



Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul
Unidade de Dourados
Química Industrial



FAGNER DE ALMEIDA GOMES

Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da fração hidroalcoólica das folhas de *Piper amalago*.

DOURADOS – MS

2016

FAGNER DE ALMEIDA GOMES

Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da fração hidroalcoólica das folhas de *Piper amalago*.

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão do Curso de graduação em Química Industrial, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS.

Orientador: Prof. Dr. Jonas da Silva Mota

DOURADOS – MS

2016

FAGNER DE ALMEIDA GOMES

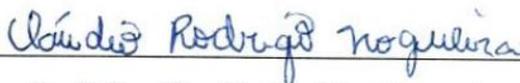
**Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da fração
hidroalcoólica das folhas de *Piper amalago*.**

Monografia aprovada como requisito parcial para a conclusão do Curso de Graduação em Química Industrial, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS, com a nota nove(9,0) atribuída pela banca examinadora formada pelos professores:

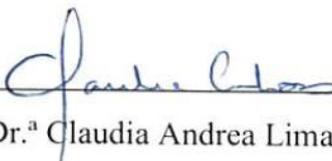
Aprovado em: 28/ 11/ 2016



Prof. Dr. Jonas da Silva Mota
Orientador



Prof. Dr. Claudio Rodrigo Nogueira
Membro



Prof.ª Dr.ª Claudia Andrea Lima Cardoso
Membro

DEDICATÓRIA

Este trabalho é fruto da pertinácia de meu orientador e fruto, também, da persistência de minha família aos quais dedico o resultado do meu estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, seu corpo docente, administração e direção que oportunizaram meu crescimento como profissional, engrandecendo meu conhecimento, confiança e ética.

Ao um orientador Dr. Jonas da Silva Mota, pelo suporte desde a iniciação científica até o presente trabalho, pelas suas correções e incentivos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

**Não! Tentar não. Faça. Ou não Faça.
Tentativa não há.**

Mestre Yoda em “Star Wars: Episódio
V – O Império Contra-Ataca”.

RESUMO

A *Piper amalago* apresenta grande potencial para estudos, a literatura relata para esta espécie atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante, atividade diurética, atividade antililítasica entre outras. O objetivo deste trabalho foi o estudo químico da fração hidroalcoólica do extrato de *Piper amalago* e sua atividade antioxidante. O extrato foi preparado a partir das folhas coletadas no município de Dourados, estas foram secas por três semanas a temperatura ambiente, moídas em moinho de facas. Adicionou-se etanol para a extração por 7 dias, a parte líquida foi concentrada em evaporador rotativo e posteriormente seca em capela, este procedimento foi repetido três vezes, gerando 25 g de extrato etanólico bruto. Este foi dissolvido em 250 mL em metanol/água(8/2) e submetido a partição líquido-líquido, obtendo as frações hexânica (2,00g), clorofórmica (5,00g), acetato de etila (3,00g) e hidroalcoólica (15,00g). A avaliação da atividade antioxidante da fração hidroalcoólica foi realizada pelo método do DPPH, os resultados indicam que a fração possui boa atividade antioxidante ($IC_{50} = 45,78 \mu\text{g mL}^{-1}$), quando comparados com os padrões Trolox e TBHQ. O fracionamento foi realizado utilizando as seguintes fases estacionárias Sephadex® com eluição em metanol, C18 como com eluição em gradiente de água e metanol, e sílica gel com eluição em gradiente de hexano e acetato de etila. O fracionamento resultou na purificação de 5 frações (S4-3, S5-4, S3-5, S3-8 e S8-1), de acordo com os resultados por cromatografia líquida de alta eficiência. Até o presente momento recebemos os espectros de RMN de ^1H para a amostra S5-4, estes dados em conjunto com os espectros de UV indicam que temos um flavonol.

Palavras-chave: Cromatografia em coluna, CLAE, RMN.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Piper amalago</i>	10
Figura 2-Fluxograma do fracionamento da fração hidroalcoólica.	14
Figura 3-Fluxograma do fracionamento da fração S4.	15
Figura 4-Fluxograma do fracionamento da fração S5.	16
Figura 5-Fluxograma do fracionamento da fração S3.	17
Figura 6-Fluxograma do fracionamento da fração S8.	18
Figura 7-Curva com a relação entre concentração da amostra e inibição de DPPH em porcentagem.....	19
Figura 8-Cromatograma da fração S1.	20
Figura 9-Cromatograma da fração S2.	21
Figura 10- Cromatograma da fração S3.	21
Figura 11-Cromatograma da fração S4.	22
Figura 12-Cromatograma da fração S5.	22
Figura 13-Cromatograma da fração S6.	23
Figura 14-Cromatograma da fração S7.	23
Figura 15-Cromatograma da fração S8.	24
Figura 16-Cromatograma da fração S9.	25
Figura 17-Cromatograma da fração S4-3 com seu respectivo espectro UV.	26
Figura 18-Cromatograma da fração S5-4 com seu respectivo espectro de UV.....	26
Figura 19-Cromatograma da fração S3-5 com seu repectivo espectro de UV.	27
Figura 20-Cromatograma da fração S3-8 com seu respectivo espectro de UV.....	27
Figura 21-Cromatograma da fração S8-1 com seu respectivo espectro de UV.....	28
Figura 22-Espectro de RMN de ^1H da fração S5-4 (600 MHz, CD_3OD).....	29
Figura 23-Espectro de RMN ^1H da fração S5-4 expandido.	30
Figura 24-Espectro de RMN ^1H da fração S5-4 expandido.	31
Figura 25-Espectro de RMN ^1H da fração S5-4 expandido.	32
Figura 26-Estrutura genérica de um flavonol.	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Solventes	12
3.2 Cromatografia em coluna	12
3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou <i>High Precision Liquid Chromatograph (HPLC)</i>	12
3.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	12
3.5 Obtenção do material vegetal, preparo e fracionamento do extrato etanólico	12
3.6 Ensaio antioxidante da fração hidroalcoólica pelo método do DPPH	13
3.7 Fracionamento da fração hidroalcoólica por cromatografia em coluna	13
3.8 Fracionamento da fração S4 por cromatografia em coluna	14
3.9 Fracionamento da fração S5 por cromatografia em coluna	15
3.10 Fracionamento da fração S3 por cromatografia em coluna	17
3.11 Fracionamento da fração S8 por cromatografia em coluna	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Avaliação da atividade antioxidante da fração hidroalcoólica	19
4.2 Resultados obtidos das análises por CLAE dos fracionamentos em coluna cromatográfica	20
5 CONCLUSÕES FINAIS	34
6 REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

As pessoas de modo geral recorrem aos conhecimentos populares para utilização das plantas como medicamento, acreditando não haver perigo por se tratar de um produto natural. Pensar desta forma pode ser muito perigoso. Muitas plantas contêm constituintes tóxicos, e o uso indiscriminado de certas plantas pode resultar em intoxicações. A toxicidade pode ser resultado de altas concentrações ingeridas, do estado de conservação das plantas e também da forma de uso. Neste sentido é importante conhecermos os princípios ativos das plantas e sua atividade biológica, para enfim, utilizar de forma segura, plantas medicinais (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Dentre as diversas atividades que os extratos vegetais podem possuir, a atividade antioxidante é uma das mais avaliadas. Denominam-se antioxidantes, as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparada ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (BARREIROS et al., 2006).

Os radicais livres e outros oxidantes, vem sendo considerados, nos últimos anos, como grandes causadores de várias doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes tipo I (SOUZA et al., 2007). O excesso desses radicais pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquirido de forma exógena.

Diversos métodos podem ser utilizados para determinação da atividade antioxidante de extratos de plantas, como a 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (COSIO et al., 2005). O método consiste na medida espectrofotométrica do DPPH e da inibição do sinal de acordo com a variação da concentração da amostra analisada (NASCIMENTO et al., 2011).

A espécie *Piper Amalago* (Figura 1) é utilizada na medicina popular, infusões são utilizadas para aliviar cólica, tratamento de feridas e queimaduras (COELHO et al., 2008).

Figura 1: *Piper amalago*.

Fonte: autoria própria.

O nome vulgar em espanhol é *Higuillo limón*, que significa pimenta limão. A espécie é uma pimenta, cujas folhas e sementes apresentam sabor picante, e odor desagradável nas folhas, caules e frutos quando esmagados. Os frutos maduros e sementes possuem o mesmo sabor da pimenta preta, *Piper nigrum* (conhecida vulgarmente como pimenta-do-reino), e por vezes, são utilizados como um substituto para ela, geralmente quando secos (GRIEVE, 2010).

Estudos com extrato clorofórmico de *P. amalago* apontam atividade leishmanicida relacionada a amidas no mesmo (CARRARA et al., 2013). A significativa quantidade de amidas e compostos fenólicos na *P. amalago*, entre os principais β -copaen-4- α -ol, 7-epi- α -eudesmol e n-hexil-benzoato (CARRARA et al., 2014), assim como em outras plantas de sua família, tornam os óleos essenciais das folhas desta espécie com fortes características antifúngicas (MORANDIN-GIANNETTI, et al., 2010).

A literatura também cita atividade diurética e utilização de *P. amalago* contra problemas estomacais, atividade anti-inflamatória e potencial contra as larvas do *Aedes Aegypti* (LIOGIER, 1990). Há relatos também de avaliação da atividade diurética e antilítica (NOVAES). et al., 2014).

A literatura relata o estudo químico do óleo essencial das folhas caules e flores de *P. amalago* (MOTA et al., 2013), também o isolamento de amidas pirrolididas no extrato (ARRIGO et al., 2016). Amidas piperamidas e pirrolididas também foram isoladas da fração diclorometano das folhas de *P. amalago*, que apresentou alta atividade esquistomicida (CARRARA, et al., 2014)..

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Estudo químico da fração hidroalcoólica e avaliação da atividade antioxidante de *P. amalago*, planta encontrada na flora de Dourados MS.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar extrato etanólico
- Fracionar o extrato etanólico
- Isolar e identificar metabólitos secundários presentes na fração hidroalcoólica
- Analisar as frações por CLAE
- Avaliar a atividade antioxidante da fração hidroalcoólica pelo método do DPPH.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes

Acetato de etila 99,5% P. A., etanol 95,0% P. A., hexano 98,5% P.A., metanol 99,5% P.A., clorofórmio 99,5% P. A., todos da marca Dinâmica e água ultrapura (*Pure Water System, Scholar-UV, Human UP 900*).

3.2 Cromatografia em coluna

As amostras (extrato/frações) foram fracionadas utilizando como fase estacionária Sephadex® LH-20, fase reversa C18 230-400 mesh e sílica gel 60 70-230 mesh VETEC.

3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou *High Precision Liquid Chromatograph (HPLC)*

Cromatógrafo binário SHIMADZU (semianalítico), modelo LC6A, utilizando detector de arranjo de diodo, *Diode Array (DAD)*, e coluna de fase reversa C18 (15 cm x 4,6 mm x 5 µm). A eluição foi realizada com sistema gradiente de metanol e água, iniciando com 95% de água, indo a 0% de água aos 10 minutos, mantendo essa proporção até os 15 minutos e retornando a 95% de água aos 20 minutos. O volume de injeção das amostras foi de 5 µL e a temperatura de análise 25° C.

3.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Para obtenção dos espectros de RMN foi utilizado um espectrômetro da BRUKER AC 400 operando a 600 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C. As análises por RMN foram realizadas na UFPR (Universidade Federal do Paraná) em parceria com o professor Dr. Anderson Barison.

