuliginum* e 311780 para *Piper macedoi*.

4.3.2. Obtenção dos óleos essenciais.

A umidade das folhas frescas foi determinada pelo método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha. A análise foi realizada com cerca de 1,0 g de material vegetal sob temperatura de 105 ± 5 °C, até que o teor de umidade permanecesse constante.

A extração do óleo essencial foi realizada em triplicata utilizando um aparelho de clewenger (Figura 14), por hidrodestilação, sob refluxo de 4 horas. Foram utilizadas 100 g de folhas frescas trituradas com 1,0 L de água destilada em balão de fundo redondo com capacidade de 2,0 L.

Figura 14: Aparelho clewenger utilizado na extração de óleo essencial



Fonte: O autor.

A extração foi realizada em triplicata e ao término de cada extração, o óleo essencial foi extraído com 15,0 mL de diclorometano PA (3 x 5,0 mL). O solvente foi removido por evaporação em uma chapa aquecedora a 35°C até massa constante. O rendimento foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa de óleo obtida (g)} \times 100}{\text{Material de partida descontando a Umidade (g)}}$$

Equação 1

Os óleos essenciais foram armazenados em frasco de vidro, vedados e conservados em ambiente refrigerado na ausência de luz.

4.3.3. Obtenção dos extratos hexânicos e etanólicos

As folhas foram separadas dos frutos e galhos em bandejas de papelão, parte das folhas frescas foram destinadas a extração do óleo essencial, o restante foi seco em estufa a 40°C durante 3 dias, obtendo uma umidade resultante inferior a 8% para as folhas, medida em balança de luz infravermelha.

Figura 15: Folhas de *Piper fuliginum* frescas (esquerda) e secas (direita).



Fonte: O autor.

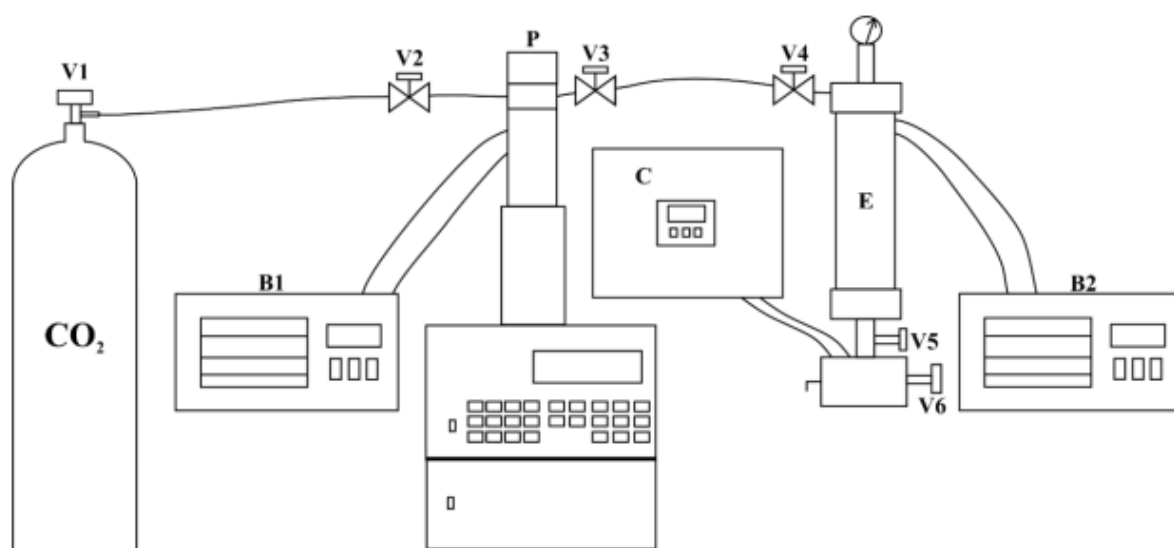
Em seguida 101,3 g de folhas trituradas foram maceradas com 600 mL de hexano durante 48 horas, o extrato resultante foi filtrado, o solvente foi removido em evaporador rotativo e o hexano recuperado foi novamente adicionado ao material vegetal, esse procedimento foi repetido 2 vezes. Após a terceira maceração, o material vegetal resultante foi submetido ao mesmo processo de extração utilizando 600 mL de etanol afim de se obter o extrato etanólico. Os extratos obtidos foram filtrados em papel filtro para remover o material vegetal e evaporados em evaporador

rotativo a 40°C sob pressão reduzida e liofilizados para remoção completa do solvente de extração.

4.3.4. Extração com CO₂ supercrítico.

A extração supercrítica foi realizada em parceria com a Faculdade de Engenharia Química da UFU com o auxílio da Mestre Ana Carolina Fornereto Soldan, do aluno Rodrigo Carrilho da Cunha e das Professoras Doutoras Erika Ohta Watanabe e Carla Eponina Hori. Foi utilizada a unidade de extração supercrítica esquematizada na Figura 16. A unidade é composta de um cilindro de dióxido de carbono; uma bomba do tipo seringa (Teledyne Isco 500D); dois banhos termostatzados, um (Tecnal, TE-184) para resfriamento do CO₂ na bomba e outro (Ethik, 521/D) para controle da temperatura do extrator; um extrator encamisado de 53 mL (1,98 cm x 20,5 cm) e um controlador de temperatura para evitar congelamento devido a expansão do CO₂ na saída como pode ser observado na Figura 16.

Figura 16: Unidade de extração supercrítica em que está apresentado o cilindro de CO₂, os banhos termostatzados (B1 – resfriamento da bomba, B2 – controle de temperatura do extrator), a bomba (P), o controlador de temperatura da saída do extrator (C), o extrator (E) e as válvulas (V1 a V6)



Fonte: Imagem extraída de Soldan (2020) com a autorização da autora.

Figura 17: Foto da unidade de extração supercrítica utilizada para obtenção dos extratos.



Fonte: O autor.

O leito do extrator foi preenchido com 8 gramas de folhas de *Piper fuliginum* secas e aproximadamente 30g de esferas de vidro de 3mm de diâmetro conforme esquematizado na Figura 18. Tal montagem foi escolhida afim de melhorar a distribuição do CO₂ pelo leito e evitar a formação de caminhos preferenciais para a passagem do CO₂.

Figura 18: Esquematização do preenchimento do extrator, os círculos brancos representam as esferas de vidro e os retângulos verdes o material vegetal.



Fonte: O autor.

A extração supercrítica foi realizada de acordo com as seguintes etapas descritas na Figura 16:

1) O banho de resfriamento da bomba (B1) foi ligado e o tempo necessário para que ele atingisse 5 °C foi aguardado a fim de evitar que o CO₂ se tornasse gasoso.

2) As válvulas V1 e V2 foram abertas e a bomba (P) foi então preenchida com CO₂.

3) Um tempo de 20 minutos após o preenchimento da bomba foi contabilizado a fim de garantir a acomodação do CO₂ dentro da bomba.

4) O banho de controle de temperatura do extrator (B2) foi ligado de acordo com a temperatura de interesse de cada experimento.

5) O leito do extrator (E) foi preenchido e o extrator foi fechado e a tubulação do CO₂ foi conectada.

6) O controlador de temperatura na saída do extrator (C) foi configurado para 90 °C a fim de evitar congelamento devido ao efeito Joule-Thompson.

7) Após decorridos 20 minutos, as válvulas V1 e V2 foram fechadas, as válvulas V3 e V4 foram abertas e o CO₂ foi alimentado no extrator.

8) A bomba e o extrator foram pressurizados ao mesmo tempo até o valor pressão desejado e então um tempo de 30 minutos (tempo de extração estática) foi contabilizado, a fim de evitar gradientes de pressão e temperatura dentro do extrator.

9) Decorridos os 30 minutos, as válvulas V5 e V6 foram abertas de forma a atingir a vazão de solvente de 3 g min⁻¹, a qual foi mantida constante em todas as extrações.

10) A cada 5 minutos as válvulas V5 e V6 eram fechadas e eram anotadas a massa de extrato acumulada e a quantidade de CO₂ gasta.

Todas as extrações foram realizadas até que a massa de extrato acumulada se tornasse constante (dentro do erro da medida da balança). Os extratos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar e refrigerados.

A extração foi feita em duas condições diferentes descritas na Tabela 1, a condição 1 foi escolhida afim de maximizar a densidade de CO₂ dentro do extrator respeitando suas limitações físicas (pressão máxima de 258,6bar atingida pela bomba), porém mantendo uma temperatura baixa (40°C) para que não haja degradação dos compostos ativos presentes na planta (MOHAMED, 1997). Na condição 2 foi utilizado o etanol como cossolvente de extração afim de aumentar a

polaridade do da mistura e possibilitar a extração de compostos polares (KOPCAK, 2003), aproximando-se mais do extrato obtido via maceração em etanol.

Tabela 1: Condições utilizadas para a extração com CO₂ supercrítico.

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade CO₂ (Kg/m³)	Cossolvente
1	40	250	880,22	X
2	40	250	880,22	Etanol

Nas extrações empregando-se cossolvente, misturou-se 0,5 mL de cossolvente (etanol) para cada 1 g de folha e a mistura foi transferida para o extrator. Tal proporção foi definida em teste preliminar baseado no método da umidade incipiente, ou seja, acrescentava-se cossolvente de tal forma que fosse suficiente apenas para umedecer a amostra evitando que exista excesso de etanol. O mesmo procedimento foi realizado por Alvarez e colaboradores (2019) para a extração supercrítica de resíduo de soja. As extrações com cossolvente foram realizadas até o tempo de esgotamento necessário para a condição de 40 °C e 250 bar sem cossolvente.

4.4. ANÁLISE DOS EXTRATOS

4.4.1. Prospecção Fitoquímica.

Os extratos foram solubilizados em metanol a uma concentração 1 mg mL⁻¹ e aplicados em placas comerciais de CCD (cromatografia em camada delgada). Foi utilizada uma única fase móvel para a maceração em etanol e hexano, composta de: hexano, acetato de etila, ácido fórmico (2;1;0,4). Um total de 8 reveladores foram utilizados: vanilina sulfúrica, sulfato cérico, reagente de Lieberman – Burchard, NP-PEG, Dragendorff, Ninhidrina, KOH e KI+I.

-Dragendorff: foi preparada uma solução A, a partir da dissolução de 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e adicionou-se 40,0 mL de água destilada sob aquecimento; e uma solução B a partir da dissolução de 8,0 g de iodeto de potássio em 30,0 mL de água. As soluções A e B foram misturadas na mesma proporção produzindo uma solução estoque. A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução estoque; 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL

de água. A placa foi revelada e observada a coloração laranja amarelada na presença de alcaloides.

-KI+I: foi preparada uma solução A contendo 1,0 g de iodeto de potássio (KI) e 2,0 g de iodo (I₂) dissolvidos em 100 mL de EtOH (96%) e uma solução B contendo 10 mL de solução de HCl 25% molar e 10 mL de EtOH. A revelação da placa é feita se aspergindo a solução A e depois de 1 min aspergir a solução B.

-NP/PEG: foi preparada uma solução A contendo difenilboriloxietilamina (NP) 1% (m v⁻¹) em metanol; e uma solução B contendo polietilenoglicol-4000 (PEG4000) 5% (m v⁻¹) em etanol. A solução reveladora foi preparada com 10,0 mL da solução A e 8 mL da solução B e aplicada na placa. Posteriormente a placa CCD foi observada em câmara de luz UV.

-KOH: hidróxido de potássio 5% em etanol. As antraquinonas revelam com coloração vermelhas. Na câmara de luz UV é possível identificar antronas (amarela) e cumarina (azul).

-Sulfato Cérico: 2,1 g de Ce(SO₄)₂.5H₂O foi dissolvido em 15 mL de H₂SO₄ concentrado e adicionado a 800 mL de água (CHAVES, 1997). Mistura foi aplicada na placa e os compostos revelados apresentaram coloração marrom.

-Liebermann-Burchard: foi adicionado 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado a 50,0 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa foi borrifada com a solução e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min e os compostos revelados ficaram coloridos na placa.

-Vanilina Sulfúrica: foi preparada uma solução A contendo vanilina 1% em etanol (m/v) e uma solução B contendo ácido sulfúrico 5% em etanol (v/v). A placa CCD foi borrifada com a solução A seguida da B e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min podendo observar os compostos revelados de diversas cores.

-Ninhydrina: 30 mg de ninhydrina foi dissolvida em 10 mL de n-butanol seguidos de 0,3 mL de ácido acético 98%. A placa foi borrifada com a solução reveladora e aquecida por 5 a 10 min e observada sob luz visível.

4.4.2. Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas dos óleos essenciais.

A identificação das substâncias foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (GC-MS) da marca Agilent Technologies modelo 7890B GC System/5977B GC/MSD (Figura 19). Foi utilizada coluna cromatográfica capilar Agilent 19091S-433 HP-5ms (30 m x 250 μm x 0.25 μm). As condições cromatográficas empregadas foram: temperatura do injetor, 274 °C. O gás de arraste era hélio de alta pureza a uma taxa de fluxo constante de 0,9 mL min⁻¹. As amostras a serem analisadas foram preparadas com concentração de 5 mg mL⁻¹ em diclorometano e foram feitas injeções de 1 μL . O modo Scan (MS) foi varrido de m/z 35–550, com uma contagem de 150 limiar e atraso de solvente de 3 min. O quadrupolo foi mantido a 150 °C com a fonte de íons a 280 °C. A temperatura inicial do forno foi programada de 60 °C aumentando a uma taxa de 3°C min⁻¹ até 246 °C, mantendo a essa temperatura por 30 minutos (ADAMS, 2007).

Figura 19: Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas.



Fonte: O autor.

O padrão de alcanos utilizado foi obtido da marca Supelco (C7-C40 Saturated Alkanes Standard) na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em hexano. A identificação foi

baseada em índices aritméticos (IA) calculados e comparados ao da *NIST Standard Reference Data e Adams (2007)*.

Essa identificação foi realizada de acordo com o seguinte procedimento. Inicialmente os espectros de massas obtidos na análise foram comparados com os de presentes na biblioteca Nist17 utilizando o software *Unknows Analysis* da Agilent. A comparação foi realizada entre os padrões de fragmentação mostrados pela biblioteca do software e do composto analisado. O equipamento mostra um índice de similaridade, resultante da comparação entre os espectros dos compostos sugeridos pelas bibliotecas. Nessa análise, para a identificação dos compostos foi considerado apenas aqueles índices de similaridade com valores superiores à 60% sendo para os compostos com índices entre 60% e 90% outros fatores foram analisados, como fragmentação e seu índice aritmético (IA) comparado com a literatura.

O índice aritmético (IA) correlaciona o tempo de retenção dos compostos analisados aos de padrões de alcanos. Nesta equação são considerados os tempos de retenção do alcano anterior ($Tr(Pz)$) e posterior ($Tr(Pz+1)$) ao tempo de retenção dos compostos analisados ($Tr(x)$) e o número de carbono do alcano ($C(Pz)$) com tempo de retenção anterior ao analisado. A Tabela 2 mostra o tempo de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético (IA).

Tabela 2: Tempos de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético na análise por GC-MS.

Número de carbonos	Tempo de retenção (min)	Número de carbonos	Tempo de retenção (min)
C9	4,7818	C20	47,0010
C10	7,4996	C21	50,2249
C11	11,1746	C22	53,2948
C12	15,4108	C23	56,2436
C13	19,8451	C24	59,0824
C14	24,2354	C25	61,8112
C15	28,4936	C26	64,7161
C16	32,5538	C27	68,2591
C17	36,4269	C28	72,7154
C18	40,1240	C29	78,3710
C19	43,6450	C30	85,6661

Fonte: O autor.

O IA foi calculado através da Equação 2, utilizando o tempo de retenção do composto analisado e dos padrões de alcanos (C8-C30) previamente injetados utilizando a mesma metodologia.

$$I A(x) = 100 C(P_Z) + 100 \left[\frac{T_r(x) - T_r(P_Z)}{T_r(P_{Z+1}) - T_r(P_Z)} \right] \quad \text{Equação 2}$$

O IA calculado foi comparado com o de compostos isolados tabelados por Adams (2007). Além disso, o IA calculado, também foi comparado com a NIST (2014), nas mesmas condições utilizadas para a análise em GC-MS.

4.4.3. Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas dos extratos hexânicos e etanólicos.

A análise dos extratos hexânicos e etanólicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi realizada com o auxílio do aluno de Doutorado Marcus Vinicius de Sá Gonçalves da Silva, em parceria com Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) situado na Universidade Estadual de São Paulo campus Araraquara-SP.

Os extratos obtidos passaram por um processo de *clean up* utilizando-se cartuchos de extração em fase sólida (SPE) contendo sílica modificada com grupos octadecil (C18). Para tanto, solubilizou-se os extratos em 300,0 µL de metanol:água (95:5, v/v) com auxílio de banho ultrassônico e agitação.

Os cartuchos de SPE foram condicionados com 1,0 mL de metanol grau de pureza HPLC. Após condicionamento, equilibrou-se o cartucho com 1,0 mL de solução metanol:água (95:5, v/v) e aplicou-se a solução da amostra. A eluição foi realizada com 1,0 mL de metanol:água (95:5, v/v), coletando-se o eluato em microtubos de 1,5 mL com massa previamente mensurada. As soluções de extrato foram parcialmente evaporadas em capela de exaustão até o volume aproximado de 100 µL. As soluções resultantes foram secas em evaporador a vácuo por 5 horas a 1,0 Torr e 35°C. Os extratos obtidos foram solubilizados em metanol:água (70:30, v/v) de modo a obter soluções a 1,0 mg mL⁻¹. Estas soluções foram diluídas na razão de 1:10 para ajuste da concentração a 100 ppm. Posteriormente, as soluções resultantes foram centrifugadas em mini centrífuga a 10000 rpm por 3,0 min e prontamente analisadas.

Na análise por UPLC-ESI-QqTOF-MSE, a separação foi realizada em coluna Acquity UPLC® HSST3, com dimensões de 100 x 2,1 mm, contendo fase estacionária reversa (C18), constituída de partículas com 1,8 µm de diâmetro médio e 100 Å de

diâmetro médio de poro. A eluição foi realizada em modo gradiente, utilizando-se água como componente A e acetonitrila como componente B, ambos contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. Realizou-se um gradiente exploratório de 5,0 a 100,0% de B em 8,0 minutos, com uma etapa adicional de limpeza após o término do gradiente, na qual manteve-se 100,0% de B por 5,0 minutos. A vazão utilizada foi de 500,0 μLmin^{-1} e o forno da coluna foi mantido a 40,0°C. O detector de DAD foi operado na faixa de comprimento de onda de 210-800nm, com frequência de aquisição de 20,0 Hz.

No espectrômetro de massas a aquisição foi realizada no modo resolução positivo e negativo na faixa de m/z 50-1000. Ajustou-se os parâmetros da fonte de ionização de modo que sua temperatura foi mantida a 100 °C e, no capilar de electrospray, foi aplicado um potencial de 1,5 kV. A voltagem do cone de transferência foi estabelecida a um potencial de 40 V. A vazão do gás de dessolvatação (N_2) foi ajustada a 800 Lh^{-1} e sua temperatura mantida a 650°C. O experimento de MS^E foi realizado em duas condições de energia aplicadas à célula de colisão, sendo que os espectros de baixa energia foram obtidos a 6,0 eV e para obtenção dos espectros de alta energia, utilizou-se uma rampa de potencial de 25,0 a 45,0 eV. Leucina-encefalina foi utilizada como referência de massa para promover a correção dos valores de m/z experimentais. Para tanto, uma solução a 200,0 $\text{pg}\mu\text{L}^{-1}$ deste composto foi continuamente infundida através do capilar secundário de *electrospray* do espectrômetro. A vazão de infusão foi ajustada a 10,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o capilar secundário de ESI foi mantido a um potencial de 0,5 kV. O monitoramento da razão m/z deste calibrante foi realizado a uma energia de colisão de 6,0 eV a cada 10 segundos de análise. Os dados de MS foram corrigidos durante a aquisição.

Os dados obtidos a partir dos experimentos de UPLC-QqTOF-MSE foram tratados no software UNIFI® V 1.8 (Waters, Millford, USA) através do qual realizou-se uma análise de *screening* para identificação das substâncias detectadas. Para a análise é possível criar bibliotecas customizadas baseadas em compostos já descritos na literatura através de suas estruturas. Para tal análise utilizou-se uma biblioteca criada a partir das moléculas encontradas por Mazzeu et al. (2017), bem como os metabólitos encontrados nas espécies de piperáceas mais próximas de *Piper fuliginum* na árvore filogenética. As espécies utilizadas para a montagem desse banco de dados foram: *Piper macedoi*, *Piper flavicans*, *Piper gaudixhaudianum* e *Piper hispudinervum*.

A atribuição dos sinais foi realizada com base na comparação entre as razões m/z dos íons detectados e as razões m/z dos íons das substâncias que constituem o banco de dados, considerando-se a formação de íons $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ para o modo positivo e $[M-H]^-$ para o modo negativo. Os parâmetros utilizados na comparação foram os recomendados pela Waters sendo a tolerância máxima de erro foi estabelecida a 10 ppm. O valor mínimo de intensidade de pico para alta energia foi ajustado a uma contagem de 1000 íons, enquanto, para baixa energia, estabeleceu-se o valor de 2000 íons.

4.4.4. Análise dos extratos obtidos via CO₂ supercrítico.

Para possibilitar a análise dos extratos obtidos por extração supercrítica via espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa (GC-MS) e comparar sua composição com os óleos essenciais foi necessário empregar um método de derivatização dos compostos presentes afim de torna-los mais voláteis e permitir que eles sejam observados por essa técnica.

A derivatização das amostras foi realizada conforme protocolo definido por Marinho et al. (2019) onde é utilizada uma solução de KOH afim de esterificar os ácidos graxos presentes no extrato aumentando sua volatilidade e possibilitando sua análise via GC-MS. Adicionou-se 2 mL de solução KOH (2 mol L⁻¹, metanol) em 60 mg de extrato e agitou-se em banho de ultrassom por 15 min. Acrescentou-se 5 mL de heptano formando-se duas fases. A fase superior (heptano) foi coletada e injetada em conjunto com as amostras de óleo essencial conforme descrito acima. Apesar de já haver sido empregada para a análise de extratos vegetais (Soldan, 2020) acreditamos que essa metodologia de derivatização seja mais indicada para a análise de biodiesel, pois a complexidade da composição de um extrato vegetal acarretaria na produção de outros compostos e não somente a esterificação dos ácidos graxos.

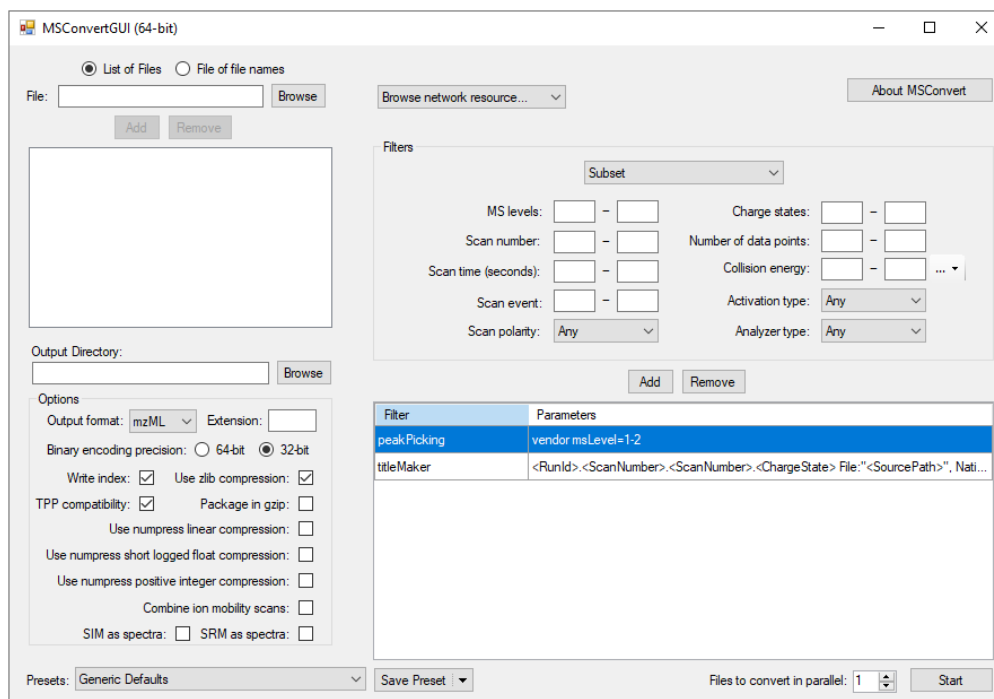
Os extratos obtidos também foram analisados via espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-MS) em conjunto com as amostras enviadas ao NuBBE em Araraquara, afim de observar os compostos antes de sua derivatização e compara-los aos extratos obtidos via maceração.

4.4.5. Comparação dos extratos e óleos essenciais de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* via a plataforma GNPS.

Para realizar a comparação dos diferentes metabólitos presentes em ambos espécimes (*Piper fuliginum* e *Piper macedoi*), os dados de espectrometria de massa dos extratos e óleos essenciais obtidos nas etapas anteriores foram analisados utilizando as ferramentas de molecular networking presentes na plataforma GNPS (site: <http://gnps.ucsd.edu>) e o tratamento das redes moleculares foi feito no software Cytoscape.

Para que os dados de GC-MS e LC-MS das amostras desejadas possam ser analisados pelo GNPS é necessário primeiramente converter os arquivos do formato utilizado pelos respectivos softwares em eles foram obtidos para o formato mzML. Para realizar a conversão foi utilizado o software MSConvert disponibilizado pelo site ProteoWizard®, os parâmetros utilizados para a conversão se encontram na Figura 20.

Figura 20: Parâmetros de conversão dos dados de espectrometria de massas para .mzML.



Fonte: O autor.

Após a conversão os dados foram inseridos nos servidores da plataforma para que possam ser acessados e processados pelo site da mesma.

Foram realizadas duas análises distintas, uma com os dados de LC-MS dos extratos hexânicos e etanólicos, e outra com os dados de GC-MS dos óleos essenciais, e dos extratos obtidos na extração com CO₂ supercrítico. Os extratos obtidos com o CO₂ não são relevantes para a comparação entre as duas espécies, já que eles foram realizados apenas com *Piper fuliginum*, porém eles foram adicionados a análise afim de atingir o mínimo de 10 amostras impostas pela plataforma. Esse limite é necessário para que o software de desreplicação tenha dados suficientes para realizar a separação dos picos corretamente. Tais dados foram excluídos das redes moleculares durante o processamento no software Cytoscape.

O fluxo de trabalho seguido para gerar as redes moleculares dos dados de LC-MS e GC-MS foram os seguintes: os dados foram filtrados removendo todos os fragmentos de íons MS/MS dentro de uma janela de +/- 17 Daltons da massa do íon precursor. Os espectros de MS/MS foram filtrados escolhendo os 6 fragmentos de maior intensidade em uma janela de +/- 50 Da ao longo do espectro. Foi utilizada uma tolerância de 2 Da para os íons precursores e de 0,5 Da para os fragmentos na análise dos dados de LC-MS e 2 Da para os íons precursores e de 0,5 Da para os fragmentos na análise dos dados de GC-MS. As redes moleculares foram criadas utilizando um valor de cosseno de no mínimo de 0.7 e com pelo menos 6 picos em comum entre cada espectro. Linhas conectando nodos diferentes só foram mantidas somente quando os compostos presentes nos 2 nodos também estavam presentes nos 10 nodos similares respectivamente. Finalmente o número máximo de compostos dentro de uma família molecular foi de 100 compostos, onde os compostos com menores valores de cosseno foram eliminados até a família não passasse deste limite. Os espectros presentes nas redes moleculares foram comparados com a biblioteca de espectros do GNPS, onde foram filtrados do mesmo modo que os dados. Todos os *matches* feitos com a biblioteca respeitaram também as mesmas condições acima, valor de cosseno acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondentes entre eles (WANG et al., 2016). As redes moleculares foram visualizadas e tratadas utilizando o software Cytoscape (SHANNON, 2003). Os parâmetros utilizados para ambas análises foram escolhidos com base nas recomendações da plataforma, como os resultados obtidos foram satisfatórios não houve necessidade de alterá-los.

4.4.6. Análise do potencial de inibição da protease Mpro dos compostos encontrados nos extratos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* via *docking* molecular.

O ensaio de *docking* molecular foi realizado pelo Doutor Rafael Aparecido Carvalho Souza, envolvendo um total de 152 compostos identificados nos extratos de ambas espécies. As estruturas químicas em 3D foram desenhadas no software GABEDIT (ALLOUCHE, 2011) e otimizadas via método semiempírico PM7 via software MOPAC2016 (STEWART, 2016).

A estrutura cristalina da proteína Mpro complexada com um inibidor N3 foi obtida no Protein Data Bank (código PDB: 6LU7). Um cubo de dimensões ($x = 20$, $y = 20$, $z = 20$), e centro ($x = 10.641$, $y = 11.847$, $z = 68.346$) com espaçamento de 1 Å foi criado para cobrir o centro ativo N3 na proteína 6LU7. O protocolo de *docking* foi validado por re-*docking* do ligante co-cristalizado (inibidor N3) na proteína Mpro do SARS CoV-2.

O ensaio de *docking* molecular foi realizado utilizando a interface AutoDockTools 1.5.6 em conjunto com Autogrid4 e Autodock4.2 (MORRIS et al., 2009), que faz uso do algoritmo genérico de Lamarckian (LGA) para reconhecer sítio de ligação putativo e a orientação do ligante. De acordo com os pré-requisitos do LGA, para preparar as proteínas para o *docking* molecular a água co-cristalizada e outras moléculas foram removidas, as estruturas proteicas protonadas utilizando a ferramenta de redução, em seguida os hidrogênios não polares foram removidos seguidos pela adição das cargas de Gasteiger (SANNER, 2005). O LGA no Autodock foi utilizado com 100 corridas para a simulação de *docking* com uma população inicial de 152 indivíduos; avaliação máxima de energia (25.000.000); máximo de gerações (27.000); o indivíduo que sobrevive para a próxima geração e a análise de classificação de cluster for realizada utilizando uma tolerância de RMS de 2,0 Å para cada cálculo de *docking*. As interações dos ligantes com os sítios ativos dos receptores foram visualizadas utilizando o programa Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2017). O *docking* molecular foi avaliado de acordo com as classificações, energia livre de ligação e os resultados das análises das interações de: Van der Waals, ligação de hidrogênio, hidrofobicidade, eletroestática e entropia. Tomando como base a literatura foram consideradas os fármacos antivirais Nelfinavir, Remdesivir, Paxlovid, Fluvoxamine, Ritonavir e Molnupiravir como ligantes de referência para o estudo dos

metabólitos presentes nas plantas de estudo desse trabalho contra a proteína Mpro do vírus SARS CoV-2 (CAO; DENG; DAI, 2020; HUSSAIN BASHA, 2020; SAQRANE et al., 2021).

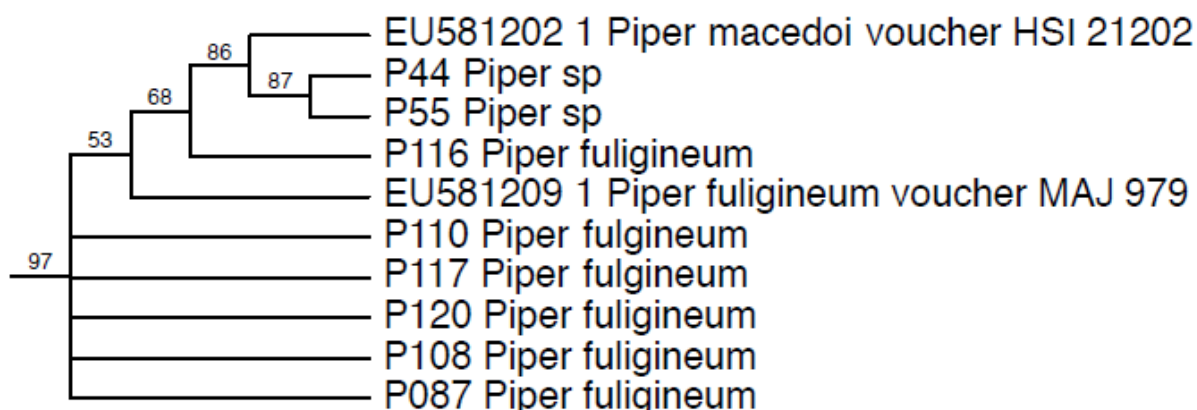
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Análise molecular do material genético de *Piper fuligineum* e *Piper macedoi*.

Durante os trabalhos de campo para a coleta do material vegetal, a espécie *Piper macedoi* foi coletada e identificada como uma variante da *Piper fuligineum* devido ao fato dessas duas espécies possuírem grandes similaridades morfológicas e de *Piper macedoi* ser uma espécie dificilmente encontrada. Logo, afim de identificá-la de maneira correta, foi realizada a análise molecular de seu material genético. Esta análise foi realizada em parceria com a Professora Doutora Micheline Carvalho Silva da Universidade de Brasília, que também foi responsável pela identificação morfológica dos espécimes coletados neste projeto.

Para esse trabalho foram utilizadas 52 sequências de material genético considerando todas as espécies brasileiras com morfologia próxima a *Piper fuligineum* e *Piper macedoi*. Na Figura 21 se encontra o fragmento da árvore filogenética, gerada pela Professora Doutora Micheline Carvalho Silva. Nesta imagem as amostras da espécie coletada em campo onde não foi possível realizar a identificação estão intituladas como P44 *Piper sp* e P55 *Piper sp*.

Figura 21: Fragmento da árvore filogenética do complexo fuligineum destacando a comparação entre *Piper macedoi* coletada (*Piper sp*) e *Piper macedoi* presente na literatura.



Fonte: O autor.

Para se interpretar esse fragmento precisamos entender o significado de cada uma das informações presentes na imagem. Os números presentes no início das chaves indicam o grau de similaridade genética entre as amostras presentes dentro da chave, logo como existe um 97 no início deste chaveamento, todas essas amostras

apresentam pelo menos 97% de similaridade em seu material genético. Cada momento em que a árvore se divide, o número sobre o chaveamento indica o grau de similaridade entre as amostras presentes.

Analisando a posição de *Piper sp* na árvore, observamos que apesar de possuir uma alta similaridade com a amostra de *Piper fuliginum* P116 (68%), ela possui uma similaridade muito maior com a amostra de *Piper macedoi* (86%) presente na literatura (EU581202). Portanto pode-se afirmar que a planta coletada em campo pertence a espécie *Piper macedoi*, e não uma variante de *Piper fuliginum* como se acreditava inicialmente. Tal resultado entra de acordo com as observações morfológicas, onde apesar do espécime coletado apresentar certas características que a aproximariam de *Piper fuliginum* algumas de suas organelas são muito características de *Piper macedoi*.

O estudo comparativo dessas duas espécies se torna então muito interessante pois ambas possuem altíssima similaridade em seu material genético e foram coletadas muito próximas, logo estão submetidas a um mesmo ecossistema. Espera-se então um metabolismo especial similar entre elas.

5.2. Prospecção Fitoquímica dos extratos via maceração de *Piper fuliginum*.

A primeira etapa do trabalho foi avaliar o potencial fitoquímico de *Piper fuliginum*. Para isso foi realizada a prospecção fitoquímica para identificar quais famílias químicas estão presentes no metabolismo especial dessa espécie. Inicialmente, a maceração em etanol e hexano foi escolhida pela possibilidade de extrair os metabólitos polares e apolares presentes no material vegetal coletado.

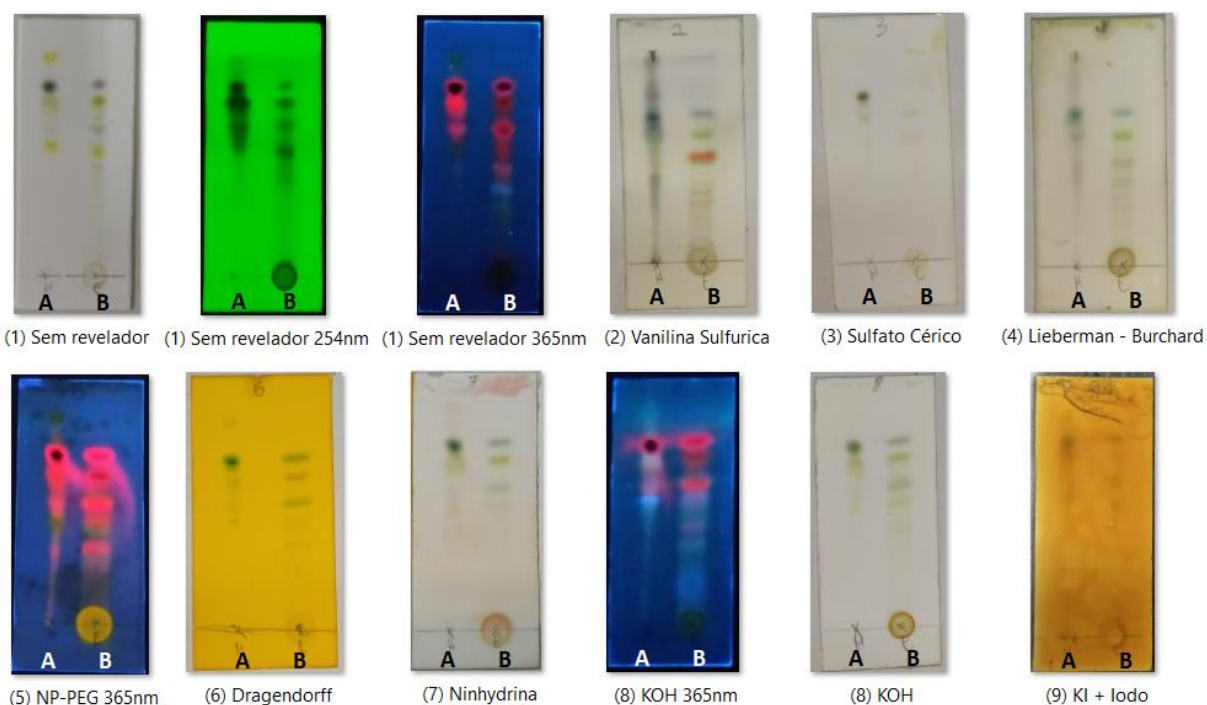
A prospecção fitoquímica foi realizada utilizando cromatografia de camada delgada (CCD) em conjunto com 8 reveladores listados na Tabela 3 e fase móvel composta por: hexano, acetato de etila, ácido fórmico (2;1;0,4). Apesar das diferentes polaridades dos extratos a mesma fase móvel se mostrou ideal para separação da maioria dos compostos presentes, permitindo a avaliação da viabilidade de utilizar *Piper fuliginum* como objeto de estudo neste trabalho.

Tabela 3: Prospecção fitoquímica dos extratos das folhas de *Piper fuliginum*.

