



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



Veronica Augusta Costa Santos

Estudo fitoquímico de *Peperomia pereskiifolia*

Dourados
2015

Veronica Augusta Costa Santos

Estudo fitoquímico de *Peperomia pereskiifolia*

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de graduado em Química Industrial, pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Jonas da Silva Mota.

Dourados

2015

S239e Santos, Veronica Augusta Costa

Estudo fitoquímico de *Peperomia pereskiiifolia*/ Veronica Augusta Costa Santos. Dourados, MS: UEMS, 2015.

34p. ; 30cm.

Monografia (Graduação) — Química Industrial — Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Jonas da Silva Mota

1.Ciências exatas e da terra 2. Química orgânica 3. Produtos naturais.I.Título.

CDD 23.ed. 547

Veronica Augusta Costa Santos

Estudo fitoquímico de *Peperomia pereskiifolia*

Dourados, 05 de outubro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jonas da Silva Mota

(Orientador)

Profa Dra. Claudia Andréa Lima Cardoso

(Membro)

Profa Dra Silvia Cristina Heredia Vieira

(Membro)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me capacitado; a minha mãe, pai e minha avó por toda motivação, esforços e total apoio nessa jornada; ao meu irmão por todo seu carinho; ao meu marido por me ajudar, entender e estar sempre ao meu lado.

Ao professor Jonas da Silva Mota por permitir que fizesse parte de sua equipe e por me orientar na realização deste trabalho, agregando muito mais conhecimento e crescimento pessoal e intelectual.

A todos os professores por terem sido fonte de um amplo aprendizado.

Aos companheiros do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio), Giuliana Vitorino, Cayo Vinícius Fernandes, Joyce Justino, Luciano Stevanin, Victor Liuti, Linston Romão, Elizabete Maximiano, Allyne Moreira Santos, Vanessa Martins e Jane Brito, por terem compartilhado seus conhecimentos de laboratório. Ao Franksteffen Silva Maia por toda paciência e ensinar metodologias e operacionalidade de equipamentos e programas.

A Carlise Frota pela parceria na obtenção dos espectros de RMN.

A minha amiga Lais Zacheu de Paula por toda ajuda durante esse período.

A minha turma por toda amizade, que ficará registrada em minha memória.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ASPECTOS GERAIS	1
1.2	GÊNERO <i>PEPEROMIA</i>	2
1.3	A ESPÉCIE <i>PEPEROMIA PERESKIIFOLIA</i>	7
1.4	CLASSE DOS CROMENOS	8
2	OBJETIVO	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1	SOLVENTES.....	11
3.2	MÉTODOS	11
3.2.1	<i>Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)</i>	11
3.2.2	<i>Cromatografia em coluna (CC)</i>	11
3.2.3	<i>Cromatografia em camada fina (CCF)</i>	11
3.2.4	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	12
3.2.5	<i>Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear</i>	12
3.3	MATERIAL VEGETAL.....	12
3.4	PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>PEPEROMIA PERESKIIFOLIA</i>	12
3.5	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO HEXÂNICA E CLOROFÓRMICA.....	13
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1 (PP59)	15
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Detalhamento das folhas (a), caules (b) e inflorescência (c) da <i>P. pereskiiifolia</i>	7
Figura 2: Representação estrutural do grupo cromeno.....	8
Figura 3: Representação do fragmento do grupo prenilo (a) e geranil (b), respectivamente, presente em muitos cromenos de <i>Peperomia</i>	8
Figura 4: Representação estrutural de compostos que apresentam o grupo cromeno: alcaloide (a), flavonoide, (b), tocoferol (c) e antocianina (d).	9
Figura 5: Fluxograma de obtenção dos extratos das folhas de <i>Peperomia pereskiiifolia</i>	13
Figura 6: Fluxograma de obtenção das frações da “Coluna – PP _n ” mostrando as frações reunidas por apresentarem semelhança em RF.....	14
Figura 7: Cromatograma empregando CLAE da substância PP59.	14
Figura 8: Espectro e RMN de ¹ H da substância 1 (400 MHz, CDCl ₃).	16
Figura 9: Espectro de RMN de ¹³ C da substância 1 (100 MHz, CDCl ₃).	17
Figura 10: Estrutura molecular da substância 1 (PP59).	17

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Levantamento da atividade biológica e estudos químicos com espécies de Peperomia.....	4
Tabela 2: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C da literatura e do presente trabalho.....	16

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ø	Diâmetro da coluna
	Comprimento da coluna
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCF	Cromatografia em camada fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
δ _H	Deslocamento químico do hidrogênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
MeOH	Álcool metílico
MHz	Megahertz
p.A	Para análise
PP _n	Genérico para indicar o fracionamento da mistura de extrato hexânico com o clorofórmico
RF	Razão de Frente (definido como a razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente).
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
UV-Vis.	Ultravioleta-visível

RESUMO

O gênero *Peperomia* é um dos dois maiores gêneros da família Piperaceae, com cerca de 1700 espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais do mundo. A literatura não relata trabalhos sobre a constituição química da espécie *Peperomia pereskiifolia*. Este estudo teve como objetivo o estudo químico do extrato etanólico, obtido a partir de folhas secas naturalmente. Utilizando a técnica de partição líquido-líquido, obtiveram-se frações hexânica-clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica. Utilizando-se da técnica de Cromatografia em Camada Fina (CCF), Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi possível realizar o isolamento observar o isolamento da substância metil 7-metóxi-5-metil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato, com rendimento de 0,76%, a qual foi caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para prótons de ^1H e de ^{13}C .

Palavras-Chave: Piperaceae, RMN, Cromenos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

As plantas têm um papel muito importante na manutenção da saúde, onde cerca de 80% dos habitantes do planeta confiam no seu poder medicinal (EGWUCHE et al., 2011). Substâncias orgânicas originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades no ser humano, sendo que grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada direta ou indiretamente de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres (NEWMAN et al., 2000; CHIN et al., 2006). Dessa forma, os produtos naturais constituem uma importante fonte de pesquisa visando a descoberta de novas substâncias com atividades farmacológicas (BUTLER, 2004; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

Os componentes responsáveis por essas características são os chamados de metabólitos secundários, que atuam como um mecanismo de defesa das mesmas ou surgem como resultado de uma adaptação do organismo ao seu meio ambiente circundante (FELIPPE, 2013). Estes metabólitos secundários são de diferentes classes tais como alcaloides, flavonoides, cromenos, terpenos, dentre outros (VERPOORTE & MARASCHIN, 2001). Enquanto que a outra classe de metabólitos, os primários, são responsáveis pelas necessidades de sobrevivência da planta, tais como aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, glicosídeos e ácidos graxos (FELIPPE, 2013).