3.5 Obtenção do material vegetal, preparo e fracionamento do extrato etanólico

As folhas foram coletadas no município de Dourados. A espécie já foi identificada previamente (DDMS 4412). O material vegetal coletado foi seco a temperatura ambiente por 3 semanas, sendo posteriormente moído em moinho de facas

gerando 500,00 g. Às folhas moídas foi adicionado etanol 92,8 INPM (4L), e a mistura permaneceu em repouso por 7 dias e posteriormente foi filtrada com algodão, a parte líquida foi concentrada em rota evaporador e posteriormente seca em capela, este procedimento foi repetido três vezes, resultando em 25 g de extrato etanólico bruto. Este foi dissolvido em 250 mL de uma solução 80% água e 20% metanol e submetido a extração líquido-líquido. A extração consistiu da adição do volume total da solução e 80 mL de solvente orgânico em funil de separação, com decantação de 30 minutos e posterior separação das fases. O processo foi repetido três vezes para cada solvente orgânico, os solventes utilizados foram hexano, clorofórmio e acetato de etila em sua respectiva ordem de adição. A extração resultou nas frações hexânica (2,00g), clorofórmica (5,00g), acetato de etila (3,00g) e hidroalcoólica (15,00g) após secagem em capela.

3.6 Ensaio antioxidante da fração hidroalcoólica pelo método do DPPH

A partir da fração hidroalcoólica foram preparadas soluções de 10, 25, 30, 50, 70, 90 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluídas em metanol. A solução de DPPH foi preparada em metanol com concentração de 0,004% m/m (massa/massa) com os devidos cuidados para evitar a oxidação pela luz.

O ensaio foi adaptado de Nascimento et al. (2011) e consistiu na adição de 0,5 mL da solução da amostra com 1 mL da solução de DPPH, e após 30 minutos de reação a medida de absorbância da mistura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS Global Trade Technology, no comprimento de onda de 517 nm. Este ensaio foi realizado em triplicata para todas as concentrações incluindo o branco, que constituía apenas da solução de DPPH e metanol. O percentual dos radicais livres foi calculado a partir da equação a seguir:

$$\text{Percentual de redução} = \frac{(\text{Absorbância do branco} - \text{Absorbância da amostra}) \times 100}{\text{Absorbância do branco}}$$

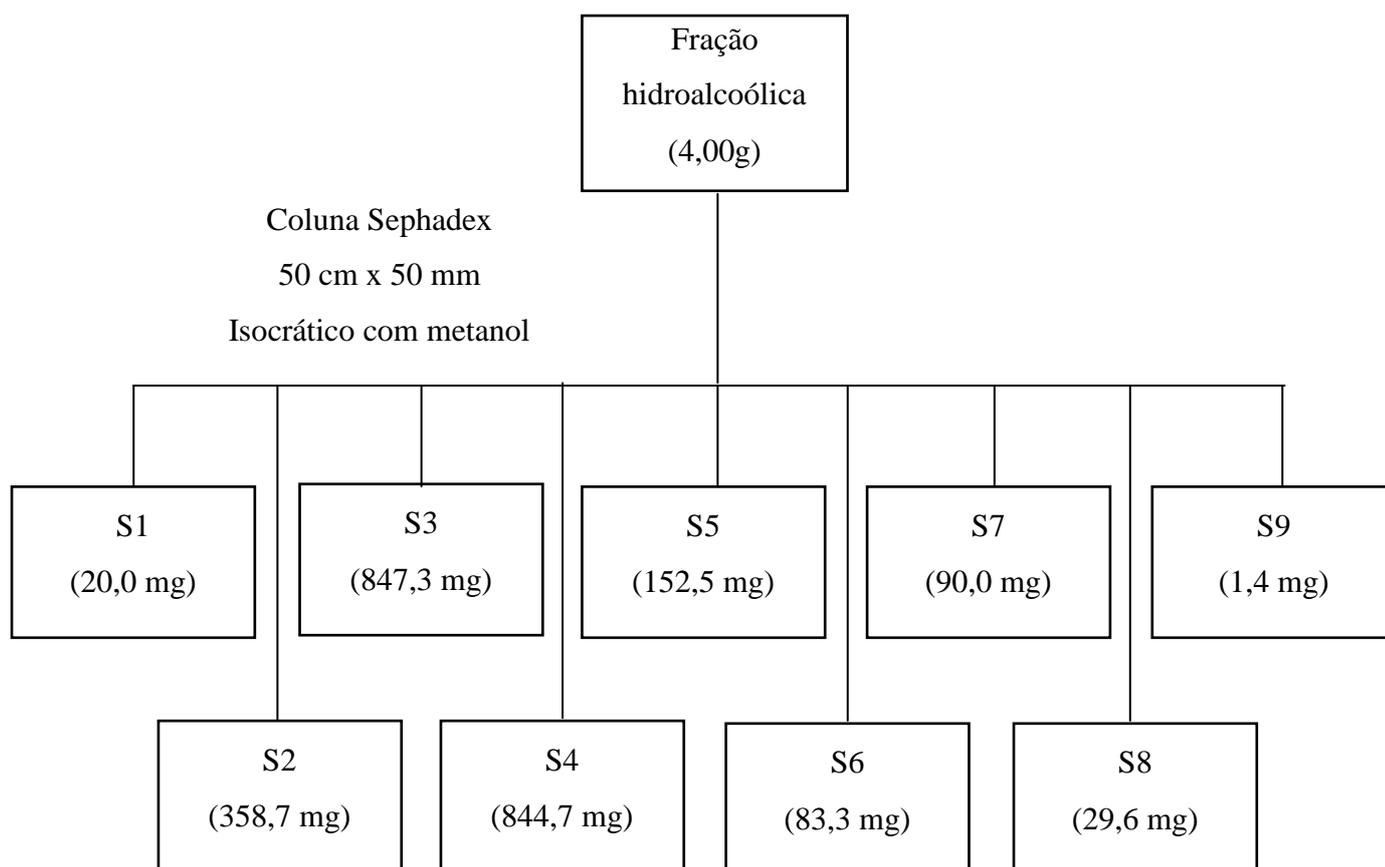
Os valores estão apresentados na seção “6 Resultados e Discussão”.

3.7 Fracionamento da fração hidroalcoólica por cromatografia em coluna

Utilizando uma coluna de Sephadex (50 cm x 50 mm) e fase móvel composta por metanol fracionou-se a fração hidroalcoólica em sistema isocrático. As frações

recolhidas foram analisadas por CLAE e as que se mostraram semelhantes foram reunidas e nomeadas pelo código “S” seguido do número que classifica a ordem em que a fração foi recolhida da coluna como indica o fluxograma (Figura 2).

Figura 2-Fluxograma do fracionamento da fração hidroalcoólica.



Fonte: autoria própria.

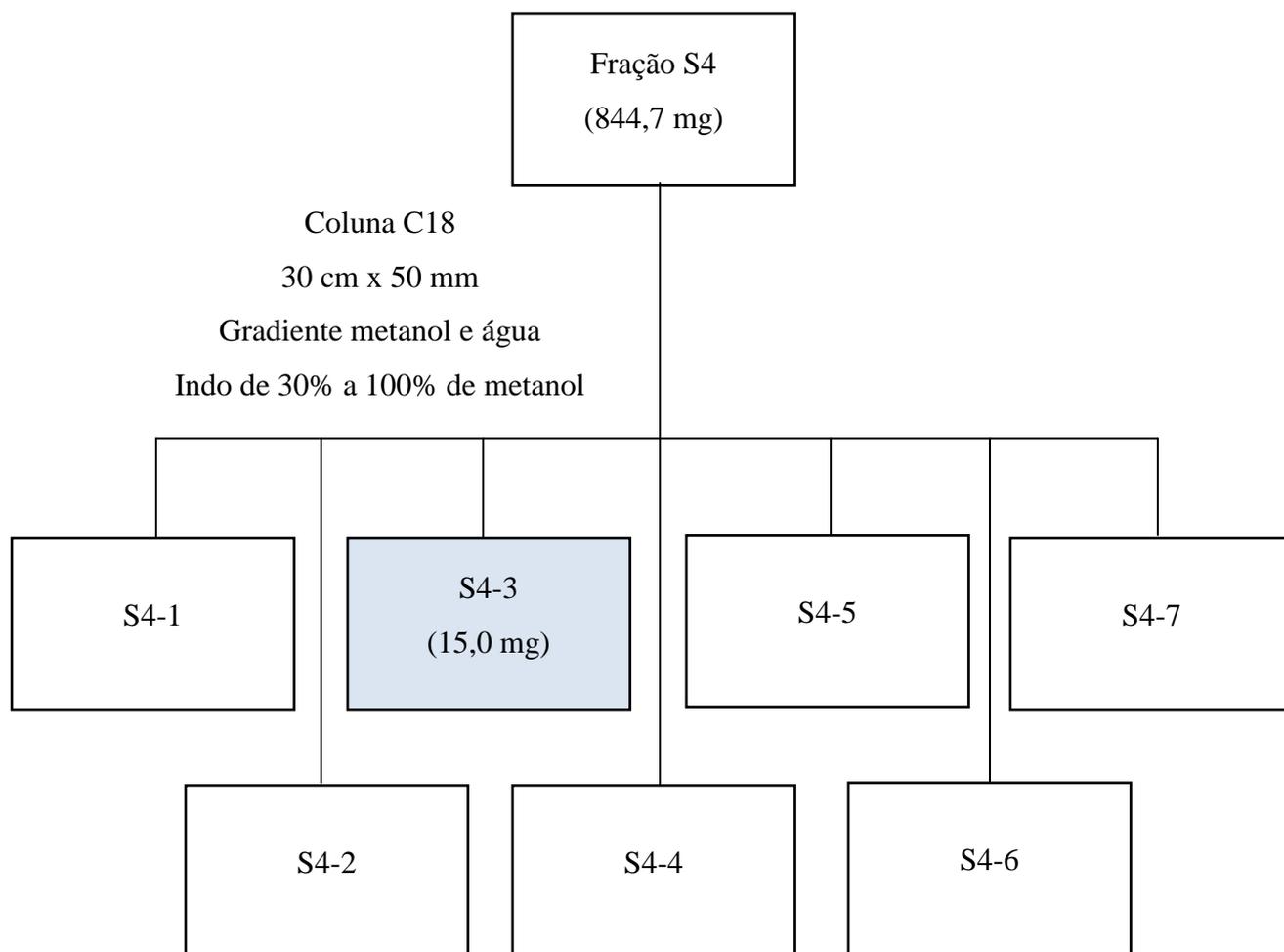
A partir dos resultados por CLAE para este fracionamento selecionou-se as frações com maiores possibilidades de isolamento e maiores massas para o prosseguimento do trabalho.

3.8 Fracionamento da fração S4 por cromatografia em coluna

Utilizando uma coluna de fase reversa C18 (30 cm x 30 mm) e fase móvel composta por metanol e água, fracionou-se a fração S4 em sistema gradiente, iniciando com 30% de metanol até 100% de metanol. As frações recolhidas foram analisadas via

CLAE, as que apresentaram resultados semelhantes foram reunidas e nomeadas pelo código “S4” seguido de travessão e o número que representa a ordem em que foi recolhida da coluna, como apresentado no fluxograma (Figura 3).

Figura 3-Fluxograma do fracionamento da fração S4.



Fonte: autoria própria.