Extratos	Flavonoides	Aminoácidos	Alcaloides		Antraquinonas, Antronas, Cumarinas	Terpenos, Esteroides, Saponinas, Açúcares, Fenóis, Taninos, Flavonoides		
	NP/PEG	Ninhydrina	Dragendorff	KI/I ₂	KOH	Liebermann Burchard	Sulfato Cérico	Vanilina Sulfúrica
Etanol	+++	+	-	-	+++	+++	+	+++
Hexano	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++

Nota: -: não identificado, +: pouco intenso, ++: intenso, +++: muito intenso.

Figura 22: Imagem das placas CCD: extrato hexânico (A) e extrato etanólico (B) aplicados na mesma placa CCD.



Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Figura 22 e na Tabela 3 os extratos possuem uma quantidade considerável de compostos de diferentes classes moleculares, destaca-se a presença de flavonoides observados nas machas de cor vermelha na placa revelada com NP-PEG o que pode indicar a presença das kavalactonas e cromononas descritas por Mazzeu (2014) e ilustrados na Figura 5 (exibida anteriormente no texto).

Os resultados observados nessa análise preliminar mostram que a espécie *Piper fuliginum* tem alto potencial como objeto de estudo para as análises propostas

nesse trabalho, já que seus extratos apresentam uma considerável gama de compostos de diferentes classes moleculares, aumentando assim a possibilidade de que eles possuam atividades biológicas relevantes para o trabalho.

5.3. Comparação entre os rendimentos de extração de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.

Os métodos de extração utilizados foram: extrato etanólico e hexânico obtidos via maceração, óleo essencial obtido via hidrodestilação e extrato obtido via extração com CO₂ supercrítico. Os rendimentos de extração observados se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Rendimentos de extração dos extratos de *P. fuliginum* e *P. macedoi*.

Espécie	Extrato	Tipo de Extração	Rendimento (%)
<i>Piper fuliginum</i>	Etanólico	Maceração	16,18 ± 0,58
	Hexânico	Maceração	5,89
	Óleo Essencial	Hidrodestilação	1,56 ± 0,23
	CO ₂ (40 °C, 250 bar)	CO ₂ Supercrítico	1,36 ± 0,28
	CO ₂ + Etanol (40 °C, 250 bar)	CO ₂ Supercrítico	2,33 ± 0,37
<i>Piper macedoi</i>	Etanólico	Maceração	11,20
	Hexânico	Maceração	6,81
	Óleo Essencial	Hidrodestilação	1,20 ± 0,03

A interpretação e comparação dos rendimentos de extração e cromatogramas dos extratos serão divididas em dois estudos:

- Estudo comparativo dos métodos de extração de *Piper fuliginum*.
 - Comparação entre os extratos obtidos via maceração, hidrodestilação e extração supercrítica.
 - Comparação entre as duas condições de extração supercrítica (com e sem adição de cossolvente).

- Estudo comparativo entre as espécies: *Piper fuligineum* e *Piper macedoi*.
 - Óleo essencial, extrato etanólico e extrato hexânico de ambas espécies.

5.3.1. Estudo comparativo dos métodos de extração de *Piper fuligineum*.

5.3.1.1. Comparação entre os extratos obtidos via maceração, hidrodestilação e extração supercrítica.

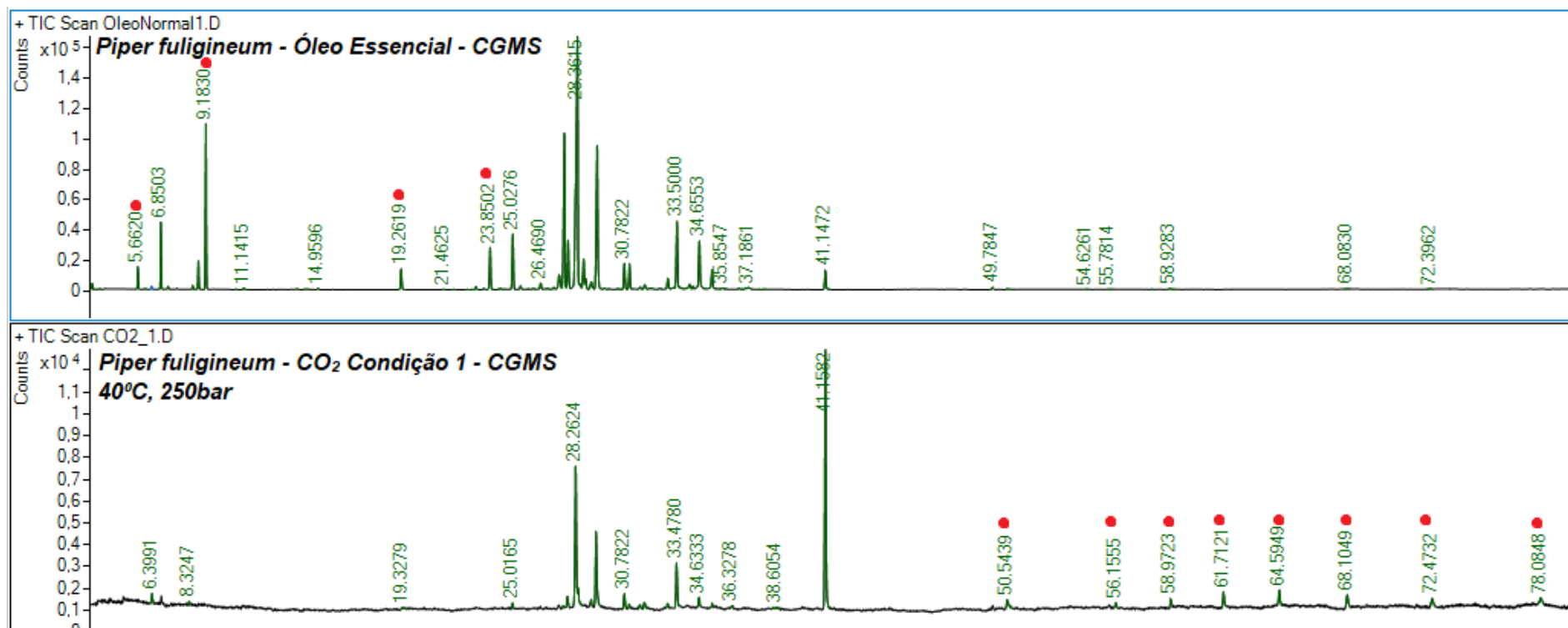
Neste estudo foram utilizados 3 métodos diferentes de extração: hidrodestilação, maceração e extração com fluido supercrítico. Foram utilizadas folhas de *Piper fuligineum* oriundas de uma só coleta, afim de assegurar que os dados obtidos fossem comparáveis. Isso porque as plantas assim como os outros seres vivos passam por diferentes estágios de desenvolvimento e são influenciadas pelo clima, incidência solar durante o ano e muitos outros fatores que interferem na produção e acúmulo dos metabolitos especiais nas diferentes partes da planta (MAHAJAN; KUIRY; PAL, 2020).

Os dados exibidos na Tabela 4 mostram que o rendimento de ambas condições supercríticas foi ligeiramente inferior ao observado na hidrodestilação. A adição de etanol como cossolvente de extração proporcionou um aumento de quase 100% no rendimento de extração, porém ainda assim seu rendimento foi muito inferior que o observado em uma maceração com etanol. Tais observações não são inesperadas, pois os estudos realizados com essa técnica apontam seus pontos fortes como a seletividade, velocidade de extração e a possibilidade de se obter um extrato puro sem a necessidade de uma etapa extra para remoção do solvente de extração, e não o rendimento.

Na Figura 23 se encontram os cromatogramas de GC-MS da extração via CO₂ supercrítico sem cossolvente e do óleo essencial de *Piper fuligineum*. Os destaques em vermelho nos picos são os compostos que são exclusivos a cada extratos. No cromatograma da extração com CO₂ constata-se a ausência de vários picos no começo do gráfico que estão presentes no óleo essencial, isso pode ser explicado devido ao material vegetal usado para extração do óleo estar fresco e o usado para extração supercrítica estar seco. A água presente nas folhas frescas pode danificar os componentes do extrator quando submetida as condições de extração supercrítica,

logo foi necessário secar o material vegetal afim de evitar danos aos equipamentos. O processo de secagem, além da água, remove parte dos compostos voláteis presentes na folha, logo é provável que a ausência de picos no começo do cromatograma corresponda a essa perda de composto voláteis de baixa massa molecular. Entretanto existem compostos que foram extraídos somente na extração supercrítica presentes na parte final do cromatograma, tais picos provavelmente devem corresponder a ácidos graxos comumente observados nessa técnica devido à sua afinidade ao solvente.

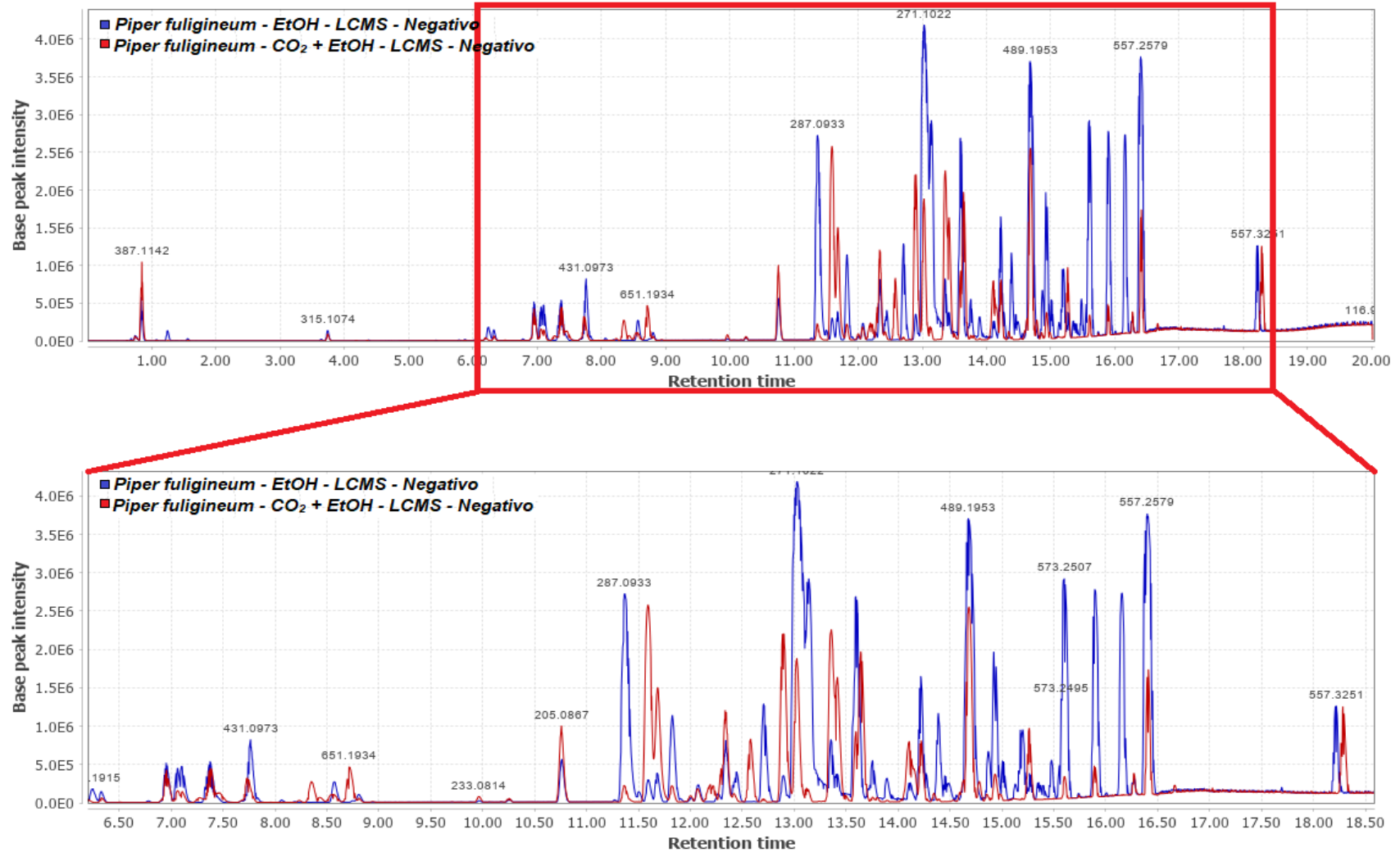
Figura 23: Cromatograma da análise por GC-MS do óleo essencial e extratos obtidos via condição 1 (40 °C, 250 bar) e condição 2 (60 °C, 180 bar) de CO₂ supercrítico.



Fonte: O autor.

Quando observamos os cromatogramas da análise por LC-MS mostrado na Figura 24 podemos perceber que a extração supercrítica com etanol como cossolvente se assemelha muito com o extrato obtido via maceração em etanol. Isso indica que a adição de etanol ao CO₂ foi capaz de mudar a polaridade do solvente de extração e extrair também os compostos polares, explicando o aumento no rendimento de extração, quando comparamos com o método usando apenas CO₂. Podemos observar também a existência de alguns picos únicos do extrato supercrítico bem como diferenças nas intensidades dos picos divididos pelos dois cromatogramas, ilustrando a capacidade da extração supercrítica em extrair compostos que não são possíveis de se obter em uma maceração convencional.

Figura 24: Cromatogramas sobrepostos da análise por LC-MS (modo negativo) do extrato etanólico e do extrato obtido via CO₂ supercrítico com cossolvente etanol.



Fonte: O autor.

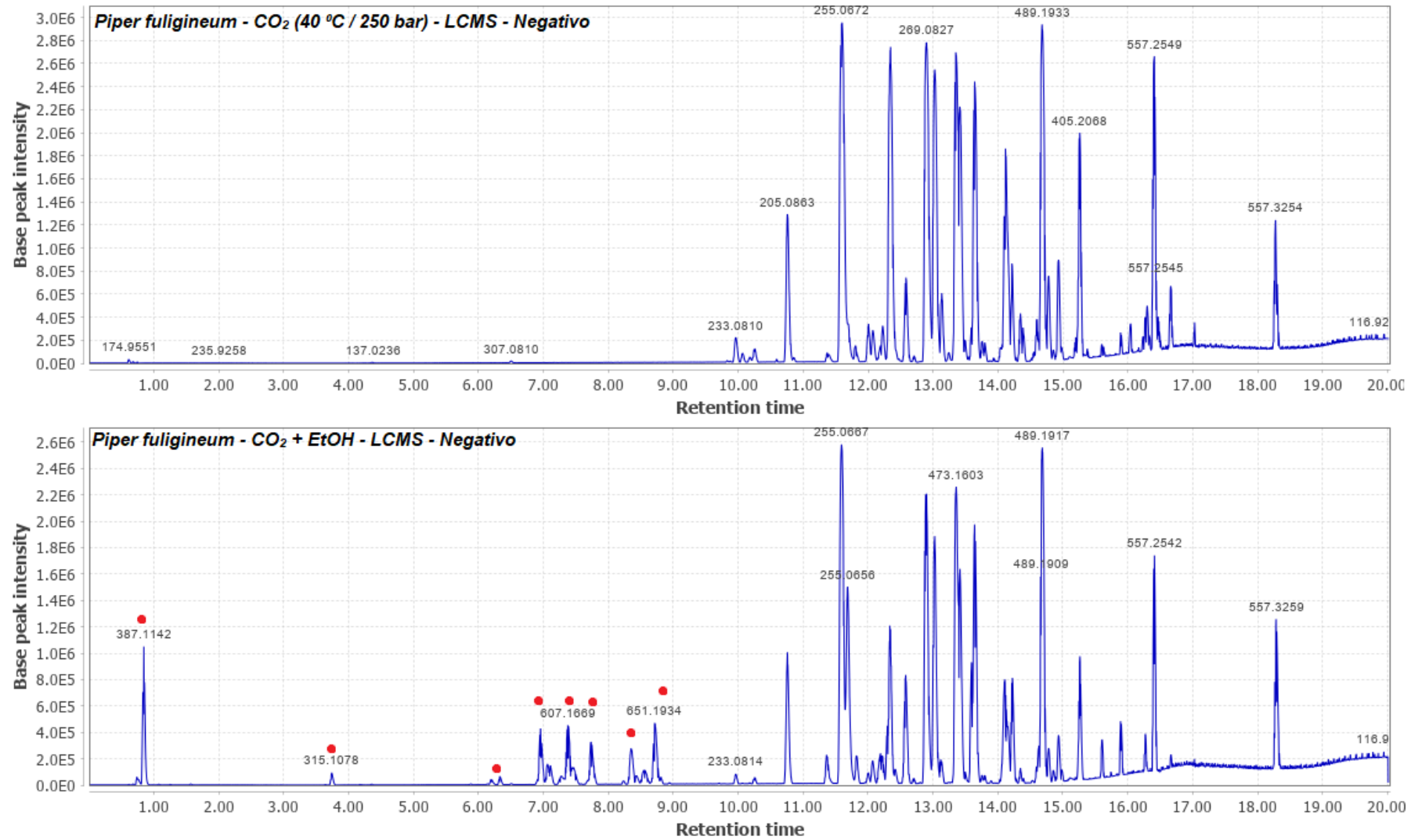
5.3.1.2. Comparação entre as diferentes condições de extração via CO₂ supercrítico.

Comparando os dados referentes a extração supercrítica presentes na Tabela 4 os rendimentos obtidos nos experimentos sem adição de cossolvente foram similares aos obtidos em um estudo realizado com *Piper regnelli* (LEMOS et al., 2012). A adição de etanol como cossolvente proporcionou um aumento considerável no rendimento de extração (71%), o etanol sendo um solvente polar foi capaz de solubilizar compostos não solubilizados pelo CO₂ explicando o aumento no rendimento.

Nas Figura 25 e 26 se encontram os cromatogramas da extração supercrítica convencional (experimento 1) e da extração com etanol como cossolvente (experimento 2). Observando os cromatogramas referentes ao experimento 2 é possível observar a presença de vários picos em seu início que não se encontram nos cromatogramas do experimento 1, entretanto boa parte dos picos presentes na extração supercrítica clássica existem também no extrato com cossolvente. Esse fato confirma a suposição feita acima de que a adição do EtOH foi capaz alterar a polaridade do solvente de extração. O interessante é que a mistura CO₂ e EtOH possibilitou a extração de compostos polares e apolares com um único processo.

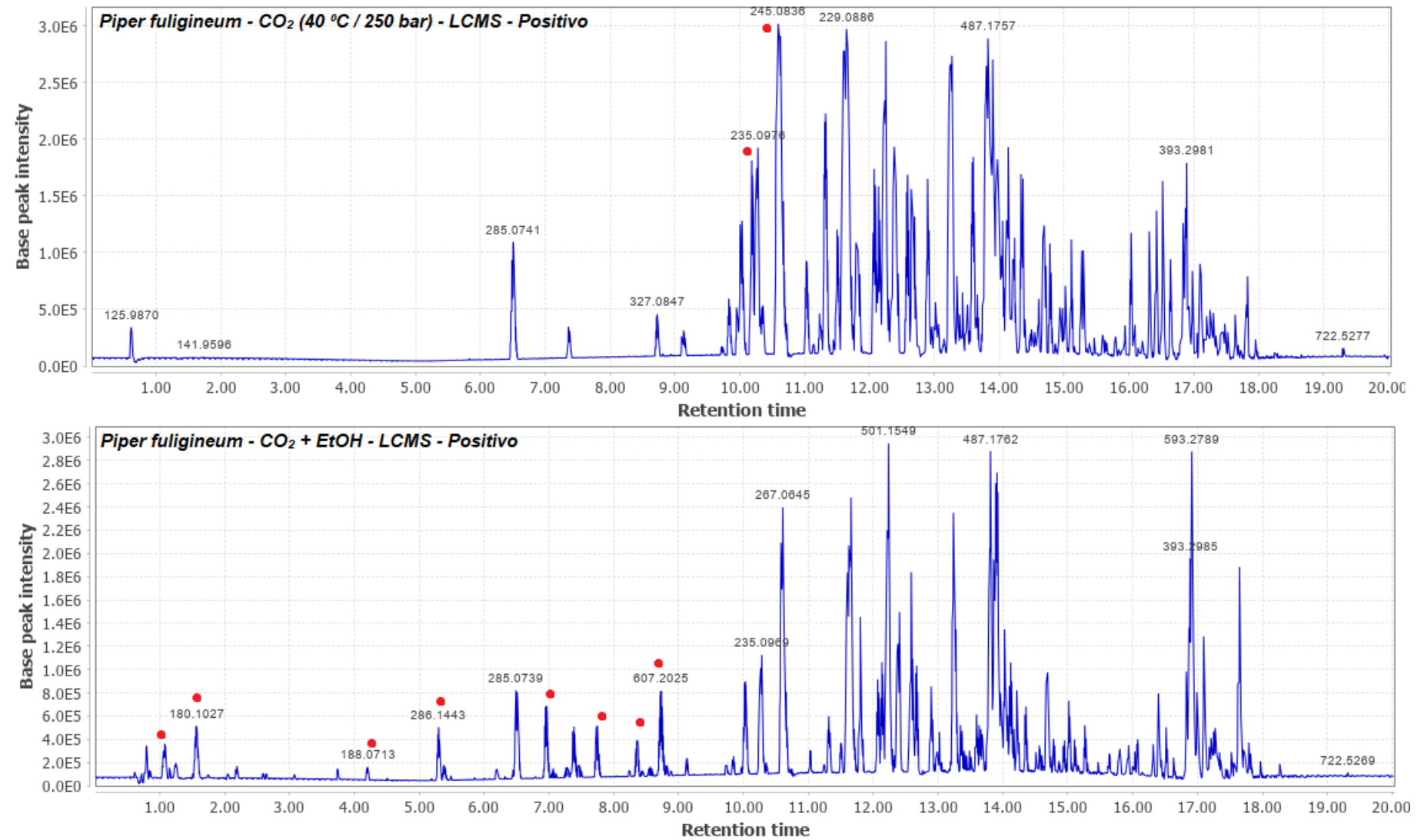
Apesar da extração ter sido realizada somente com uma condição de temperatura e pressão, tais observações ilustram a versatilidade dessa técnica de extração.

Figura 25: Cromatogramas de LC-MS (modo negativo) dos extratos em CO₂ supercrítico.



Fonte: O autor.

Figura 26: Cromatogramas de LC-MS (modo positivo) em modo negativo e positivo, dos extratos em CO₂ supercrítico.



Fonte: O autor.

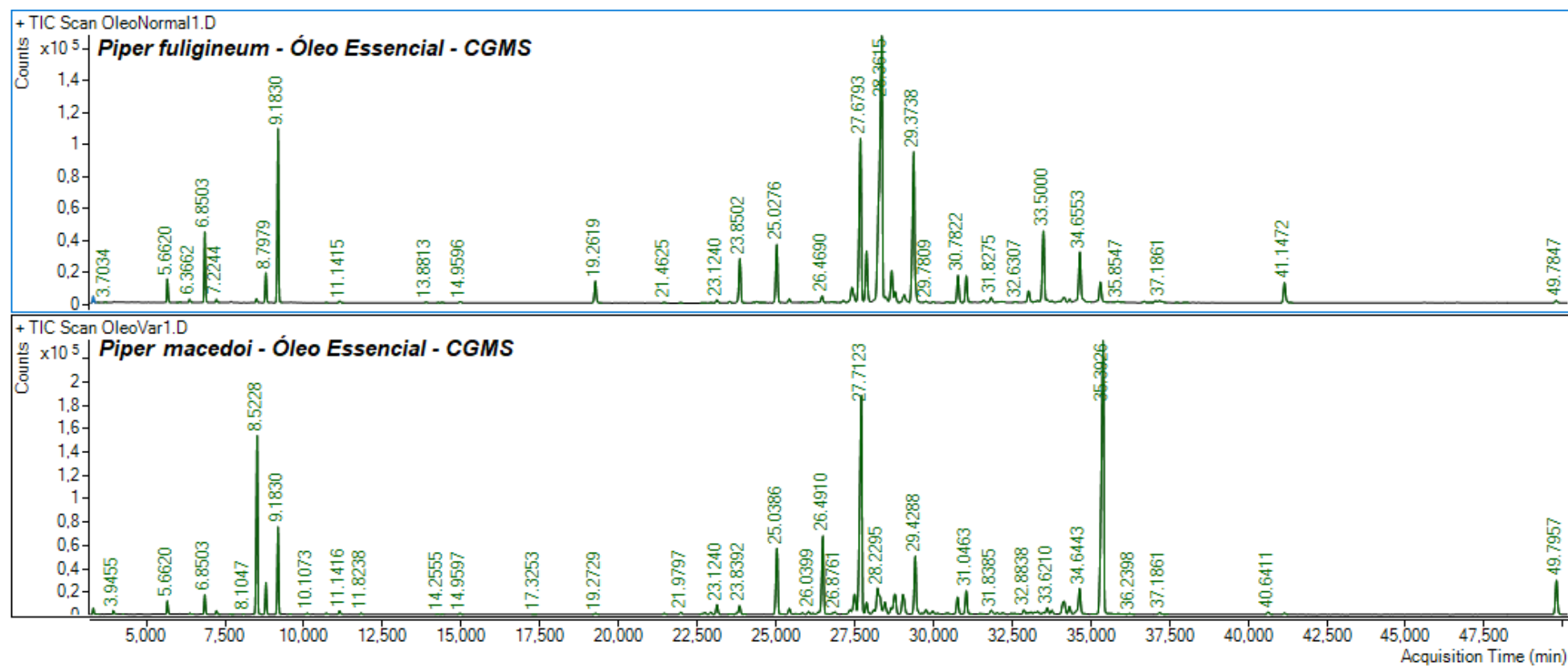
5.3.2. Estudo comparativo entre as espécies: *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.

Nos dados referentes aos extratos etanólicos, hexânicos e o óleo essencial presentes na Tabela 4 existe uma discrepância entre os rendimentos obtidos na extração via maceração e na hidrodestilação, *Piper fuliginum* possui um rendimento superior a *Piper macedoi* de 25 – 40% menos na maceração em hexano onde o contrário foi observado. Tais diferenças são provavelmente oriundas do metabolismo de cada uma das plantas, onde existe um acúmulo maior de ativos nas folhas da primeira planta do que na segunda. O maior rendimento de *Piper macedoi* na maceração em hexano pode indicar um acúmulo maior de compostos apolares como terpenos e seus derivados.

Comparando com os dados da literatura, Mazzeu (2014) obteve um rendimento de 12,95% em sua maceração etanólica das folhas de *Piper fuliginum* o que é inferior ao rendimento obtido neste trabalho. Entretanto tal diferença é esperada tendo em vista que a metodologia aplicada por Mazzeu consiste em 3 macerações com duração de apenas 30 minutos, e realizada neste presente estudo consiste em 3 macerações de 48 horas (MAZZEU, 2014).

O rendimento da extração do óleo essencial de *Piper macedoi* também foi superior ao encontrado na literatura, onde Oliveira (2016), Dos Santos (2021) e Bezerra (2022) obtiveram um rendimento de apenas 0,4% em contraste ao rendimento de 1,20% observado aqui. Tal diferença pode ser atribuída ao refluxo de apenas 2 horas na hidrodestilação, enquanto foi usado um refluxo de 4 horas neste trabalho (BEZERRA et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2016).

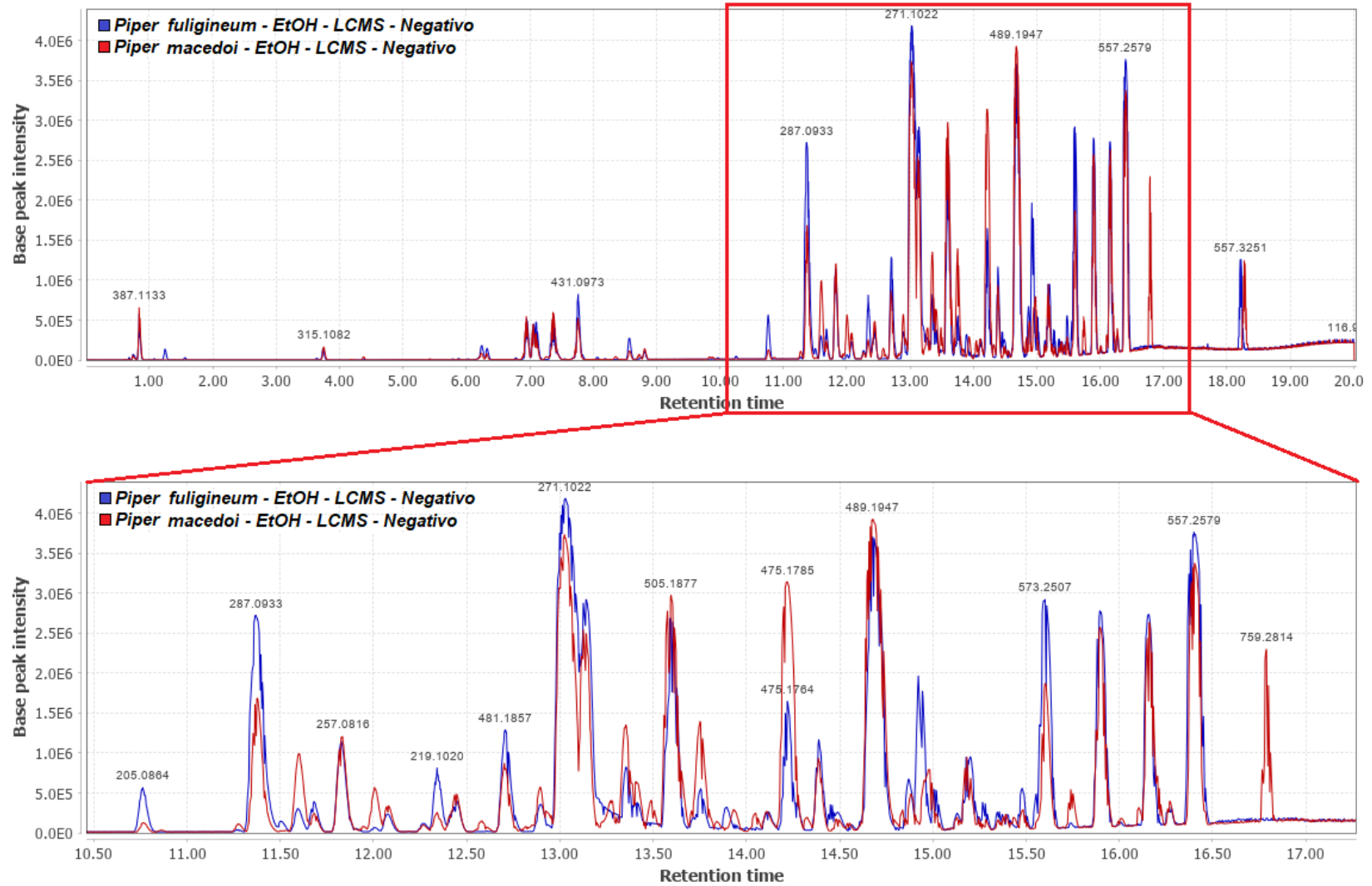
As variações observadas nos rendimentos de extração indicam que *Piper macedoi* e *Piper fuliginum* possuem diferenças em seu metabolismo, apesar de possuírem grande similaridade genética como discutido anteriormente. Observando o perfil cromatográfico da análise por GC-MS dos óleos essenciais (Figura 27) existe uma clara diferença nos cromatogramas dos óleos essenciais das duas espécies. Onde os picos majoritários presentes em cada uma das amostras possuem tempos de retenção diferentes sendo um ótimo indicativo para que a composição dos óleos seja diferente para cada uma das plantas.

Figura 27: Cromatogramas da análise por GC-MS dos óleos essenciais de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.

Fonte: O autor.

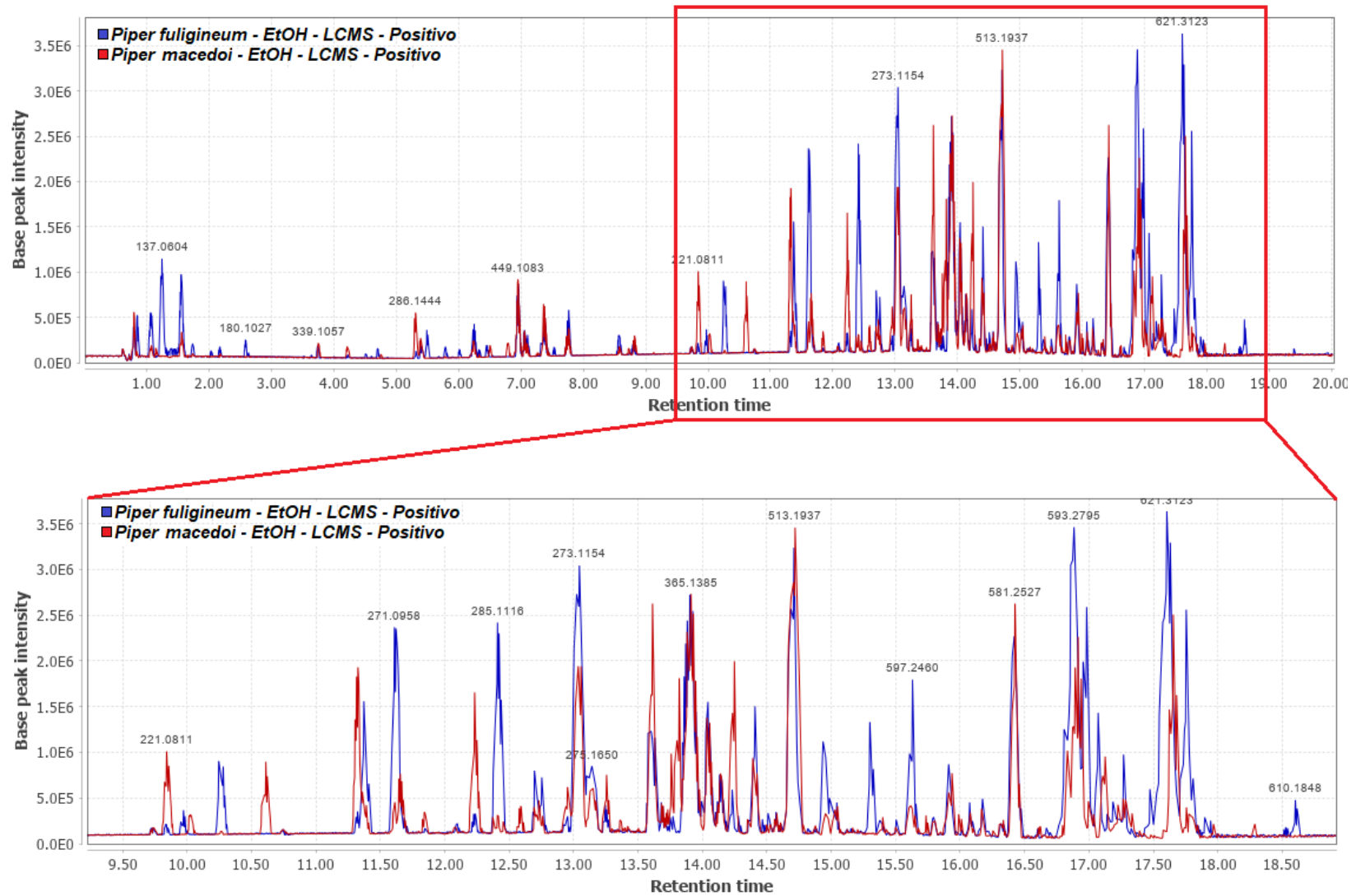
Quando observamos os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos (Figuras 28 e 29) e dos extratos hexânicos (Figuras 30 e 31) podemos observar uma tendência similar a observada nos óleos essenciais. As duas plantas, apesar de muito próximas geneticamente e estarem presentes no mesmo ecossistema, são capazes de produzir metabólitos especiais exclusivos a cada uma das espécies.

Figura 28: Cromatogramas da análise por LC-MS (modo negativo) dos extratos etanólicos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.



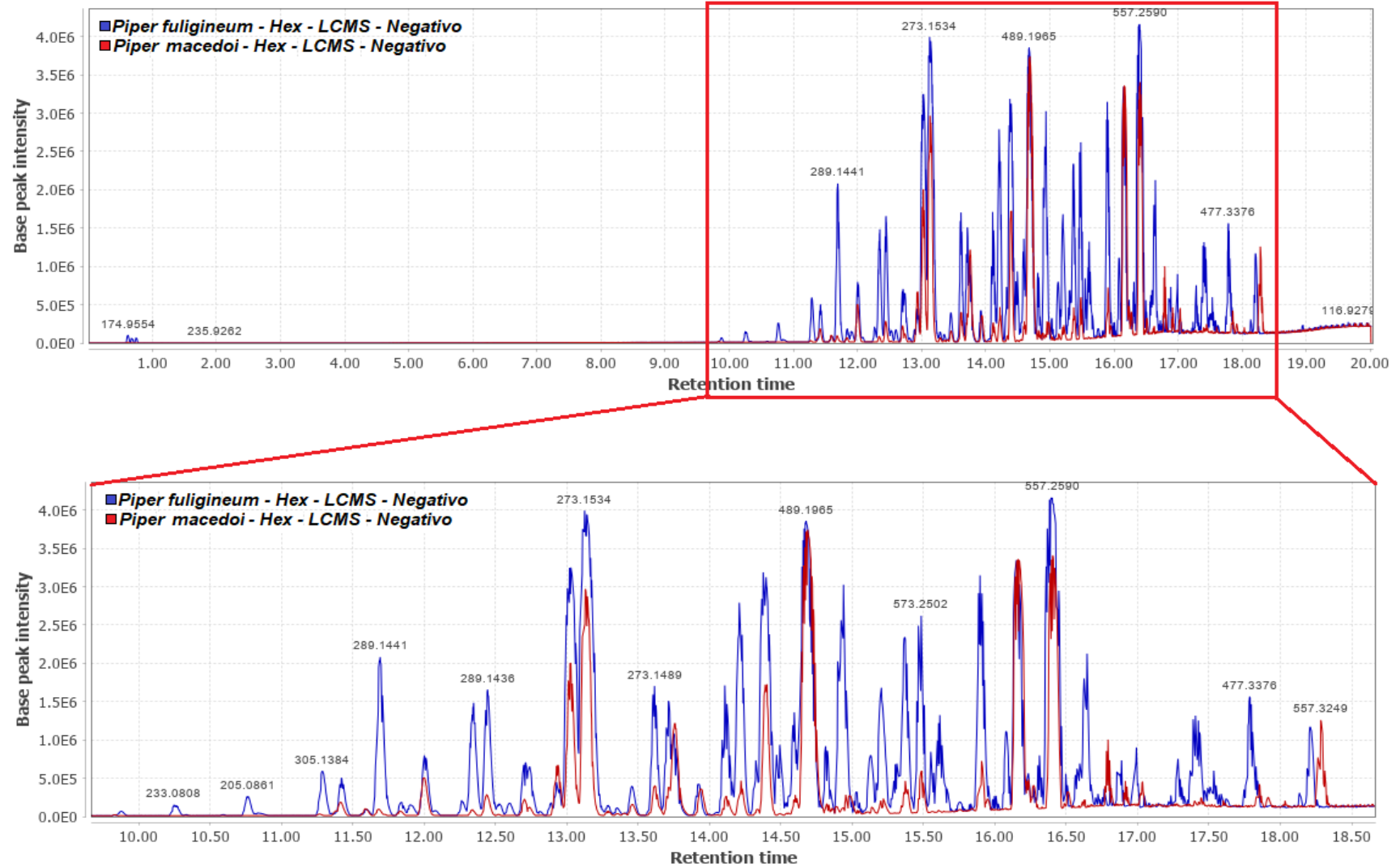
Fonte: O autor.