A quantidade a qual estes são produzidas variam de acordo com o gênero, fatores climáticos, temporais ou ambientais, tais como, baixas temperaturas, poluição atmosférica, altitude, incidência luminosa, fatores mecânicos, adição de nutrientes (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

É de grande importância e interesse terapêutico conhecer os principais grupos de metabólitos secundários com seus respectivos métodos de extração, para que se possa isolar, identificar e dosar os mesmos. Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. Também pode considerar que os compostos presentes em menor proporção na planta podem apresentar melhores efeitos terapêuticos (YUNES & CALIXTO, 2001).

Os compostos extraídos das plantas podem ser utilizados para novos tratamentos (JARDIM et al., 2015). Atualmente, estudos nessa área têm aumentado frente à diversidade e o potencial dos produtos medicinais encontrados em diversas plantas (SUSSA et al., 2013).

A flora brasileira apresenta uma imensa diversidade de representantes, muitos, inexplorados, que podem ser um recurso potencial em compostos bioativos (JARDIM et al., 2015), assim, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundários e caso o interesse seja por uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis pela atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural (FOGLIO et al., 2006).

1.2 Gênero *Peperomia*

A família *Piperaceae* compreende cinco gêneros, incluindo: *Peperomia*, *Piper*, *Manekia*, *Zippelia* e *Verhuellia*, sendo os dois primeiros os mais importantes desta família com 2000 (FELIPPE, 2013) e 1500-1700 representantes, respectivamente (PINHEIRO et al., 2011; SANTOS et al., 2001; FELIPPE, 2013).

Muitas espécies da família *Piperaceae* ocorrem nos trópicos, estando estas adaptadas a ambientes úmidos e a planaltos secos (LAGO et al., 2007). As espécies do gênero *Peperomia* são poucas estudadas do ponto de vista fitoquímico, em contraste com extensivas pesquisas sobre os componentes de *Piper* (SEERAM et al., 1998; LAGO et al., 2007). O conhecimento químico de espécies de *Peperomia* ainda é limitado, sendo que atualmente apenas 46 das espécies foram estudadas (FELIPPE, 2013).

Os metabólitos secundários de espécies das *Piperaceae* apresentam atividade biológica e o gênero *Peperomia* é apontado como a segunda maior fonte de compostos bioativos da família, considerando que este fora pouco estudado quimicamente. (BATISTA JÚNIOR et al. 2011)

Espécies do gênero *Peperomia* são usadas principalmente como plantas ornamentais (SANTOS et al., 2001) e algumas delas são usadas na medicina popular (LIRA et al., 2007).

As análises fitoquímicas de espécies de *Peperomia* resultaram no isolamento de amidas aromáticas e alifáticas (SALAZAR et al., 2005), cromenos e derivados de policetídeos (LAGO et al., 2007), fenilpropanoides, lignanas, neolignana, secolignana (LIN et al., 2011), piranos, alcaloides, derivados de ácido benzoico e benzopirano (BATISTA JÚNIOR et al., 2011; MOTA et al., 2009). Muitas espécies da família *Piperaceae* são amplamente utilizadas na medicina tradicional como anti-inflamatório e analgésico (ARRIGONI-BLANK, et al., 2004; SILVA et al., 2008), cicatrizante (VILLEGAS et al., 2001), leishmanicida (CÉLINE et al., 2009; ODONNE et al., 2009), antitumoral (LI et al., 2003), anticolérico, antiulcerogênico (RHO et

al., 2007), antifúngico, bactericida (MICHEL et al., 2007), antidepressivo e ansiolítico (MICHEL et al., 2010), dentre outros.

Dessa forma, a Tabela 1 complementa o trabalho, mostrando uma relação entre a utilização popular, a partes da planta estudadas, o potencial biológico estudado e qual classe de composto fora identificada.

Tabela 1: Levantamento da atividade biológica e estudos químicos com espécies de *Peperomia*.

(continua)

Espécie	Utilização popular	Parte da planta	Extrato estudado	Potencial biológico	Classe de compostos isolados
<i>P. dindygulensis</i>	Tratamento de estômago, glândulas mamárias, fígado e câncer no esôfago	Planta inteira	Etanólico	Supressão da proliferação de células endoteliais de veias de células umbilicais humanas	Secolignana (LIN et al., 2011)
	Potencial atividade contra o câncer; anti-inflamatória; e contra o HIV	Planta inteira	Acetonitrila	-	Secolignana; lignana tetraidrurfurânica; lignana dibenzibutano (WANG et al., 2014)
<i>P. duclouxii</i>	-	Planta inteira	Acetato de etila	Atividade anticâncer e anti-inflamatória	Lignana tetraidrofurânica; arilnaftalina (WANG et al., 2014)
<i>P. obtusifolia</i>	-	Folhas e caules	Hexânico	Antifúngica contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (SALAZAR, et al 2005), antitripanocipada (MOTA et al.; 2009)	Benzopiranos prenilados (MOTA et al., 2009) Ésteres cromenos monoterpenos (MBAH et al., 2002).
<i>P. glabella</i>	Antiasmático	Planta inteira	Metanólico	-	Secolignana (MONACHE & COMPAGNONE, 1996)

Tabela 1: Levantamento da atividade biológica e estudos químicos com espécies de *Peperomia*.

(continua)

Espécie	Utilização popular	Parte da planta	Extrato estudado	Potencial biológico	Classe de compostos isolados
<i>P. pellucida</i>	Tratamento feridas; furúnculos; espinhas; abscessos; cólica; gota; dores abdominais, reumáticas; dor de cabeça; cura de sarampo; varíola; impotência masculina; transtornos mentais; e câncer de mama.	Folhas e caules	Metanólico	Atividade antimicrobiana contra <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. rubrum</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. vitis</i> , <i>Penicillium notatum</i> ; antiprotozoa contra <i>Trychophyton mentagrophytes</i> , <i>T. tronsurum</i> ; e antifúngica contra <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>Cladosporium cladosporioides</i>	Alcaloide, flavonoide, saponina, esterol, tanino, triterpenoide (KHAN & OMOLOSO, 2002).
	Usada contra furúnculos, abscessos, feridas na pele; inflamação ocular; ação antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória	Planta inteira	Metanólico	Atividade antibacteriana	Fitoesterol e apiol. (MANALO et al., 1983).
	As partes aéreas são usadas para cicatrização de ferimentos.	Folhas	-	Atividade antibacteriana contra <i>Staphilococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> ; efeito hipercolesterêmico; pesticida	Alcaloides e derivados, cardenoloides, saponinas, taninos (EGWUCHE et al., 2011).
<i>P. proctorii</i>	-	Planta inteira	Hexânico	Inseticida	Acilcicloexanodienos (SEERAM et al., 2000).