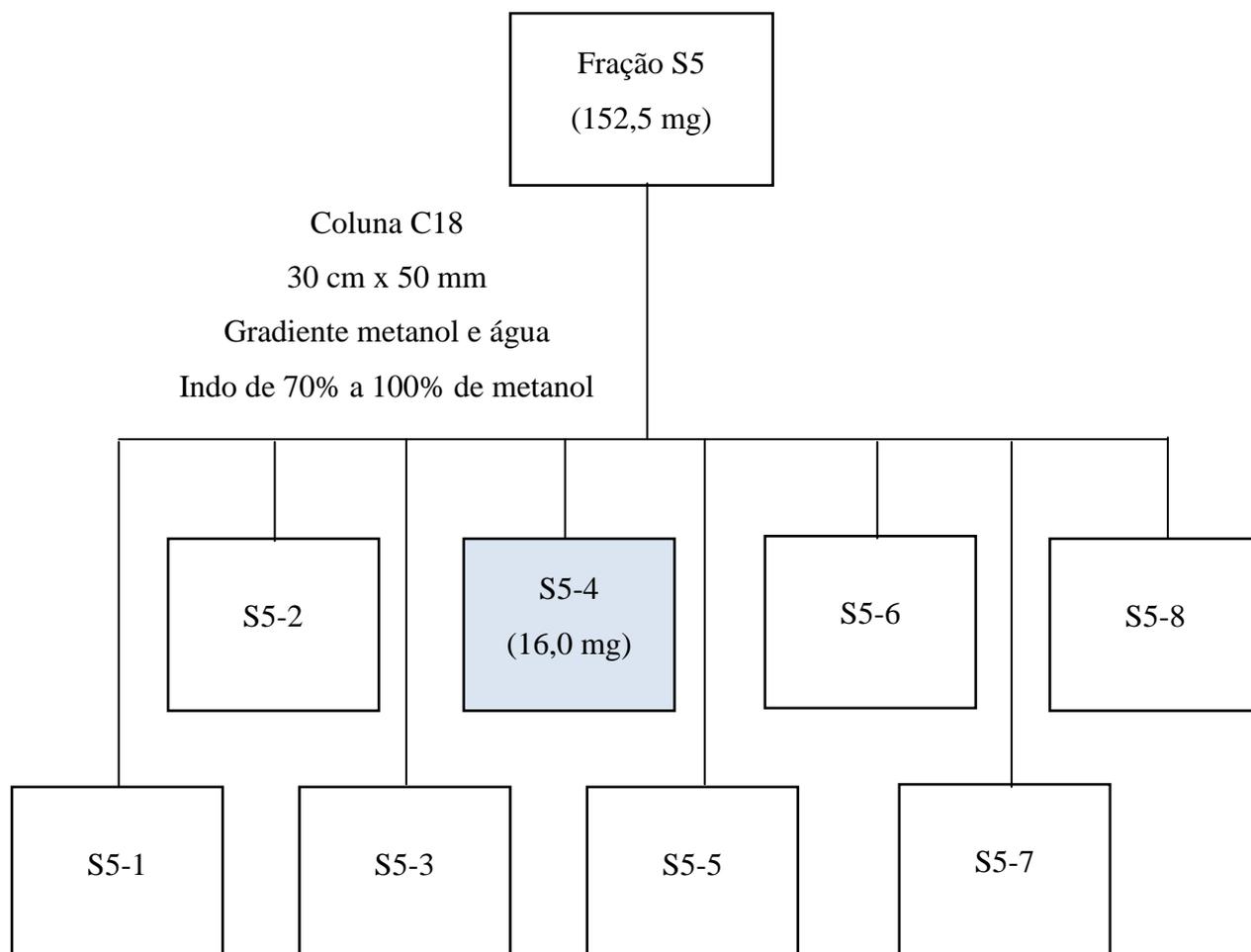
A amostra S4-3 em destaque no fluxograma apresentou pureza de acordo com resultado CLAE e foi enviada para análise por RMN.

3.9 Fracionamento da fração S5 por cromatografia em coluna

Utilizando uma coluna de fase reversa C18 (30 cm x 30 mm) e fase móvel composta por metanol e água, fracionou-se a fração S5 em sistema gradiente indo de

70% a 100% de metanol. As frações recolhidas foram analisadas via CLAE, as que apresentaram resultados semelhantes foram reunidas e nomeadas pelo código “S5” seguido de travessão e o número que representa a ordem em que foi recolhida da coluna, como apresentado no fluxograma (Figura 4).

Figura 4-Fluxograma do fracionamento da fração S5.



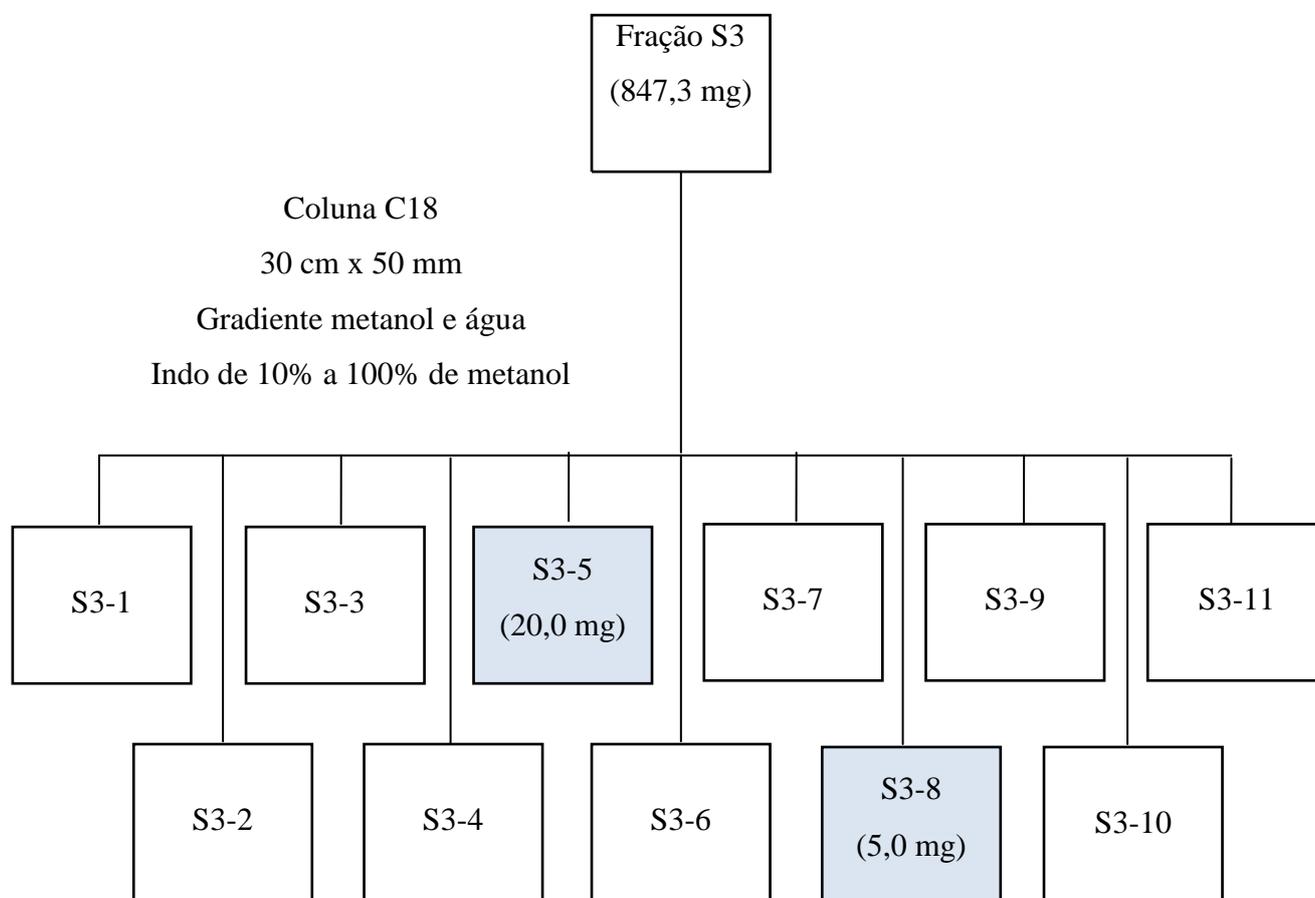
Fonte: autoria própria.

A fração S5-4 em destaque no fluxograma apresentou pureza nos resultados das análises por CLAE e foi enviada para análise por RMN.

3.10 Fracionamento da fração S3 por cromatografia em coluna

Utilizando uma coluna de fase reversa C18 (30 cm x 30 mm) e fase móvel composta por metanol e água, fracionou-se a fração S3 em sistema gradiente, indo de 10% a 100% de metanol. As frações recolhidas foram analisadas via CLAE, as que apresentaram resultados semelhantes foram reunidas e nomeadas pelo código “S3” seguido de travessão e o número que representa a ordem em que foi recolhida da coluna, como apresentado no fluxograma (Figura 5).

Figura 5-Fluxograma do fracionamento da fração S3.



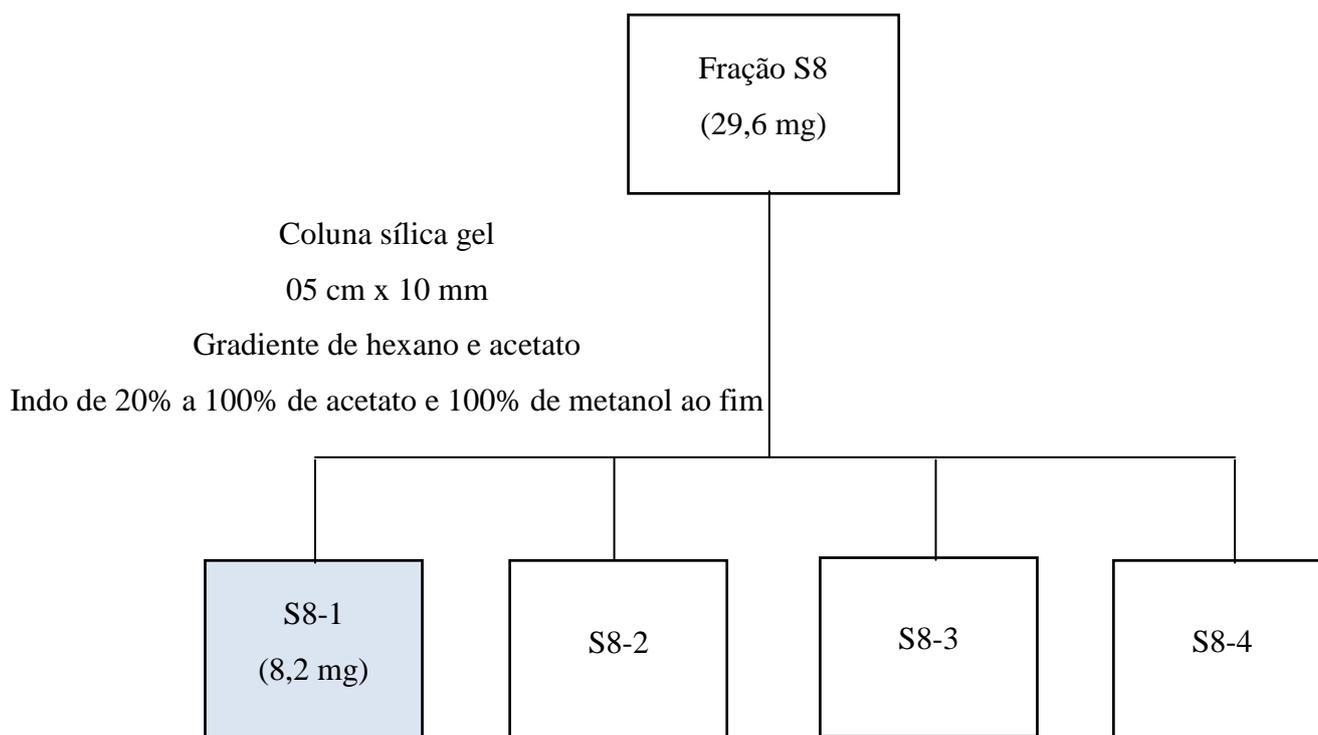
Fonte: autoria própria.