Figura 29: Cromatogramas da análise por LC-MS (modo positivo) dos extratos etanólicos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.



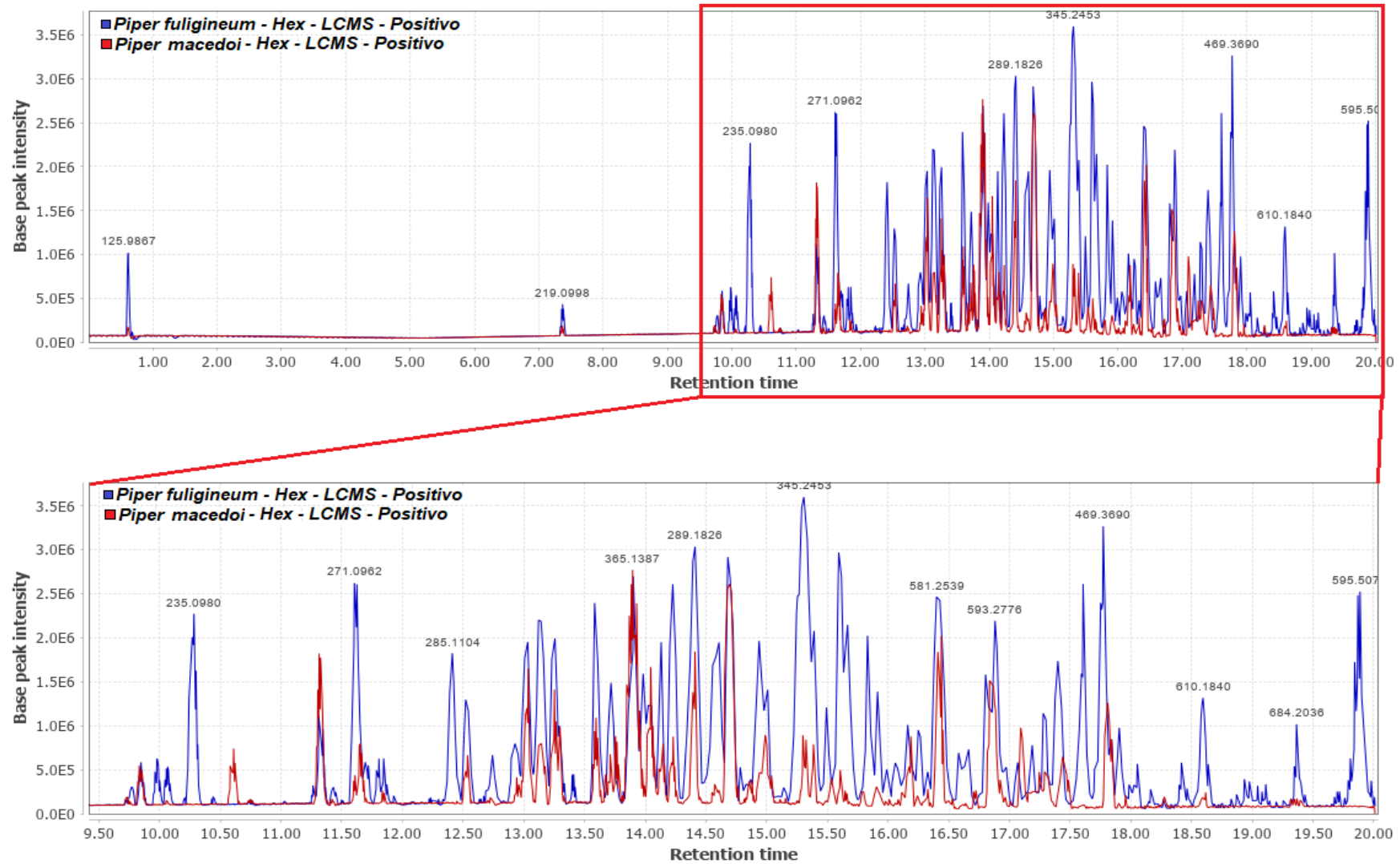
Fonte: O autor.

Figura 30: Cromatogramas da análise por LC-MS (modo negativo) dos extratos hexânicos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.



Fonte: O autor.

Figura 31: Cromatogramas da análise por LC-MS (modo positivo) dos extratos hexânicos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.



Fonte: O autor.

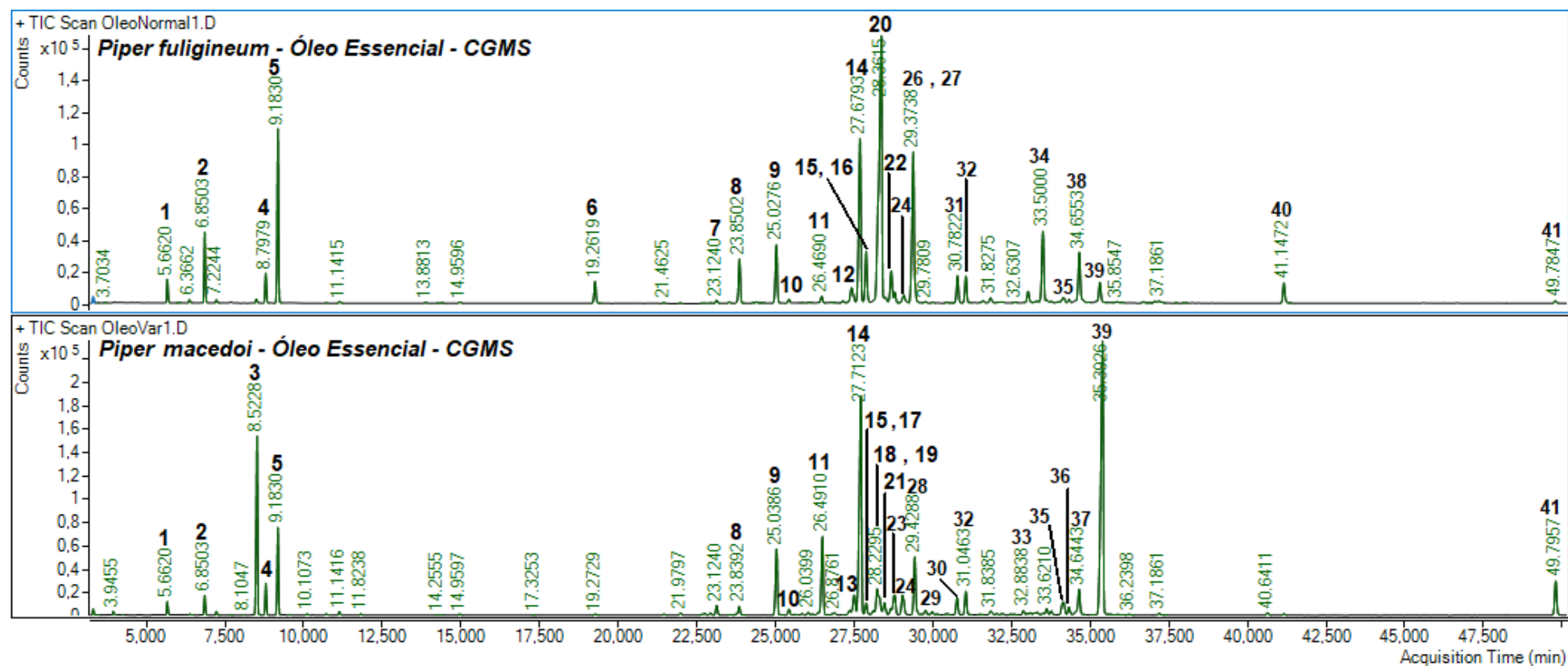
5.4. Identificação dos compostos presentes nos extratos.

5.4.1. Identificação via GC-MS.

A técnica de GC-MS foi utilizada para a análise dos compostos presentes nos óleos essenciais. Para a identificação foi utilizado o software Unknows da Agilent afim de realizar a comparação dos espectros de fragmentação com os espectros presentes na biblioteca NIST 2017. Além do *score* de similaridade entre espectro detectado com o espectro da biblioteca foi utilizado o Índice Aritmético para aumentar a confiabilidade da identificação do composto.

Para a identificação dos compostos foram filtrados somente os que possuíam um *score* de comparação com a biblioteca acima de 60 e uma área de pico acima de 100 unidades, afim de manter somente os compostos com maior confiabilidade em sua identificação.

Figura 32: Cromatograma de GC-MS do óleo essencial de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.



Fonte: O autor.

Tabela 5: Compostos identificados via GC-MS no óleo essencial de *Piper fuliginum* (Pf) e *Piper macedoi* (Pm). Compostos comuns a ambas espécies estão destacados em negrito

(continua)

Composto	Pf	Pm	Nº pico	Tr	Score	AlE	AlT
alpha-Pinene	X		1	5.66	87.2	932	932
		X	1	5.66	83.3	932	932
beta-Pinene	X		2	6.85	93.8	976	974
		X	2	6.85	88.9	976	974
D-Limonene		X	3	8.52	97.4	1028	1024
trans-beta-Ocimene			4	8.80	93.1	1035	1032
	X		4	8.80	89.7	1035	1032
beta-Ocimene		X	5	9.18	96.7	1046	1044
	X		5	9.18	97.0	1046	1044
Safrole	X		6	19.27	95	1287	1285
alpha-Copaene		X	7	23.12	85.3	1375	1374
beta-Elemene		X	8	23.84	83.7	1391	1389
	X		8	23.85	92.9	1391	1389
Caryophyllene	X		9	25.03	94.6	1419	1417
		X	9	25.04	95.0	1419	1417
beta-Copaene		X	10	25.42	80.0	1428	1430
	X		10	25.42	72.4	1428	1430
Humulene	X		11	26.46	78	1452	1452
		X	11	26.49	95.0	1453	1452
beta-Selinene	X		12	27.42	87.7	1475	1489
gamma-Amorphene		X	13	27.50	90.8	1477	1495
beta-Copaene*	X		14	27.68	95.3	1481	1430
		X	14	27.71	95.8	1482	1430
gamma-Gurjunene	X		15	27.87	87	1485	1475
		X	15	27.88	88.5	1486	1475
Valencene	X		16	27.88	93.7	1486	1496
Eremophilene		X	17	27.88	85.2	1486	-
Cadina-3,5-diene		X	18	28.11	73.5	1491	-
beta-Guaiene		X	19	28.23	91.3	1494	1492
Myristicin*	X		20	28.38	92	1497	1517
alpha-Muurolene		X	21	28.46	87.9	1499	1500
gamma-Elemene	X		22	28.68	90.6	1505	1434
Ylangene		X	23	28.78	82.9	1507	1419
alpha-Farnesene		X	24	28.79	82.5	1507	1505
	X		24	28.79	81	1507	1505

Tabela 5: Compostos identificados via GC-MS no óleo essencial de *Piper fuliginum* (Pf) e *Piper macedoi* (Pm). Compostos comuns a ambas espécies estão destacados em negrito

(conclusão)							
Composto	Pf	Pm	Nº pico	Tr	Score	Al _E	Al _T
gamma-Cadinene		X	25	29.03	91.1	1513	1513
Cubebol	X		26	29.09	81	1515	1514
Myristicin	X		27	29.41	98	1522	1517
delta-Amorphene		X	28	29.43	93.4	1523	1511
trans-Cadina-1,4-diene		X	29	29.77	77.1	1531	1533
Germacrene B		X	30	30.77	89.6	1556	1559
Elemicin	X		31	30.78	94	1556	1555
Nerolidyl acetate	X		32	31.05	88.0	1563	1676
		X	32	31.05	87.5	1563	1676
cis-Z-alpha-Bisabolene epoxide		X	33	32.87	74.1	1608	-
Apiol	X		34	33.51	93	1625	1677
epi-alpha-Cadinol		X	35	34.15	86.0	1641	1638
	X		35	34.16	70.6	1641	1638
beta-Copaene*		X	36	34.33	83.4	1646	1430
alpha-Cadinol		X	37	34.66	90.7	1654	1652
Azuleno A**	X		38	34.66	91.4	1654	-
Ácido benzoico A**	X		39	35.30	82	1671	-
		X	39	35.43	87.8	1674	-
Benzofurano A**	X		40	41.15	67.2	1829	-
Diazepina A**	X		41	49.78	74	2086	-
		X	41	49.80	78.6	2087	-

* Isômero do composto identificado não presente na biblioteca.

** Azuleno A = 1*H*-Cycloprop[e]azulene, 1*a*,2,3,5,6,7,7*a*,7*b*-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1*a*R-(1*alpha*,7*alpha*,7*beta*,7*b* *alpha*)]-; Ácido benzoico A = Benzoic acid, 4-(3-hydroxy-3-methyl-1-butynyl)-, methyl ester; Benzofurano A = 3-(6-Methoxy-3-methyl-2-benzofuranyl) propionic acid; Diazepina A = 4*H*-Benzo[*f*]pyrrolo[1,2-*a*] [1,4] diazepine, 4-cyclohexyl-8,9-diethoxy-5,6-dihydro-.

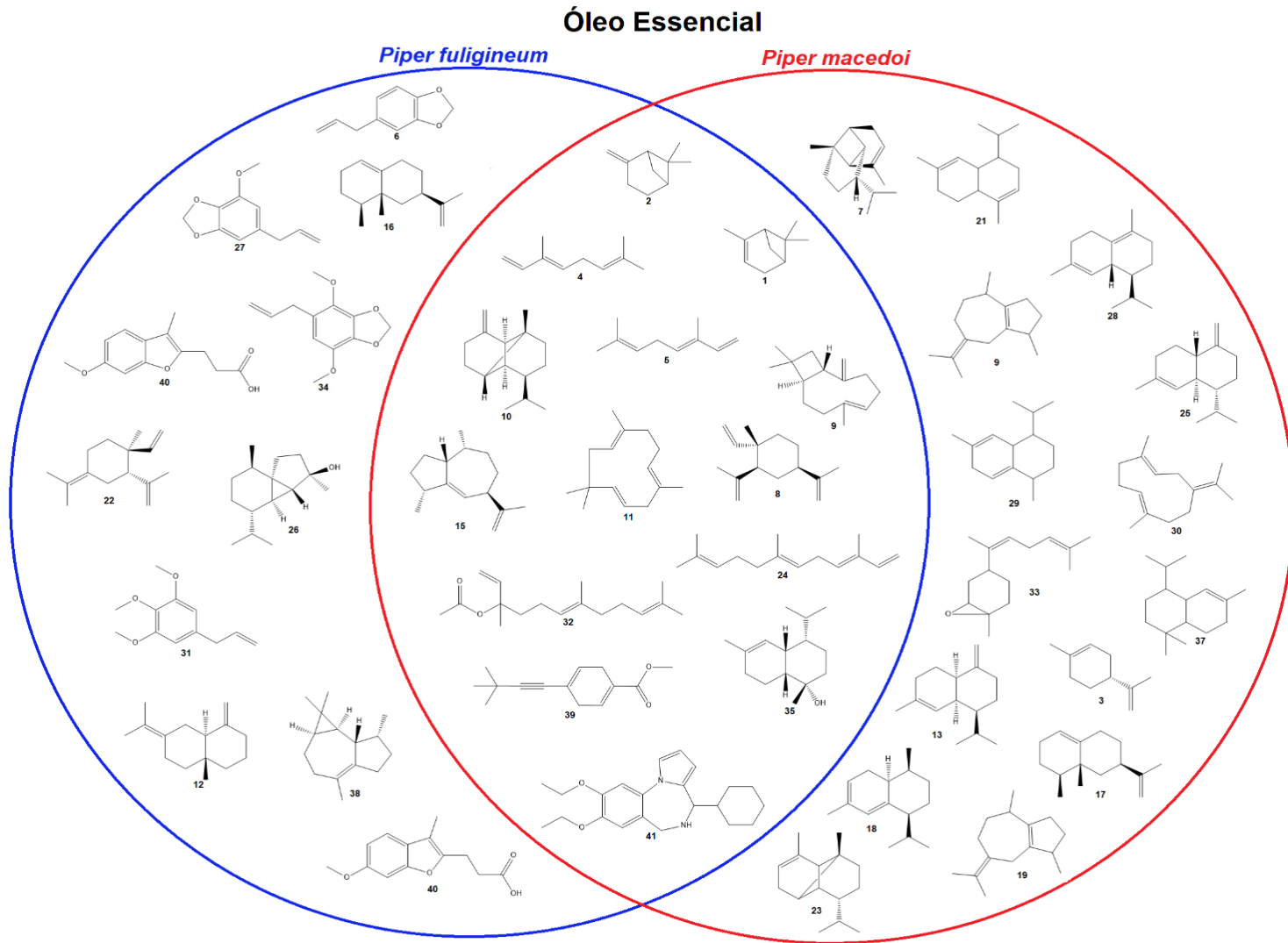
Comparando os compostos identificados em ambas espécies é possível perceber a mesma tendência observada nos cromatogramas, existem alguns compostos comuns a ambas espécies porém existe uma grande quantidade de compostos exclusivos a cada uma das plantas. A Figura 33 ilustra essa diferença entre a composição dos óleos essenciais.

Comparando os compostos em comum as espécies temos alguns monoterpenos (α -Pineno, β -Pineno, *trans*- β -Ocimeno e β -Ocimeno) e sesquiterpenos (β -Elemeno, Carofileno, β -Copaeno e Humuleno).

Analisando as moléculas exclusivas a *Piper fuliginum* percebemos que grande parte delas pertencem a classe dos fenilpropanoides. A presença desses compostos podem servir como marcadores dessa espécie já que outros estudos mostraram a presença de outros fenilpropanoides em extratos etanólicos (MAZZEU et al., 2017). Krinski et al. (2018), em seus estudos sobre o óleo essencial de *Piper fuliginum*, encontrou cinco sesquiterpenos (Biciclogermacreno, delta-Cadeneno, Spathuleno e Thujopsan-2-alfa-ol) e dois derivados de fenilpropanoides (Asaricine e Dillapiol). Apesar desses compostos não terem sido encontrados neste estudo existe uma alta similaridade nas estruturas desses derivados de fenilpropanoides com os encontrados.

Analisando os compostos exclusivos a *Piper macedoi* observamos uma grande quantidade de sesquiterpenos e uma ausência de derivados de fenilpropanoides, indicando uma diferença no metabolismo dessas duas plantas. Observando a composição geral ela se assemelha bastante dos resultados observados por Oliveira et al. (2016) em um estudo sobre o óleo essencial dessa mesma espécie, onde foram encontrados monoterpenos (α -Pineno, β -Pineno, Limoneno) e sesquiterpenos (α -Copaeno, Carofileno, Humuleno, β -Selineno e Cubebol) entre outros também encontrados em nossas amostras.

Figura 33: Diagrama ilustrando as diferentes composições dos óleos essenciais de cada uma das espécies.



Fonte: O autor.

Tabela 6: Compostos identificados via LC-MS nos extratos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.

(continuação)

Composto	<i>P. fuliginum</i>				<i>P. macedoi</i>		Nº
	EtOH	Hex	CO ₂ 1	CO ₂ 2	EtOH	Hex	
7,2',3'-Trihydroxy-4'-methoxy-isoflavan	X			X	X		54
Apigenin-7-O- α -L-galactopyranoside	X						55
Arnebifuranone					X		56
Arnebinone		X					57
Bavachin(Corylifolin)		X					58
Benzopyran derivative II	X	X	X				59
Bletilol A					X		60
Cadambine	X				X	X	61
Chloranthalactone E				X			62
Cumambrin A		X					63
Dendrocandin B					X		64
Desmetoxyagonina				X			65
Diosmin					X		66
Esculentoside D						X	67
Evodionol						X	68
Furoaloesone			X	X	X		69
Grosvenorine			X	X			70
Helenalin		X					71
Heterodendrin					X		72
Interiorin A	X	X			X	X	73
Interiorin D	X	X	X	X	X		74
Jangomolide					X		75
Kadsurenin B	X	X					76
Kadsurenin F						X	77
Kaempferide-3-O-α-L-rhamnosyl-7-O-α-L-rhamnoside				X	X		78
Kaempferitrin				X			79
Kaempferol-7-O- α -L-rhamnoside					X		80
Kushenquinone A	X	X			X		81
Lobetyol		X					82
Mahuannin E			X				83
Marstenacigenin B		X					84

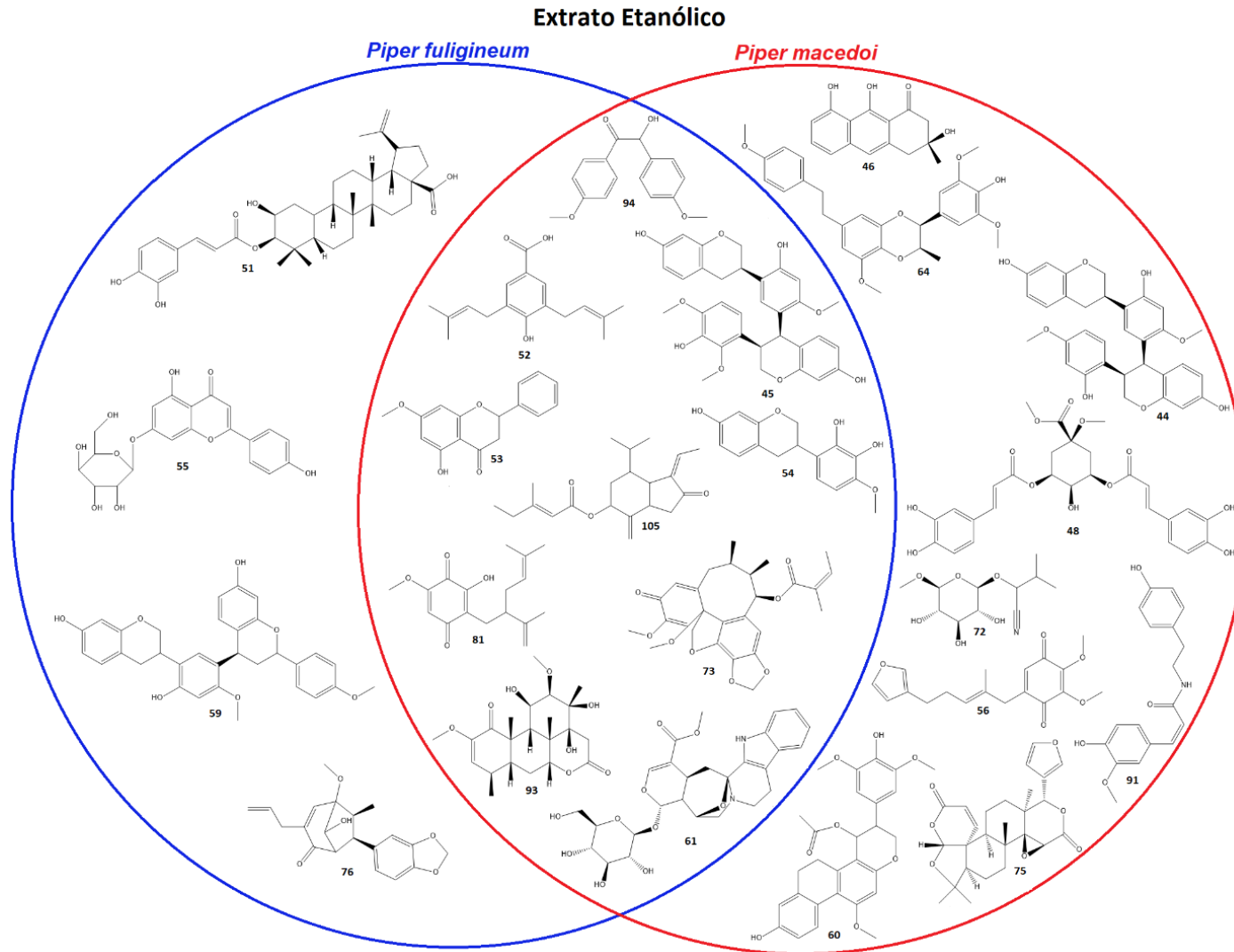
Tabela 6: Compostos identificados via LC-MS nos extratos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.

Composto	<i>P. fuliginum</i>				<i>P. macedoi</i>		Nº
	EtOH	Hex	CO ₂ 1	CO ₂ 2	EtOH	Hex	
Methyl 2,2-dimethyl-4-oxochromane-6-carboxylate			X		X	X	85
Methyl 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzoate		X	X	X	X	X	86
Methyl glycyrrhetate						X	87
Methyl kulonate		X					88
Methyl pachymate		X					89
Moracenin C					X	X	90
N-cis-Feruloyl tyramine					X		91
Nevadensin-7-O-[α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoside				X			92
Nigakilactone H	X		X	X	X	X	93
p-Anisoín	X	X	X	X	X	X	94
Phenthyl caffeate		X					95
Picrasidine M			X				96
Picrasidine U		X			X	X	97
Pinocembrin	X		X			X	98
Safflomin C					X		99
Schisantherin D						X	100
Shanciol E			X	X	X		101
Spinosin				X			102
Stigmastan-3,6-dione		X					103
Tectochrysin			X				104
Tussilagonone	X	X			X		105

EtOH = Maceração em etanol; Hex = Maceração em hexano; CO₂ 1 = Extração via CO₂ supercrítico, condição 1; CO₂ 2 = Extração via CO₂ supercrítico, condição 2.

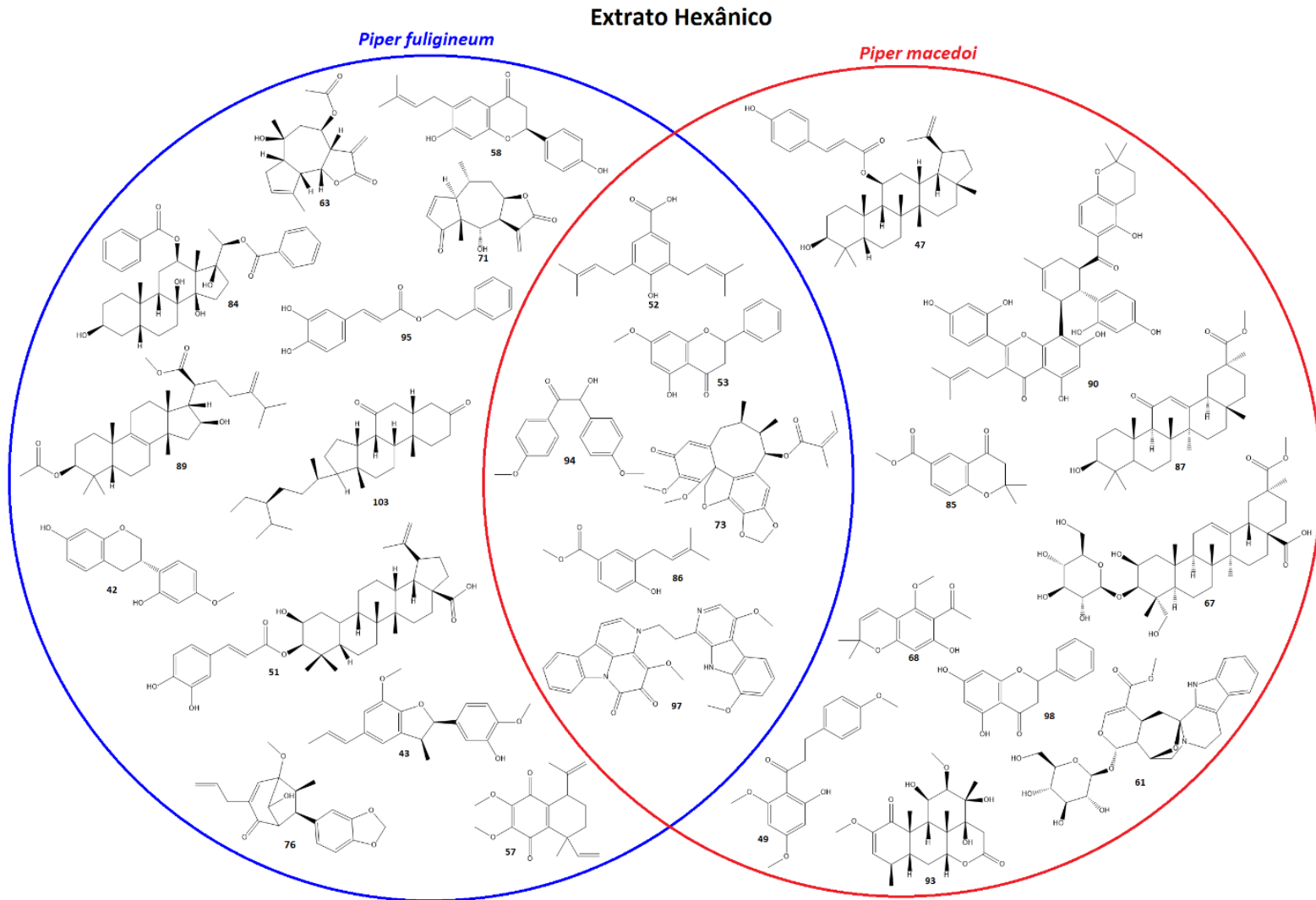
Comparando os compostos identificados na análise de cromatografia líquida observamos a mesma tendência existente nos compostos presentes no óleo essencial. Existe uma quantidade considerável de compostos presentes em ambas espécies, porém existem compostos que são exclusivos a cada uma delas. Foi possível também encontrar alguns dos compostos descritos por Mazzeu (2014), sendo eles os derivados de ácido benzoico 85 e 86 e a Kavalactona 65. As Figuras 34 e 35 abaixo ilustram a distribuição dos compostos encontrados nos extratos etanólicos e hexânicos entre as espécies *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*.

Figura 34: Diagrama ilustrando as diferentes composições dos extratos etanólicos de cada uma das espécies.



Fonte: O autor.

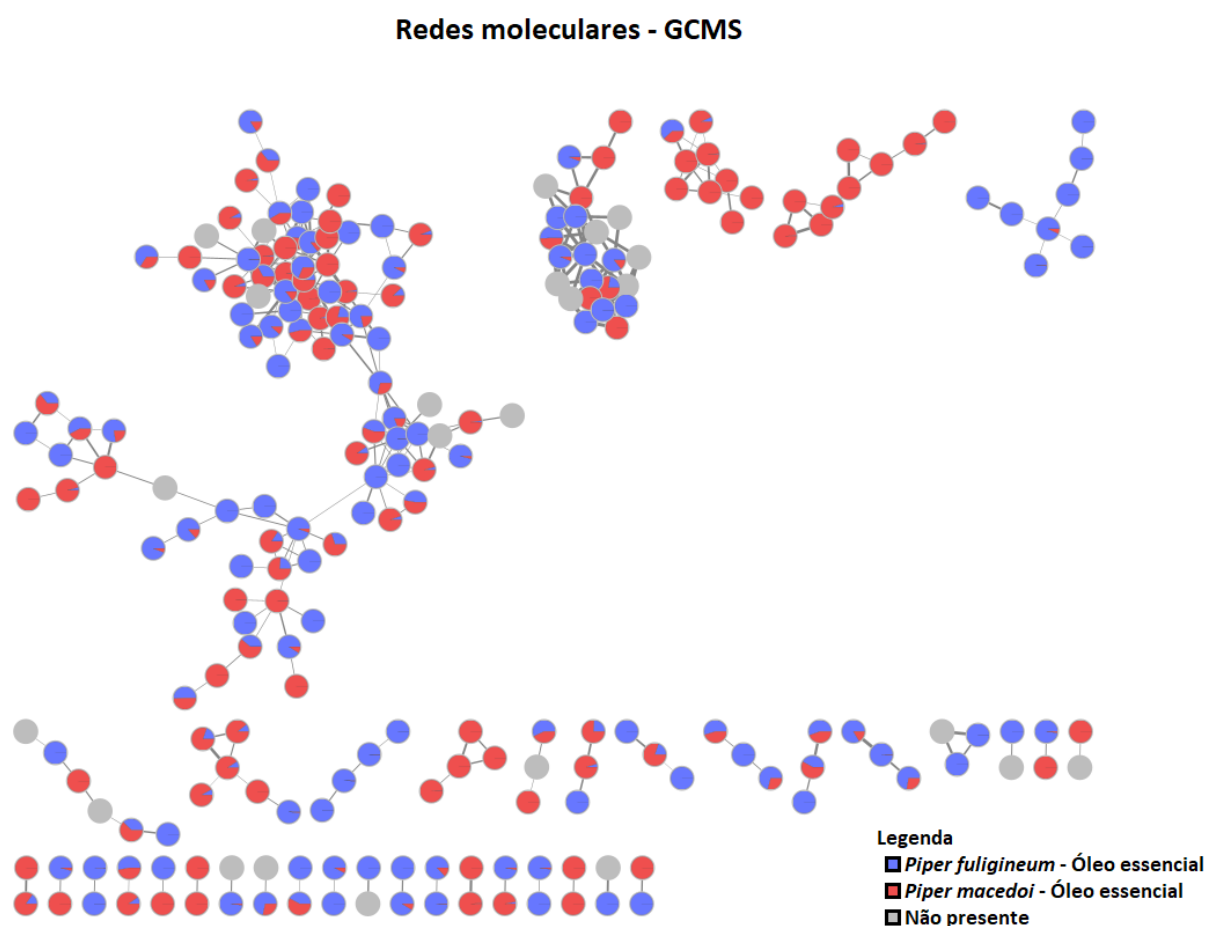
Figura 35: Diagrama ilustrando as diferentes composições dos extratos hexânicos de cada uma das espécies.



5.5. Redes moleculares GNPS.

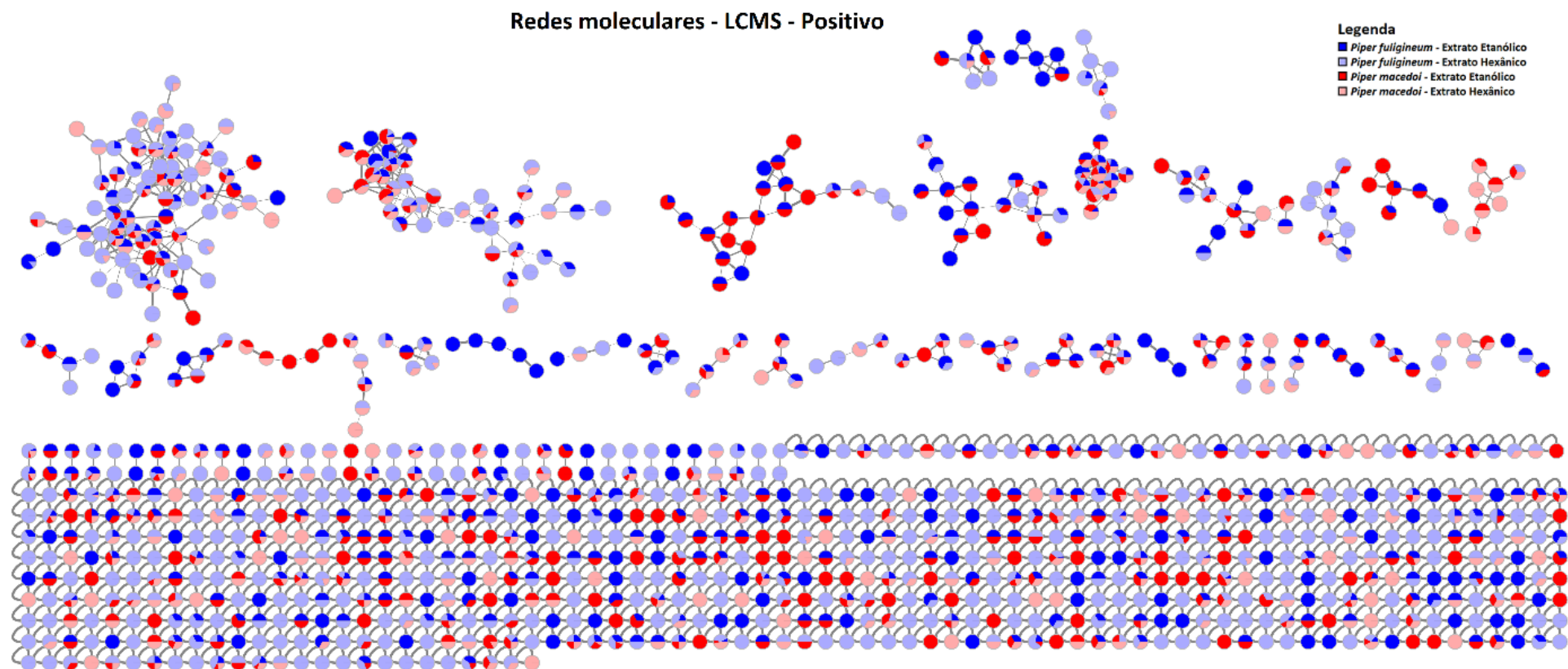
Foram realizadas 3 análises de molecular networking envolvendo os óleos essenciais e extratos etanólicos e hexânicos de ambas espécies. As análises foram divididas de acordo com maneira que os dados de espectrometria de massas foram adquiridos. A primeira rede foi criada somente com os dados obtidos via cromatografia gasosa, e as outras duas com os dados de cromatografia líquida, separando o modo de ionização positivo e negativo. As Figuras 36, 37 e 38 trazem as redes moleculares em sua totalidade.

Figura 36: Redes moleculares geradas pela plataforma GNPS com os dados de GC-MS.