Tabela 1: Levantamento da atividade biológica e estudos químicos com espécies de Peperomia.*(conclusão)*

Espécie	Utilização popular	Parte da planta	Extrato estudado	Potencial biológico	Classe de compostos isolados
<i>P. blanda</i>	-	Folhas e raízes	Acetato de etila, metanol, etanol, isopropanol e uma mistura de hexano: acetato de etila (3:7)	Antiparasitárias (FELIPPE et al., 2008), anti-inflamatória (WU et al., 2005), larvicida (LEITE et al., 2012) e antitumoral (YUN et al., 2011), inseticida (GOVINDACHARI; KUMARI; PARTHO, 1998), antiviral e anti-inflamatória (ZHANG et al., 2007).	Lignanas tetraidrofurânicas e secolignanas (JARDIM et al., 2015; ZHANG et al., 2014; FELIPPE, 2013)
<i>P. japonica</i>	Tratamento de tumores malignos	Folhas e caules	-	Atividade anti-inflamatória	Secolignana (CHEN et al., 1989).
<i>P. vulcanica</i>	Contra a esterilidade	Planta inteira	Hexânico	-	Cromenos (MBAH et al., 2002).

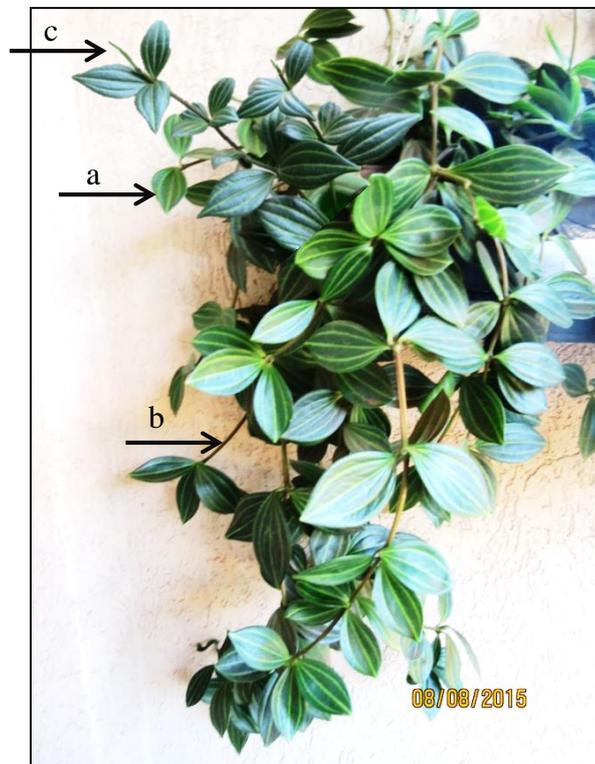
1.3 A espécie *Peperomia pereskiifolia*

A classificação botânica para a *Peperomia pereskiifolia* (Figura 1) é descrita a seguir (SANTOS et al. 2001):

Reino: *Plantae*, **Filo:** *Magnoliophyta*, **Classe:** *Magnoliopsida*, **Subclasse:** *Magnoliidae*,
Ordem: *Piperales*, **Família:** *Piperaceae*, **Gênero:** *Peperomia*, **Espécie:** *Peperomia pereskiifolia*.

A literatura não relata estudos fitoquímicos com esta espécie. A ausência de trabalhos motivou o desenvolvimento deste estudo.

Figura 1: Detalhamento das folhas (a), caules (b) e inflorescência (c) da *P. pereskiifolia*.

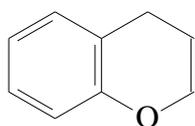


Fonte: a autora.

1.4 Classe dos cromenos

Dentre as diversas classes de metabólitos secundários bioativos, isolados de espécies de *Peperomia*, destacam-se os cromenos (Figura 2) pela sua grande potencialidade biológica, apresentando um amplo espectro de atividades tais como antifúngica, antioxidante e antiparasitária. Os cromenos são caracterizados pela presença de um núcleo benzopirânico (um anel benzeno fundido a um anel pirano (BATISTA JÚNIOR et al., 2008; SOUZA JÚNIOR, 2014).

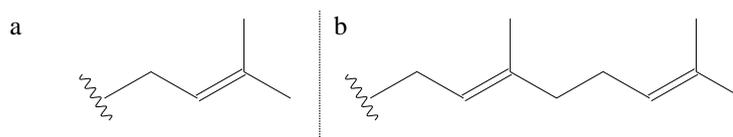
Figura 2: Representação estrutural do grupo cromeno.



Fonte: a autora.

As substâncias desta classe que ocorrem em *Peperomia* são principalmente cromenos prenilados e geranilados (Figura 3) de origem policetídic, as quais apresentam diversas atividades biológicas e já foram identificados nas espécies *P. blanda*, *P. serpens*, *P. villipetiola* (COSTA et al., 2013; VELOZO et al., 2006; KITAMURA et al., 2006; SALAZAR et al., 2005).