As frações S3-5 e S3-8 em destaque no fluxograma apresentaram pureza nos resultados das análises por CLAE e foram enviadas para análise por RMN.

3.11 Fracionamento da fração S8 por cromatografia em coluna

Utilizando uma coluna de sílica gel (5 cm x 10 mm) e fase móvel composta por hexano e acetato de etila, fracionou-se a fração S8 em sistema gradiente, indo de 20% a 100% de acetato de etila e ao fim 100% de metanol. As frações recolhidas foram analisadas via CLAE, as que apresentaram resultados semelhantes foram reunidas e nomeadas pelo código “S18” seguido de travessão e o número que representa a ordem em que foi recolhida da coluna, como apresentado no fluxograma (Figura 6).

Figura 6-Fluxograma do fracionamento da fração S8.



Fonte: autoria própria.

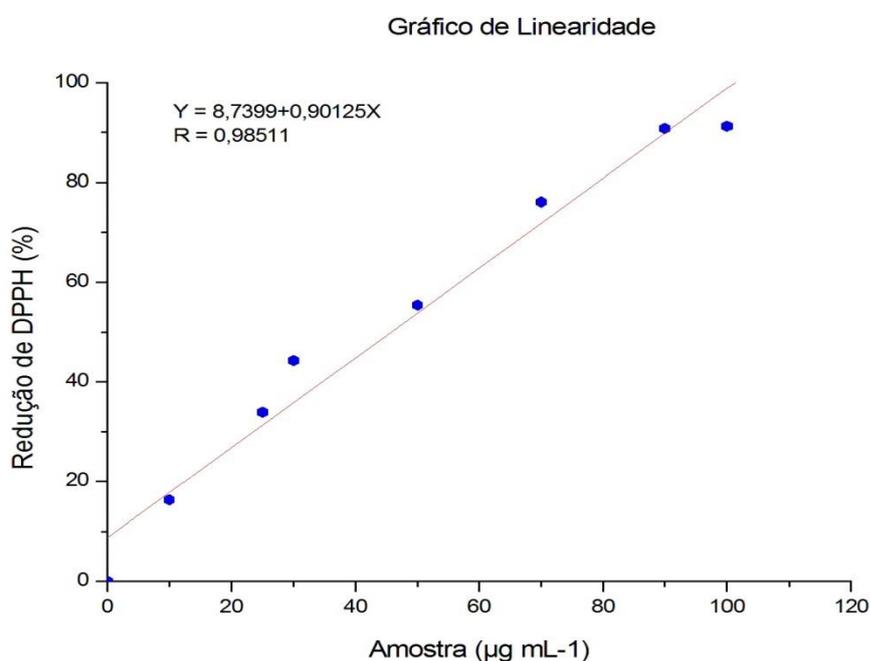
A fração S18-1 em destaque no fluxograma apontou pureza nos resultados por CLAE e foi enviada para análise por RMN.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da atividade antioxidante da fração hidroalcoólica

Com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante da fração hidroalcoólica, construiu-se uma curva (Figura 70) que mostra a relação entre a concentração da amostra e a inibição de DPPH em percentual.

Figura 7-Curva com a relação entre concentração da amostra e inibição de DPPH em porcentagem.



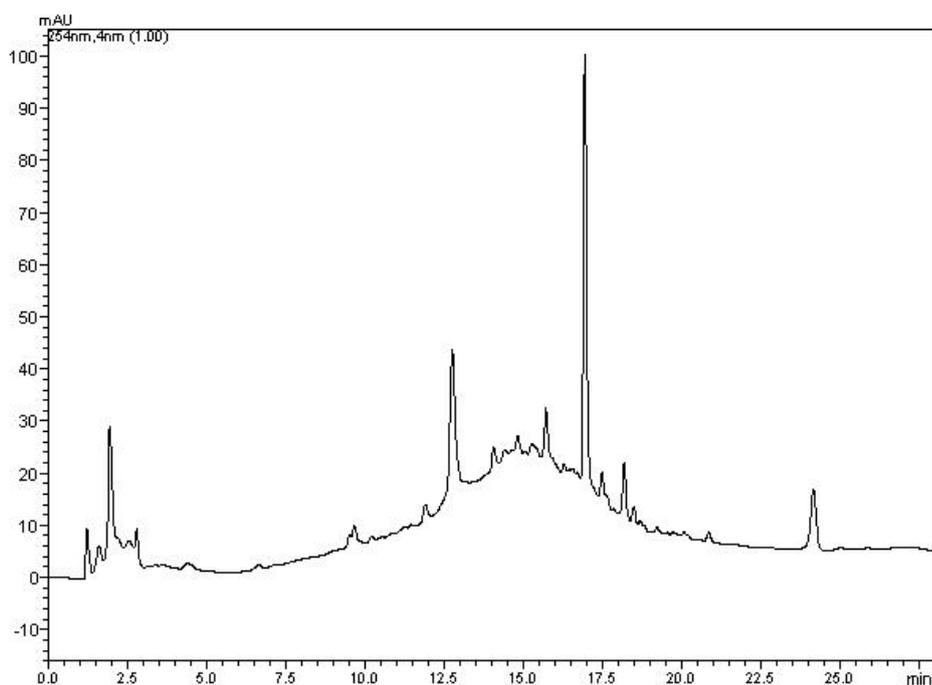
Fonte: autoria própria.

Utilizando os valores de coeficiente linear e angular obtidos, calculou-se o IC₅₀ (concentração da amostra que inibe 50% da concentração de DPPH) pela equação da reta ($y=ax+b$) onde $y=50$ (50% de inibição), obtendo o valor de $45,78 \mu\text{g mL}^{-1}$. Valores descritos na literatura apontam que, pelo método do DPPH, outros antioxidantes conhecidos apresentaram valores de IC₅₀ de $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TBHQ), $84,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Trollox), $136,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Vitamina E), $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Vitamina C) e $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (rutina) (CACERES et al., 2012). Comparando o valor obtido com os valores da literatura nota-se que a fração hidroalcoólica do extrato etanólico de *P. amalago* possui uma boa atividade antioxidante, tendo IC₅₀ melhor que TBHQ, Trollox e Vitamina E.

4.2 Resultados obtidos das análises por CLAE dos fracionamentos em coluna cromatográfica

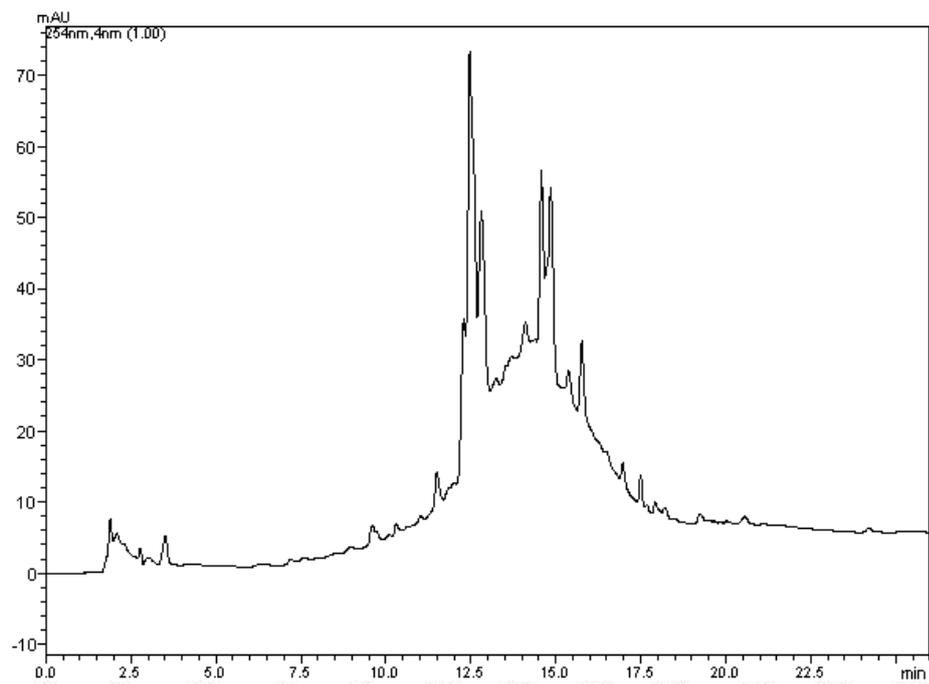
A análise via CLAE para as frações S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 e S9, geradas no primeiro fracionamento em coluna, cujos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17, respectivamente, comprovaram que ambas não estavam realmente puras.

Figura 8-Cromatograma da fração S1.



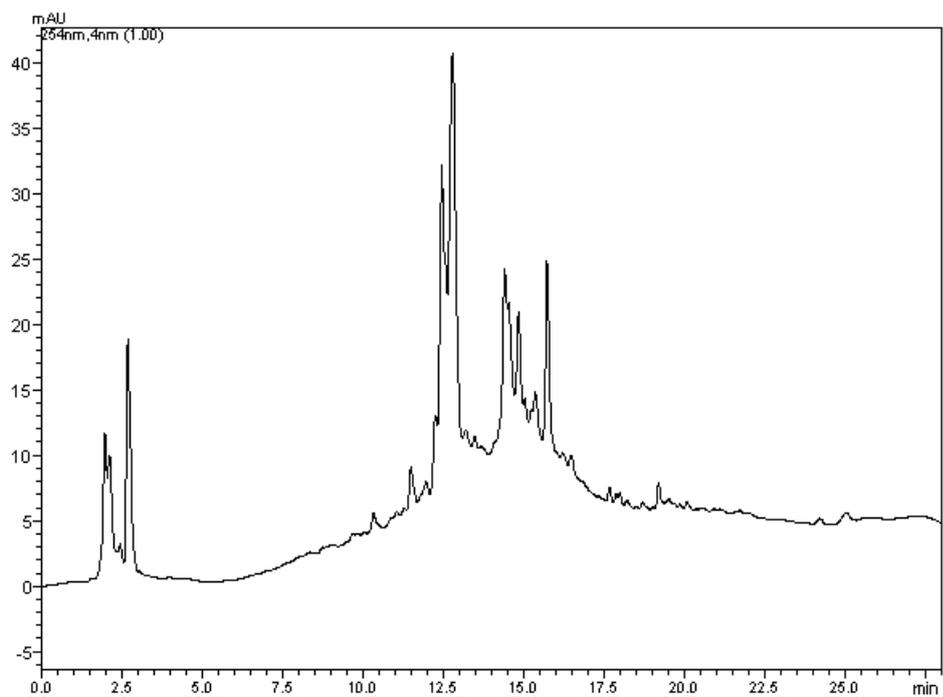
Fonte: autoria própria.

Figura 9-Cromatograma da fração S2.