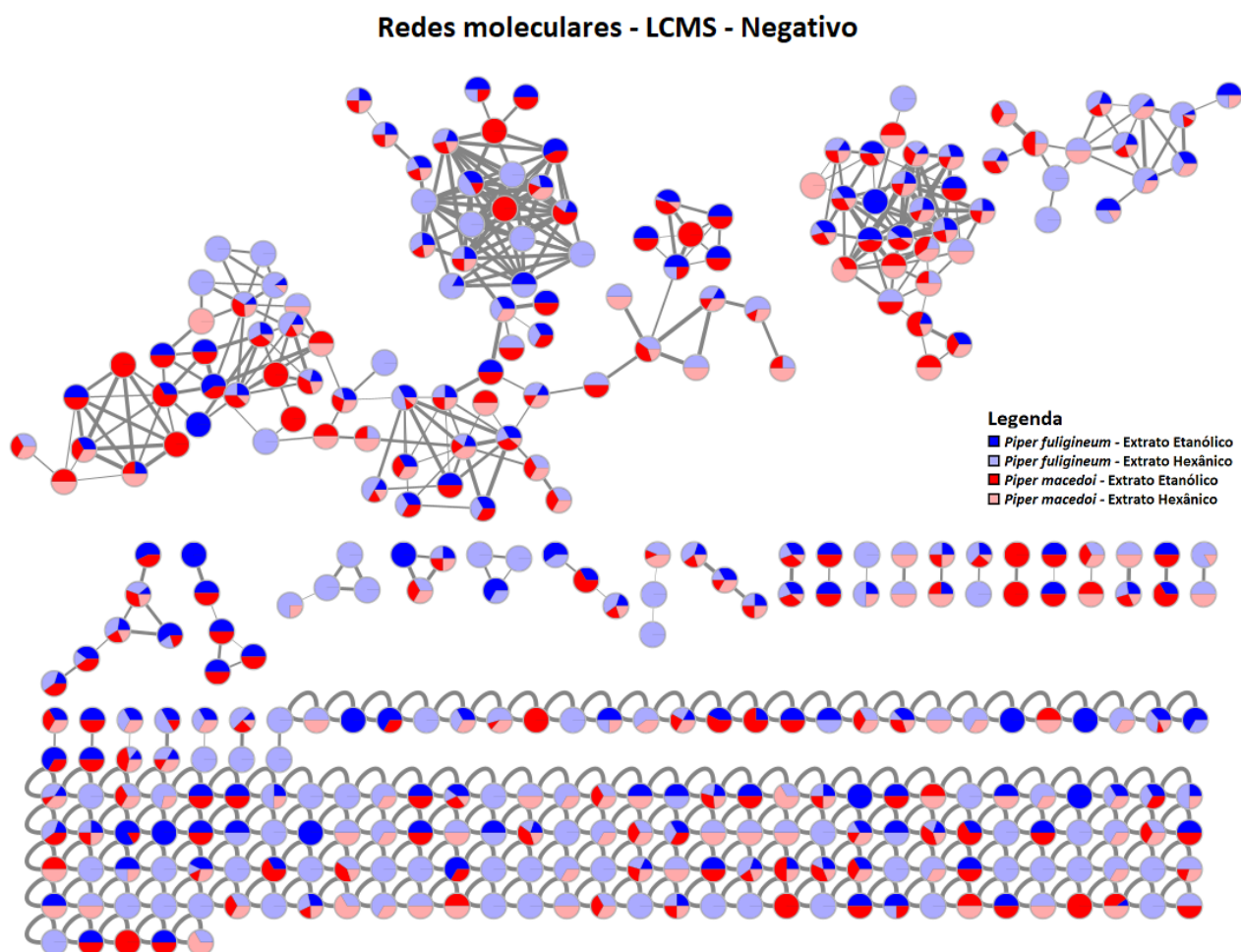
Fonte: O autor.

Figura 37: Redes moleculares geradas pela plataforma GNPS com os dados de LC-MS com ionização em modo positivo.



Fonte: O autor.

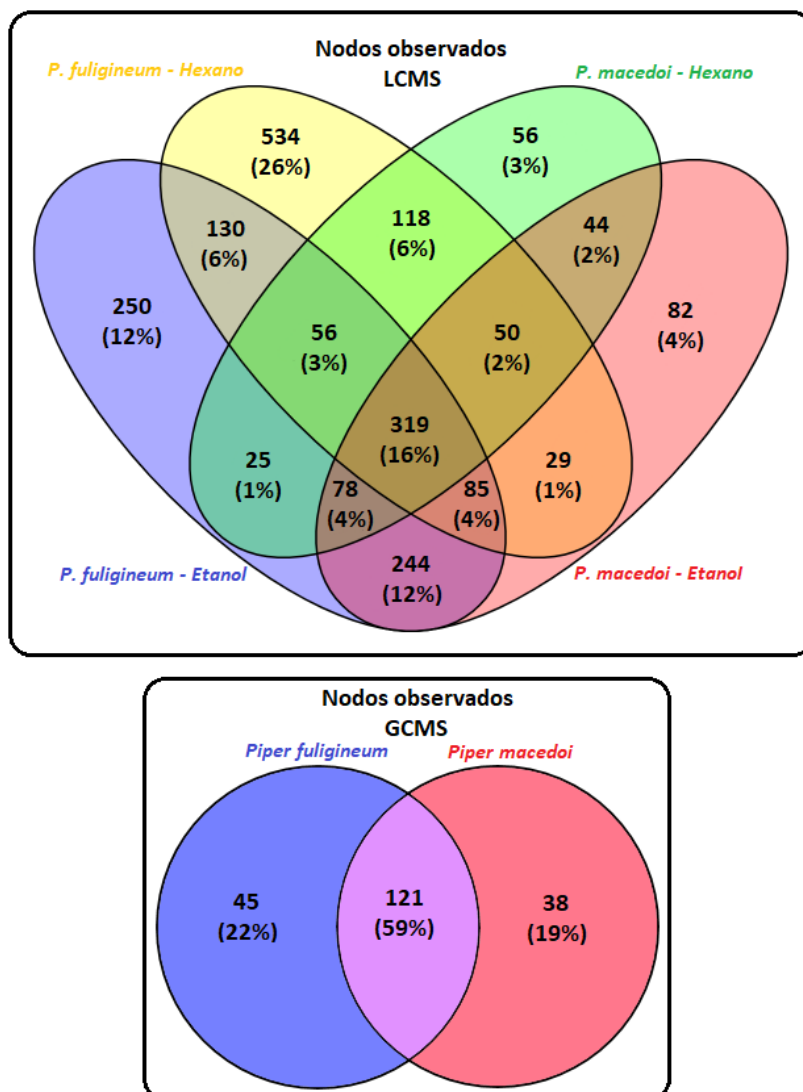
Figura 38: Redes moleculares geradas pela plataforma GNPS com os dados de LC-MS com ionização em modo negativo.



Fonte: O autor.

Cada um dos círculos presente nas redes moleculares é chamado de nodo, que são os espectros de um mesmo composto agrupados pelo algoritmo da plataforma, logo cada nodo representa um composto diferente. Nota-se então a mesma tendência observada nas outras análises onde existem uma grande quantidade de compostos comuns a ambas espécies, porém existe uma quantidade notável de compostos únicos a cada espécie. Os diagramas de Venn na Figura 39 trazem as distribuições desses compostos em cada amostra.

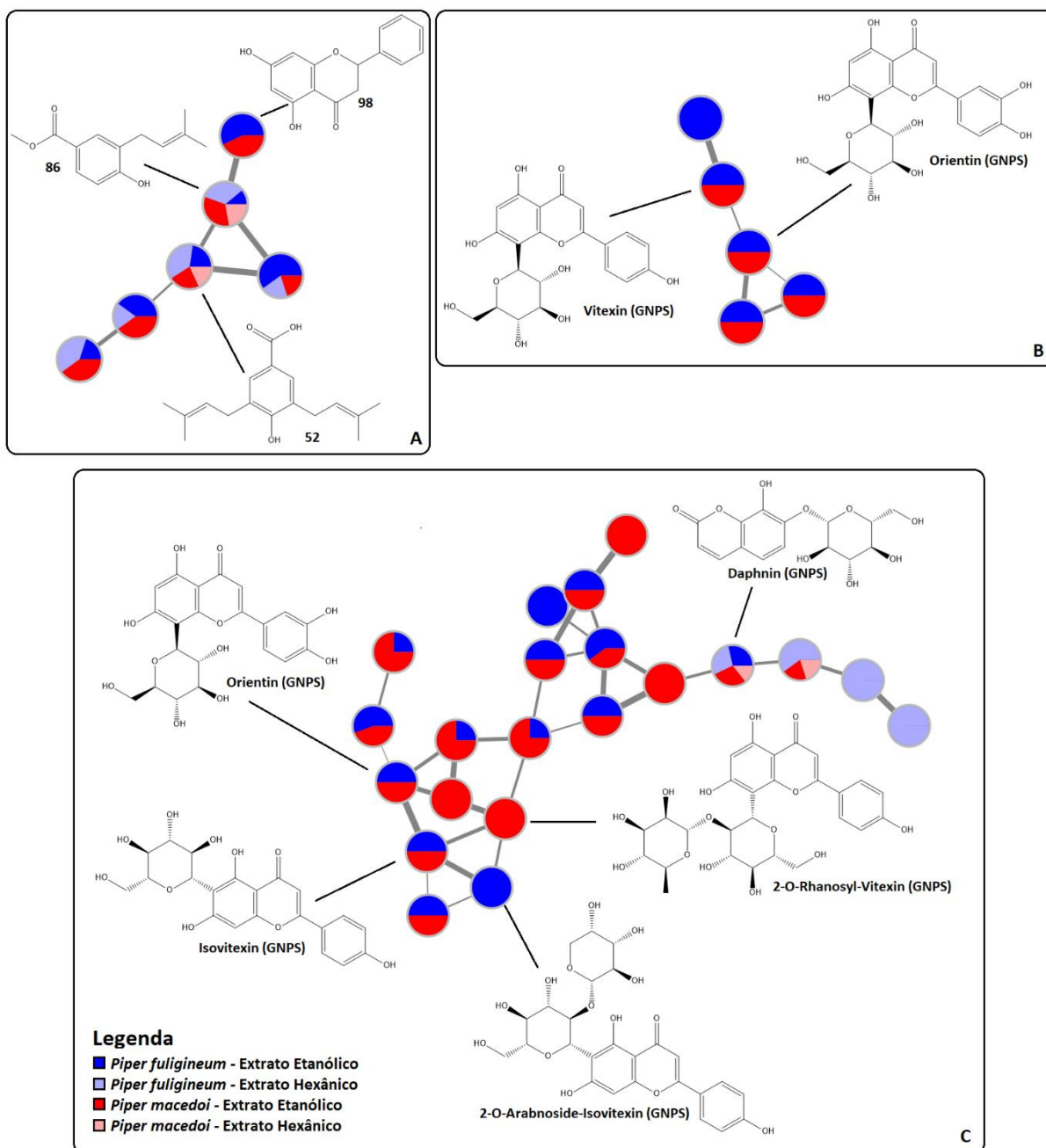
Figura 39: Diagramas de Venn indicando a distribuição dos nodos entre as amostras analisadas.



Fonte: O autor.

Na Figura 40 foram selecionadas algumas redes moleculares que representam algumas famílias moleculares presentes nas espécies de estudo deste trabalho.

Figura 40: Redes moleculares identificadas.



Fonte: O Autor.

Cruzando as identificações obtidas pelo software Unifi com as redes moleculares e identificações obtidas pela plataforma GNPS foi possível identificar alguns dos nodos. Infelizmente devido as incompatibilidades encontradas com os arquivos gerados pelo software Masslynx da Waters e os softwares disponíveis para realizar a conversão de dados de .raw para .mzML, não foi possível a integração completa das duas análises. A conversão desses dados acabou gerando um leve

deslocamento não constante nos valores de m/z , dificultando a interligação das duas identificações.

Podemos observar na rede A uniu os compostos 86, 98 e 52 em uma mesma rede, indicando que esses compostos fragmentam de maneira similar. Logo podemos inferir que os outros nodos presentes nesta rede também devem possuir estrutura química similar.

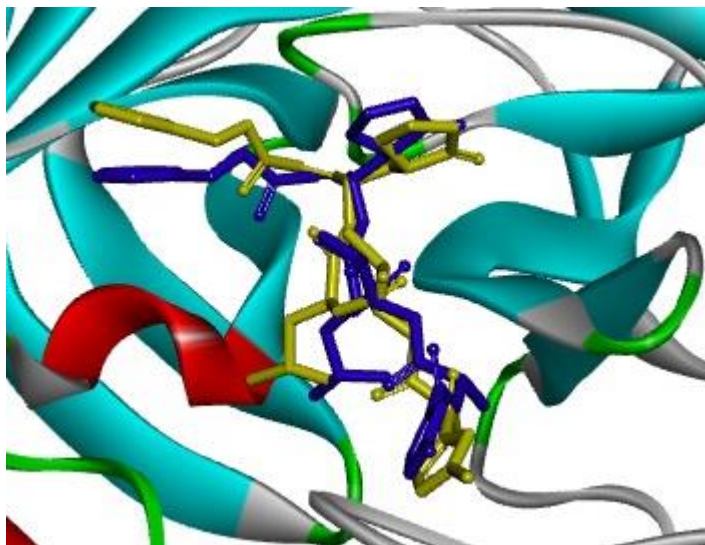
Já os metabólitos identificados nas redes B e C pertencem a classe dos flavonoides, sendo todos eles glicosilados. Essas duas redes se encontram separadas, apesar da similaridade de seus constituintes, devido ao fato da rede B ter sido observada no modo de ionização negativo e da rede C no modo de ionização positivo. Infere-se então que os outros compostos ainda não identificados presentes nestas redes são flavonoides com ligantes glicosilados.

5.6. Avaliação do potencial de inibição da protease Mpro dos compostos anotados nos extratos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* via *docking* molecular.

Afim de avaliar a potencial atividade dos metabólitos especiais produzidos pelas espécies de estudo desse trabalho contra o vírus SARS CoV-2 foi utilizada a técnica de *docking* molecular. O alvo desse para esta análise é a protease Mpro (ou 3CLpro) identificada como a principal protease para o funcionamento e replicação do vírus no corpo humano. Em conjunto com a ausência de enzimas com estrutura análoga presentes no corpo humano ela se torna um alvo ideal para a ação de fármacos no tratamento de pacientes de Covid-19 (PILLAIYAR et al., 2016).

Para a validação do protocolo utilizado no *docking* molecular, o re-*docking* do inibidor N3, co-cristalizado em conjunto com a Mpro (PDB: 6LU7), foi realizado utilizando o software AutoDock4 para validar as relações estrutura-atividade e usando o valor do RMSD (desvio quadrático médio) para analisar a precisão dos resultados. Os valores RMSD devem estar dentro da faixa de 0-2 Å para considerar o *docking* como válido (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O valor de RMSD observado foi de 1,76 Å. Esse resultado foi confirmado com a sobreposição do inibidor N3 cocrystalizado antes e depois do re-*docking* (Figura 41).

Figura 41: Sobreposição do inibidor N3 cocrystalizado em amarelo e a melhor conformação do inibidor N3 após o re-docking.



Fonte: O autor.

A Tabela 7 contém os valores de energia livre dos compostos que apresentaram maior potencial inibitório contra a protease Mpro bem como os valores de dois medicamentos antivirais cujo mecanismo de ação envolve a inibição dessa mesma enzima. Quanto menor o valor da energia livre melhor é a interação do composto com o sítio ativo da enzima e maior a possibilidade desse composto possuir atividade inibitória contra a enzima avaliada.

Tabela 7: Estruturas químicas e resultados do docking molecular contra a protease Mpro do SARS CoV-2

(continua)

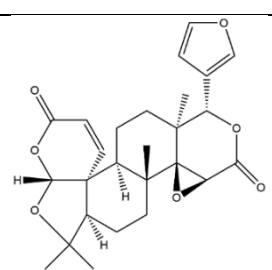
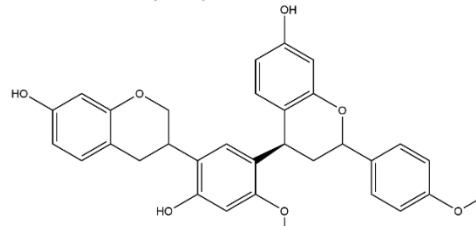
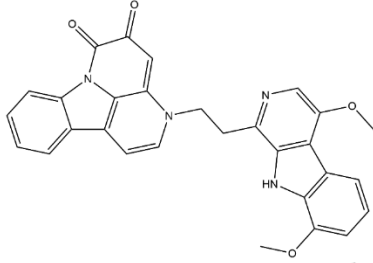
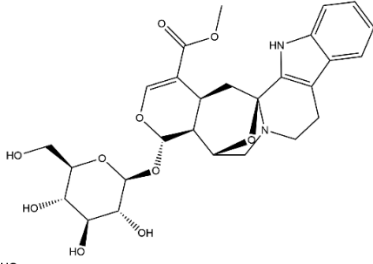
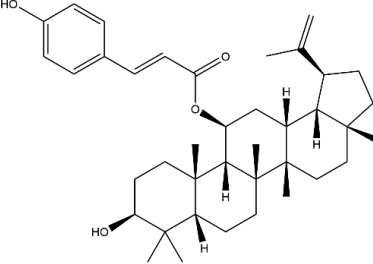
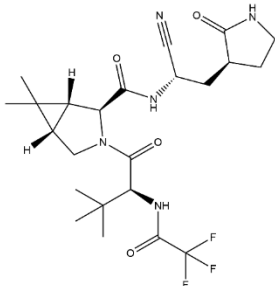
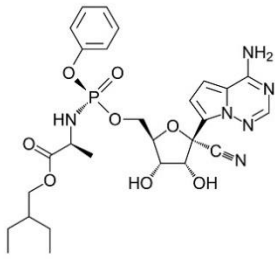
Nº	Nome	Origem	Estrutura Química	Score do docking (kcal mol ⁻¹)
75	Jangomolide	<i>Piper macedoi</i>		-10,36
59	Benzopyran derivative II	<i>Piper fuligineum</i>		-9,97

Tabela 7: Estruturas químicas e resultados do docking molecular contra a protease Mpro do SARS CoV-2

Nº	Nome	Origem	Estrutura Química	(conclusão)
				Score do docking (kcal mol ⁻¹)
96	Picrasidine M	<i>Piper macedoi</i>		-9,74
61	Cadambine	<i>Piper fuligineum</i> e <i>Piper macedoi</i>		-9,67
47	11-O-p-Coumarylnepeticin	<i>Piper fuligineum</i> e <i>Piper Macedoi</i>		-8,80
-	Paxlovid	Medicamento		-6,64
-	Rendesivir	Medicamento		-6,48

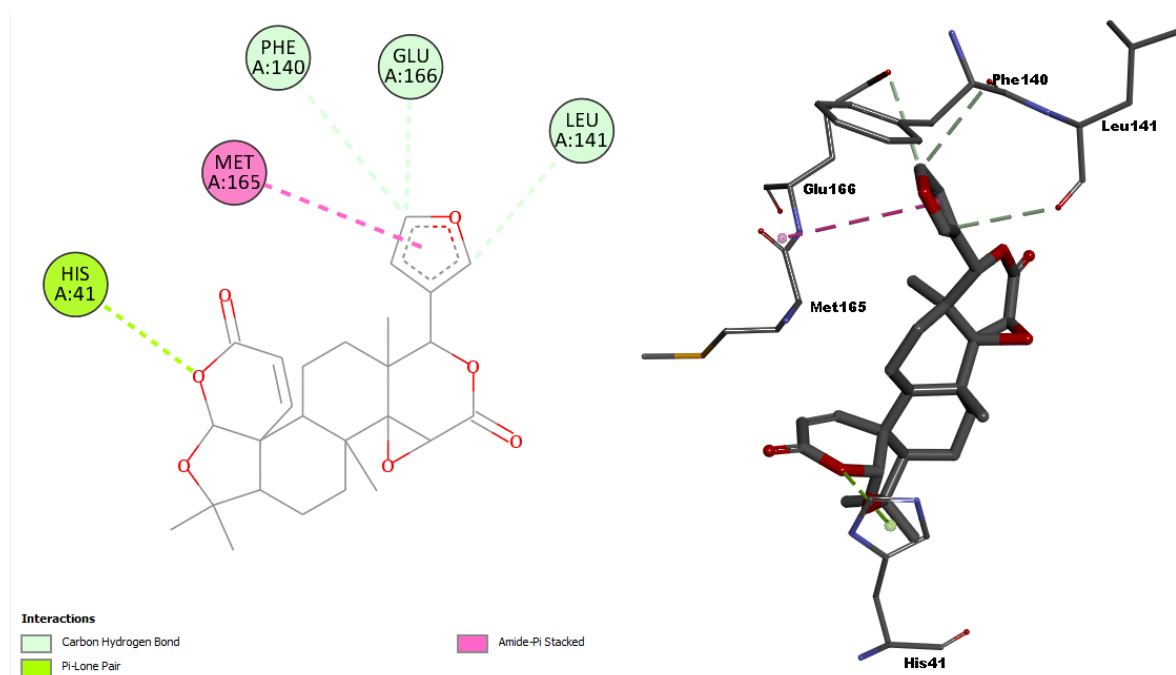
Avaliando os valores de score do docking presentes na tabela acima, observamos que a conformação de energia mais favorável dos metabólitos encontrados nos extratos de *Piper fuligineum* e *Piper macedoi* apresentaram um score

melhor que os princípios ativos de medicamentos que estão sendo utilizados atualmente para o tratamento de Covid 19.

Tal resultado é promissor pois indica que esses compostos podem vir a possuir uma atividade superior à dos medicamentos destacados na tabela. Entretanto são necessários outros testes e observações para chegar em uma resposta concreta, pois a eficácia de um medicamento em nosso corpo envolve muitos outros fatores.

A conformação de energia mais favorável do composto 75 (Jangomolide) ilustrado na Figura 42 formou interações de carbono – hidrogênio com os resíduos Phe140, Glu166 e Leu141, interação entre elétrons Pi livres com o resíduo His41 e interação hidrofóbica com o resíduo Met165. Resultando em uma energia livre de -9,74 kcal mol⁻¹.

Figura 42: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 75.

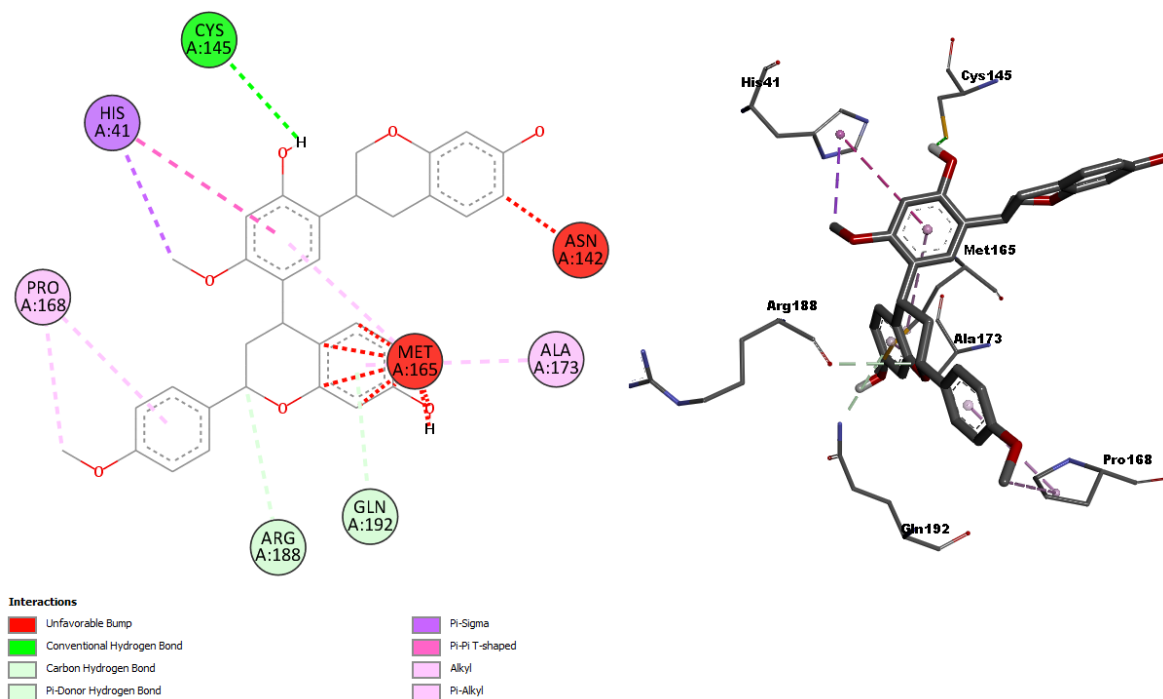


Fonte: O autor.

A conformação de menor energia do composto 59 (Benzopyran derivative II), ilustrado na Figura 43, apresentou interações de hidrogênio brandas com os resíduos Arg188 e Gln192 e forte com o resíduo Cys145, houveram também interações hidrofóbicas com os resíduos His41, Met165, Ala173 e Pro168, resultando em uma energia livre de -9,97 kcal mol⁻¹. Apesar de possuir mais interações que o composto

75 a presença de impedimentos estéricos com os resíduos Met165 e Asn142, tornam a sua interação ligeiramente menos favorável que o composto 75.

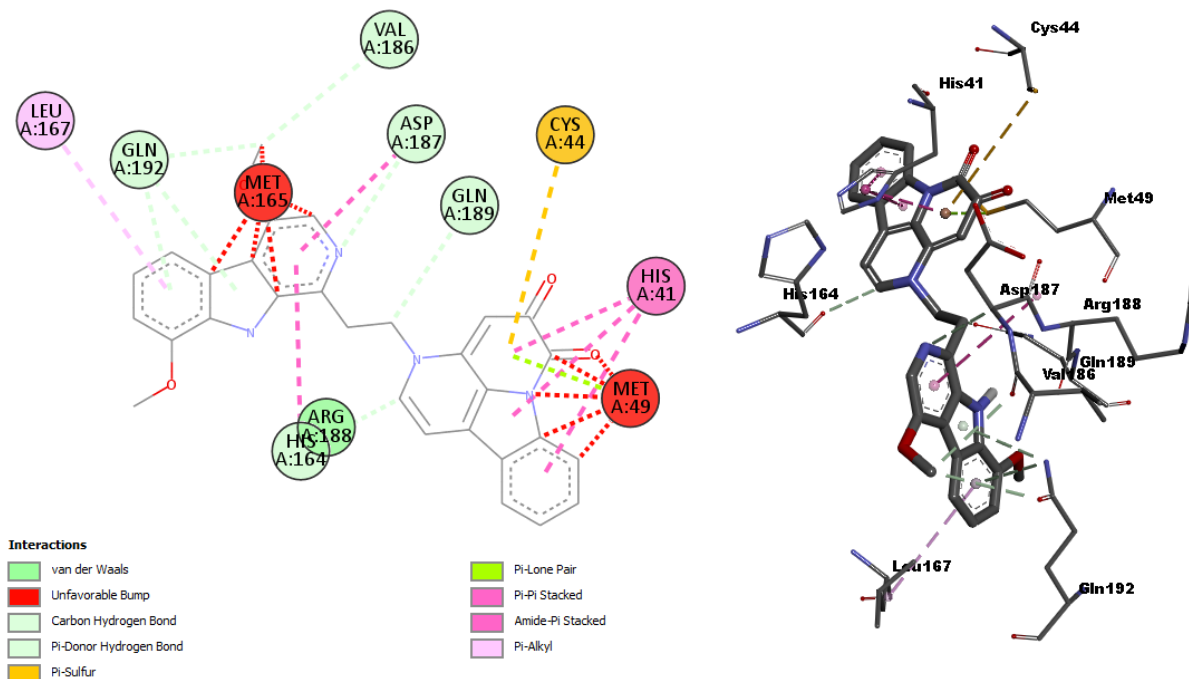
Figura 43: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 59.



Fonte: O autor.

A conformação de menor energia do composto 96 (Picrasidine M), ilustrado na Figura 44, apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos His41 e Leu167, interações de hidrogênio brandas com os resíduos Val186, Asp187, Gln189, Gln192, His164 e Arg188 e interação enxofre – pi com o resíduo Cys44. Porém ele também apresentou alguns impedimentos estéricos com os resíduos Met165 e Met49. Tais interações resultaram em uma energia livre de $-9,74 \text{ kcal mol}^{-1}$.

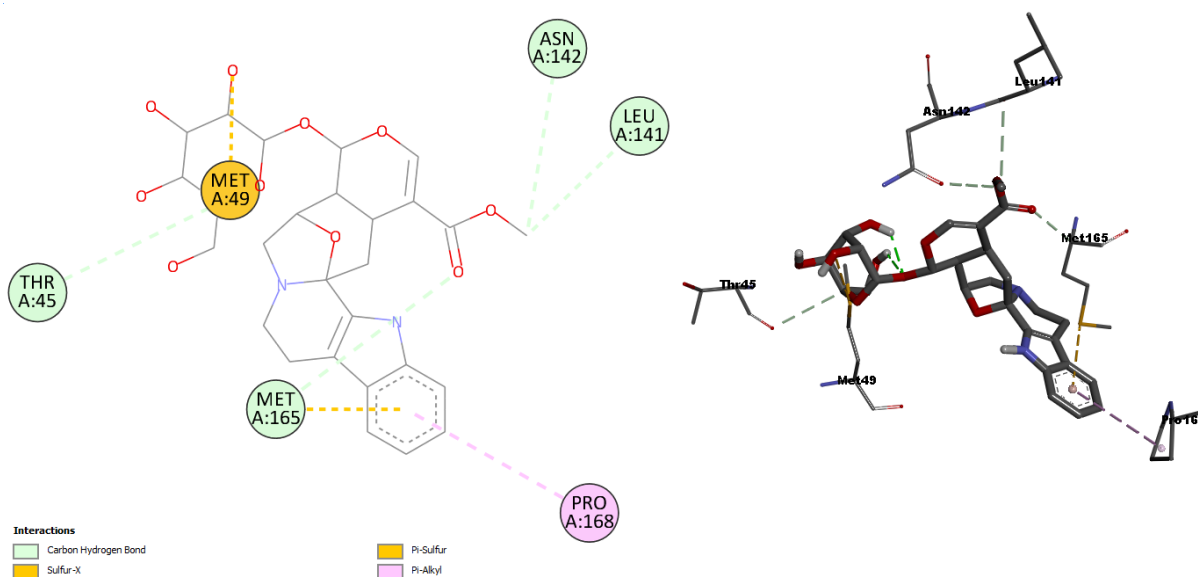
Figura 44: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 96.



Fonte: O autor.

A conformação de menor energia do composto 61 (Cadambine), ilustrado na Figura 45, apresentou interações de enxofre com os resíduos Met49 e Met165, interações carbono – hidrogênio com os resíduos Thr45, Met165, Asn142 e Leu141, e interação hidrofóbica com o resíduo Pro168. Resultando em uma energia livre de -9,67 kcal mol⁻¹.

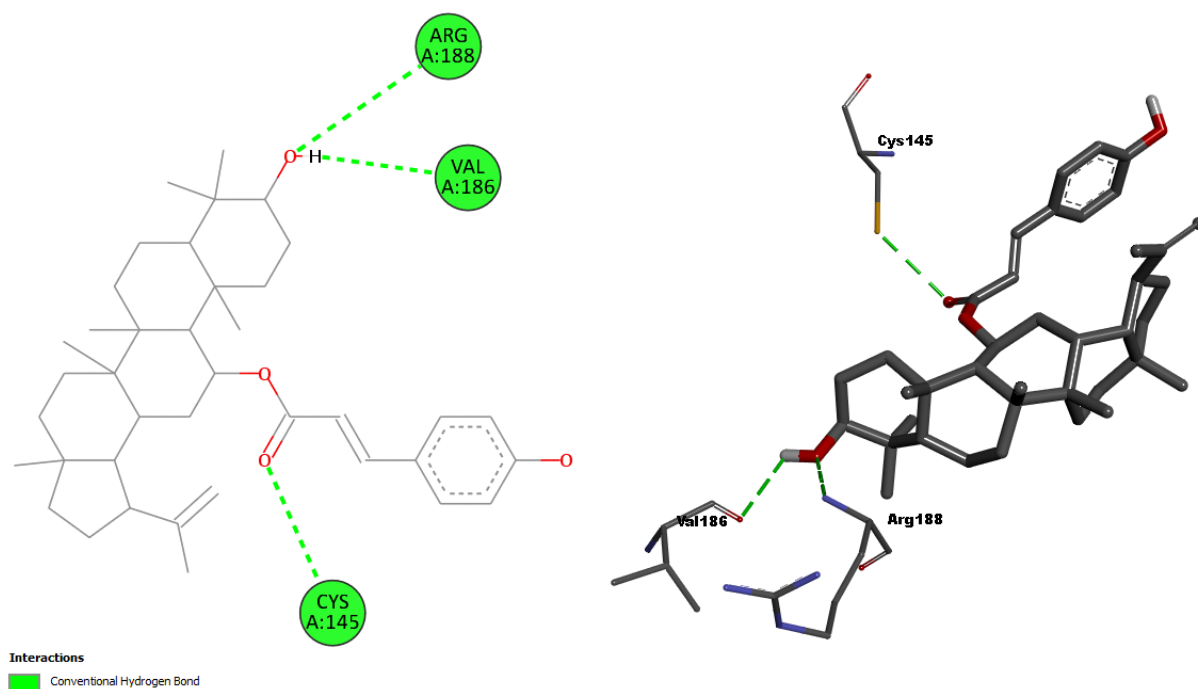
Figura 45: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 61.



Fonte: O autor.

A conformação de menor energia do composto 47 (11-O-p-Coumarylnepeticin), ilustrado na Figura 46, apresentou somente interações de hidrogênio com os resíduos Arg188, Val186 e Cys145, resultando em uma energia livre de $-8,80\text{kcal mol}^{-1}$.

Figura 46: Diagramas de interações 2D e 3D entre os resíduos do sítio ativo da protease Mpro e o composto 47.



Fonte: O autor.

Apesar de existirem impedimentos estéricos desfavoráveis entre os compostos analisados e o sítio ativo da protease Mpro, tais interações não impossibilitam a ligação das moléculas ao sítio ativo. Da mesma maneira que ligantes alteram sua conformação 3d para melhor se ligarem ao sítio ativo, o sítio também pode alterar sua conformação para promover interações de menor energia (KOSHLAND, 1963).

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível comparar as vantagens e desvantagens entre os métodos de extração avaliados. A maceração se mostrou o melhor método para se obter elevado rendimento de extrato. Entretanto, a extração supercrítica possui suas vantagens, como o fato de não necessitar do uso de grandes quantidades de solvente, possuir um tempo de extração relativamente baixo e ser capaz de com a adição de cossolventes alterar a polaridade do fluido de extração e possibilitar a extração de compostos polares e apolares.

Foi avaliada também pela primeira vez a composição dos extratos etanólicos e hexânicos de *Piper macedoi*, extrato hexânico de *Piper fuligineum* e extrato via CO₂ supercrítico de ambas espécies. Foi realizado também a primeira comparação entre a composição química de espécies do complexo fuligineum.

O estudo *in silico* de docking molecular dos compostos identificados via espectrometria de massas acoplado a cromatografia líquida e gasosa, apontou compostos com potencial atividade inibitória da principal protease do vírus SARS CoV-2. Onde os compostos 75, 59, 96, 61 e 47 apresentaram energia livre de: -10,36; -9,97; -9,74; -9,67 e -8,80 kcal mol⁻¹, respectivamente. Os valores observados nesses compostos foram menores que os observados em princípios ativos de medicamentos que vem sendo aplicados para o tratamento dessa doença. Dados como estes ilustram a importância do estudo dos produtos naturais como uma fonte de fármacos para o tratamento de novas doenças.

O estudo comparativo da composição química dos extratos das duas espécies vegetais (*Piper fuligineum* e *Piper macedoi*) avaliadas mostrou que, embora essas espécies apresentem elevada proximidade genética, a composição química apresenta especificidades. Portanto, mesmo quando submetidas as mesmas condições de clima, solo, humidade e predadores, essas espécies são capazes de produzir metabólitos especiais diferentes.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. [s.l: s.n.].

ADITYAN, K.; SOUNDARARAJAN, R.; ASHOKAVARTHANAN, P.; RAJA, A.; PREM ANAND, B. Experimental investigation on a diesel engine fuelled by algae methyl ester with additives. **International Journal of Ambient Energy**, [S. l.], v. 42, n. 11, p. 1258–1268, 2021. DOI: 10.1080/01430750.2019.1594368. Disponível em: <https://doi.org/01430750.2019.1594368>.

ALLOUCHE, Abdul-rahman. Gabedit-A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 174–182, 2011. DOI: 10.1002/jcc.21600. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21600>.

BARDELLI, Karen Cristina; KIRIZAWA, Mizué; SOUSA, Amélia Vera Guimarães De. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 553–561, 2008. DOI: 10.1590/s2236-89062008000400007.

BAUERMEISTER, Anelize et al. Metabolomic fingerprinting of *salinispora* From Atlantic Oceanic Islands. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. DEC, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03021.

BEZERRA, Daniel; FERREIRA, Paulo; MACHADO, Camila; DE AQUINO, Nayara; SILVEIRA, Edilberto; CHAMMAS, Roger; PESSOA, Claudia. Antitumour Efficacy of *Piper tuberculatum* and Piplartine Based on the Hollow Fiber Assay. **Planta Medica**, [S. l.], v. 81, n. 01, p. 15–19, 2014. DOI: 10.1055/s-0034-1383363. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0034-1383363>.

BEZERRA, Veridiane Marques et al. Acaricide activity of *Piper macedoi* Yunck essential oil against *Rhipicephalus sanguineus*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e18911124610, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i1.24610.

BIOVIA, Dassault Systèmes. **DISCOVERY STUDIO VISUALIZERS** San Diego, 2017.

CAO, Yu chen; DENG, Qi xin; DAI, Shi xue. Remdesivir for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 causing COVID-19: An evaluation of the evidence. **Travel Medicine and Infectious Disease**, [S. l.], v. 35, n. March, p. 101647, 2020. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101647. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101647>.

CHEN, Chia Nan; LIN, Coney P. C.; HUANG, Kuo Kuei; CHEN, Wei Cheng; HSIEH, Hsin Pang; LIANG, Po Huang; HSU, John T. A. Inhibition of SARS-CoV 3C-like protease activity by theaflavin-3,3'- digallate (TF3). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 209–215, 2005. DOI: 10.1093/ecam/neh081.

CHEN, Lili et al. Binding interaction of quercetin-3- β -galactoside and its synthetic derivatives with SARS-CoV 3CLpro: Structure-activity relationship studies reveal salient pharmacophore features. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 14, n. 24, p. 8295–8306, 2006. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.09.014.

CHRIST, Jheniffer Abeldt. Diversidade morfológica e molecular em Piper (Piperaceae) em um fragmento de Floresta Atlântica. [S. l.], 2016.

COLLECTIVE, Kaleidos. Experiencing Covid-19 in the Ecuadorian Amazon rainforest. **Interactions**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 10–13, 2021. DOI: 10.1145/3450436. Disponível em: <https://dl.acm.org/doi/10.1145/3450436>.

DONG, Ensheng; DU, Hongru; GARDNER, Lauren. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 533–534, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920301201>.

DOS SANTOS, Victor N.; DE OLIVEIRA, Gisele L.; MOREIRA, Davyson L.; DE DEUS, Rodrigo G.; DE ALMEIDA, Raquel M.; FUJIWARA, Ricardo T.; PIMENTA, Lúcia P. S.; FERREIRA, Sebastião R. Leishmanicidal Activity of the Volatile Oil of Piper macedoi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 342–346, 2021. DOI: 10.1007/s43450-021-00155-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00155-4>.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. **Focus**, [S. l.],

v. 12, n. 1, p. 13–15, 1990.

FINATO, Angela Carolina et al. Crude leaf extracts of piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. e0198682, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0198682. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0198682>.

GAÍNZA, Yousmel Alemán; FANTATTO, Rafaela Regina; CHAVES, Francisco Celio Maia; BIZZO, Humberto Ribeiro; ESTEVES, Sérgio Novita; CHAGAS, Ana Carolina de Souza. Piper aduncum contra isolados de Haemonchus contortus: Resistência cruzada e a pesquisa de bioativos naturais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 383–393, 2016. DOI: 10.1590/S1984-29612016073.