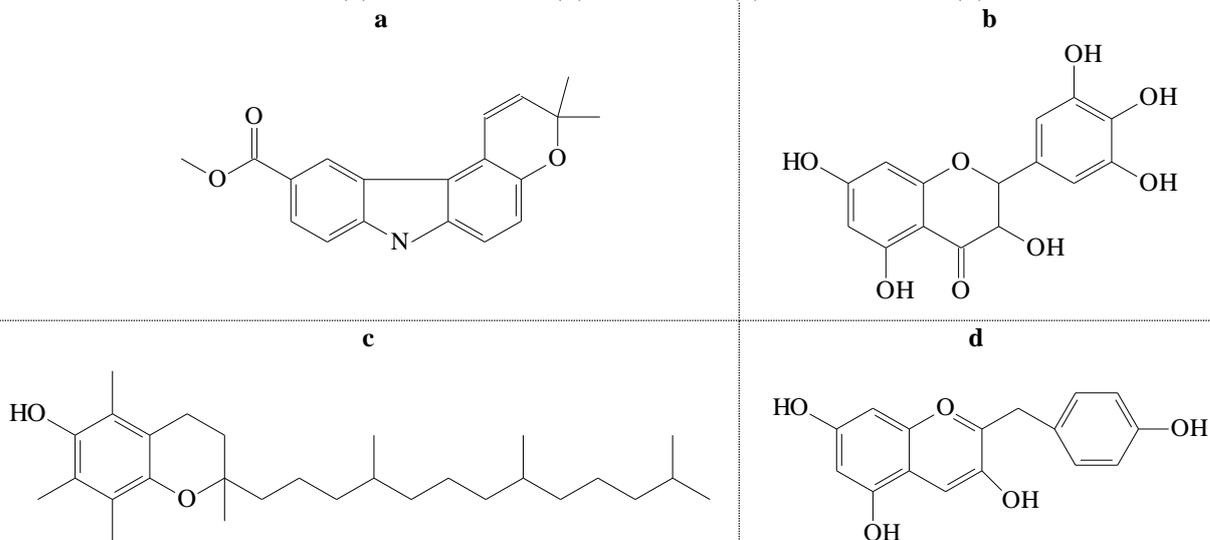
Figura 3: Representação do fragmento do grupo prenilo (a) e geranil (b), respectivamente, presente em muitos cromenos de *Peperomia*.



Fonte: COSTA et al., 2013; KITAMURA et al., 2006.

O grupo cromeno aparece como um importante componente estrutural biologicamente ativo (ALIZADEH et al., 2008a). Fragmentos cromeno ocorrem em alcaloides (4a) (SONGSIANG et al., 2011), flavonoides (4b) (ALCADE & POZO, 2008), tocoferois (4c) (SCOTTI et al., 2007) e antocianinas (4d) (FERREIRA, 2013), como representado pela Figura 4.

Figura 4: Representação estrutural de compostos que apresentam o grupo cromeno: alcaloide (a), flavonoide, (b), tocoferol (c) e antocianina (d).



Fonte: SONGSIANG et al., 2011; ALCADE & POZO, 2008; SCOTTI et al., 2007; FERREIRA, 2013.

Além disso, cromenos funcionalmente substituídos têm desempenhado crescente papéis em abordagens sintéticas para compostos promissores no campo de química. Esta classe está presente em diversos produtos naturais e com um amplo espectro de efeitos biológicos, tais como citotóxicos, antibacterianos, atividade antiprotozoária e antifúngicas (NAVARRETE-ENCINA et al., 2010; ALIZADEH et al., 2008a e 2008b; AGUILAR-GUADARRAMA et al., 2009; HAREL et al., 2011).

2 OBJETIVO

Realizar um estudo fitoquímico do extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Peperomia pereskiiifolia*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes

Metanol (Dinâmica[®]) grau cromatográfico, água ultrapurificada (Pure Water System, Scholar-UV, Human UP 900), Acetato de etila 99,5% p.A (Dinâmica[®]), clorofórmio 99,80% p.A (Synth[®]), etanol 95,0% p.A (Dinâmica[®]), hexano 98,5% p.A (Synth[®]), metanol 99,5% p.A (Dinâmica[®]), tolueno 99,5% p.A (Nuclear[®]).

3.2 Métodos

3.2.1 *Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)*

Para o preparo das placas a serem utilizadas pela cromatografia em camada delgada preparativa, pesaram-se, aproximadamente, 6 g de sílica gel 60 G para o preparo das placas e misturou-se com 12 mL de água destilada em um béquer. As placas de vidro utilizadas possuíam o comprimento de 20 x 20 cm, as quais foram inicialmente limpas com acetona, e posteriormente a mistura foi aplicada. A espessura da camada obtida é de aproximadamente 1,0 mm. Deixou-se secar naturalmente por 24 h, e em seguida as placas foram ativadas em estufa a 100°C.

3.2.2 *Cromatografia em coluna (CC)*

Para a cromatografia em coluna utilizou-se 150 mm sílica gel 60 (230-400 mesh) da (VETEC[®]) como fase estacionária em uma coluna com 40 mm de diâmetro, 300 mm de comprimento. Utilizou-se sistema de eluição gradiente de uma mistura de hexano e acetato de etila, partindo de uma razão 98:02 até 60:40.

3.2.3 *Cromatografia em camada fina (CCF)*

As amostras foram analisadas em CCF, utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ da (Merck[®]) com espessura de filme de 0,20 mm.

3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência modelo: SHIMADZU LC6A, detector UV-Vis programado em 254 nm. Coluna Phenomenex C-18 (Ø 4,6 mm x || 250 mm, diâmetro da partícula 10 µm) e pré-coluna (25 mm x 3 mm) de mesma fase da coluna. Eluição realizada em sistema gradiente: MeOH/H₂O de 20 a 100% metanol, levando 25 min para atingir 100% de metanol, e 5 min para voltar à condição inicial. Tempo de análise foi de 30 min. Vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min e volume injetado de 10 µL. As amostras foram filtradas em micro-filtro de 0,20 µm.

Foi escolhida a análise no comprimento em 254 nm após ter sido realizada uma varredura espectrométrica de 254 nm a 365 nm, intervalo de melhor faixa de trabalho para compostos orgânicos.

3.2.5 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear

Para a obtenção dos espectros de RMN foi utilizado um espectrômetro da BRUKER AC 400 operando a 400 MHz ¹H e 100 MHz para o ¹³C, realizados pelo Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