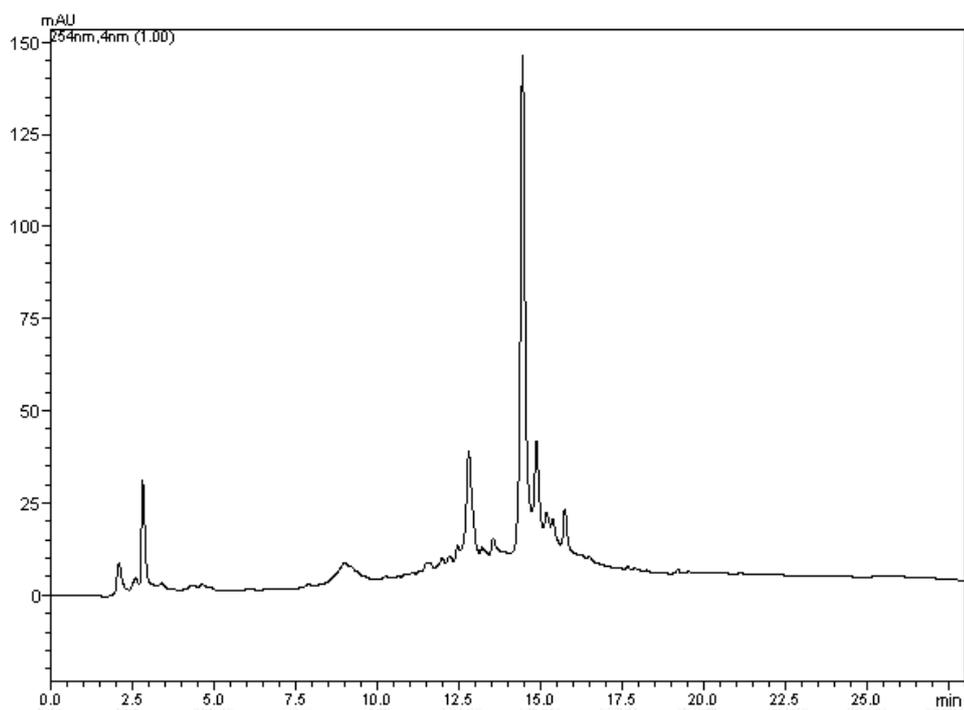
Fonte: autoria própria.

Figura 10- Cromatograma da fração S3.



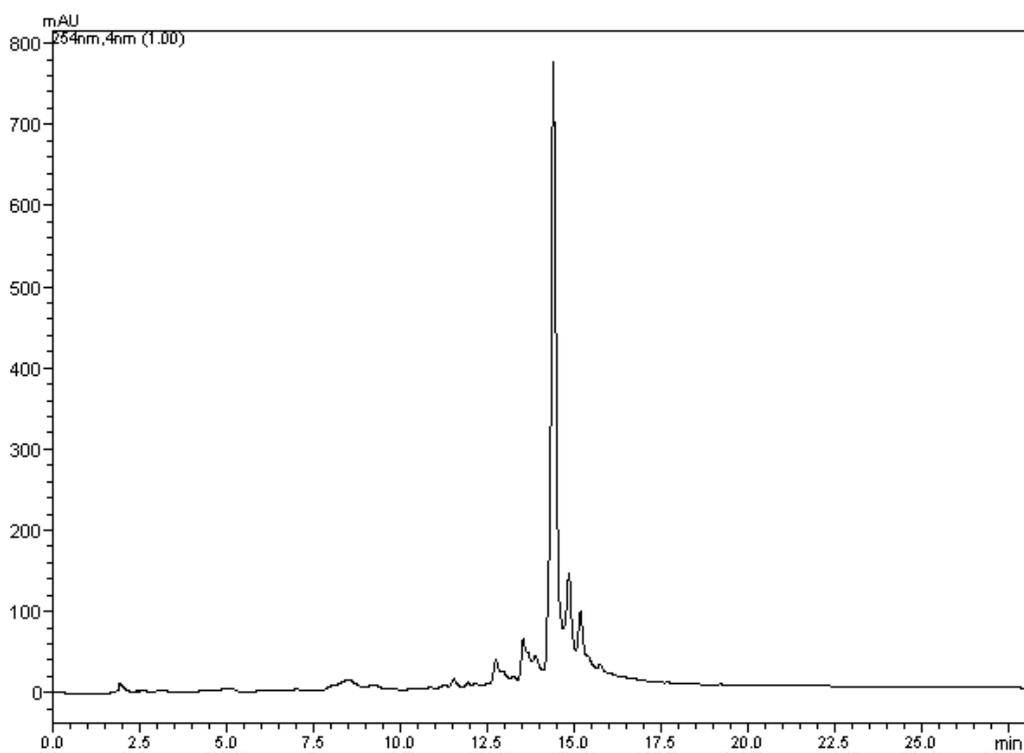
Fonte: autoria própria.

Figura 11-Cromatograma da fração S4.



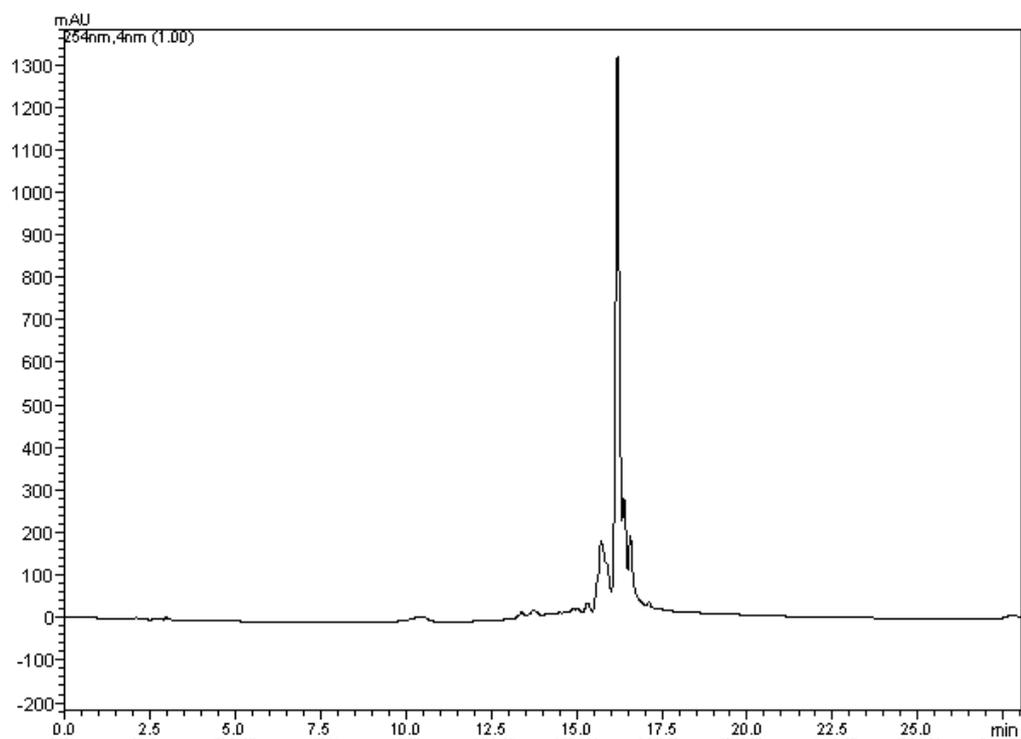
Fonte: autoria própria.

Figura 12-Cromatograma da fração S5.



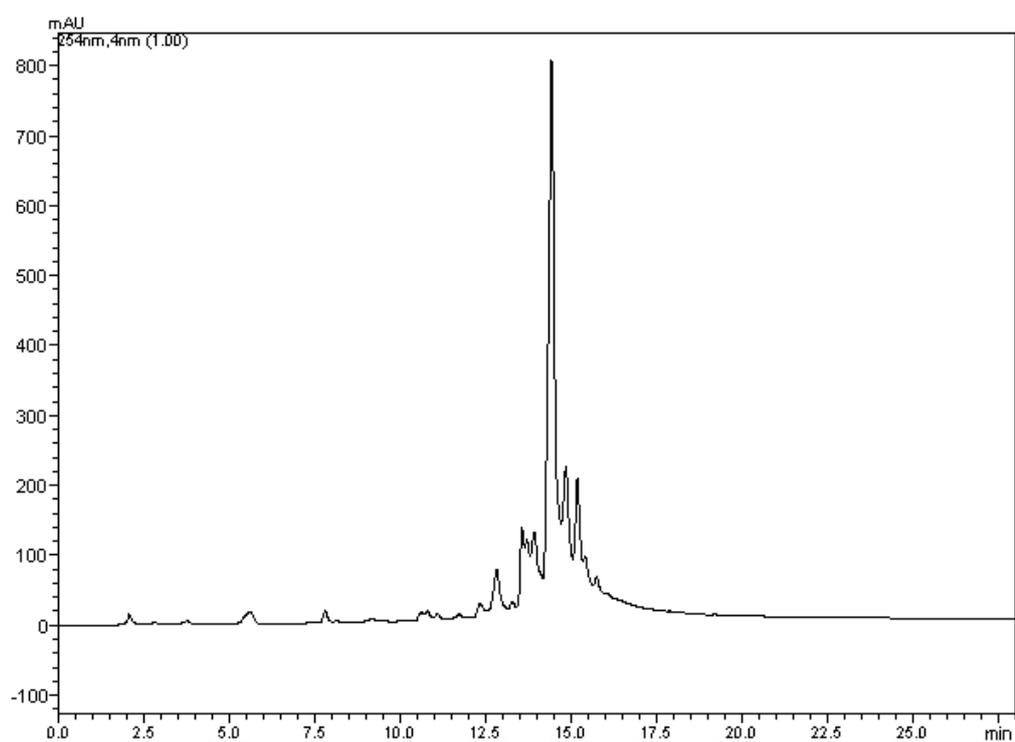
Fonte: autoria própria.

Figura 13-Cromatograma da fração S6.



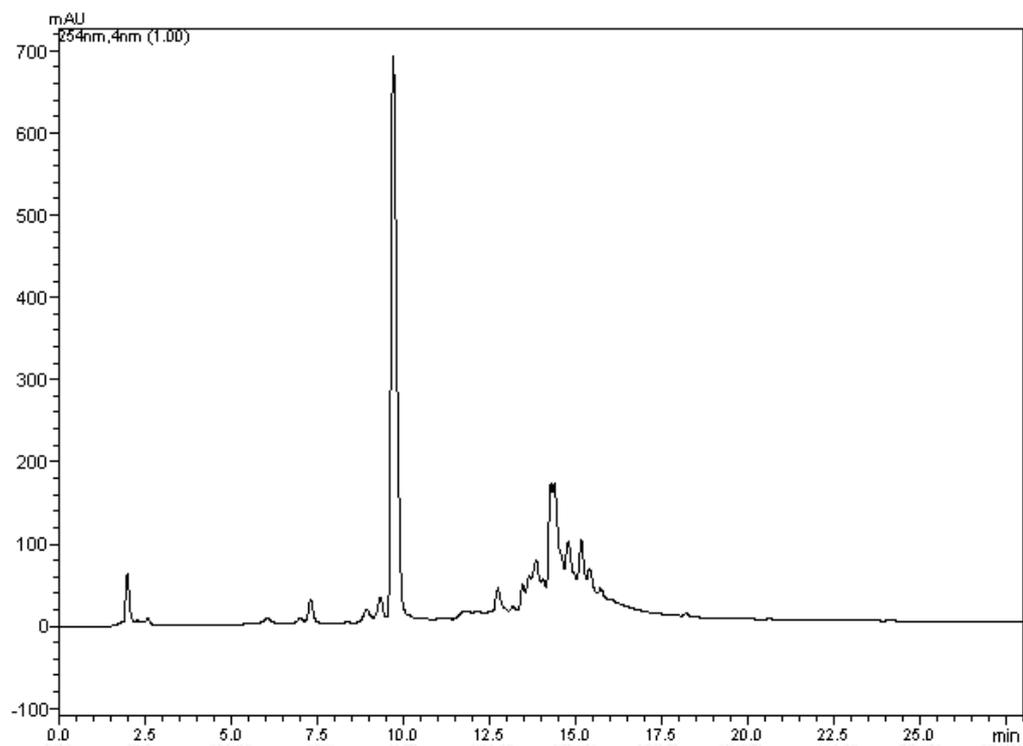
Fonte: autoria própria.