GONZALEZ, Oscar; FONTANES, Vanessa; RAYCHAUDHURI, Santanu; LOO, Rachel; LOO, Joseph; ARUMUGASWAMI, Vaithilingaraja; SUN, Ren; DASGUPTA, Asim; FRENCH, Samuel W. The heat shock protein inhibitor quercetin attenuates hepatitis C virus production. **Hepatology**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 1756–1764, 2009. DOI: 10.1002/hep.23232.

HUSSAIN BASHA, Syed. Corona virus drugs-a brief overview of past, present and future. **Journal of PeerScientist**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. e1000013, 2020. DOI: 10.5281/zenodo.3747641. Disponível em: <https://google.org/crisisresponse/covid19-map>.

JARAMILLO, M. Alejandra; CALLEJAS, Ricardo; DAVIDSON, Christopher; SMITH, James F.; STEVENS, Angela C.; TEPE, Eric J. A Phylogeny of the Tropical Genus *Piper* Using ITS and the Chloroplast Intron *psbJ-petA*. **Systematic Botany**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 647–660, 2008. DOI: 10.1600/036364408786500244. Disponível em: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0363-6445&volume=33&issue=4&spage=647>.

KOENIGHOFER, Martin; LION, Thomas; BODENTEICH, Angelika; PRIESCHL-GRASSAUER, Eva; GRASSAUER, Andreas; UNGER, Hermann; MUELLER, Christian A.; FAZEKAS, Tamás. Carrageenan nasal spray in virus confirmed common cold: Individual patient data analysis of two randomized controlled trials. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2014. DOI:

10.1186/2049-6958-9-57.

KOPCAK, Uiram. **Extração de cafeína das sementes da planta do guaraná (Paullinia cupana) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes**. 2003. Unicamp, [S. l.], 2003. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/267394>.

KOSHLAND, D. E. Correlation of Structure and Function in Enzyme Action. **Science**, [S. l.], v. 142, n. 3599, p. 1533–1541, 1963. DOI: 10.1126/science.142.3599.1533. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.142.3599.1533>.

KRINSKI, Diones; FOERSTER, Luís Amilton; DESCHAMPS, Cicero. Efeito ovicida de óleos essenciais de 18 espécies Brasileiras de piper: Controlando Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera, Erebidae) no estágio inicial de desenvolvimento. **Acta Scientiarum - Agronomy**, [S. l.], v. 40, n. 1, 2018. DOI: 10.4025/actasciagron.v40i1.35273.

LEMOS, Caroline Ortega Terra; GARCIA, Vitor Augusto dos Santos; GONÇALVES, Renata Menoci; LEAL, Ivana Correa Ramos; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias; FILHO, Lúcio Cardozo; CABRAL, Vladimir Ferreira. Supercritical extraction of neolignans from Piper regnelli var. pallescens. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 71, p. 64–70, 2012. DOI: 10.1016/j.supflu.2012.07.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844612002422>.

LI, Shi You et al. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 18–23, 2005. DOI: 10.1016/j.antiviral.2005.02.007.

LIMA, Rafaely N.; RIBEIRO, Adauto S.; SANTIAGO, Gilvandete M. P.; CINARA, Cinara O.; SOARES, Milena B.; BEZERRA, Daniel P.; SHANMUGAM, Saravanan; FREITAS, Lisiane dos S.; ALVES, Pericles B. Antitumor and Aedes aegypti Larvicidal Activities of Essential Oils from Piper klotzschianum, P. hispidum, and P. arboreum. **Natural Product Communications**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 1934578X1986393, 2019. DOI: 10.1177/1934578X19863932. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X19863932>.

MAHAJAN, Mitali; KUIRY, Raju; PAL, Probir K. Understanding the consequence of

environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, [S. l.], v. 18, n. December 2019, p. 100255, 2020. DOI: 10.1016/j.jarmap.2020.100255. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100255>.

MARINHO, Carolina Messias; LEMOS, Caroline Ortega Terra; ARVELOS, Sarah; DE SOUZA BARROZO, Marcos Antonio; HORI, Carla Eponina; WATANABE, Érika Ohta. Extraction of corn germ oil with supercritical CO₂ and cosolvents. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 56, n. 10, p. 4448–4456, 2019. DOI: 10.1007/s13197-019-03923-2.

MAZZEU, Bruna F. “ **Estudo de aspectos químicos , biológicos e biossintéticos em Piper fuliginum Kunth (Piperaceae)** . 2014. [S. l.], 2014.

MAZZEU, Bruna; FELIPPE, Lidiane; COTINGUIBA, Fernando; KATO, Massuo; FURLAN, Maysa. Kavalactones and Benzoic Acid Derivatives from Leaves of Piper fuliginum Kunth (Piperaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1286–1290, 2017. DOI: 10.21577/0103-5053.20170225. Disponível em: http://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=5108&nomeArquivo=2017-0289AR.pdf.

MOHAMED, Rahoma S. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE PRODUTOS DE OCORRÊNCIA NATURAL COM FLUIDOS SUPERCRITICOS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 344–353, 1997. DOI: 10.1590/S0101-20611997000400002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611997000400002&lng=pt&nrm=iso&tling=pt.

MORRIS, Garrett M.; HUEY, Ruth; LINDSTROM, William; SANNER, Michel F.; BELEW, Richard K.; GOODSELL, David S.; OLSON, Arthur J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009. DOI: 10.1002/jcc.21256. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21256>.

NAVICKIENE, Hosana M. Deboni et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 467–470, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000300012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

NOBRE, B. P. et al. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga - Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 135, p. 128–136, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.084. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.084>.

OLIVEIRA, Gisele Lopes De; MATOS, C. C.; SANTOS, R. R.; MAIA, J. T. S.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S.; MOREIRA, Davyson L.; KAPLAN, M. A. C. Rooting of cuttings and analysis of essential oils from wild and cultivated *Piper macedoi* Yunck. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 782–790, 2016. DOI: 10.1590/1983-084X/0033.

PILLAIYAR, Thanigaimalai; MANICKAM, Manoj; NAMASIVAYAM, Vigneshwaran; HAYASHI, Yoshio; JUNG, Sang Hun. An overview of severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease inhibitors: Peptidomimetics and small molecule chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 14, p. 6595–6628, 2016. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01461.

PIMENTEL-MORAL, Sandra; BORRÁS-LINARES, Isabel; LOZANO-SÁNCHEZ, Jesús; ARRÁEZ-ROMÁN, David; MARTÍNEZ-FÉREZ, Antonio; SEGURA-CARRETERO, Antonio. Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 147, n. August 2018, p. 213–221, 2019. DOI: 10.1016/j.supflu.2018.11.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.11.005>.

SAMADI, Mahtab; ABIDIN, Zurina Zainal; YUNUS, Robiah; AWANG BIAK, Dayang Radiah; YOSHIDA, Hiroyuki; LOK, Eng Hai. Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 216–222, 2017.

DOI: 10.1016/j.cjche.2016.09.006. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cjche.2016.09.006>.

SANNER, Michel F. A component-based software environment for visualizing large macromolecular assemblies. **Structure**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 447–462, 2005. DOI: 10.1016/j.str.2005.01.010.

SANTANA, A.; JESUS, S.; LARRAYOZ, M. A.; FILHO, R. M. Supercritical carbon dioxide extraction of algal lipids for the biodiesel production. **Procedia Engineering**, [S. l.], v. 42, n. August, p. 1755–1761, 2012. DOI: 10.1016/j.proeng.2012.07.569. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.569>.

SAQRANE, S.; EL MHAMMEDI, M. A.; LAHRICH, S.; LAGHRIB, F.; EL BOUABI, Y.; FARAHI, A.; BAKASSE, M. Recent knowledge in favor of remdesivir (GS-5734) as a therapeutic option for the COVID-19 infections. **Journal of Infection and Public Health**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 655–660, 2021. DOI: 10.1016/j.jiph.2021.02.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.02.006>.

SHANNON, P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003. DOI: 10.1101/gr.1239303. Disponível em: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110001910481/>.

SMITH, Roger M. **Supercritical fluids in separation science - The dreams, the reality and the future**. [s.l: s.n.]. v. 856 DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00617-2.

SOLDAN, Ana. **Extração supercrítica de oleoresina de resíduo de pimenta *Capsicum annum* (Jalapenho)**. 2020. Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.], 2020. DOI: 10.14393/ufu.di.2020.3011. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/29715>.

SOUZA, Luís M. P.; FILHO, Enio P. B. **CO₂ - PROPRIEDADES E APLICAÇÕES** POSMEC, , 2011.

STEVENS, P. F. **ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 14**. 2001. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em: 30 out. 2021.

STEWART, J. J. P. **MOPAC2016**, 2016.

TAHIR UL QAMAR, Muhammad; ALQAHTANI, Safar M.; ALAMRI, Mubarak A.; CHEN, Ling Ling. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 313–319, 2020. DOI: 10.1016/j.jpha.2020.03.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.009>.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006. DOI: 10.1021/jm051197e. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm051197e>.

VALADEAU, Céline et al. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 123, n. 3, p. 413–422, 2009. DOI: 10.1016/j.jep.2009.03.041. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874109001895>.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. 2. ed. [s.l: s.n.].

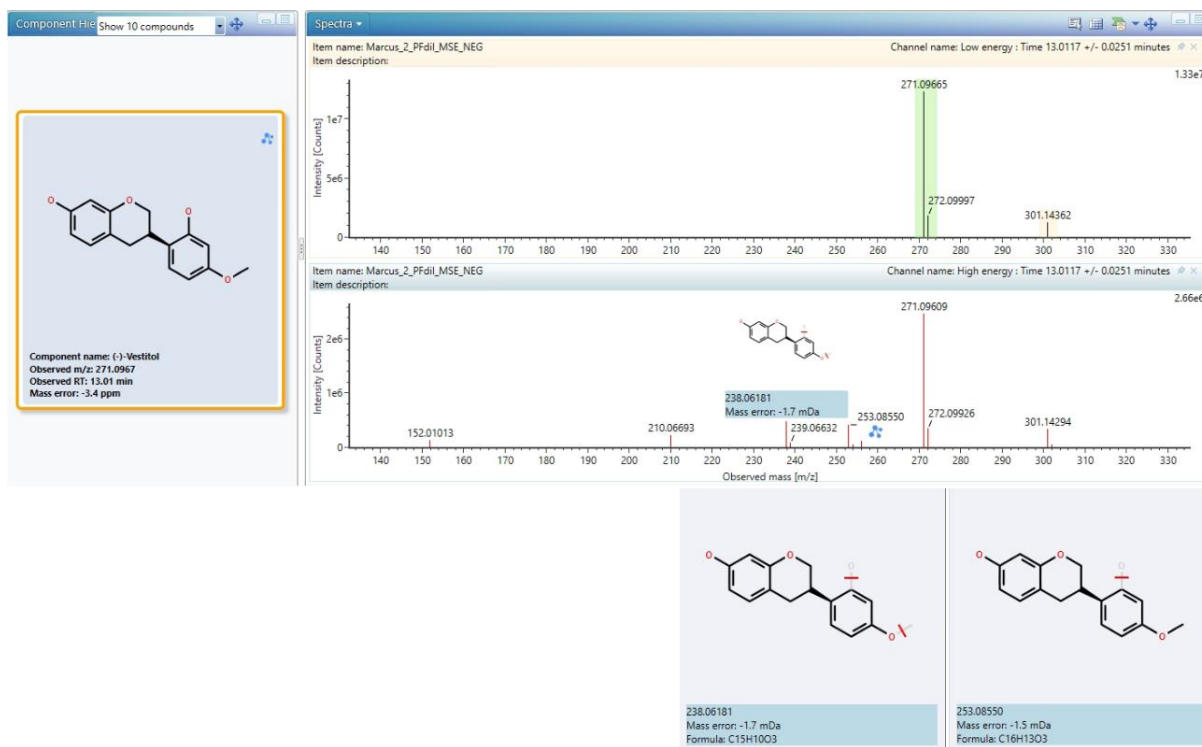
WANG, Mingxun et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3597.

WU, Canrong et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 766–788, 2020. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.02.008.

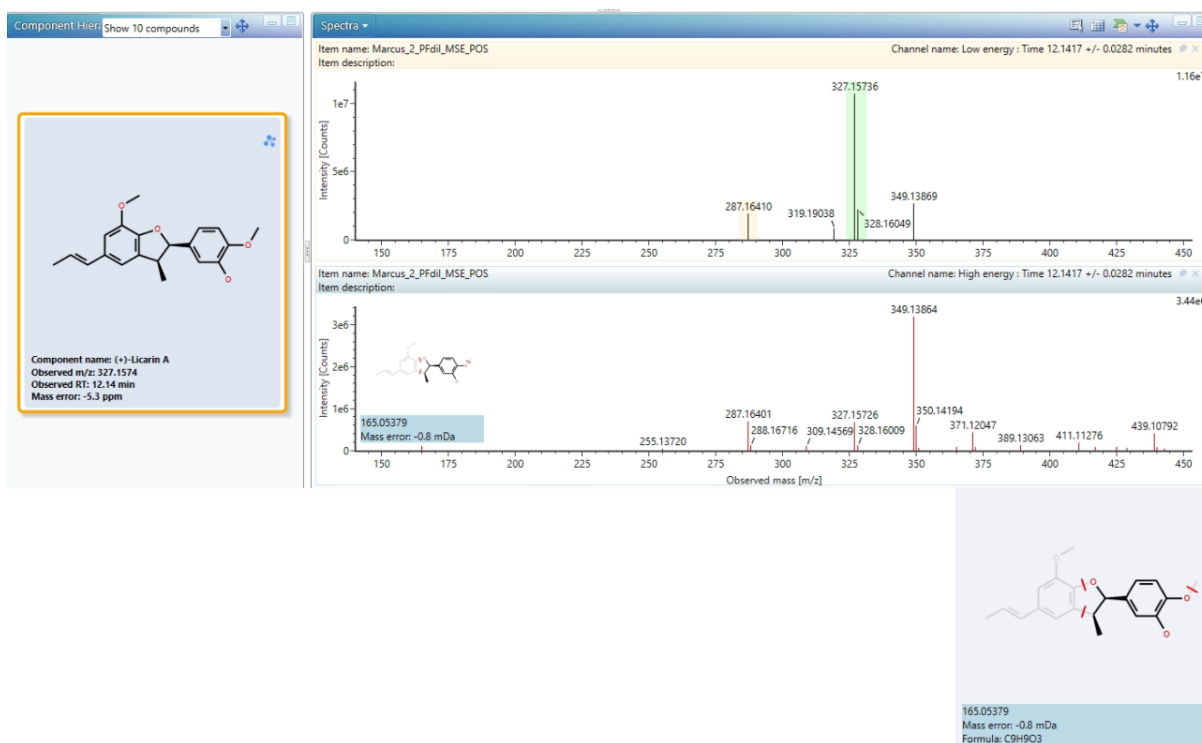
ZHANG, Qing Wen; LIN, Li Gen; YE, Wen Cai. **Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review Chinese Medicine (United Kingdom)**, 2018. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x.

ANEXO 1 – Espectros de Fragmentação em LC-MS/MS dos compostos identificados

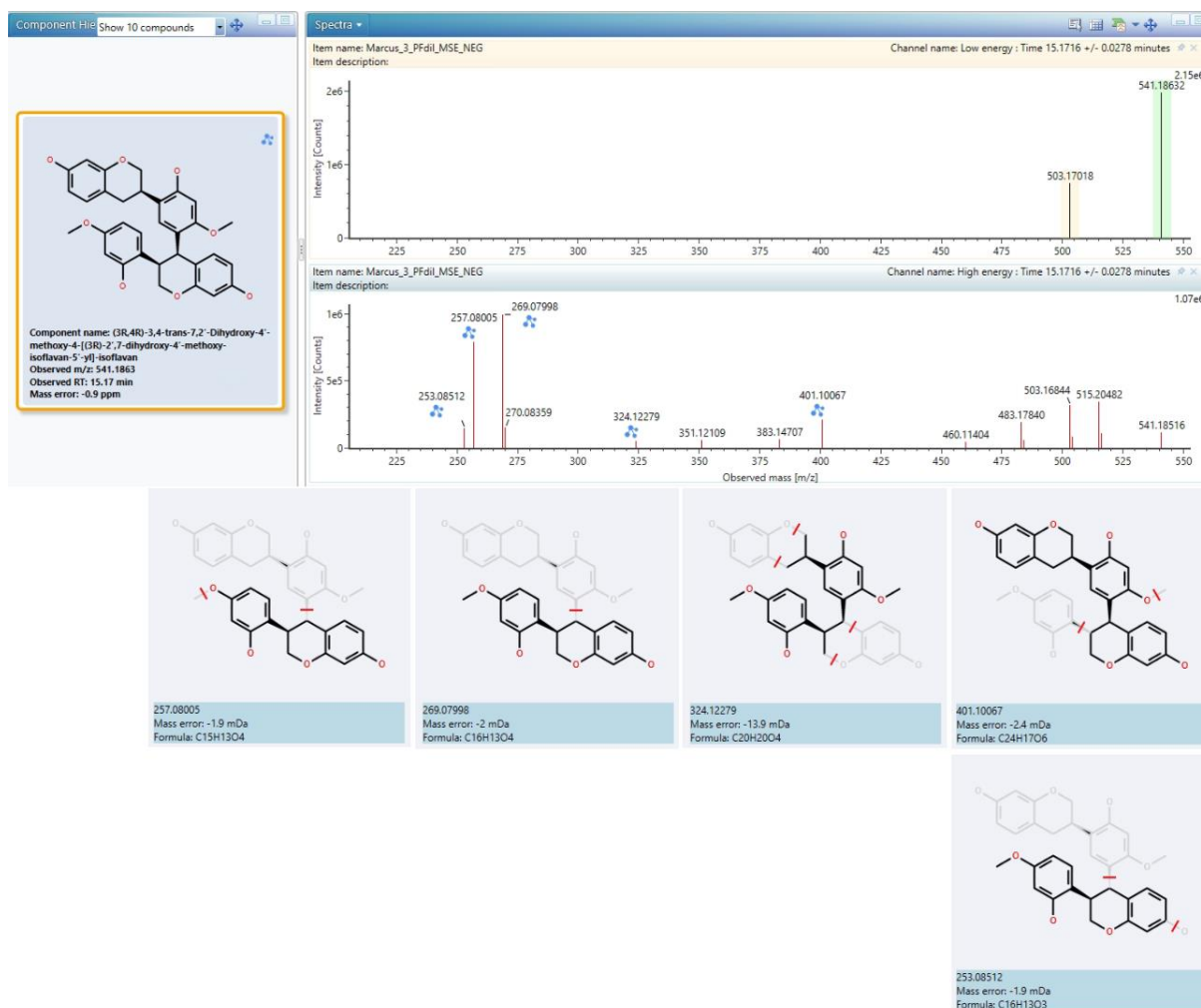
APÊNDICE A – Composto (-)-Vestitol (42)



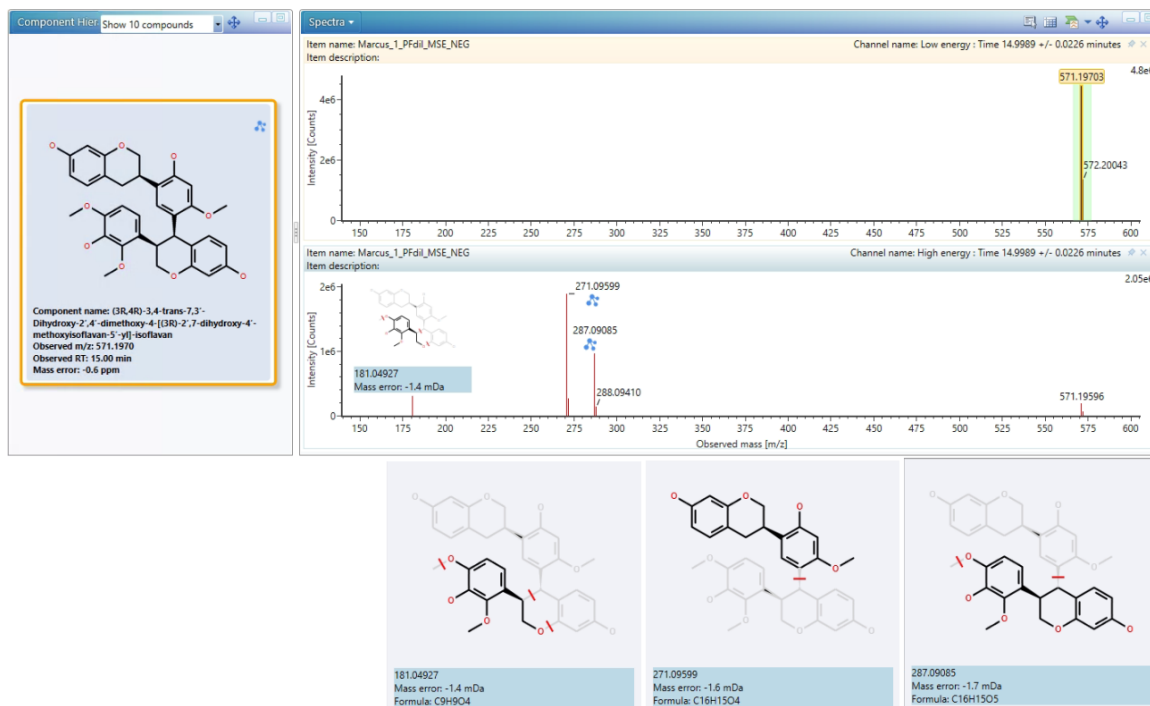
APÊNDICE B – Composto (+)-Licarin A (43)



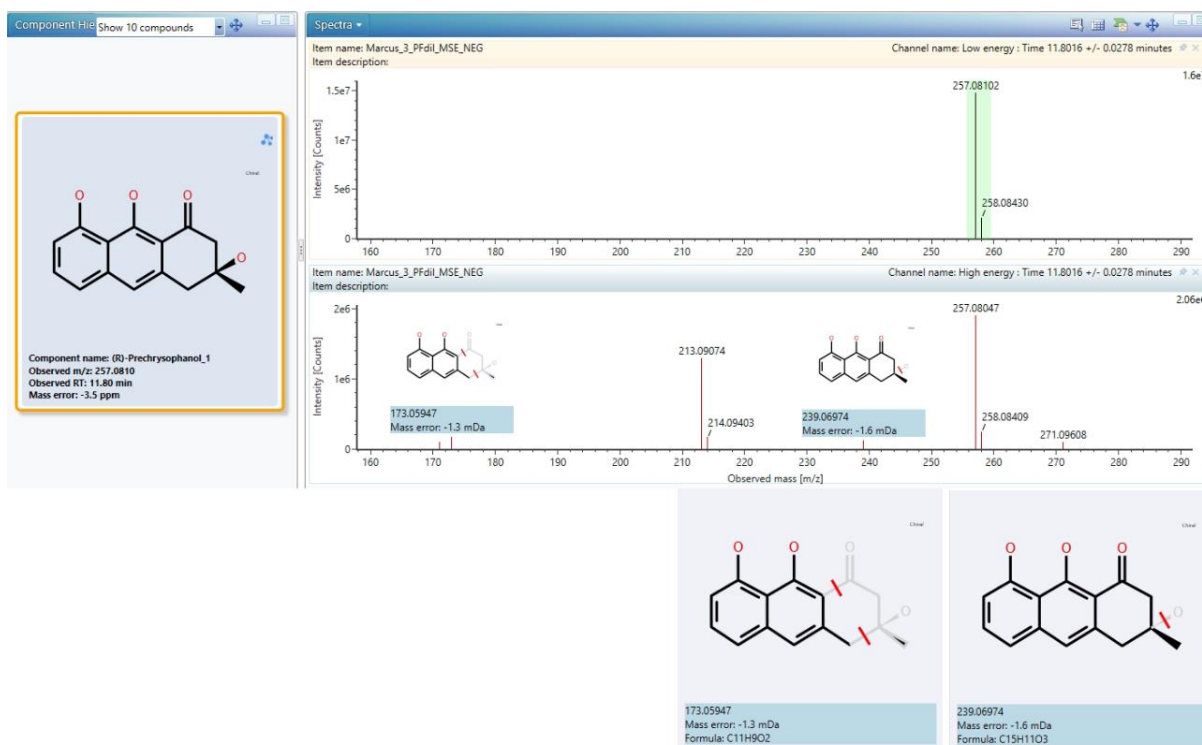
APÊNDICE C – Composto (3R,4R)-3,4-trans-7,2'-Dihydroxy-4'-methoxy-4-[(3R)-2',7-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavan-5'-yl]-isoflavan (44)



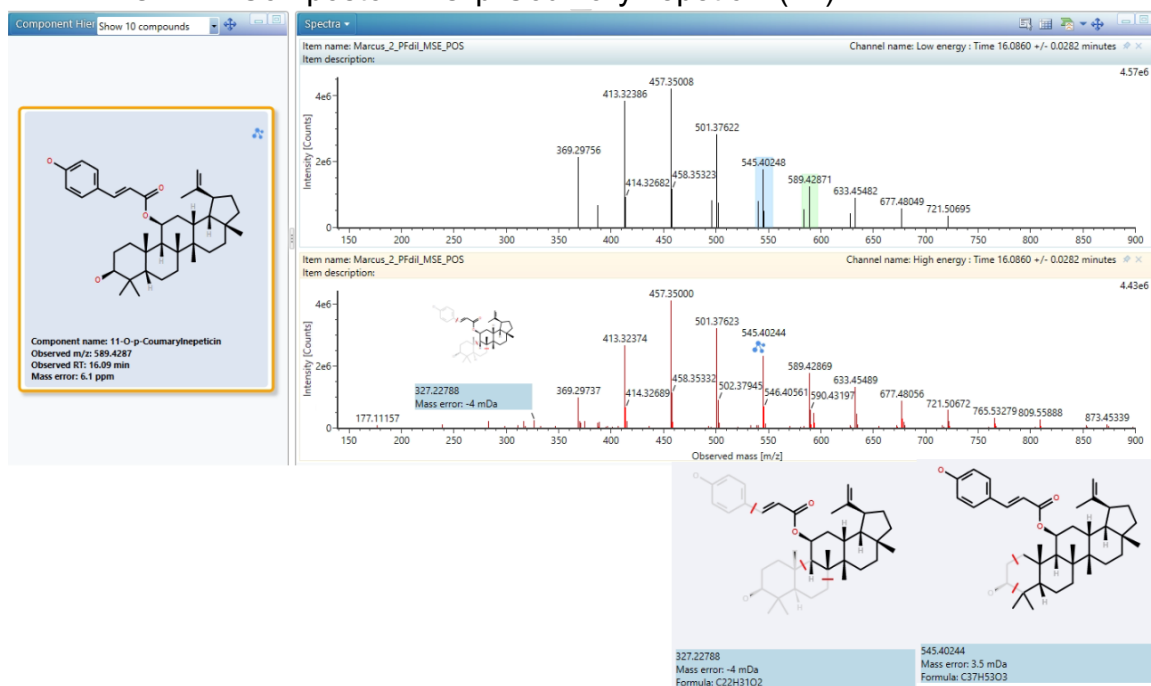
APÊNDICE D – Composto (3R,4R)-3,4-trans-7,3'-Dihydroxy-2',4'-dimethoxy-4-[(3R)-2',7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavan-5'-yl]-isoflavan (45)



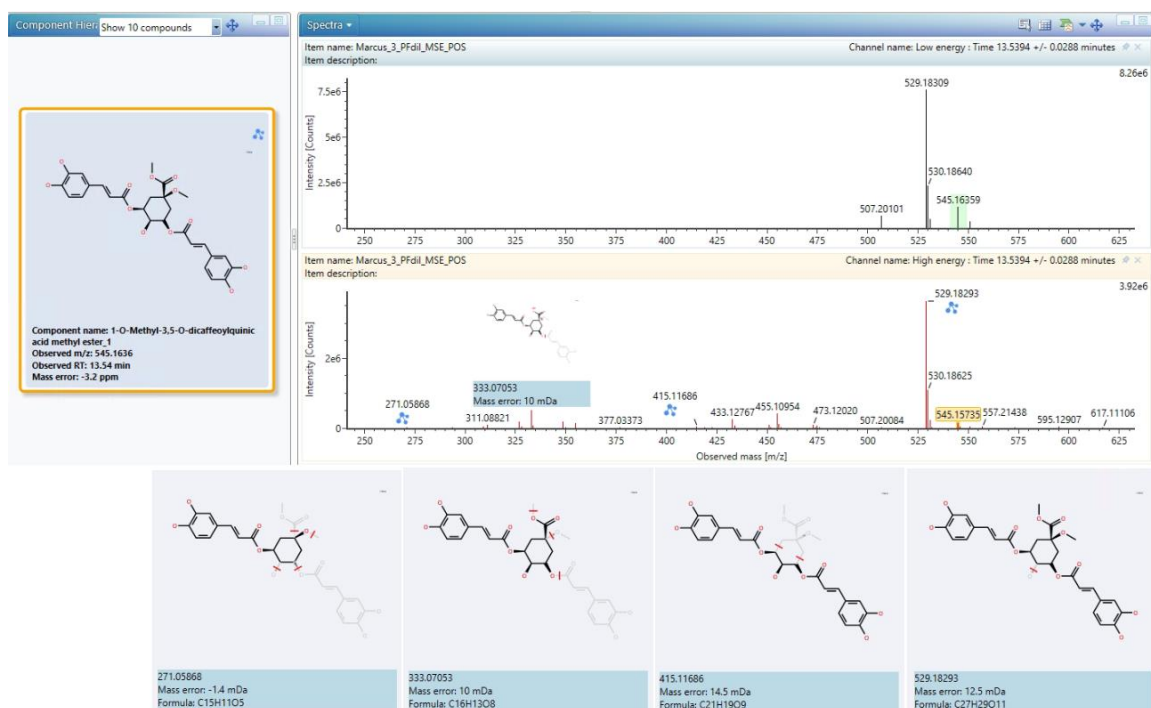
APÊNDICE E – Composto (R)-Prechrysofanol (46)



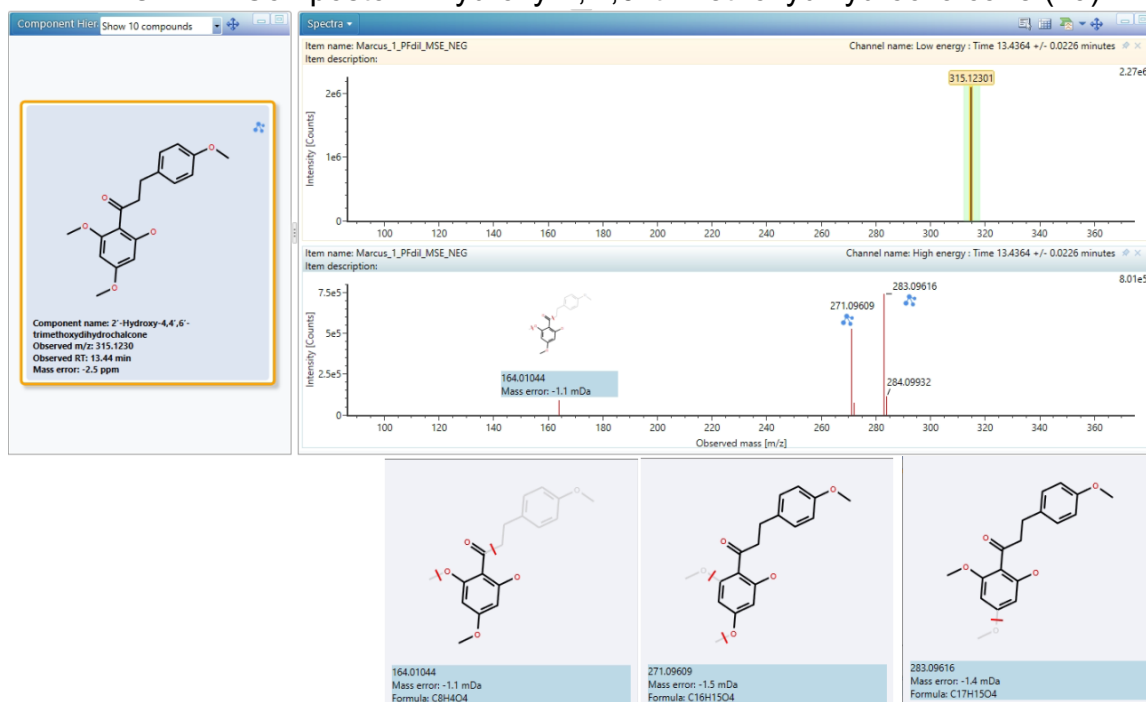
APÊNDICE F – Composto 11-O-p-Coumarylnepeticin (47)



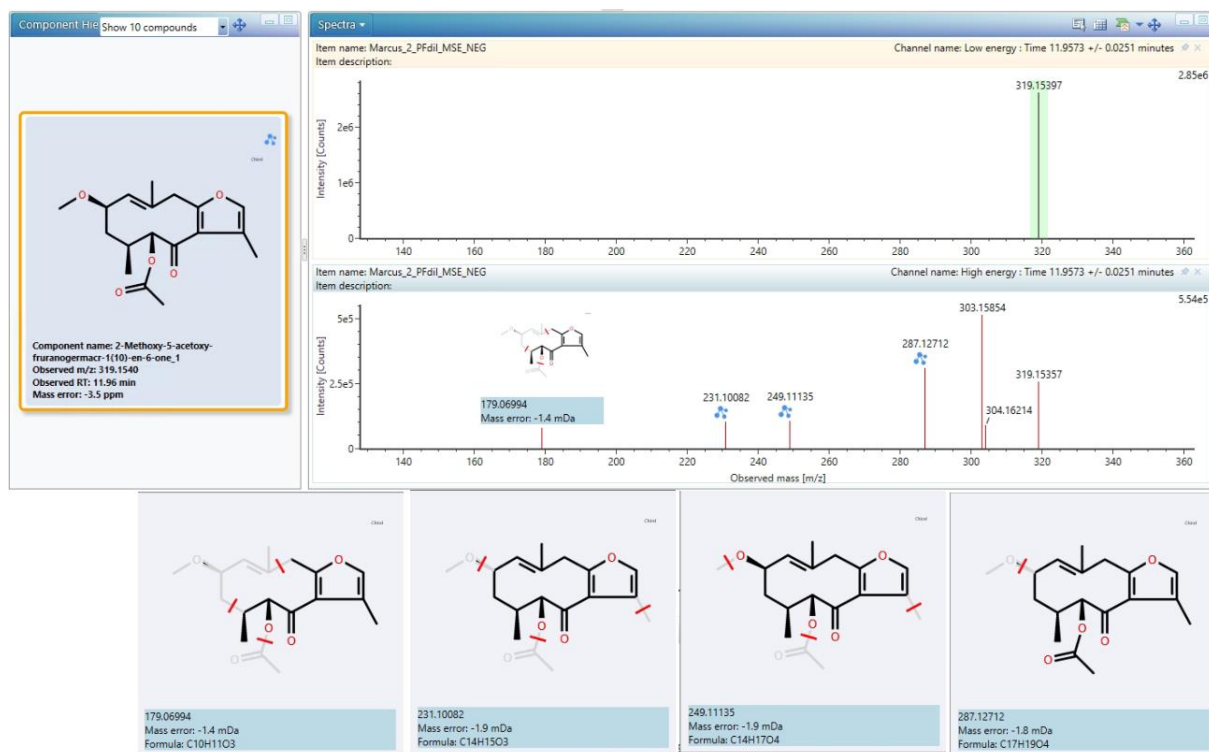
APÊNDICE G – Composto 1-O-Methyl-3,5-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester (48)



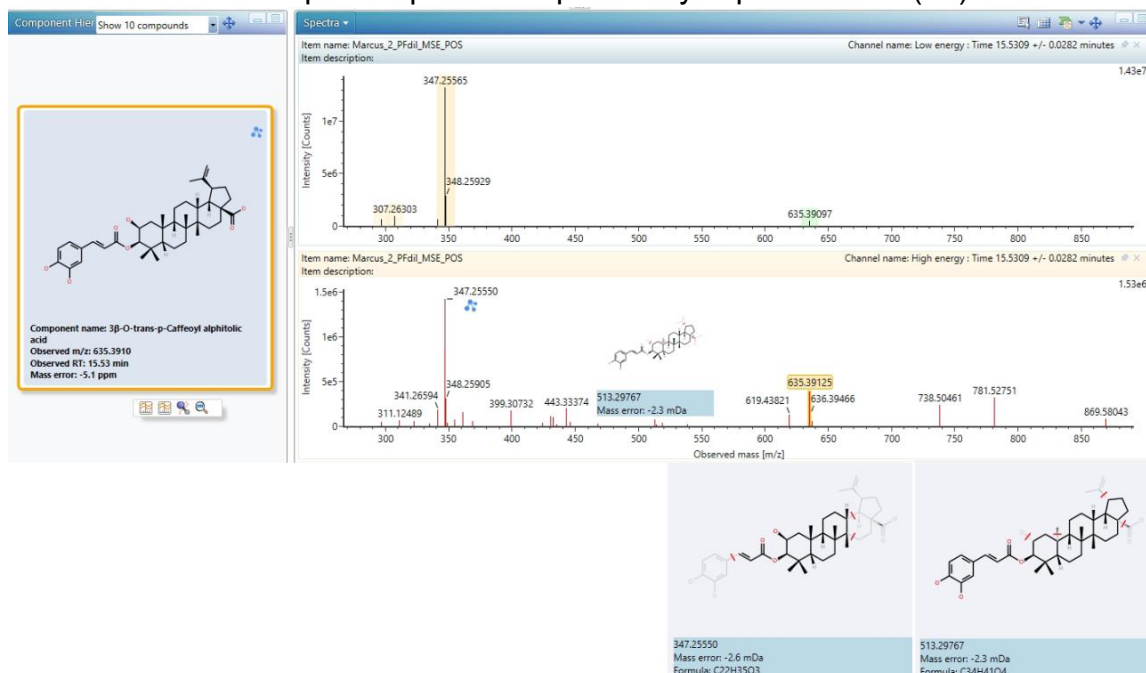
APÊNDICE H – Composto 2'-Hydroxy-4,4',6'-trimethoxydihydrochalcone (49)