3.3 Material vegetal

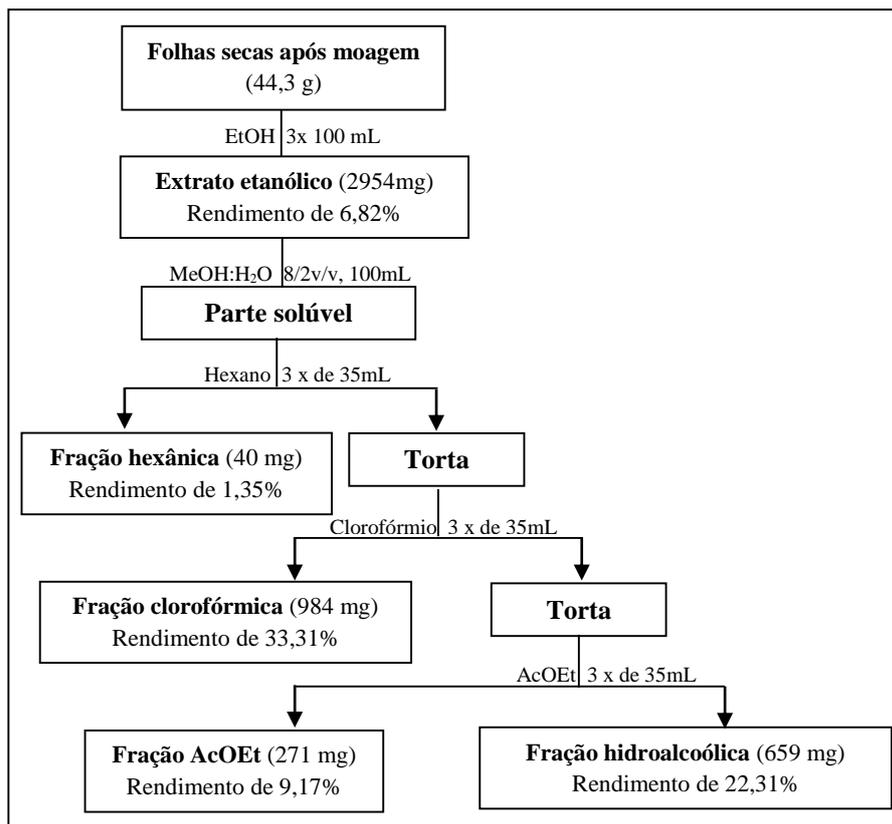
As folhas de *P. pereskiiifolia* foram coletadas em novembro de 2010 em Dourados-MS (S22^o12'37,7", WO54^o54'59,9"), Brasil. A espécie foi identificada pelo Dr. Elsie Franklin Guimaraes (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, em Rio de Janeiro, Brasil). Uma exsicata do material foi depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

3.4 Preparo do extrato etanólico de *Peperomia pereskiiifolia*

As folhas de *P. pereskiiifolia* foram secas a temperatura ambiente e moídas, obtendo-se em massa o total de 44,3 g, sendo o material pulverizado submetido à extração por maceração com etanol. O extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotativo e seco em capela. Essa operação foi realizada três vezes, utilizando-se 100 mL de solvente por extração realizada a cada sete dias, obtendo-se 2954 mg do extrato etanólico (EtOH), os quais foram dissolvidas em 100 mL de metanol/água 8/2 (v/v). A parte solúvel foi submetida a extrações sucessivas com

hexano (Hex) (3 x 35 mL), obtendo-se um total de 40 mg de extrato. A extração com clorofórmio (3 x 35 mL), resultou em 984 mg. A extração com acetato de etila (AcOEt) (3 x 35 mL), em 271 mg de extrato e a fração hidroalcoólica resultou em um total de 659 mg. Todos os extratos foram concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida (Figura 5).

Figura 5: Fluxograma de obtenção dos extratos das folhas de *Peperomia pereskiifolia*.

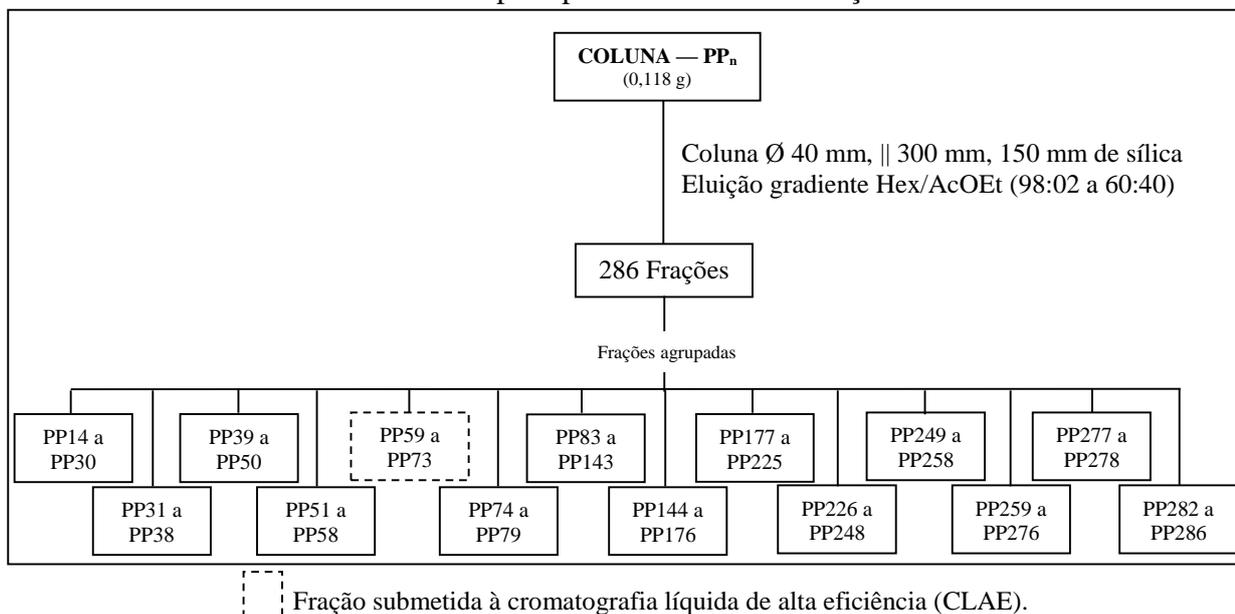


Fonte: a autora.

3.5 Fracionamento cromatográfico da fração hexânica e clorofórmica

As frações hexânica e clorofórmica apresentavam semelhanças por meio de CCD. Portanto, foram reunidas e submetidas a um fracionamento em coluna, a qual teve suas frações identificadas com " PP_n " (Figura 6) (dimensões: diâmetro de 4 cm e 30 cm de comprimento, empregando sílica gel como fase estacionária. O sistema eluente escolhido foi em gradiente de polaridade crescente (Hex e AcOEt). Foram obtidas 286 frações, as quais foram coletadas em frascos tipo penicilina de 20 mL. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança observadas por meio da CCF. A fração PP59-PP73 (identificada como PP59) resultou no isolamento da substância 1 (PP 59; 30,5 mg; rendimento de 0,76%), a qual foi encaminhada para obtenção de espectros dos RMN ^1H e RMN ^{13}C .