Figura 14-Cromatograma da fração S7.



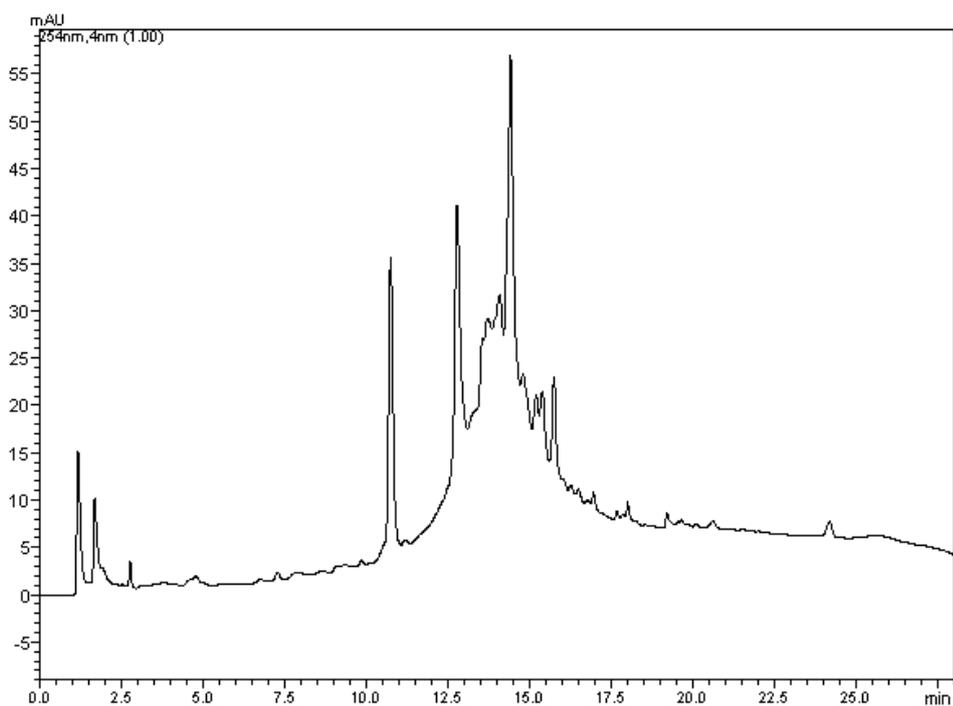
Fonte: autoria própria.

Figura 15-Cromatograma da fração S8.



Fonte: autoria própria.

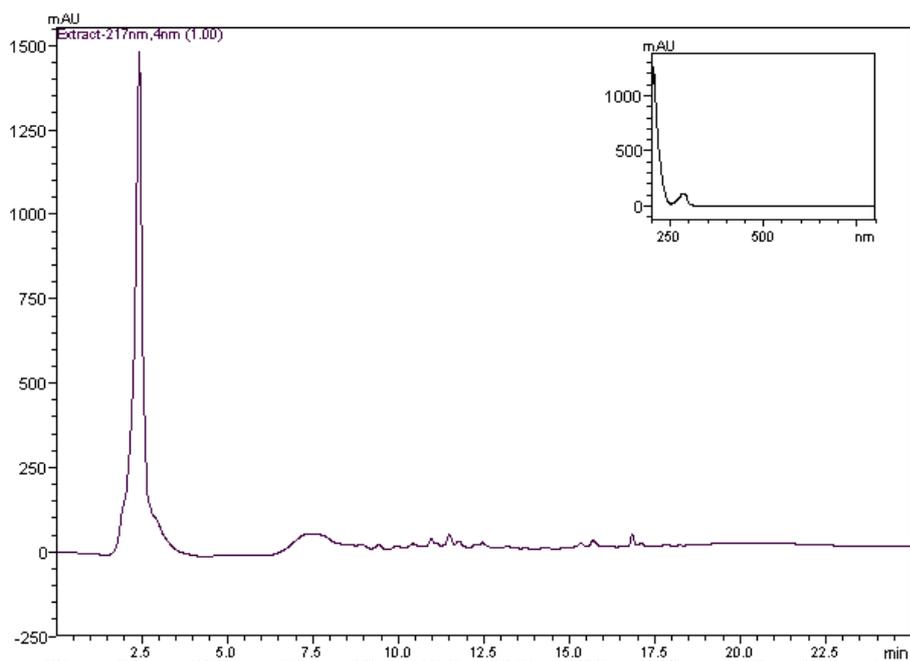
Figura 16-Cromatograma da fração S9.



Fonte: autoria própria.

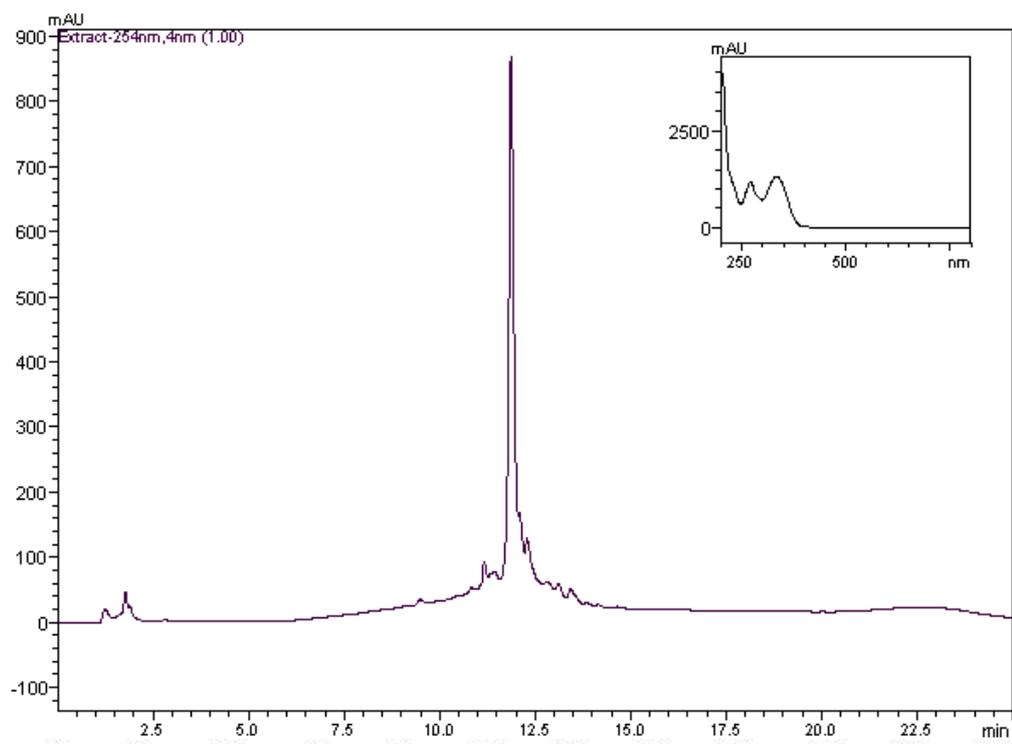
Após os demais fracionamentos algumas amostras se mostraram mais puras nos resultados por CLAE sendo elas S4-3, S5-4, S3-5, S3-8 e S8-1, cujos cromatogramas estão apresentados nas figuras 17, 18, 19, 20 e 21 respectivamente, juntamente aos espectros de ultravioleta (UV).

Figura 17-Cromatograma da fração S4-3 com seu respectivo espectro UV.



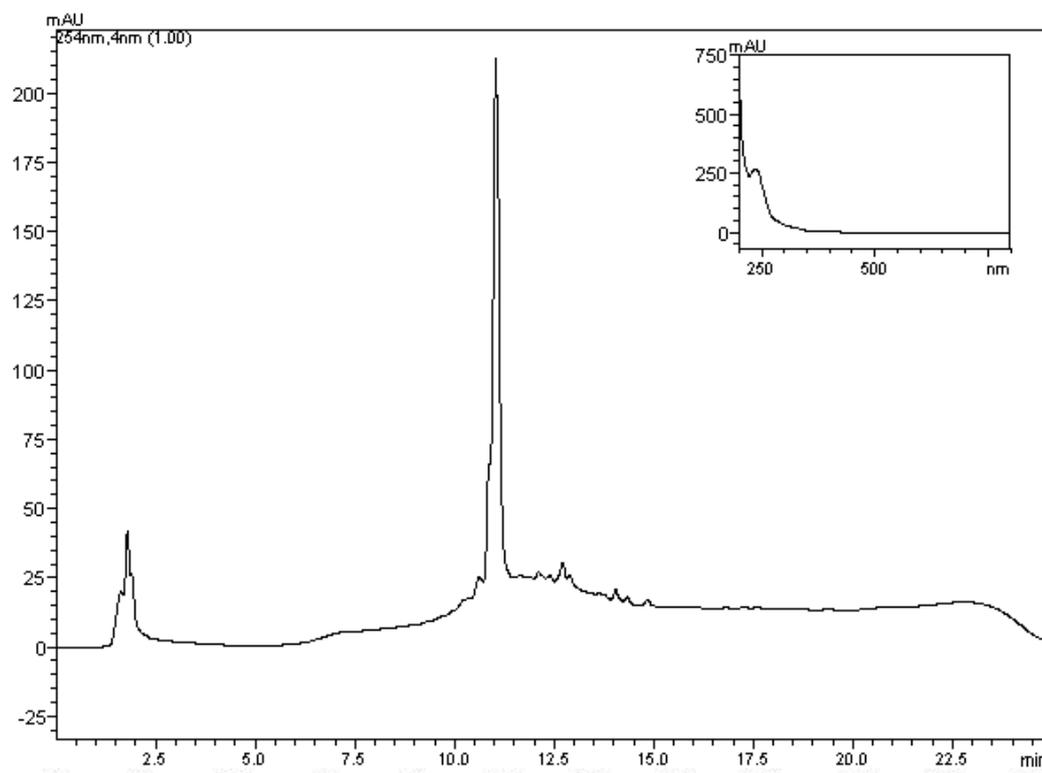
Fonte: autoria própria.

Figura 18-Cromatograma da fração S5-4 com seu respectivo espectro de UV.



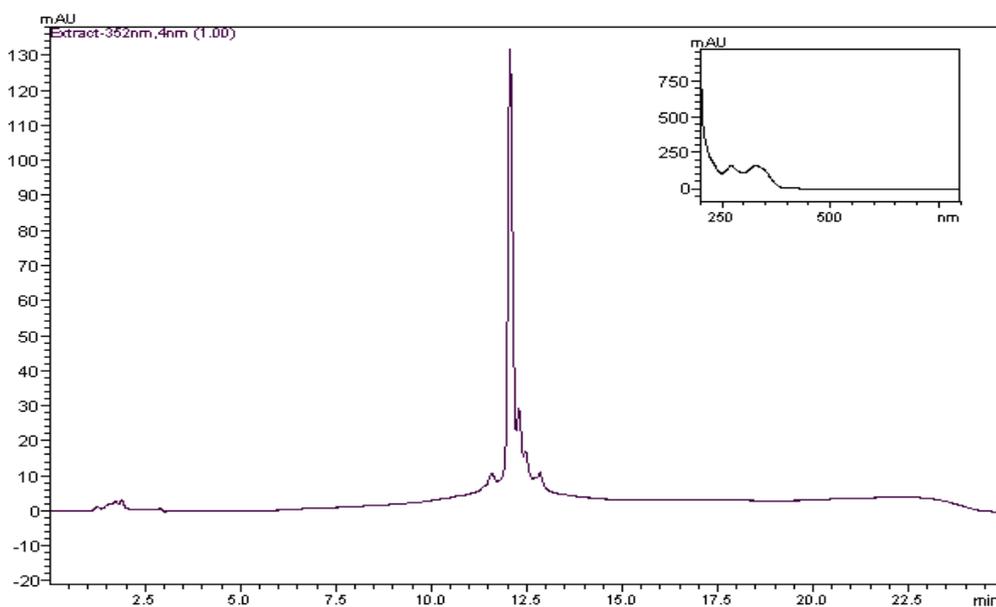
Fonte: autoria própria.