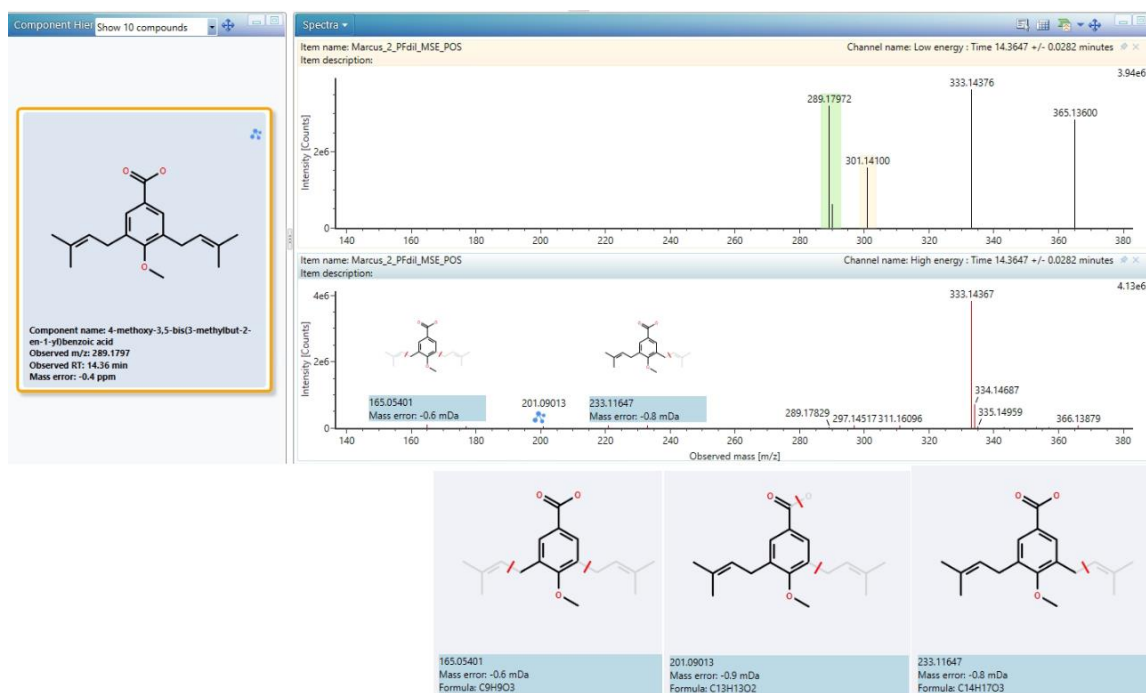
APÊNDICE I – Composto 2-Methoxy-5-acetoxy-fruranogermacr-1(10)-en-6-one (50)



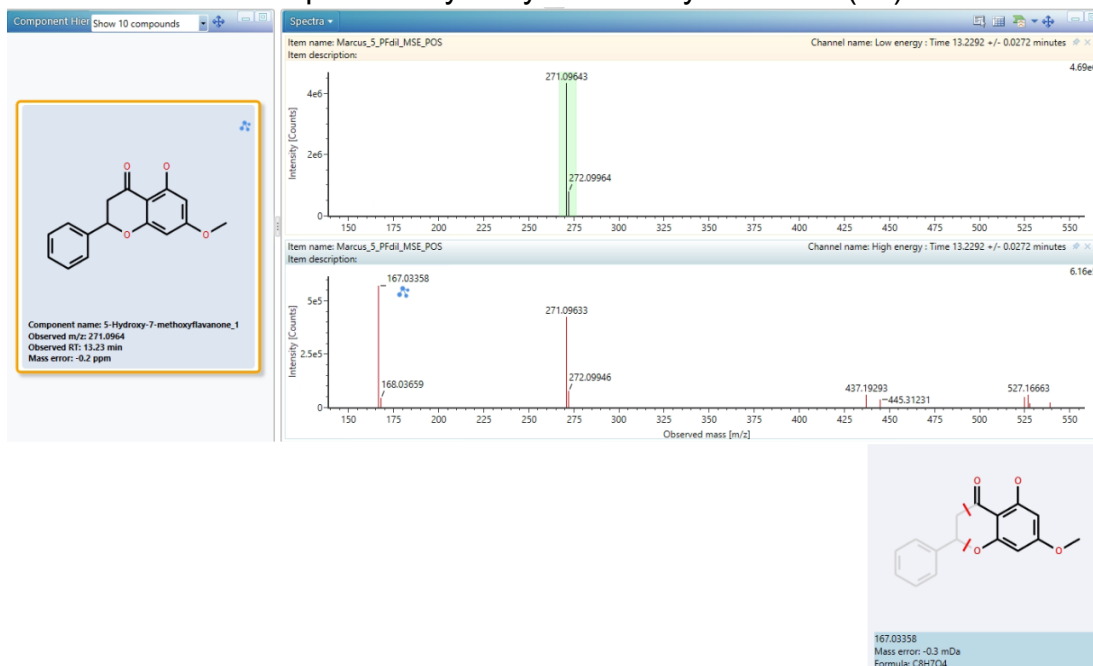
APÊNDICE J – Composto 3 β -O-trans-p-Caffeoyl alphitolic acid (51)



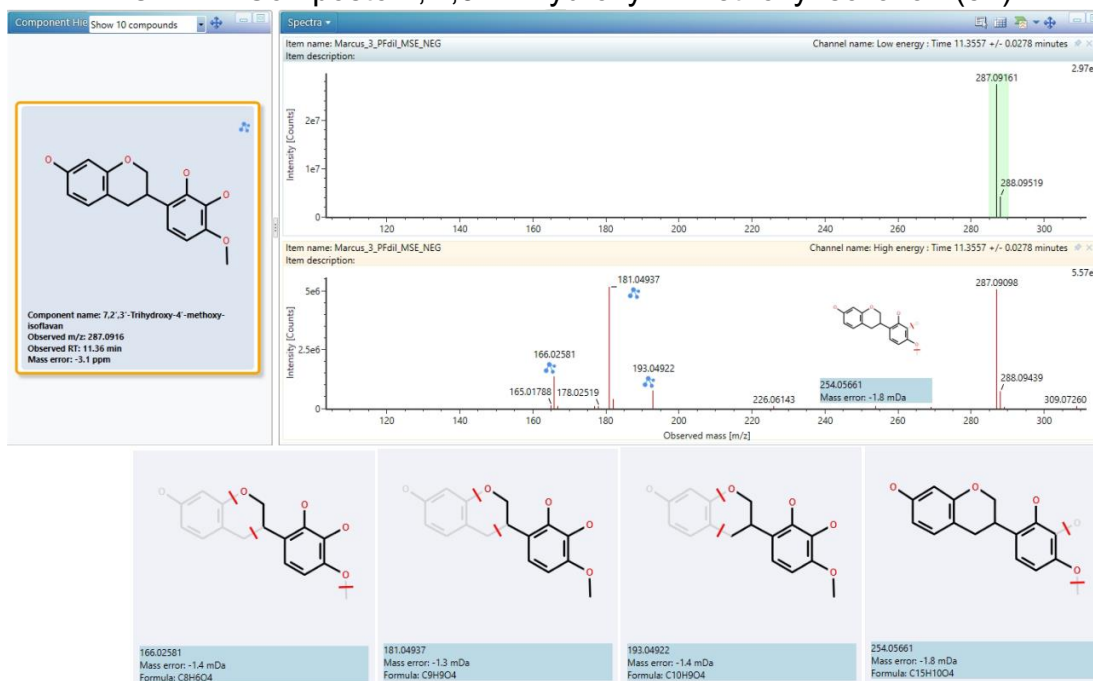
APÊNDICE K – Composto 4-hydroxy-3,5-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)benzoic acid (52)



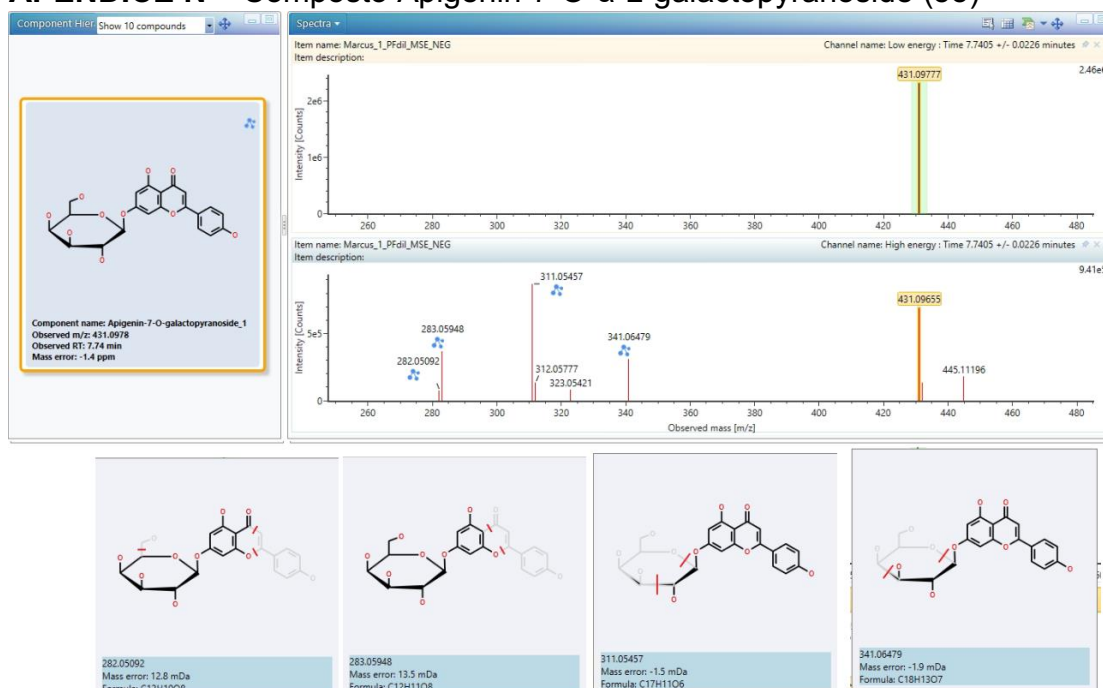
APÊNDICE L – Composto 5-Hydroxy-7-methoxyflavanone (53)



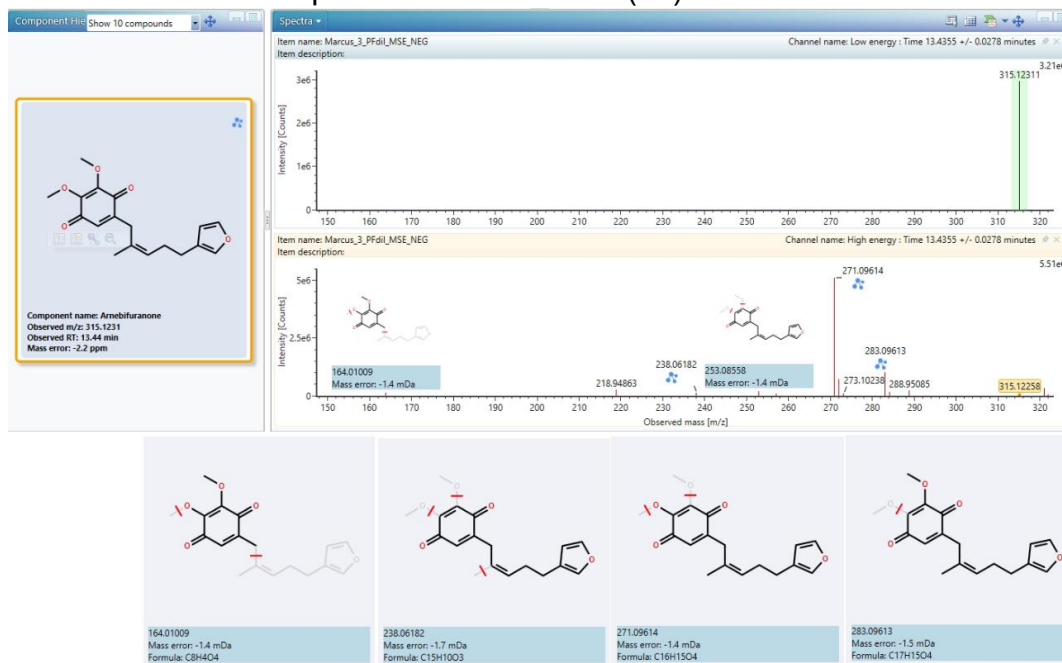
APÊNDICE M – Composto 7,2',3'-Trihydroxy-4'-methoxy-isoflavan (54)



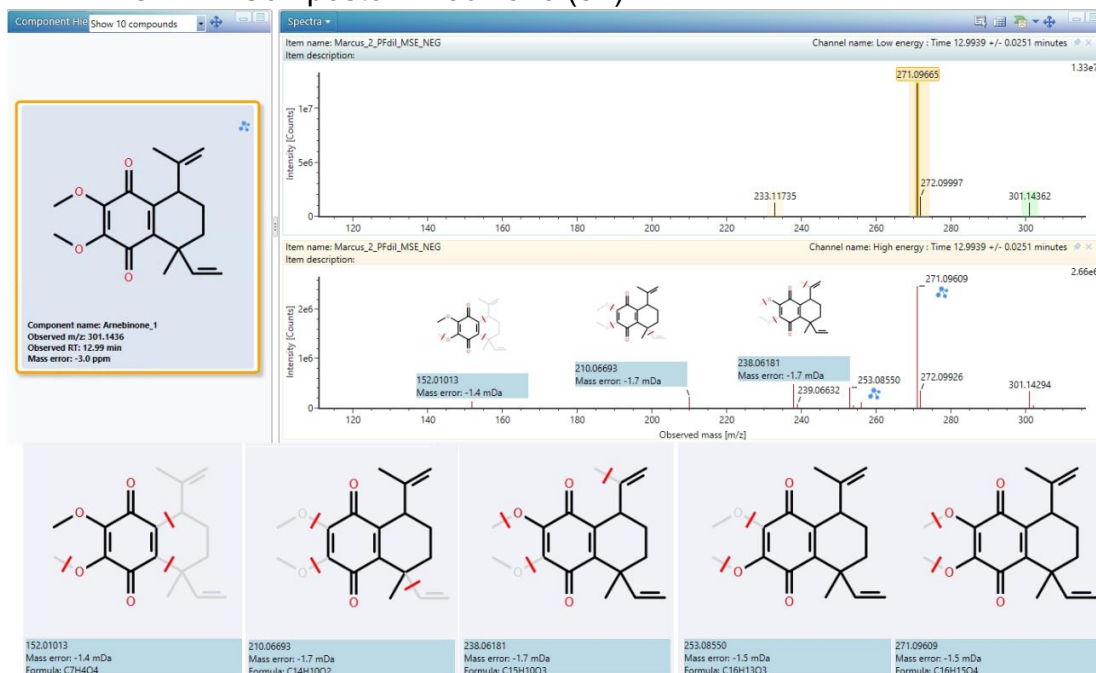
APÊNDICE N – Composto Apigenin-7-O- α -L-galactopyranoside (55)



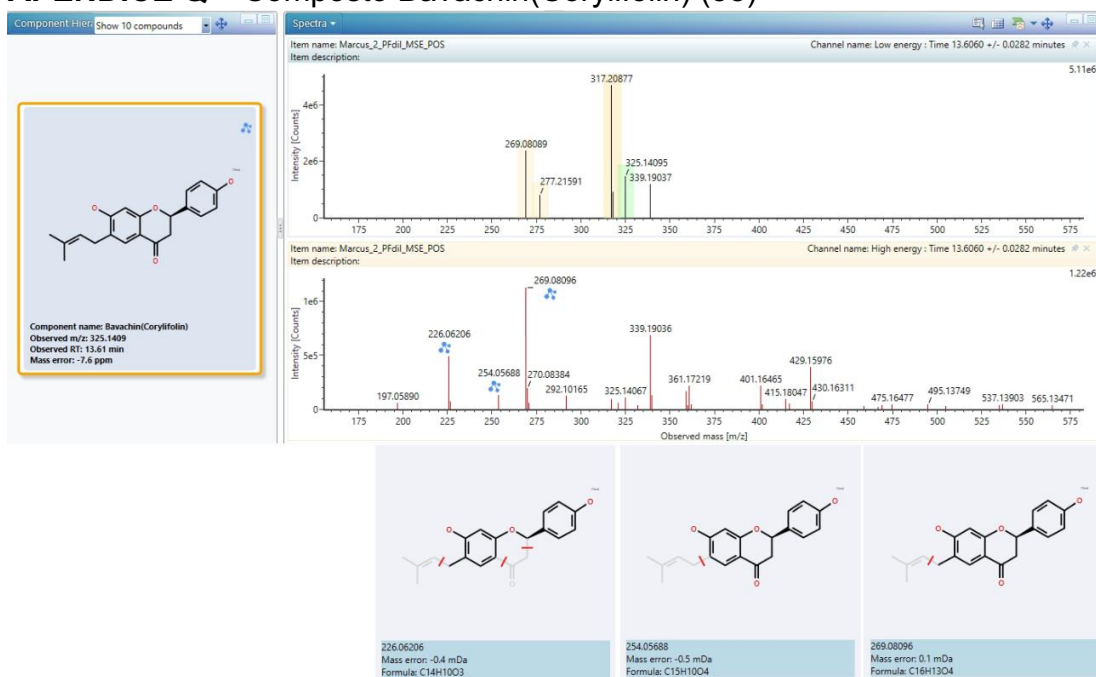
APÊNDICE O – Composto Arnebifuranone (56)



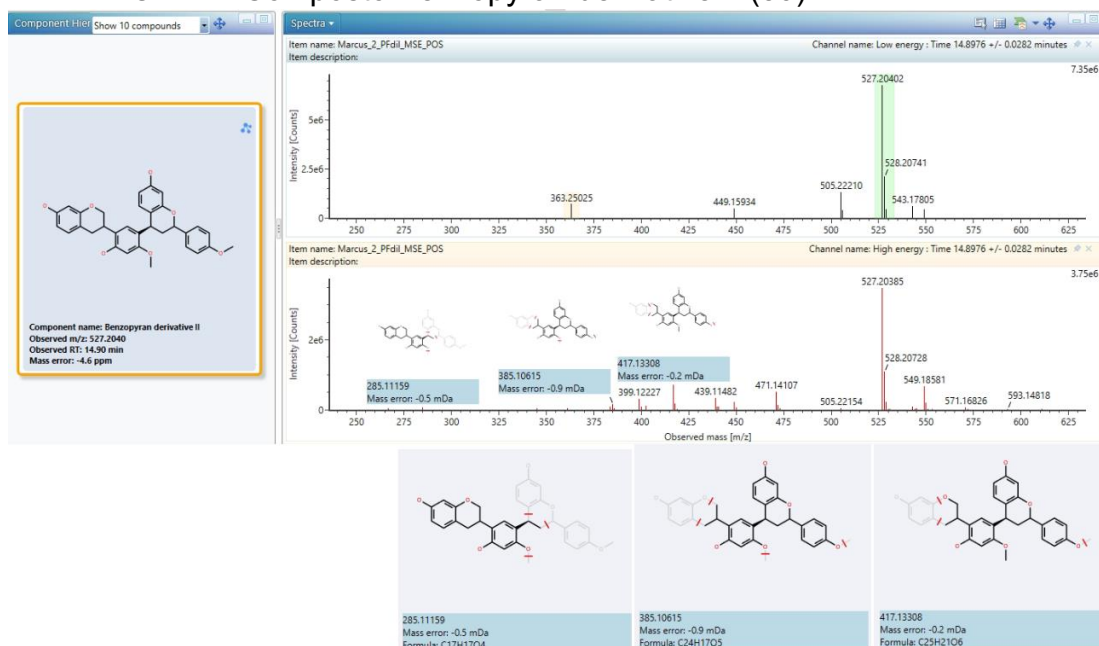
APÊNDICE P – Composto Arnebinone (57)



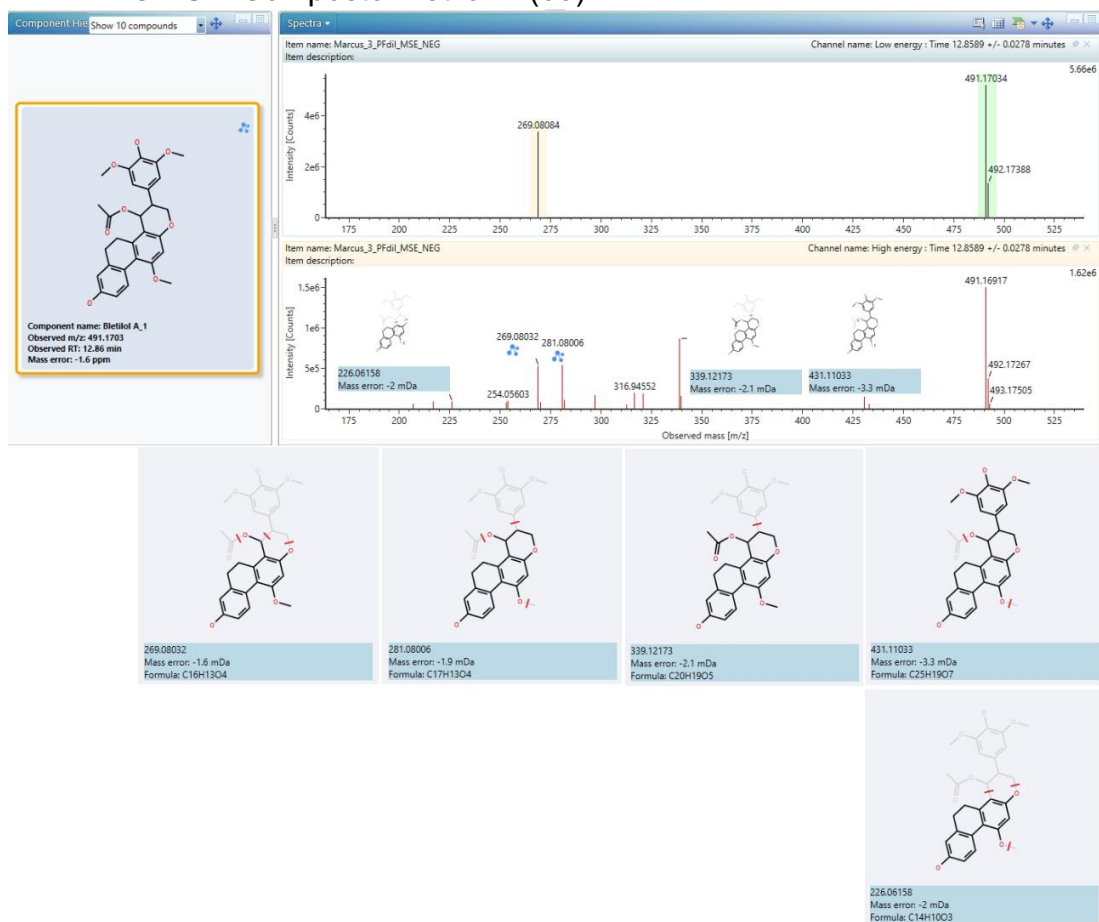
APÊNDICE Q – Composto Bavachin(Corylifolin) (58)



APÊNDICE R – Composto Benzopyran derivative II (59)



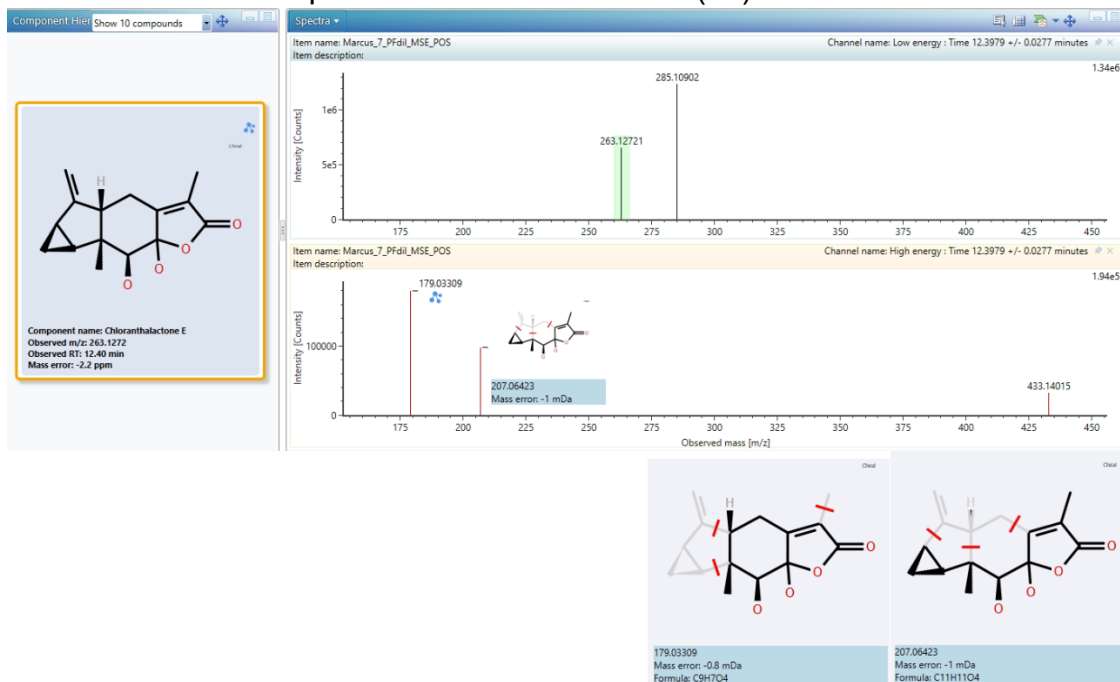
APÊNDICE S – Composto Bletilol A (60)



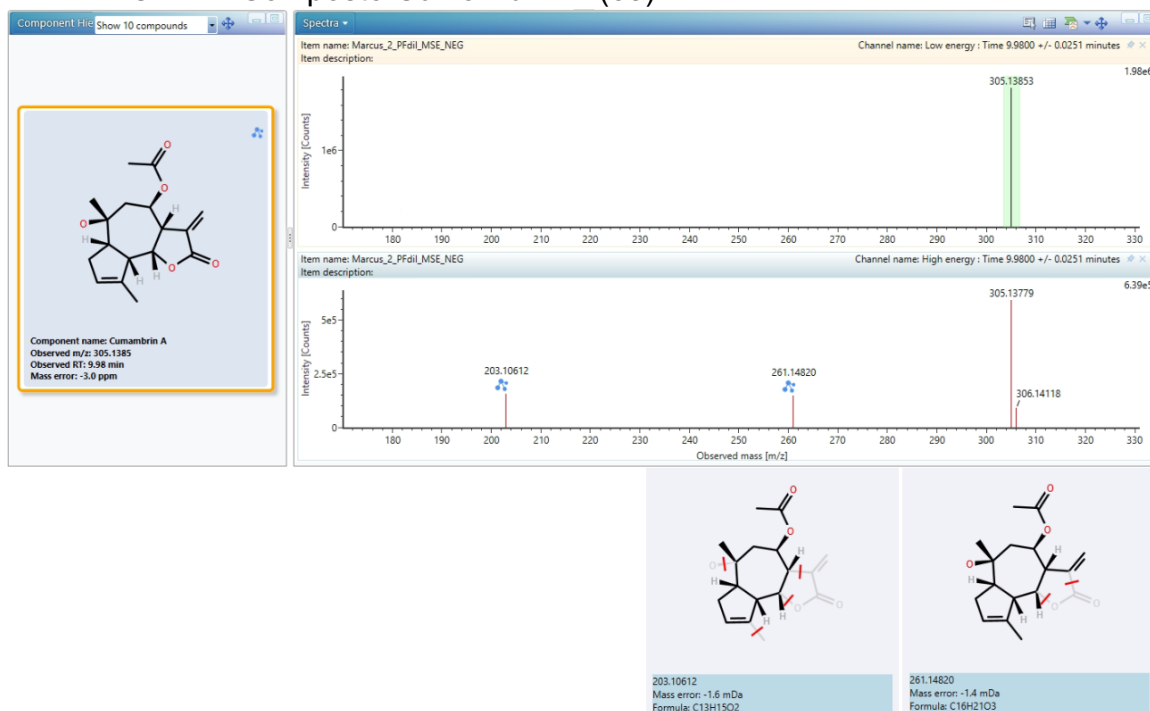
APÊNDICE T – Composto Cadambine (61)



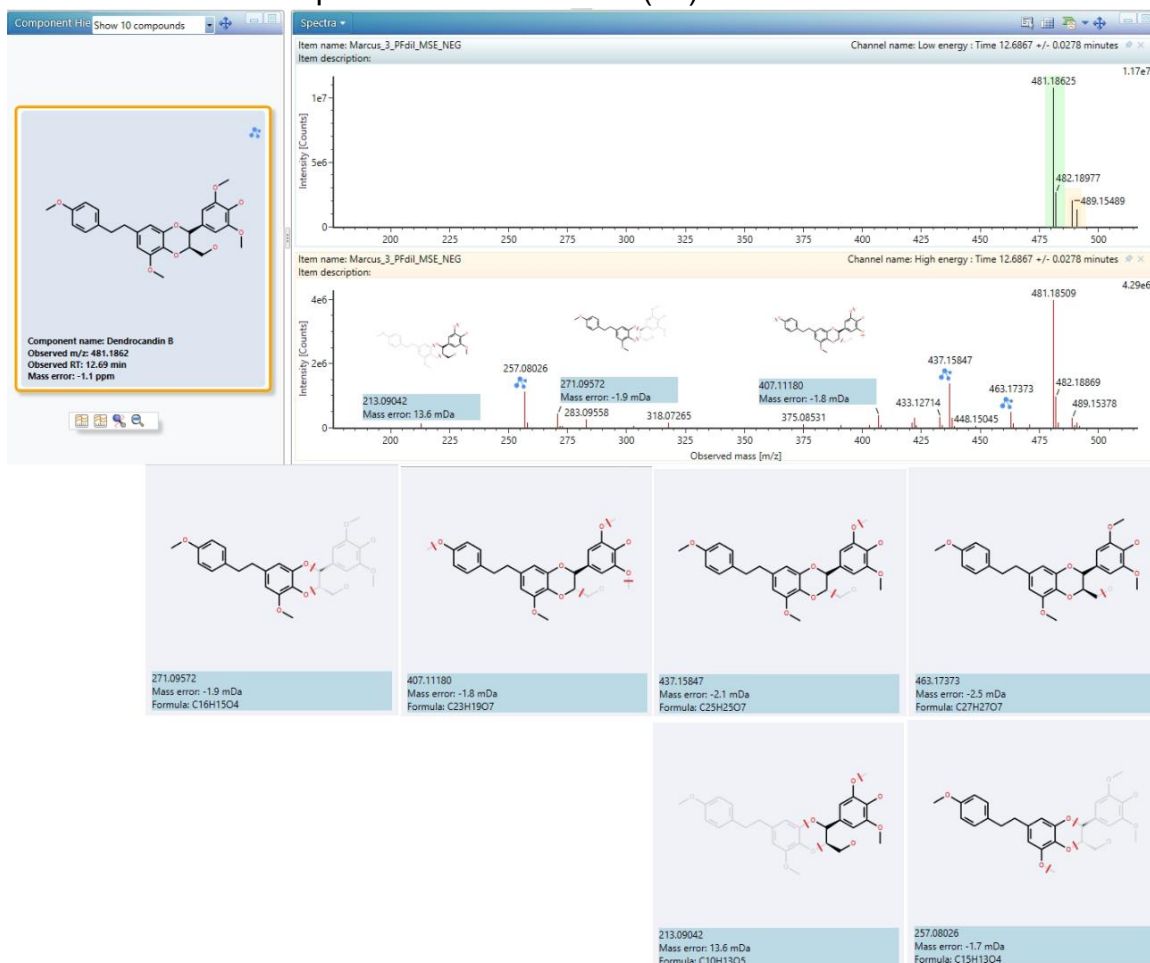
APÊNDICE U – Composto Chloranthalactone E (62)



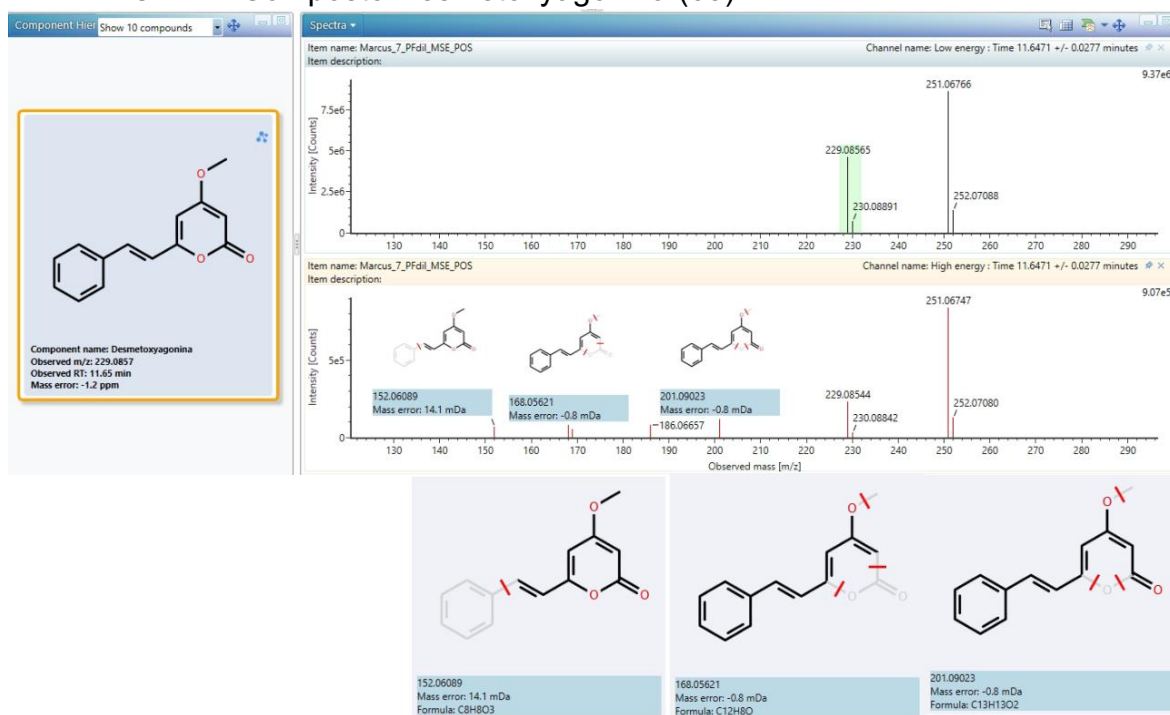
APÊNDICE V – Composto Cumambrin A (63)



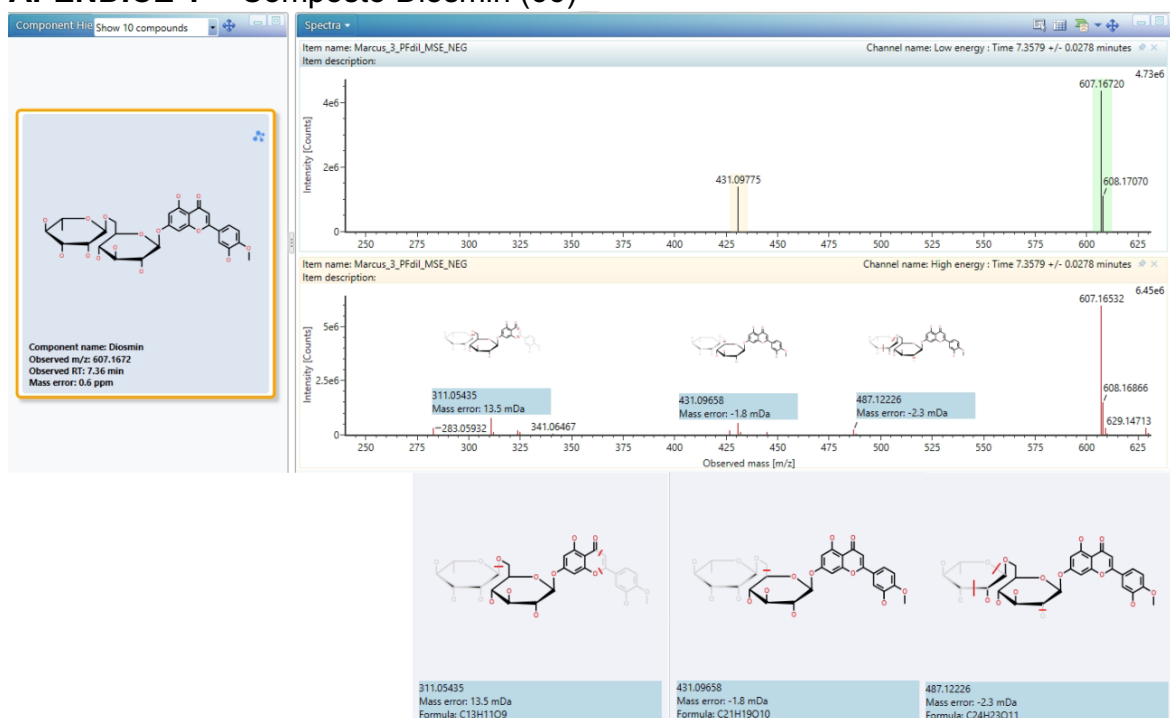
APÊNDICE W – Composto Dendrocandín B (64)



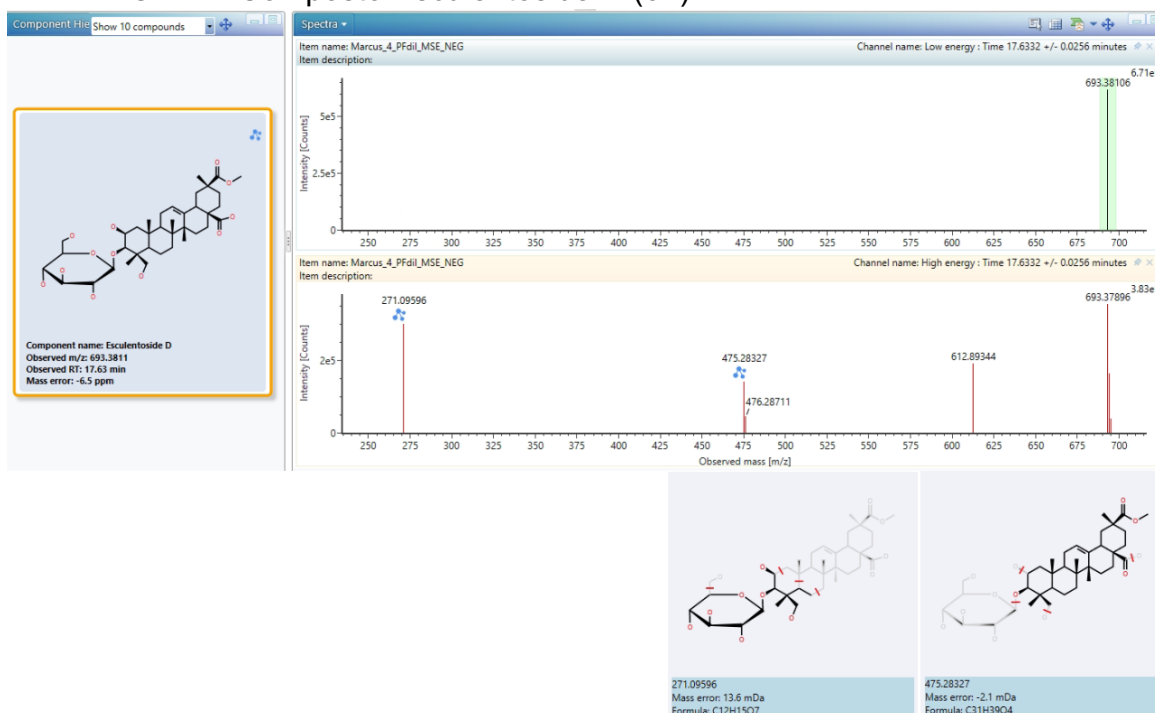
APÊNDICE X – Composto Desmetoxyagonina (65)