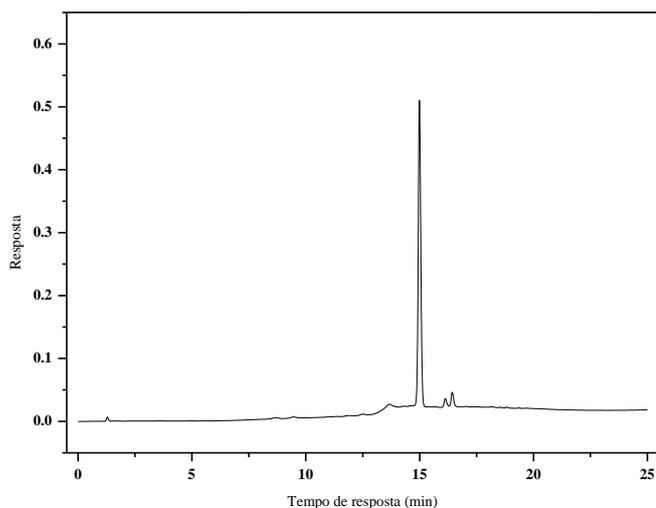
Figura 6: Fluxograma de obtenção das frações da “Coluna – PP_n” mostrando as frações reunidas por apresentarem semelhança em RF.



Fonte: a autora.

A amostra PP59 apresentou apenas uma mancha após a análise por CCF, sendo, portanto, submetida à análise por CLAE, visando identificar a pureza e o tempo de retenção da substância para posteriormente ser submetida à análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear. O cromatograma obtido (Figura 7), indicou que a fração possuía uma substância majoritária no tempo de retenção próximo à 15 min.

Figura 7: Cromatograma empregando CLAE da substância PP59.



Fonte: a autora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

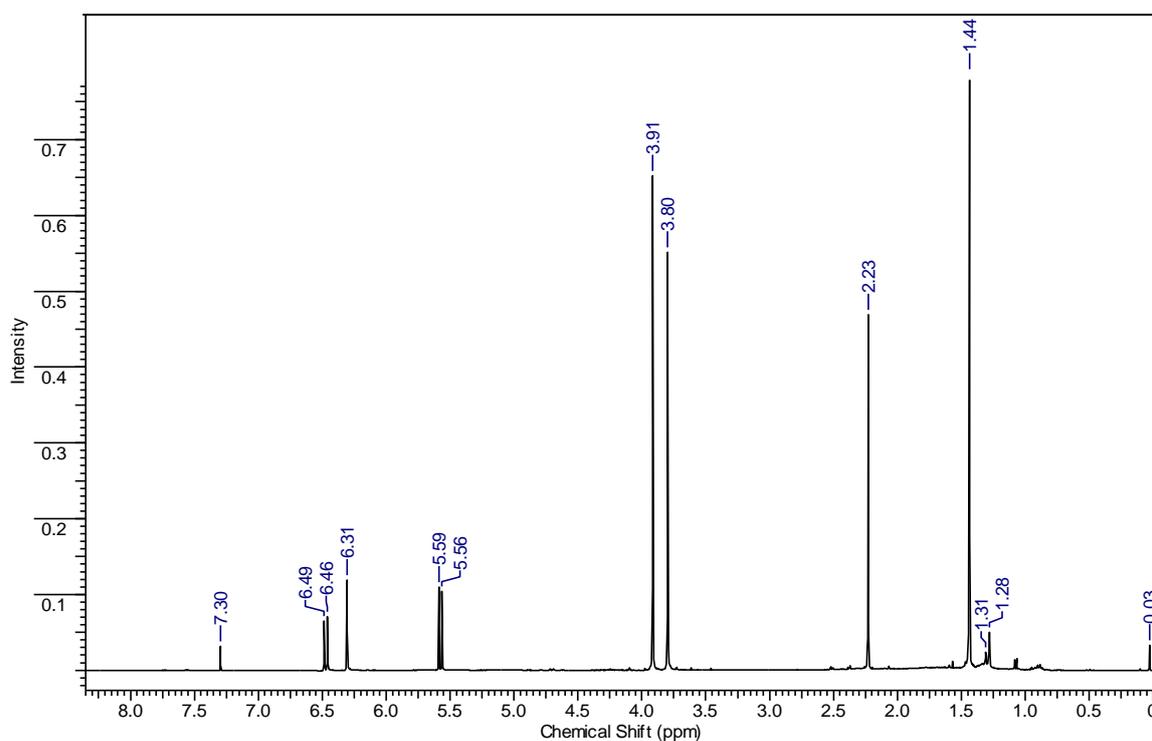
4.1 Identificação estrutural da substância 1 (PP59)

A fração denominada PP59 (37,50 mg) resultou no isolamento de uma substância, a qual foi encaminhada para RMN ^1H (Figura 8, Tabela 2) e ^{13}C Figura 9, Tabela 2). Os espectros e a estrutura da substância são apresentados abaixo.

O espectro de RMN de ^1H da substância 1 (Figura 10) apresentou um intenso singlete metílico em δ 1,44 (6H), que, associados a sinais referentes aos dois dubletos em δ 5,57 (1H) e δ 6,47 (1H), e também ao único singlete aromático δ 6,31 (1H) que indica um anel pentasubstituído e ao singlete metílico δ 2,23 (3H), caracterizam a presença de um grupo benzopirano constituído de insaturação, por estes sinais se referirem a deslocamentos químicos associados a essa classe de composto. Os dados de RMN foram comparados com a literatura (Tabela 2), permitindo-se, assim, propor o nome da substância: metil 7-metoxi-5-metil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato. Dessa forma, o espectro de RMN ^{13}C serviu como complemento às informações para confirmação das correlações entre os sinais e estrutura.