Figura 19-Cromatograma da fração S3-5 com seu respectivo espectro de UV.



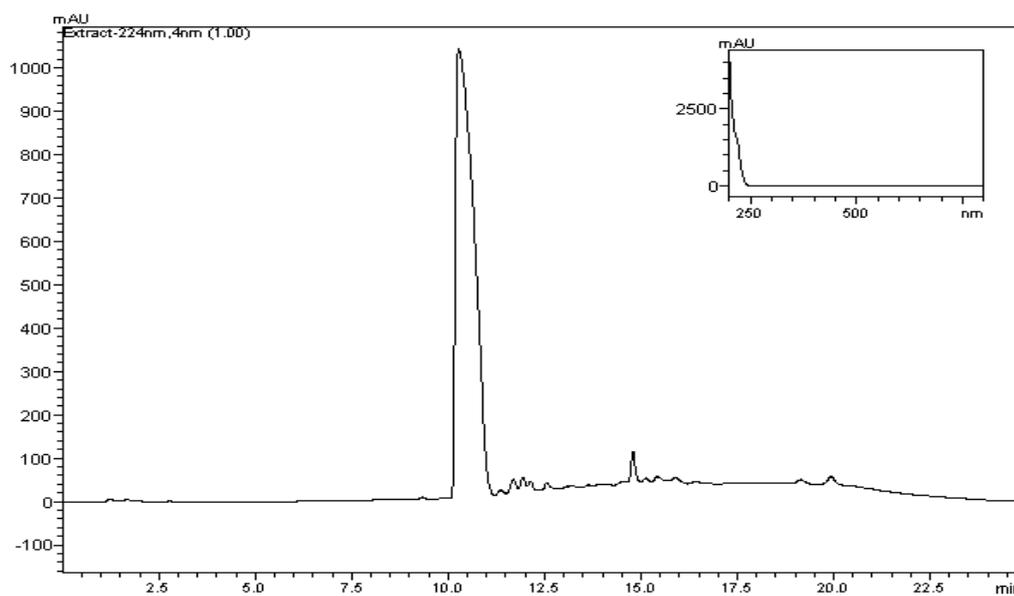
Fonte: autoria própria.

Figura 20-Cromatograma da fração S3-8 com seu respectivo espectro de UV.



Fonte: autoria própria.

Figura 21-Cromatograma da fração S8-1 com seu respectivo espectro de UV.



Fonte: autoria própria.

Das amostras enviadas para análise por RMN, recebemos os espectros de ^1H da fração S5-4 apresentados nas Figuras 22, 23, 24 e 25. Ainda não obtivemos os espectros de hidrogênio das demais frações.

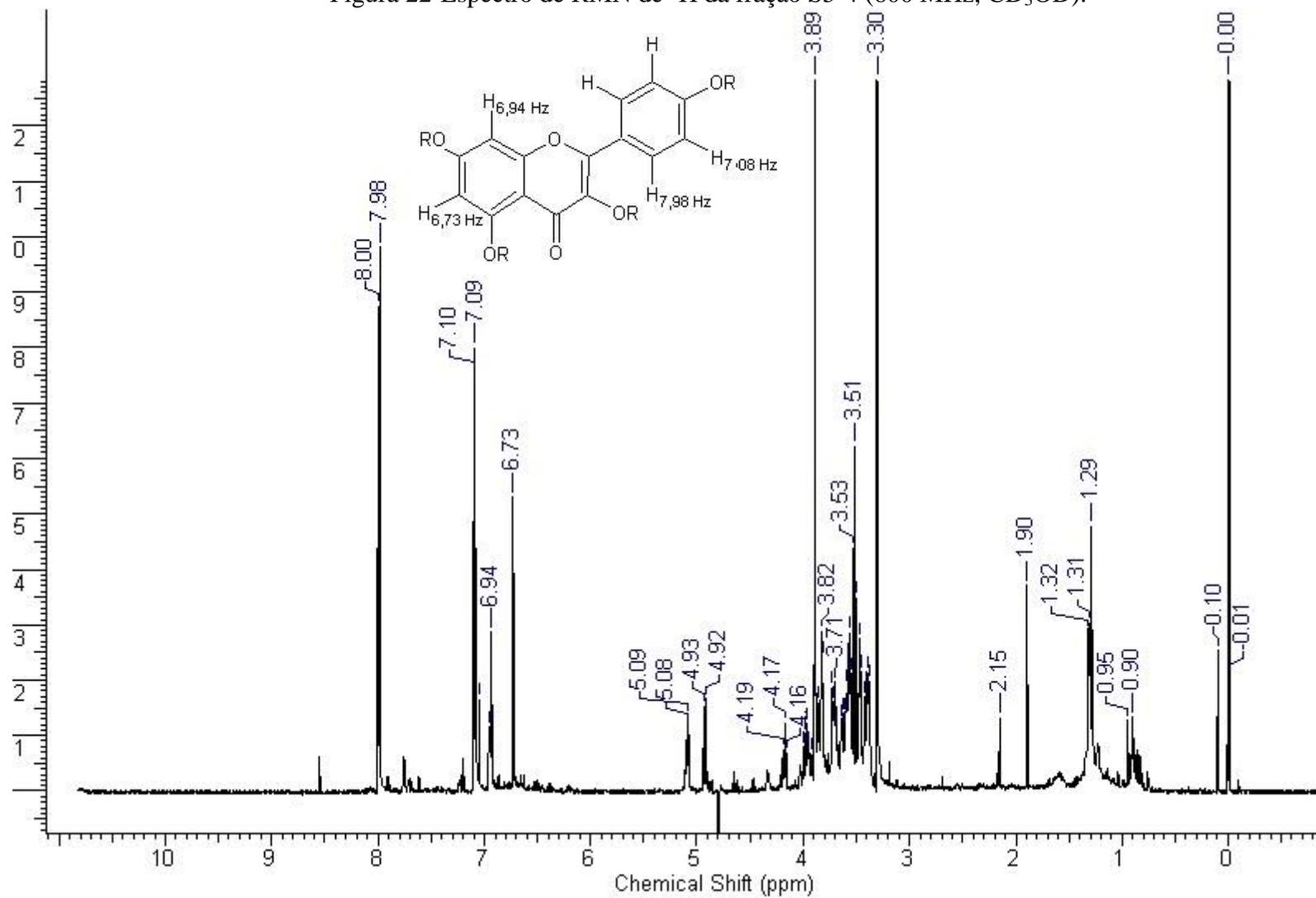
Figura 22-Espectro de RMN de ^1H da fração S5-4 (600 MHz, CD_3OD).

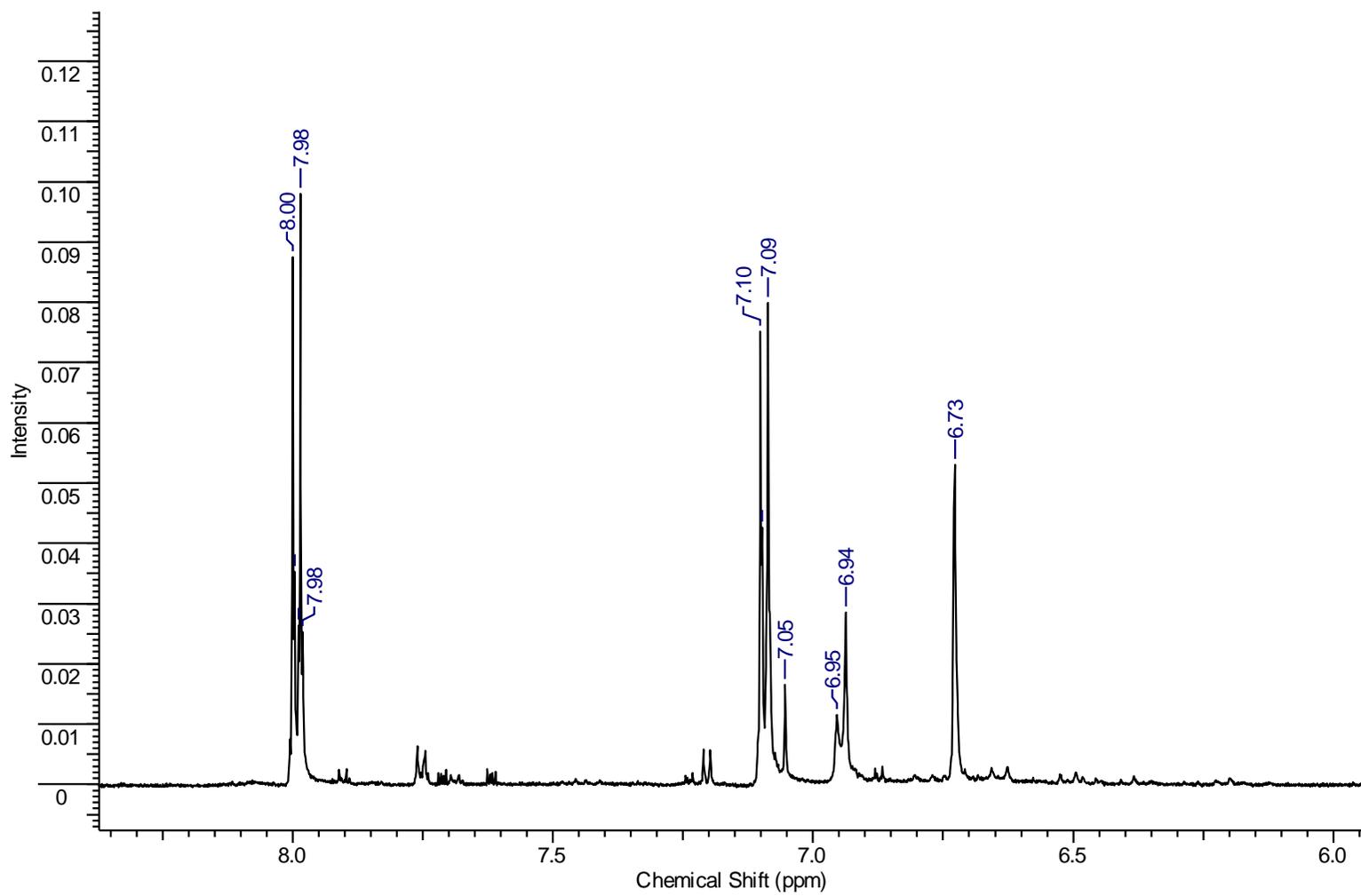
Figura 23-Espectro de RMN ^1H da fração S5-4 expandido (6-9).