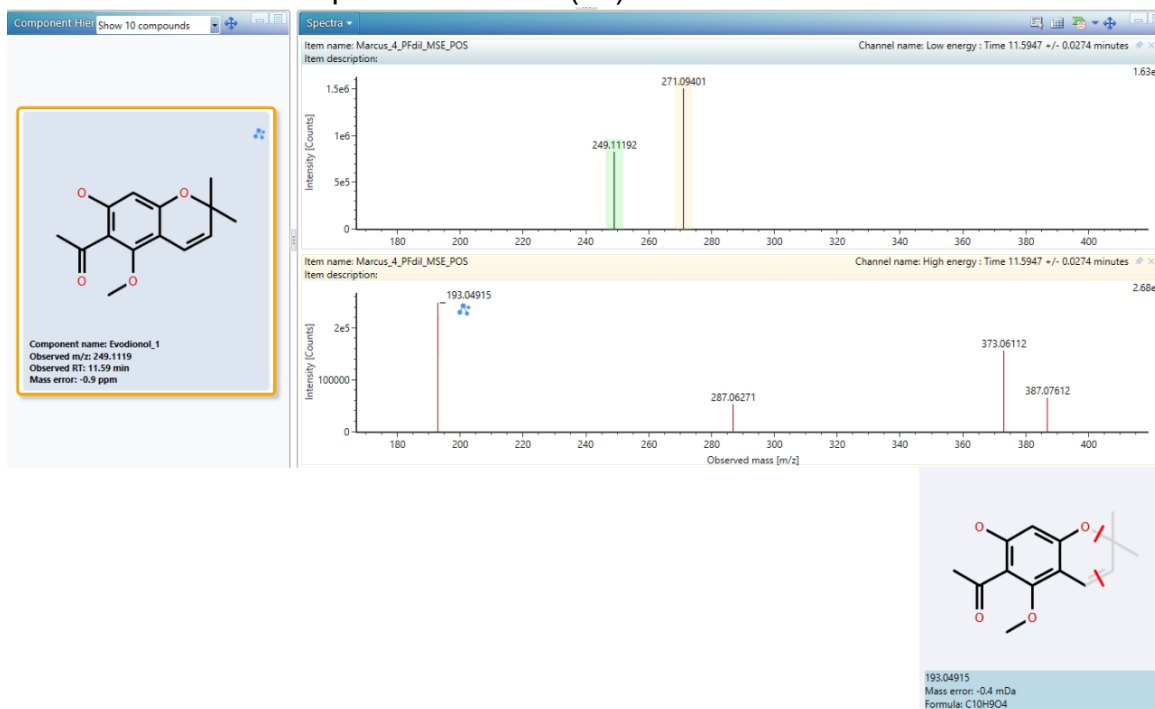
APÊNDICE Y – Composto Diosmin (66)



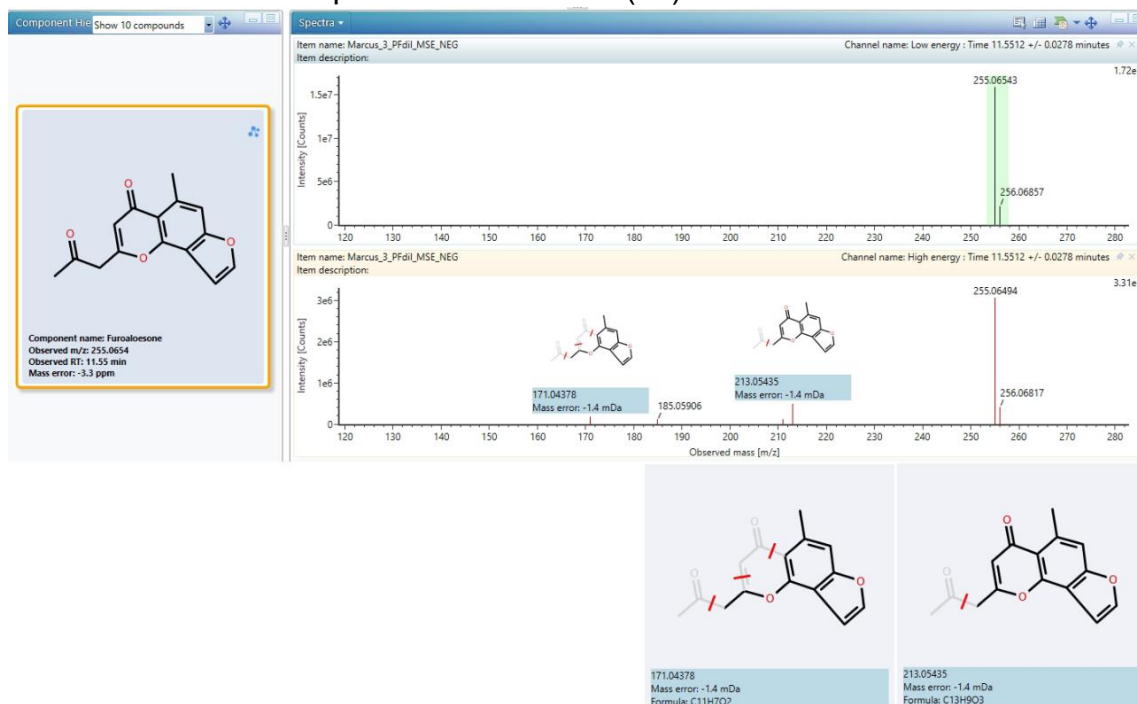
APÊNDICE Z – Composto Esculentoside D (67)



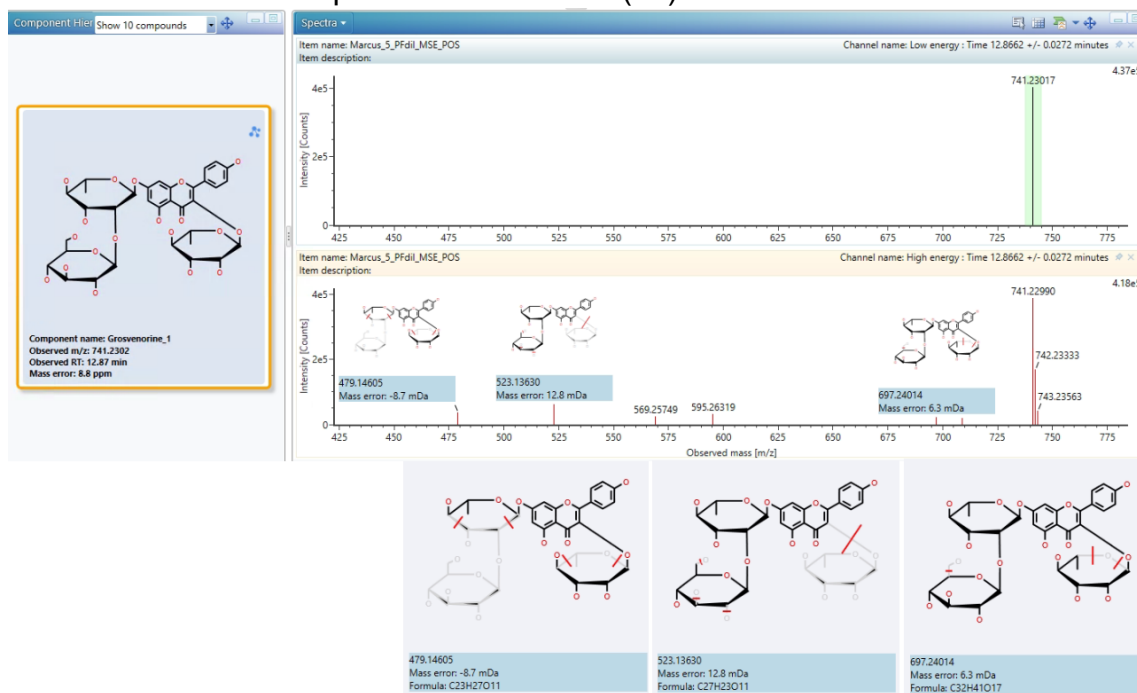
APÊNDICE AA – Composto Evodionol (68)



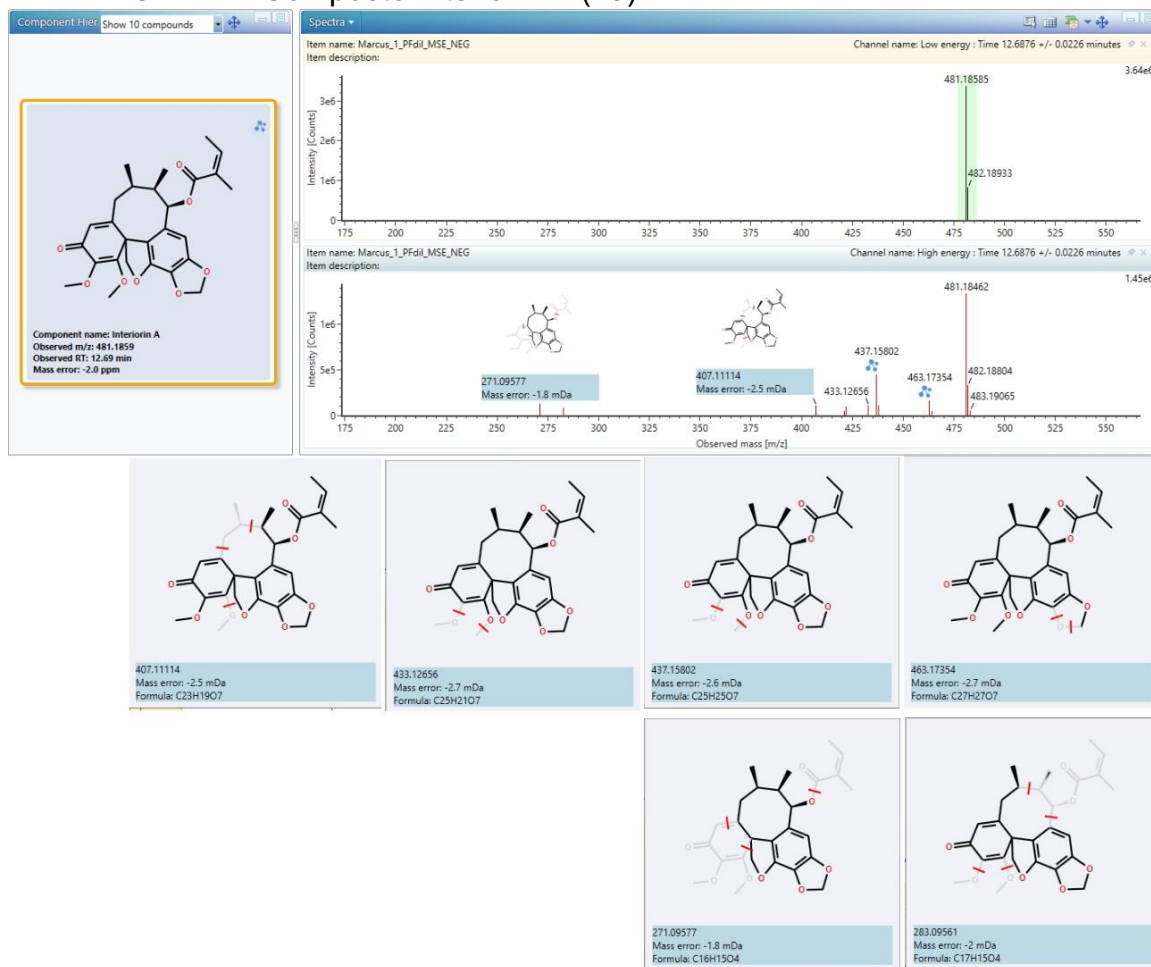
APÊNDICE AB – Composto Furoaloesone (69)



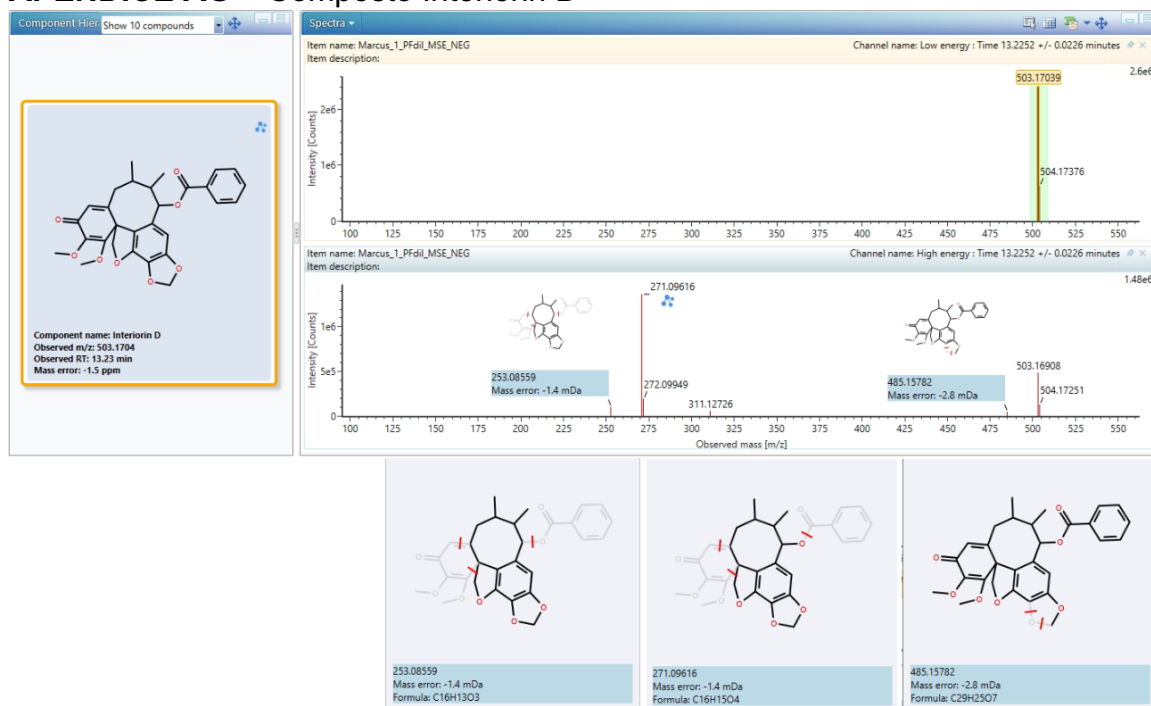
APÊNDICE AC – Composto Grosvenorine (70)



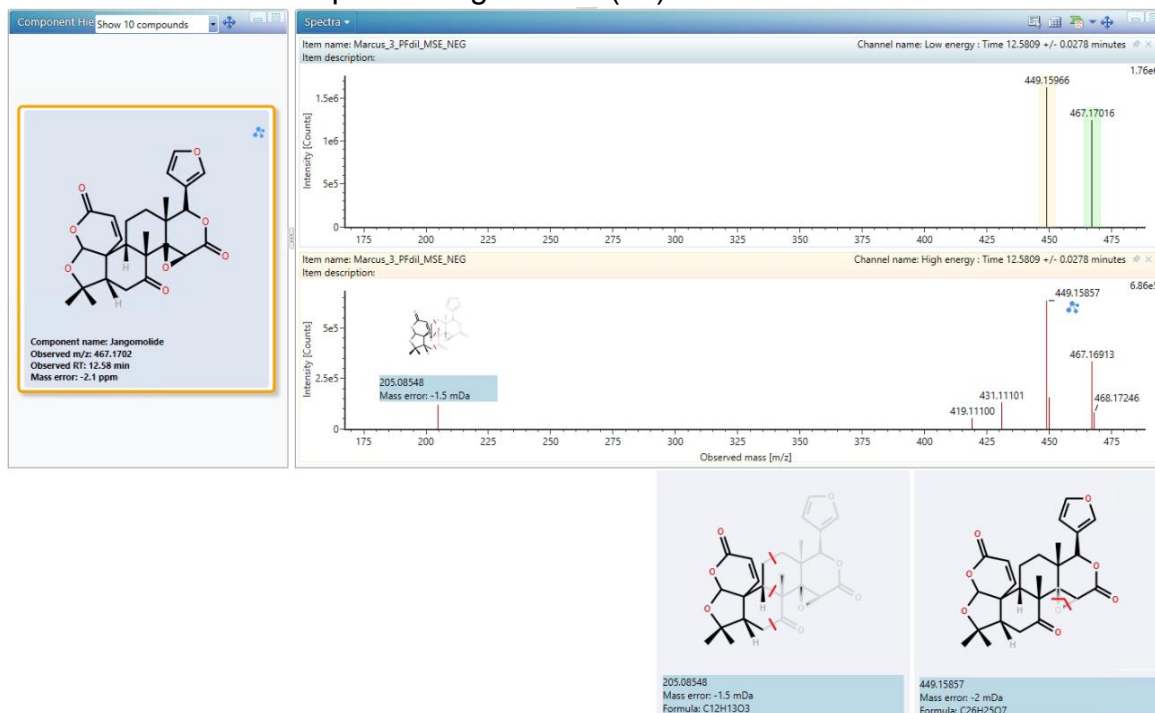
APÊNDICE AF – Composto Interiorin A (73)



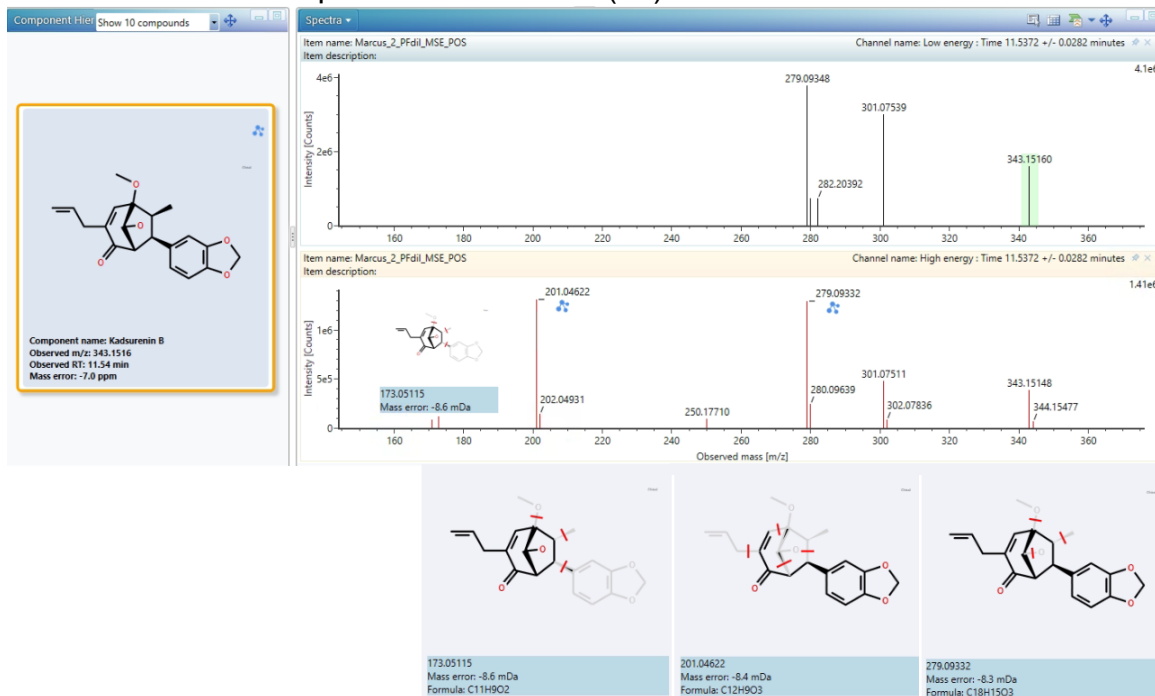
APÊNDICE AG – Composto Interiorin D



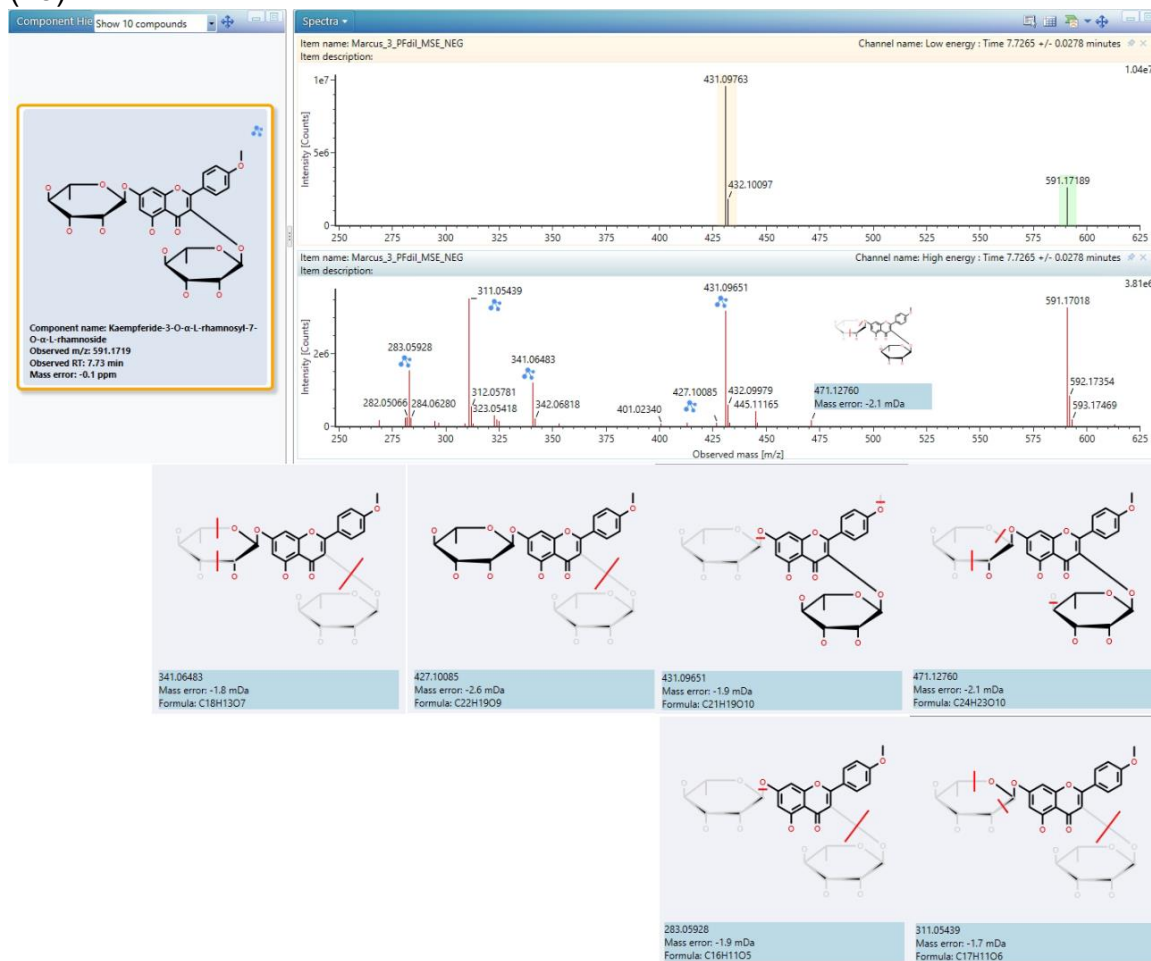
APÊNDICE AH – Composto Jangomolide (75)



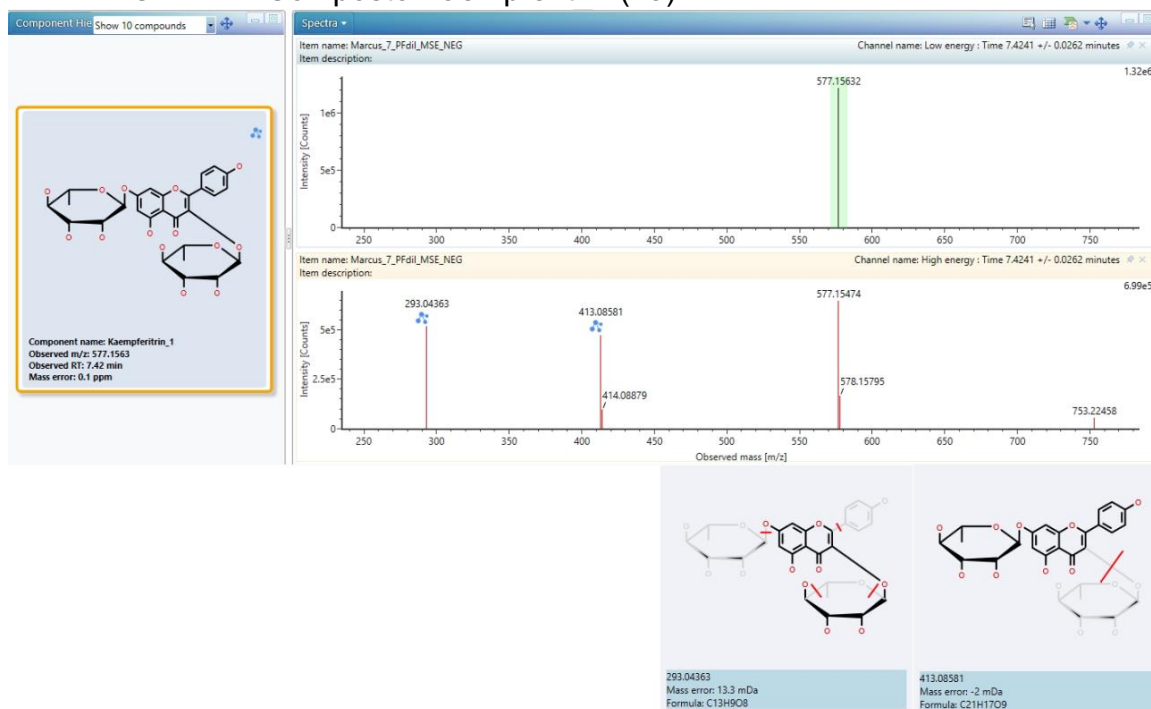
APÊNDICE AI – Composto Kadsurenin B (76)



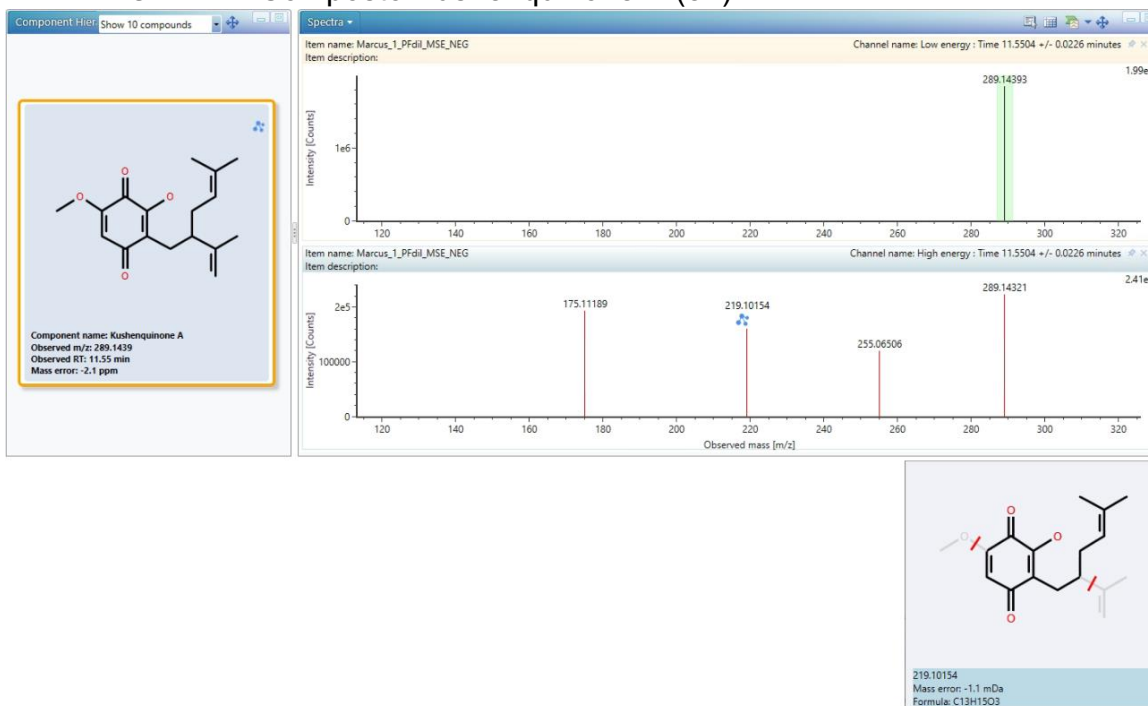
APÊNDICE AJ – Composto Kaempferide-3-O- α -L-rhamnosyl-7-O- α -L-rhamnoside (78)



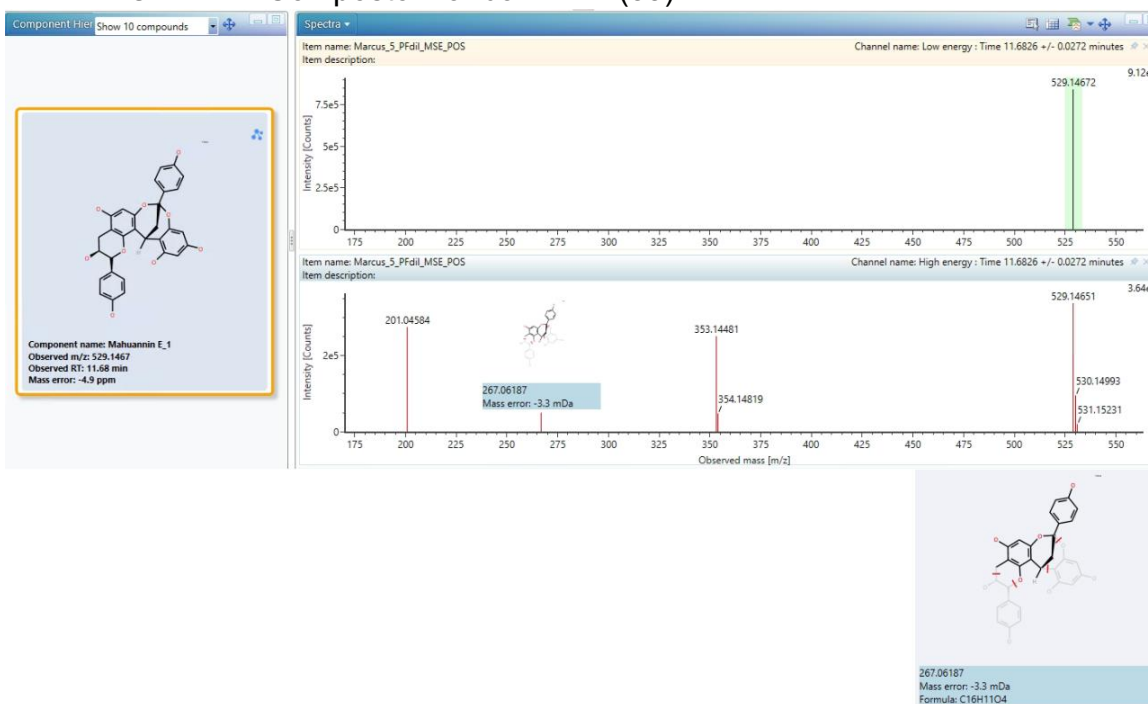
APÊNDICE AK – Composto Kaempferitrin (79)



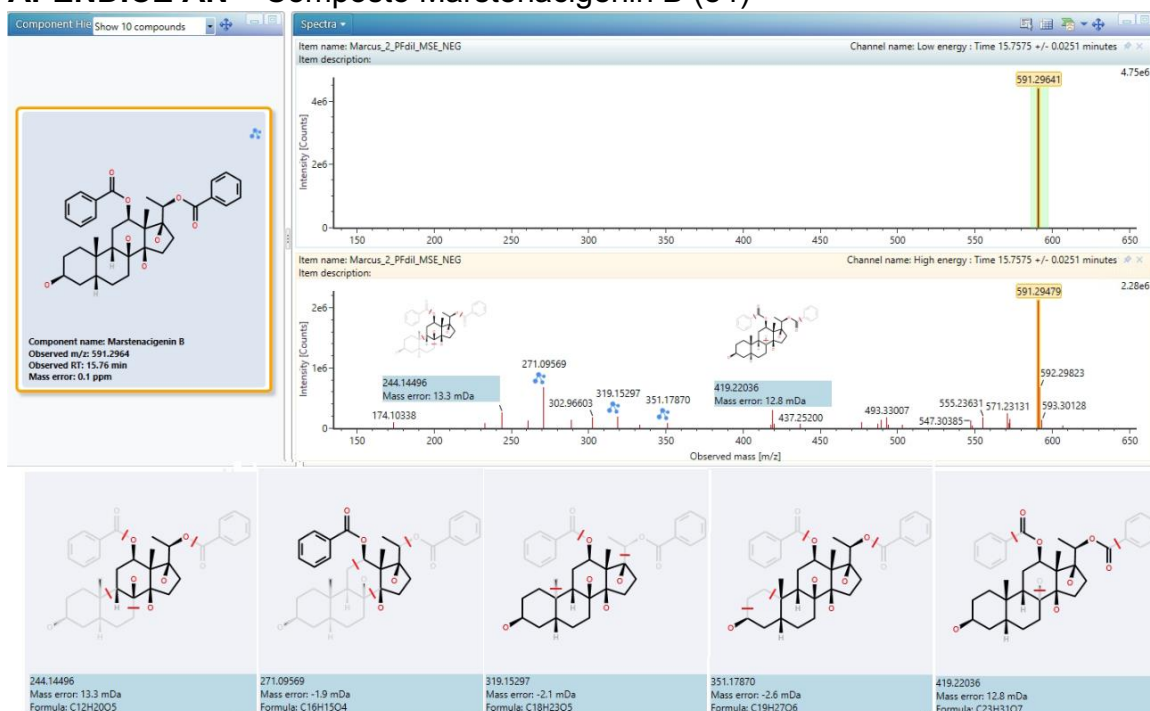
APÊNDICE AL – Composto Kushenquinone A (81)



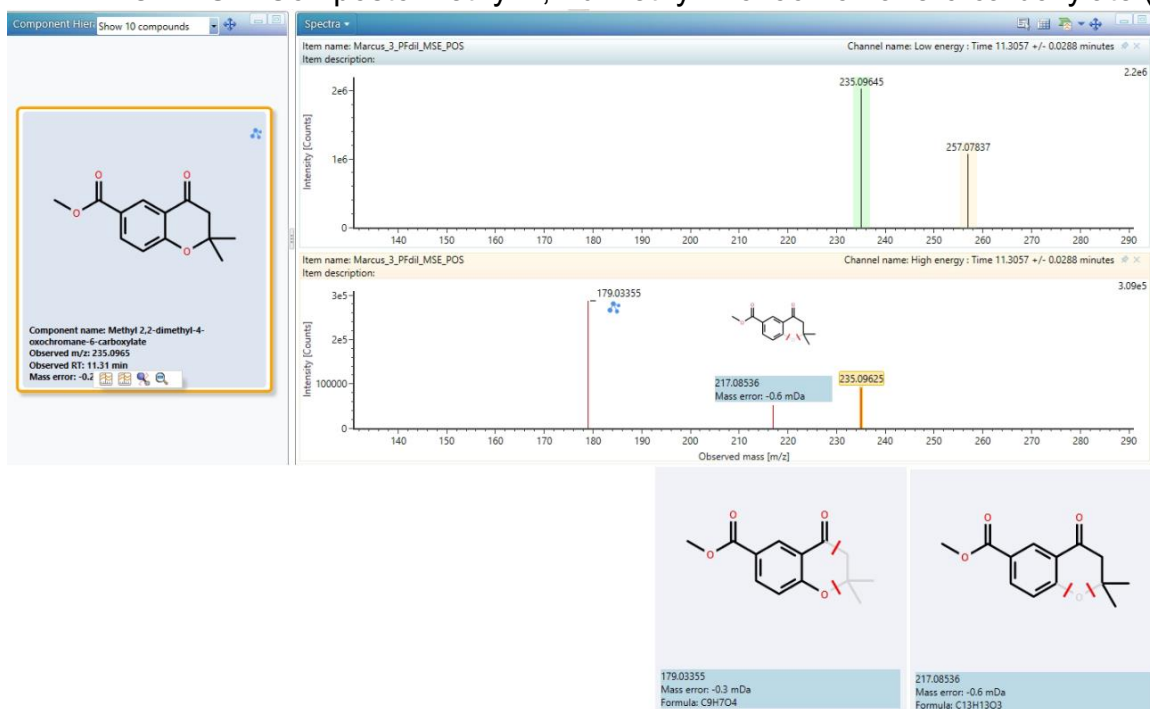
APÊNDICE AM – Composto Mahuannin E (83)



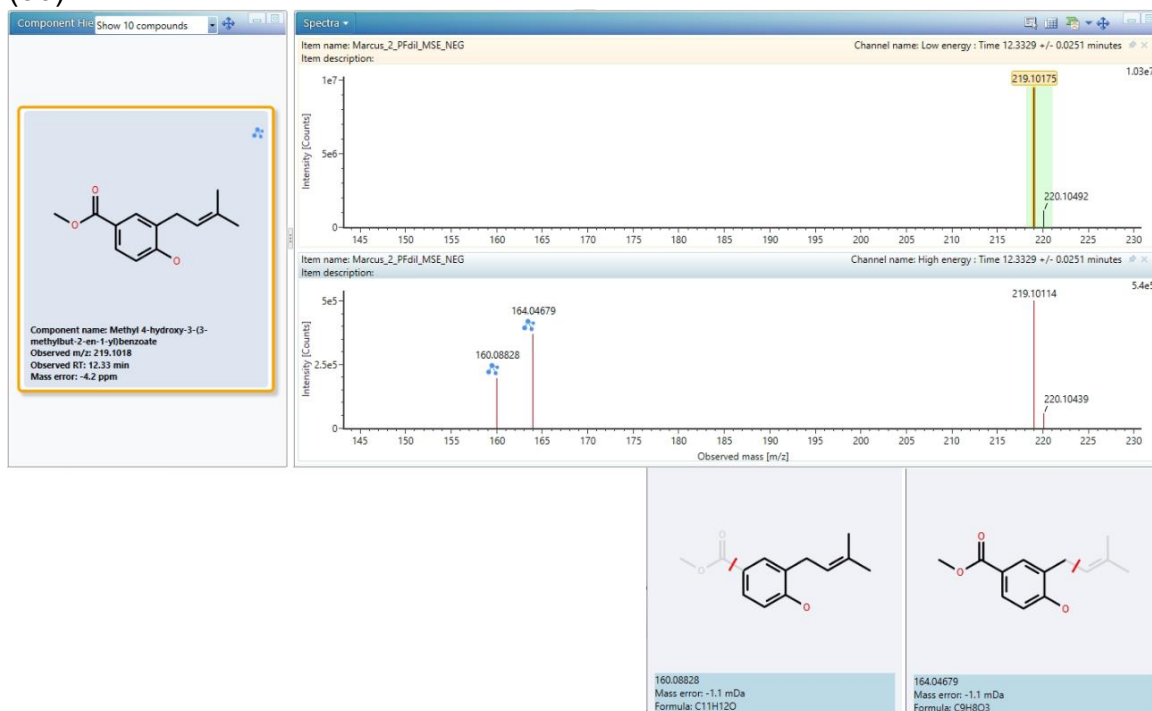
APÊNDICE AN – Composto Marstenacigenin B (84)