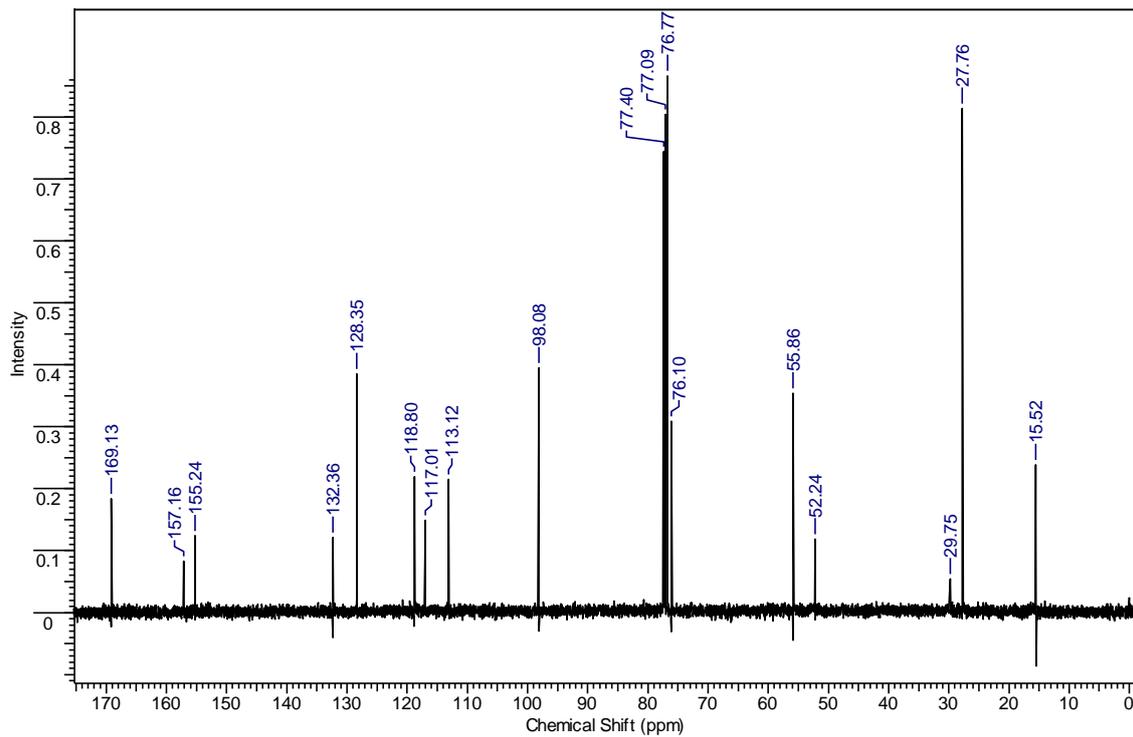
Tabela 2: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C da literatura e do presente trabalho.

N° do carbono	Literatura (SALAZAR et al., 2005)		Substância 1	
	C	δ_{H} (mult; J (Hz); quantidade)	C	δ_{H} (mult; J (Hz); quantidade)
2(C)	76,0	-	76,1	-
3(CH)	128,3	5,55 (d; 10,0; 1H)	128,3	5,57 (d; 12,0; 1H)
4(CH)	118,8	6,44 (d; 10,0; 1H)	118,8	6,47 (d; 12,0; 1H)
4a(C)	113,1	-	113,1	-
5(C)	132,3	-	132,4	-
6(C)	117,1	-	117,1	-
7(C)	157,2	-	157,2	-
8(CH)	98,1	6,28 (s; 1H)	98,1	6,31 (s; 1H)
8a(C)	155,2	-	155,2	-
9(CH ₃)	15,4	2,20 (s, 3H)	15,5	2,23 (s; 3H)
10 e 11(CH ₃)	27,7	1,40 (s, 6H)	27,8	1,44 (s; 6H)
1'(C)	169,0	-	169,1	-
2'(CH ₃)	52,0	3,89 (s, 3H)	52,2	3,91 (s; 3H)
1''(CH ₃)	55,8	3,77 (s, 3H)	55,9	3,80 (s; 3H)

Figura 8: Espectro e RMN de ^1H da substância 1 (400 MHz, CDCl_3).

Fonte: a autora.

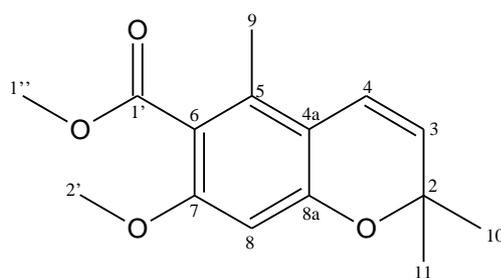
Figura 9: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (100 MHz, CDCl_3).



Fonte: a autora.

A partir dos espectros e sua correlação, e a relação entre os valores encontrados na publicação de SALAZAR et al. (2005), pode-se propor uma estrutura para a substância 1 (Figura 10).

Figura 10: Estrutura molecular da substância 1 (PP59).



Fonte: a autora.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico da união das frações hexânicas e clorofórmicas, obtidas a partir do extrato etanólico das folhas da *P. pereskiaefolia*, pode-se isolar a substância identificada como metil 7-metoxi-5-metil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato, com rendimento de 0,76%.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-GUADARRAMA, B., NAVARRO, V., LEON-RIVERA, I., RIOS, M.Y. Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. **Natural Products Research**. v. 23, p. 1559–1565. 2009.

ALBUQUERQUE, U. P.; Hanazaki, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, p. 678-689. 2006.

ALCADE, M. T.; POZO, A. Nuevos activos anticelulíticos (III) Dihidromiricetina. **OFFARM**. v. 27, n. 1, p. 89-90. 2008.

ALIZADEH, B.H., FOUROUMADI, A., ARDESTANI, S.K., POORRAJAB, F., SHAFIEE, A. Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. **Archives of Pharmaceutical and Chemical Life Sciences**. v. 341, p. 787–793. 2008b.

ALIZADEH, B.H., OSTAD, S.N., FOROUMADI, A., AMINI, M., DOWLATABADI, R., NAVIDPOUR, L., SHAFIEE, A. Synthesis and cytotoxic activity of novel chromenes. **ARKIVOC**. v. 8, p. 45–56. 2008a.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; DMITRIEVA, E. G.; FRANZOTTI, E. M.; ANTONIOLLI, A. R.; ANDRADE, M. R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 91, n. 2/3, p. 215-218, Apr. 2004.

BATISTA JÚNIOR, J. M.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, v. S.; FREEDMAN, T. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure Elucidation and Absolute Stereochemistry of Isomeric Monoterpene Chromane Esters. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 76, p. 2603–2612, 2011.

BATISTA JÚNIOR, J. M.; FLAUSINO JR., O.; KATO, M. J.; BOLZANI, v. S.; FURLAN, M. Cromenos isolados de *Piper aduncum* e *P. gaudichaudianum* com potencial atividade inibidora de protease serínica frente ao substrato de HIV protease. In: **31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, SP. 2008.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products Journal of Natural Products**. v. 67, p. 2141-2153. 2004.