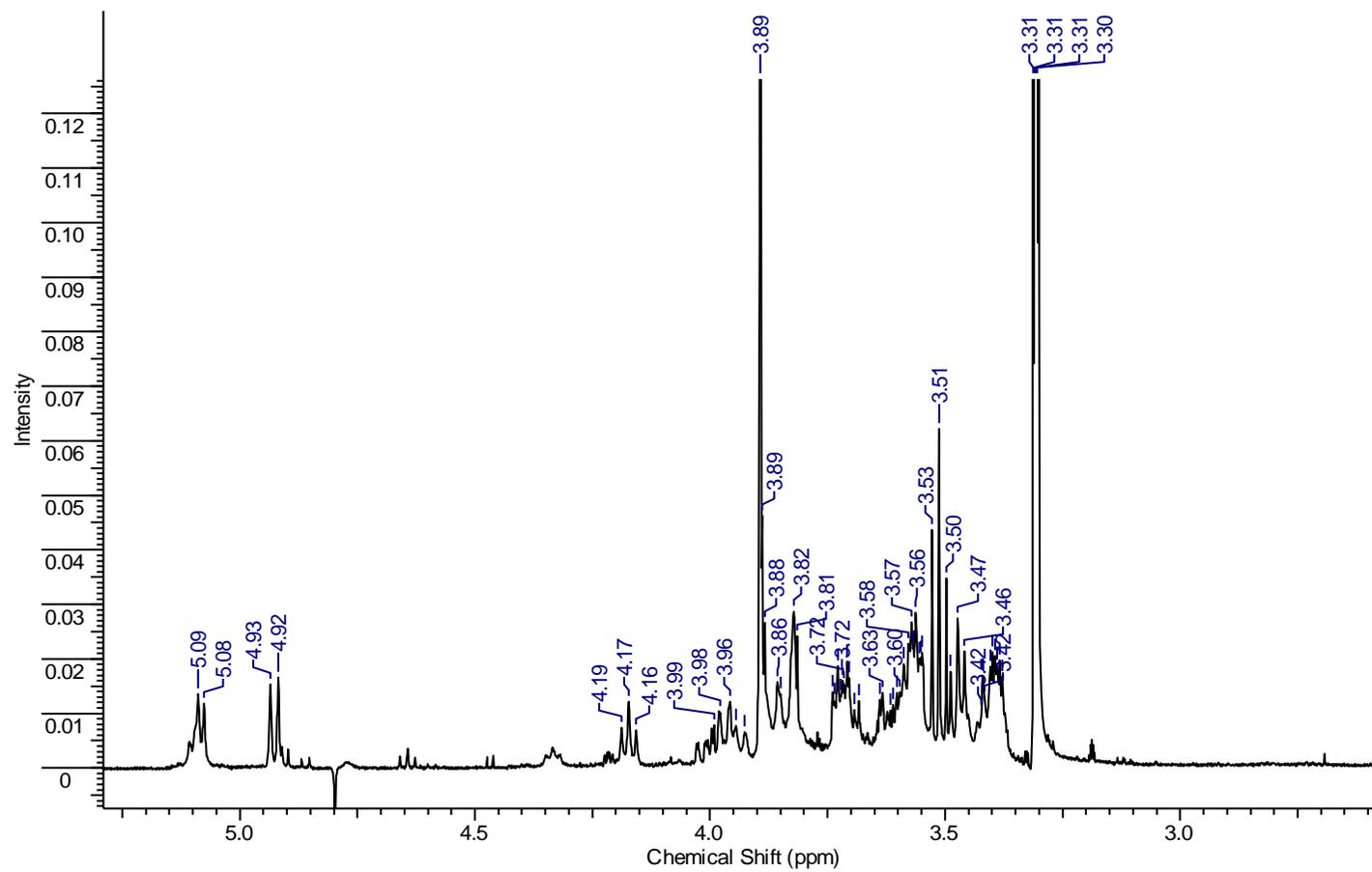
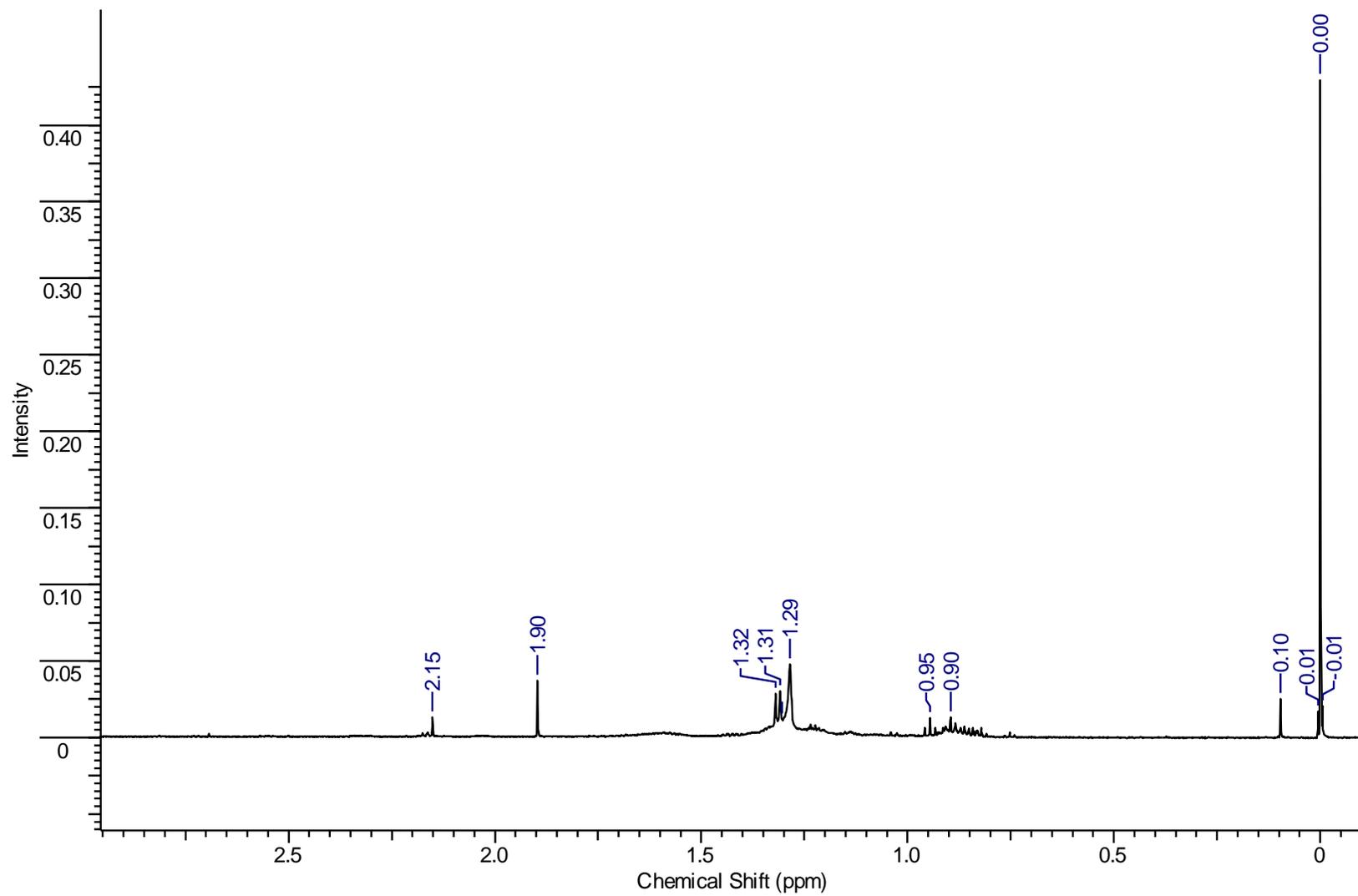
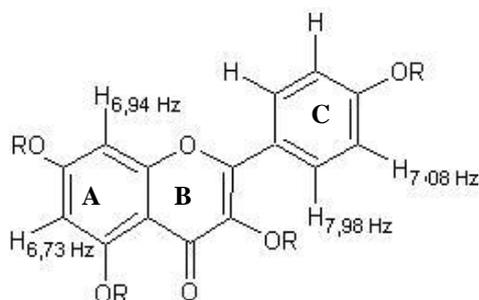
Figura 24-Espectro de RMN ^1H da fração S5-4 expandido (3-6).

Figura 25-Espectro de RMN ^1H da fração S5-4 expandido (0-3).

O espectro de UV da fração S5-4 apresenta duas bandas dos sistemas aromáticos características de flavonol, a primeira banda entre 240-290 nm e a segunda entre 300-390 nm (MARKEN & BEECHER, 2000).

A análise dos espectros de RMN da fração S5-4 reforça que esta é um flavonol devido aos hidrogênios H (δ 7,98) e H (δ 7,09) do anel C e aos hidrogênios H (δ 6,73) e H (δ 6,94) referente aos singletos do ciclo A (Figura 26).

Figura 26-Estrutura genérica de um flavonol.



Fonte: autoria própria.

5 CONCLUSÕES FINAIS

A fração hidroalcoólica do extrato etanólico de *P. amalago* possui boa atividade antioxidante ($IC_{50} = 45,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente ao teste do DPPH.

O estudo químico resultou na purificação de 5 frações. Até o presente momento recebemos os espectros de RMN de ^1H para a amostra S5-4, estes dados em conjunto com os espectros de UV indicam que esta é um flavonol.

6 REFERÊNCIAS

ARRIGO, J. S.; BALEN, E.; JUNIOR, U. L.; MOTA, J. S.; IWAMOTO, R. D.; BARISON, A.; SUGIZAKI, M. M.; KASSUYA, C. A. L. Anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritic activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 101-109, 2016.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID J. M., DAVID J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa dos organismos. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 113-123, 2006.

CARRARA, V. S.; CUNHA-JUNIOR, E. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; CORREA, A. G.; MONTEIRO, J. L.; DERMACHI, I. G.; LONARDONI, M. V. C.; CORTEZ, D. A. G. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 447-454, 2013.

CARRARA, V. S.; VIEIRA, S. C. H.; DE-PAULA, R. G.; RODRIGUES, V.; MAGALHAES, V.; CORTEZ, D. A. G.; DA-SILVA-FILHO, A. A. In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of *Piper* species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). **Journal of Helminthology**, v. 88, n. 3, p. 321-326, 2014.

COELHO, R. M.; BRAND, G.; RICARDO, L. L.; BONFIM, N. M.; BRITO, L. P. de; MACEDO, C. S. de; DOURADO, D. M.; SARRAGIOTTO, M. H. Atividade cicatrizante e isolamento de amidas pirrolidínicas do extrato metanólico de *Piper amalago*. In: XVI Encontro de Química da Região Sul, 16, 2008. Blumenau-SC. **Livro de Resumos**. Blumenau: FURB, 2008.

COSIO, M. S.; BURATTI, S.; MANNINO, S.; BENEDETTI, S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. **Food Chemistry**, v. 97, p. 725-731, 2005.

GRIEVE, Mrs. M. **A modern herbal: *Pepper***. Disponível em: <<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/p/pepper24.html>> Data de acesso: 14 de mar. 2010.

LIOGIER, H. A. Plantas medicinales de Puerto Rico y del Caribe. **Iberoamericana de Ediciones**, p. 566, 1990.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MORANDIN-GIANNETTI, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A. S.; OLIVEIRA, H. C.; MEDES-GIANNINI, M. J. S.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, J. E. O.; FURLAN, M. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1810-1814, 2010.

MOTA, J. S.; SOUZA, D. S.; BOONE, C. V.; CARDOSO, C. A. L.; CARAMAO, E. B.; Identification of the Volatile Compounds of Leaf, Flower, Root and Stem Oils of *Piper amalago* (Piperaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 1, p. 11-16, 2013.

NASCIMENTO, J. C., Lage, L. F. O., CAMARGOS, C. R. D., AMARAL, J. C., COSTA, L. M., SOUSA, A. N., OLIVEIRA, F. Q. Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 2, p. 327-332, 2011.

NOVAES, A. S.; MOTA, J. S.; BARISON, A.; VEBER, C. L.; NEGRAO, F. J.; KASSUYA, C. A. L.; BARROS, M. E. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). *Phytomedicine*, v. 21, n. 4, p. 523-528, 2014.

SOUSA C. M. M., SILVA H. R., VIEIRA G.M., AYRES M. C. C., COSTA C. S., ARAÚJO D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.