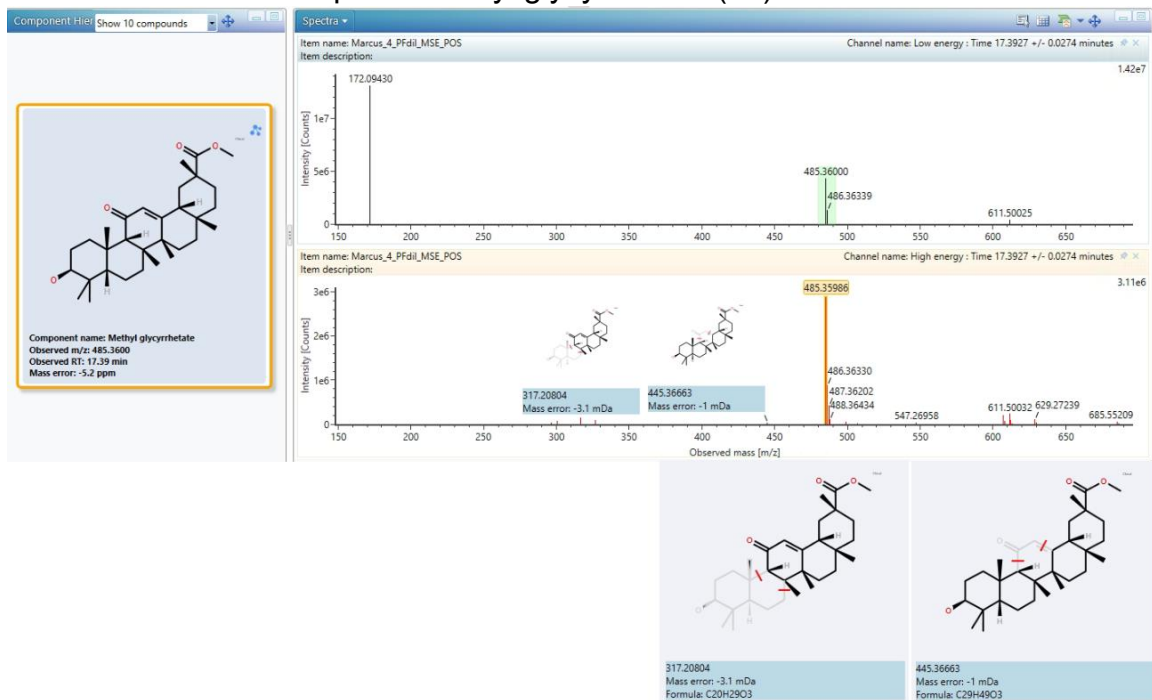
APÊNDICE AO – Composto Methyl 2,2-dimethyl-4-oxochromane-6-carboxylate (85)



APÊNDICE AP – Composto Methyl 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzoate (86)



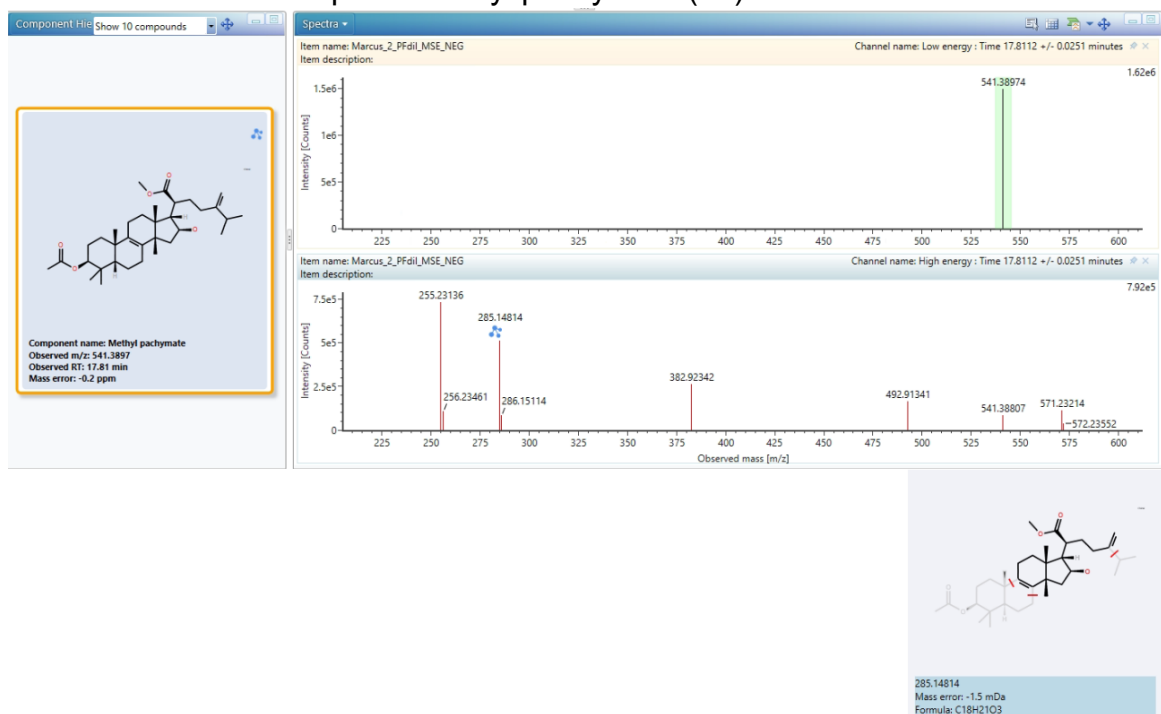
APÊNDICE AQ – Composto Methyl glycyrrhetate (87)



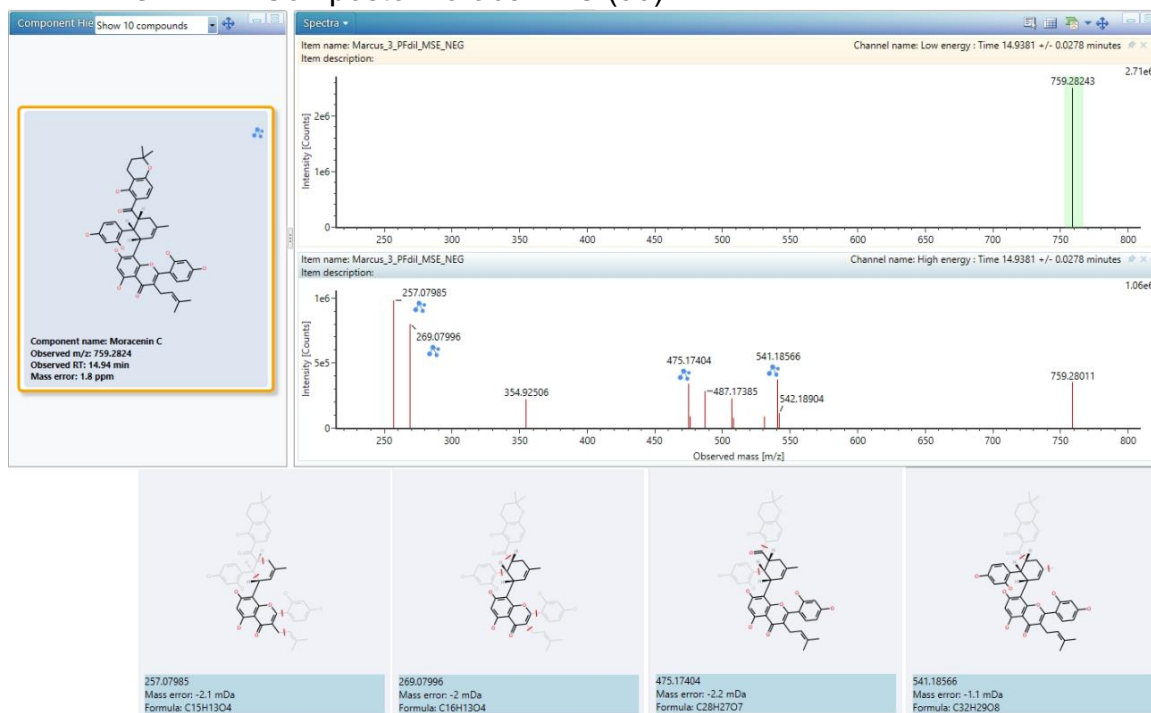
APÊNDICE AR – Composto Methyl kulonate (88)



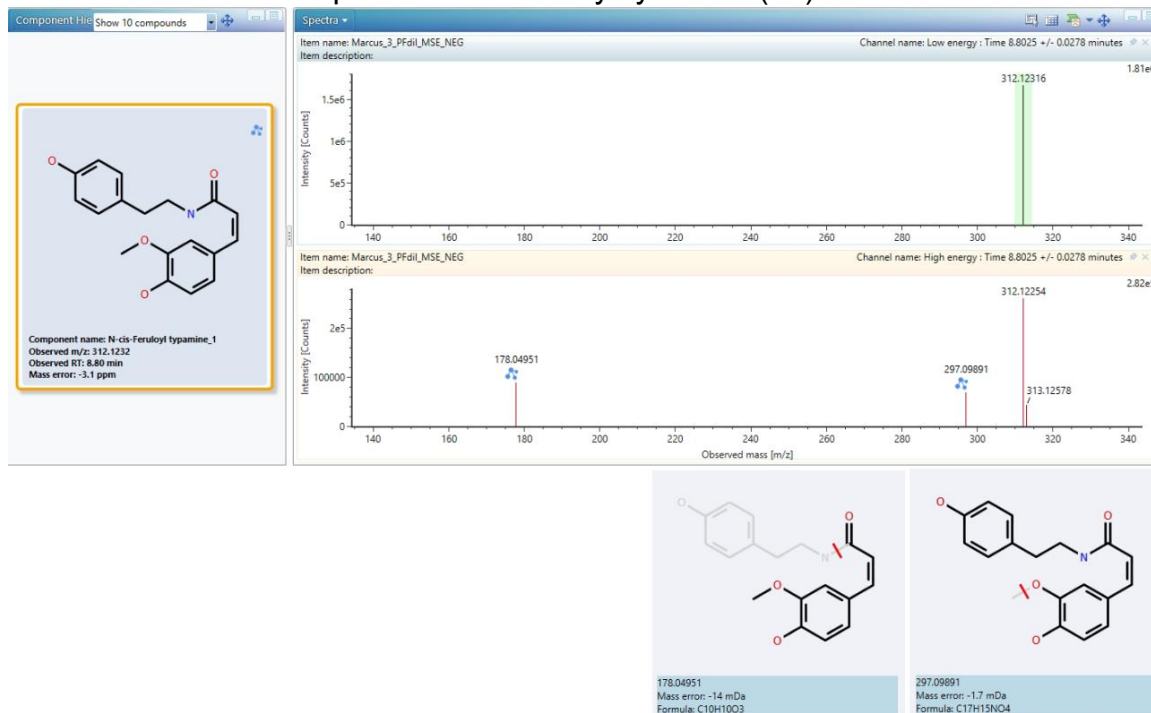
APÊNDICE AS – Composto Methyl pachymate (89)



APÊNDICE AT – Composto Moracenin C (90)



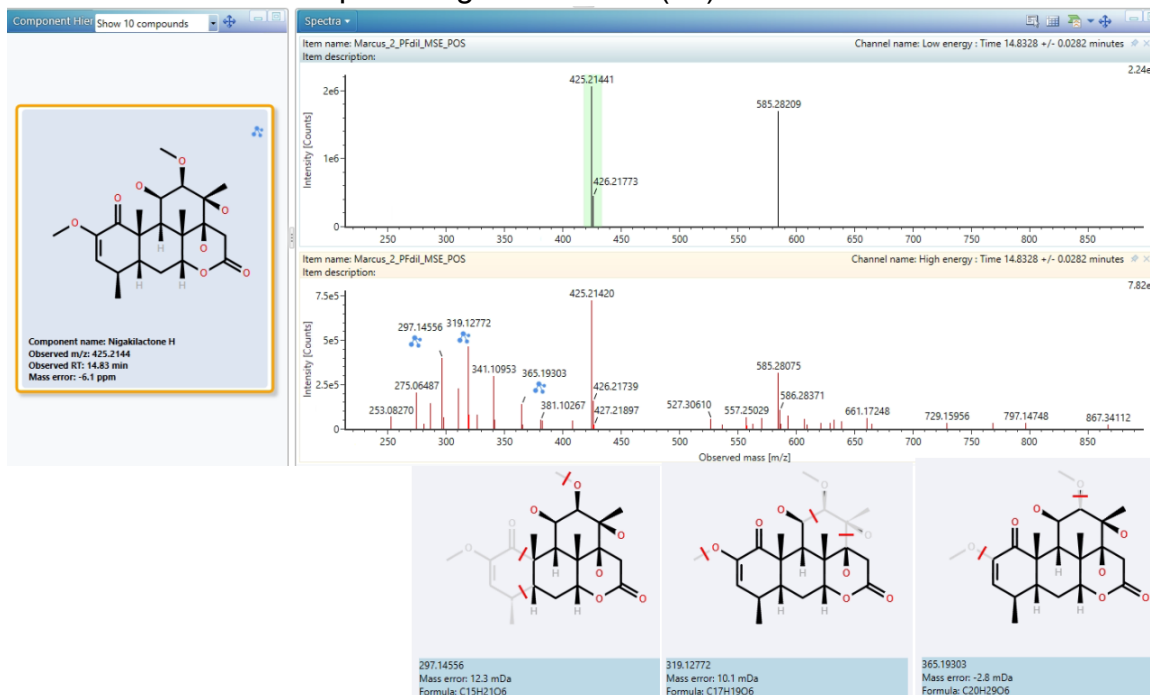
APÊNDICE AU – Composto N-cis-Feruloyl tyramine (91)



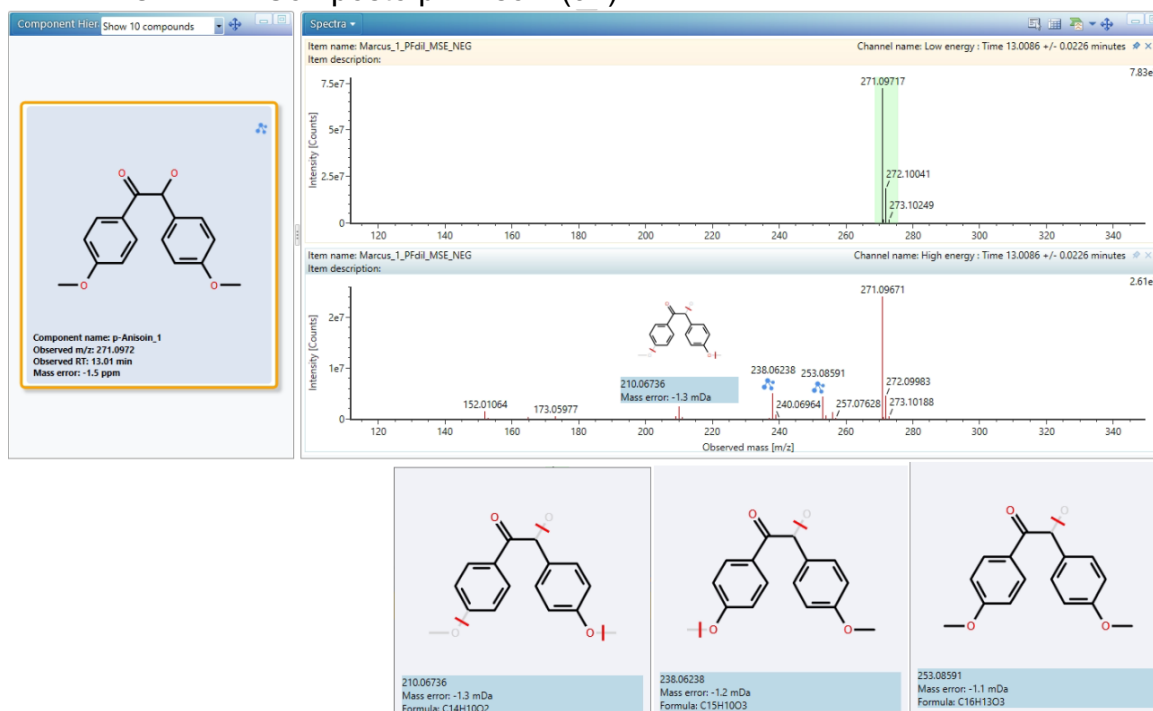
APÊNDICE AV – Composto Nevadensin-7-O-[α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoside (92)



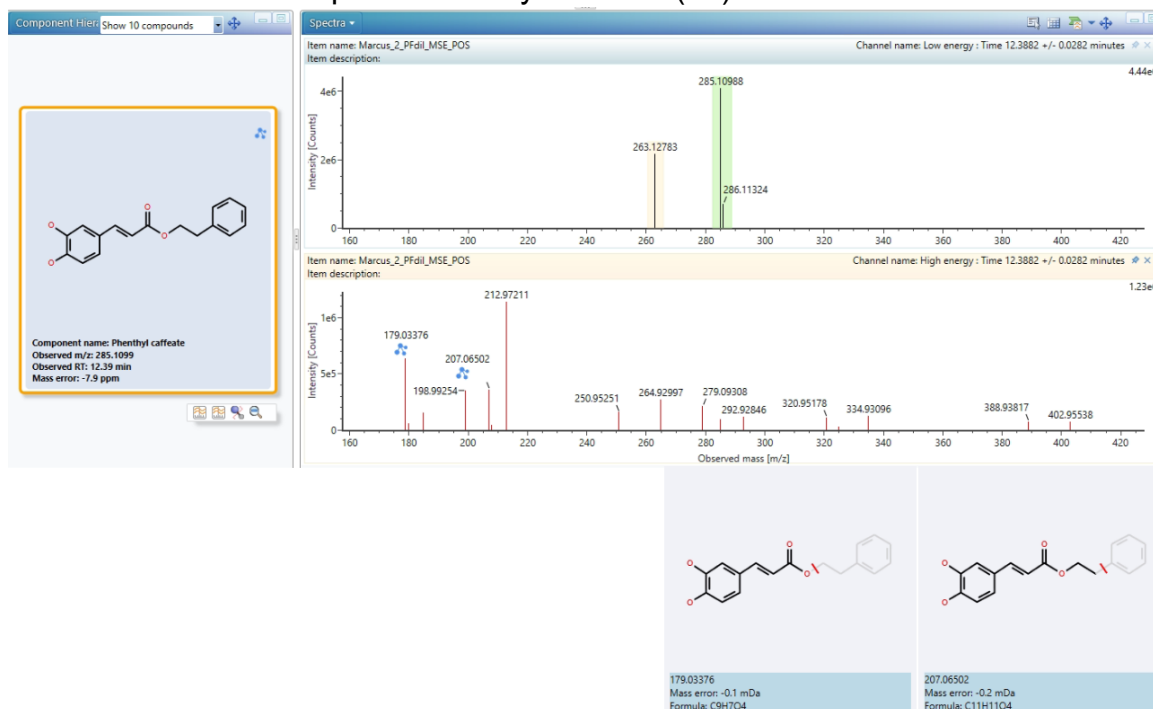
APÊNDICE AW – Composto Nigakilactone H (93)



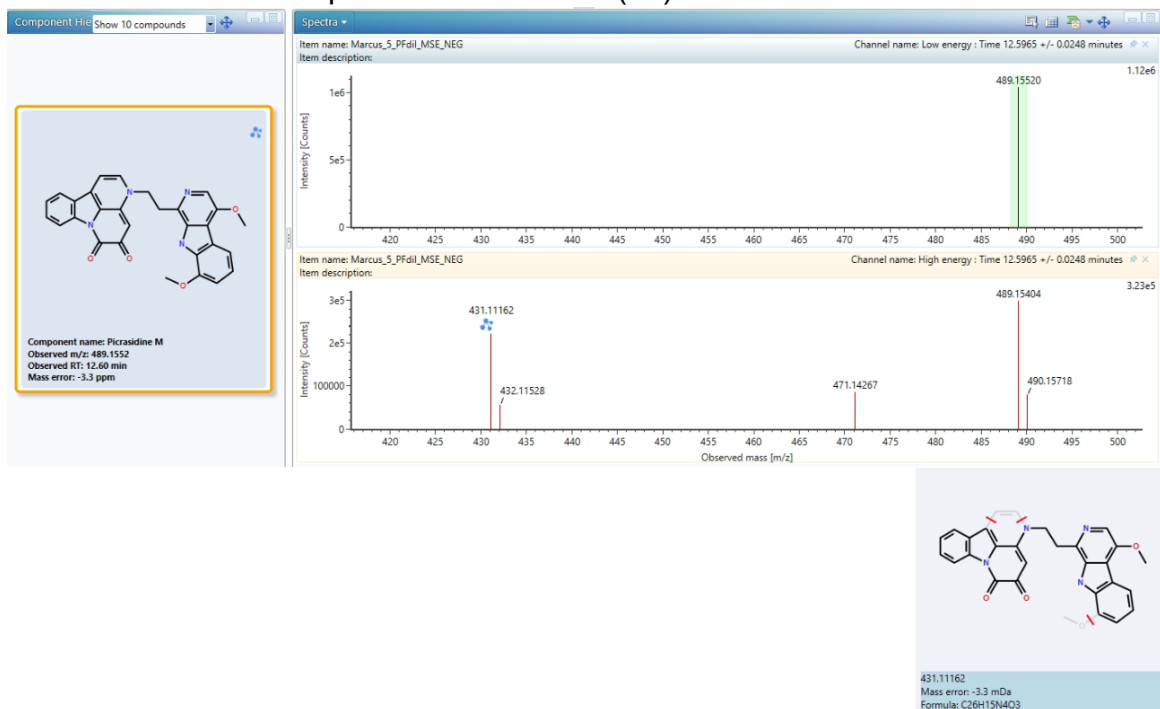
APÊNDICE AX – Composto p-Anisoiln (94)



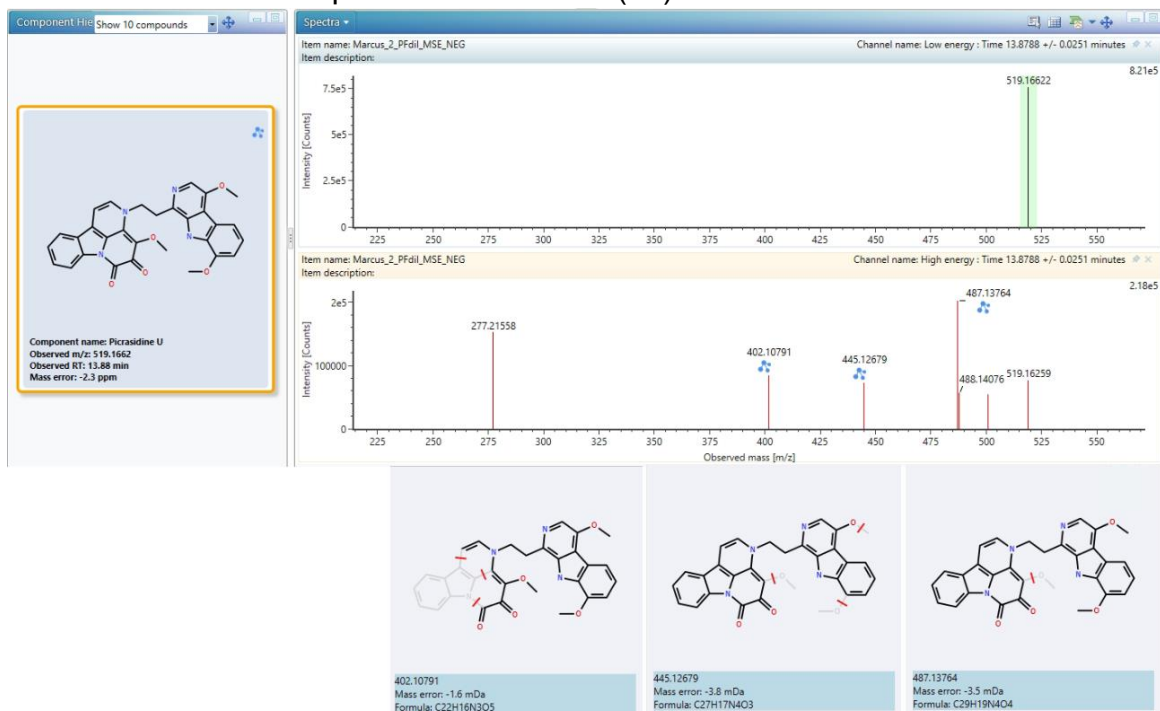
APÊNDICE AY – Composto Phenthyl caffeate (95)



APÊNDICE AZ – Composto Picrasidine M (96)



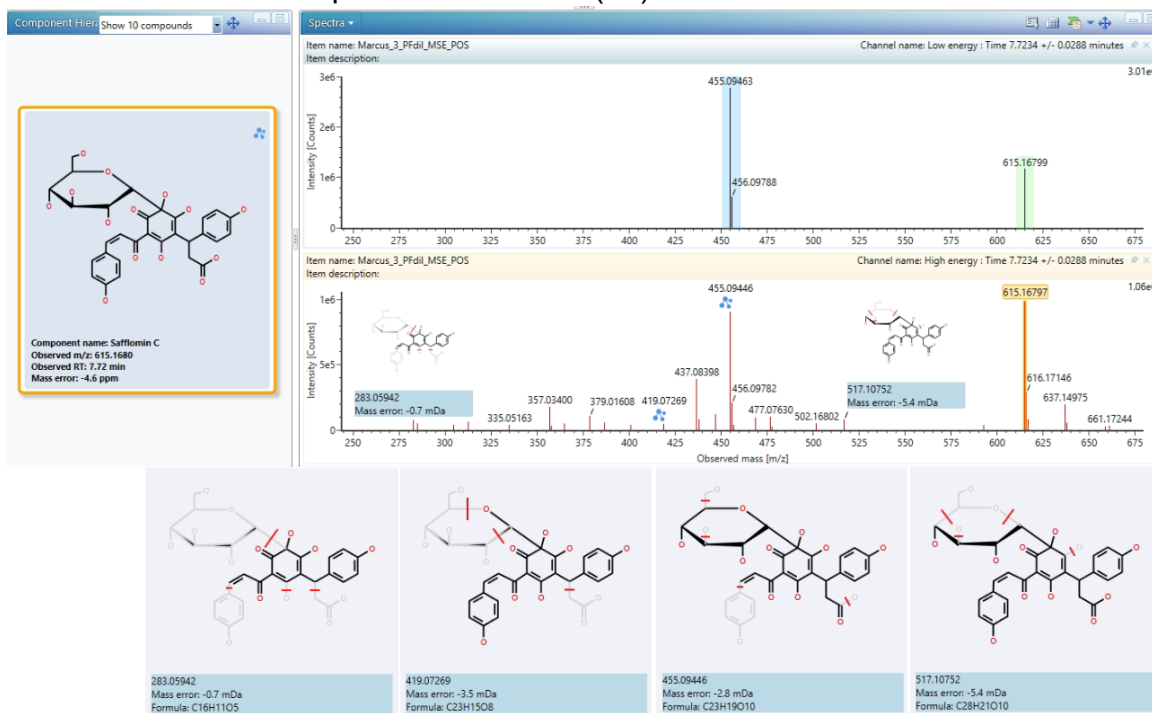
APÊNDICE BA – Composto Picrasidine U (97)



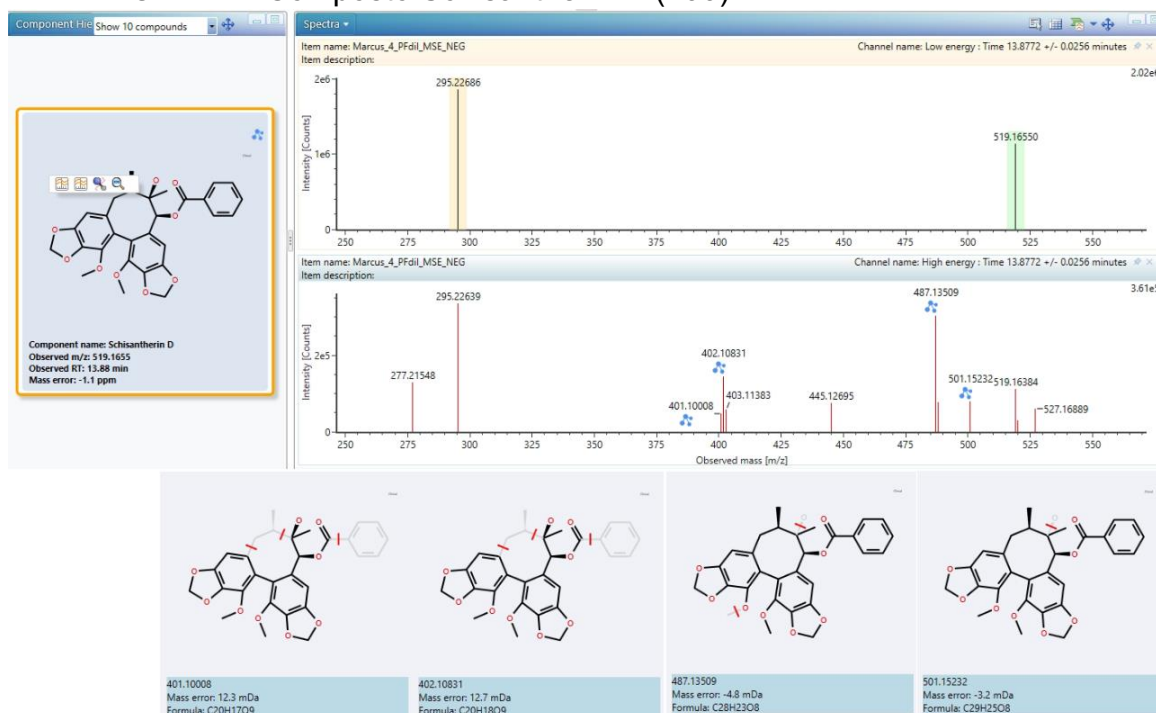
APÊNDICE BB – Composto Pinocembrin (98)



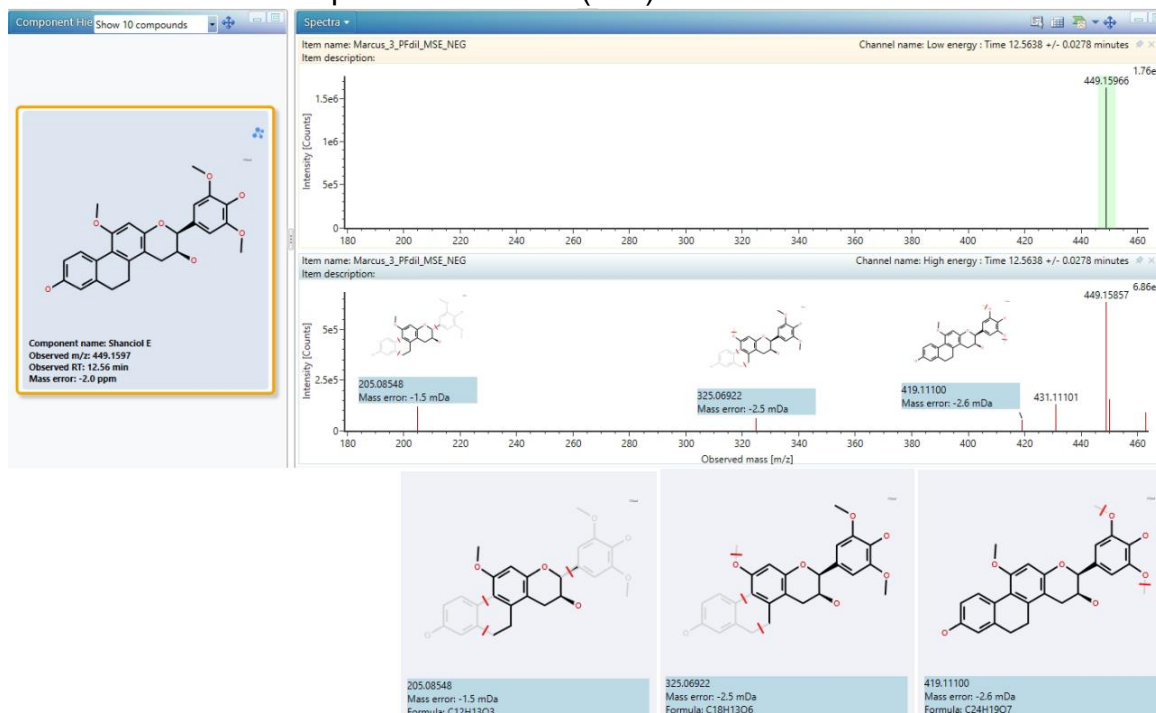
APÊNDICE BC – Composto Safflomin C (99)



APÊNDICE BD – Composto Schisantherin D (100)



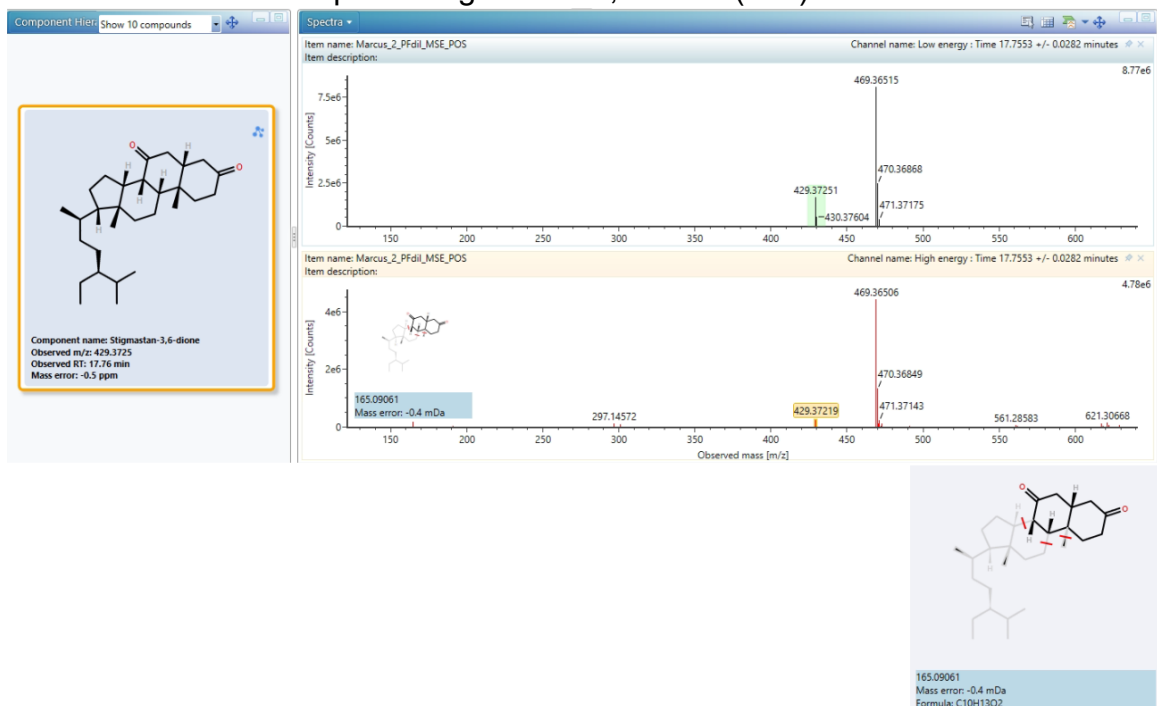
APÊNDICE BE – Composto Shanciol E (101)



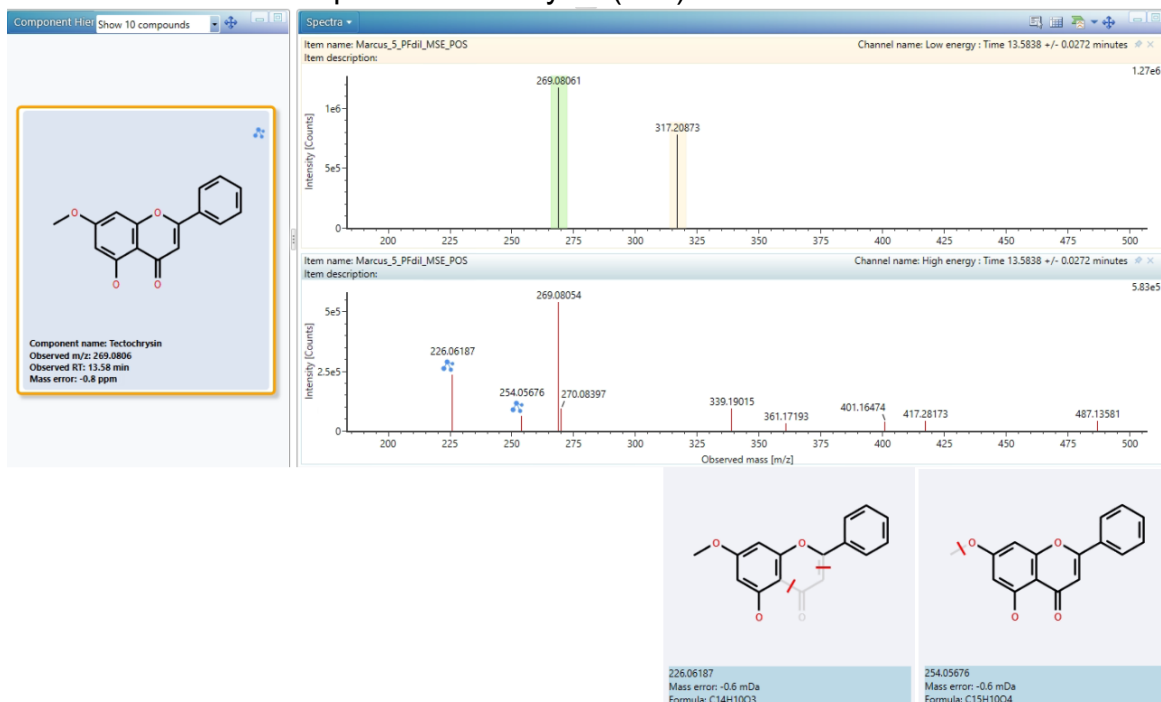
APÊNDICE BF – Composto Spinosin (102)



APÊNDICE BG – Composto Stigmastan-3,6-dione (103)



APÊNDICE BG – Composto Tectochrysin (104)



APÊNDICE BH – Composto Tussilagonone (105)