- CÉLINE, V.; ADRIANA, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A. C.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L. F.; ROSARIO, R.; DIONICIA, G.; MICHEL, S.; DENIS, C. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 123, n. 3, p. 413-422. 2009.
- CHEN, C. M.; JAN, F.Y.; CHEN, M. T.; LEE, T. J. Peperomins A, B, and C, novel secolignans from *Peperomia japonica*. **Heterocycles**. v. 29, p. 411–414. 1989.
- CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery From Natural Sources. **The American Association Pharmaceutic Scientists Journal**. v.8, n. 2, p. 239.-253. 2006.
- COSTA, D. S. S.; MOURA, V. B.; DIAS, A. G.; COSTA, P. R. R. Síntese de novas metilarilnitronas candidatas a ação citoprotetora, antineoplásica e antiparasitária. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. 36, 2013. Águas de Lindoia. Resumos. Sociedade Brasileira de Química.
- EGWUCHE, R. U.; ODETOLA, A. A.; ERUKAINURE, O. L. Preliminary investigation into the chemical properties of *Peperomia pellucida* L. **Journal of Phytochemistry**. v. 5, n. 1, p. 48-53. 2011.
- FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; GUIMARÃES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**. v. 69, n. 2, p. 445-450. 2008.
- FELIPPE, L.G. **Estudo das lignanas de *Peperomia blanda* (Piperaceae): abordagem de aspectos estruturais, metabólicos e biossintéticos**. 2013. p. 206. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química. Araraquara. p. 1; 5-6; 7; 22; 27-28; 33-34.
- FERREIRA, T. I. L. **Quantificação de antocianinas no fruto, polpa e produto processado da juçara (*Euterpe edulis Martius*)**. Universidade de Taubaté. Departamento de Engenharia Mecânica. Curso de Engenharia de Alimentos. TCC. Taubaté. 2013.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**. v. 7, p. 5. 2006.

- GOBBO-NETO L.; LOPES P. N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381. 2007.
- GOVINDACHARI, T. R.; KUMARI, G. N. K.; PARTHO, P. D. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 7, p. 2129-2131. 1998.
- HAREL, D.; KHALID, S. A.; KAISER, M.; BRUN, R.; WÜNSCH, B.; SCHMIDT, T. J. Encecalol angelate, an unstable chromene from *Ageratum conyzoides* L.: Total synthesis and investigation of its antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, p. 620-625. 2011.
- JARDIM, A. C. G.; IGLOI, Z.; SHIMIZU, J. F.; SANTOS. v. A. F. F. M.; FELIPPE, L. G.; MAZZEU, B. F.; AMAKO, Y.; FURLAN, M.; HARRIS, M.; RAHAL, P. Natural compounds isolated from brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Antiviral Research**. v. 115, p. 39-47. 2015.
- KHAN, M. R.; OMOLOSO, A.D. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. **Fitoterapia**. v. 73, p. 251-254. 2002.
- KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). **Phytochemistry**. v. 67, n. 21, p. 2398-2402. 2006.
- LAGO, J. H. G.; OLIVEIRA, A.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. 3-Ishwarone and 3-Ishwarol, rare sesquiterpenes in essential oil from leaves of *Peperomia oreophila* Hensch. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. v. 18, n. 3, 638-642. 2007.
- LEITE, A. C. C. F.; KATO, M. J.; SOARES, R. O. A.; GUIMARÃES, A. E.; SANTOS-MALLET, J. R.; CABRAL, M. M. O. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22, n. 3, p. 517-521. 2012.
- LI, N.; WU, J-L.; SAKAI, J-I.; ANDO, M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 11, p. 1421-1426. 2003.
- LIN, M.-G.; YU, D.-H.; WANG, Q.-W.; LU, Q.; ZHU, W.-J.; BAI, F.; LI, G.-X.; WANG, X.-W.; YANG, YI-FANG; QIN, XUE-MEI; FANG, CHAO; CHEN, HONG-ZHUAN; YANG, GUO-HONG. Secolignans with antiangiogenic activities from *Peperomia dindygulensis*. **Chemistry & biodiversity**. v. 8, p. 862-871. 2011.

LIRA, P. L.; FARFÁN, Y.; BAREN, C. M.; BANDONI, A. L.; COUSSIO, J. D.; ABRAM, A. P. Composition of the essential oil of two *Peperomia* from Peru: *P. Galioides* and *P. Chahuapuyana*. **Revista Latinoamericana de Química**. v. 35, n.1, p. 7 – 12. 2007.

MANALO, J. B.; HAN, B. H.; HAN, Y. N.; PARK, M. H.; ANZALDO, F. E. Studies on Ether-Soluble Neutral Compounds of *Peperomia pellucida*. **Natural Products Research**. v. 6, n. 2, p. 133-6. 1983.

MBAH, J. A.; TCHUENDEM, M. H. K.; TANE, P.; STERNER, O. Two chromones from *Peperomia vulcanica*. **Phytochemistry**. v. 60, p. 799–801. 2002.

MICHEL, J. L.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; HUANG, Y.; KRUNIC, A.; ORJALA, J.; VELIZ, M.; SONI, K. K.; SOEJARTO, D. D.; CACERES, A.; PEREZ, A.; MAHADY, G. B. Estrogenic and serotonergic butenolides from the leaves of *Piper hispidum* Swingle (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 129, n. 2, p. 220-226. 2010.

MICHEL, J.; DUARTE, R.; BOLTON, J.; HUANG, Y.; CACERES, A.; VELIZ, M.; SOEJARTO, D.; MAHADY, G. Medical potential of plants used by the Q'eqchi Maya of Livingston, Guatemala for the treatment of women's health complaints. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, n. 1, p. 92-101. 2007.

MONACHE, F. D.; COMPAGNONE, R. S. A secolignan from *Peperomia glabella*. **Phytochemistry**. v. 43, n. 5, p.1097-1098. 1996.

MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; BATISTA JÚNIOR, J. M.; LÓPEZ, S. N.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B. In vitro Trypanocidal Activity of Phenolic Derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta medica**. v. 75, p. 620-623, 2009.

NAVARRETE-ENCINA, P. A.; SALAZAR, R.; VEJA-RETTTER, C.; PÉREZ, K.; SQUELLA, J. A.; NUÑES-VERGARA, L. J. On the One Pot Syntheses of Chromeno[4,3-b]pyridine-3-carboxylate and Chromeno[3,4-c]pyridine-3-carboxylate and Dihydropyridines. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. v. 21, n. 3, p. 413-418. 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**. v.17, n. 3. 215-234. 2000.

ODONNE, G.; BOURDY, G.; CASTILLO, D.; ESTEVEZ, Y.; LANCHA-TANGO, A.; ALBAN-CASTILLO, J.; DEHARO, E.; ROJAS, R.; STIEN, D.; SAUVAIN, M. Ta'ta',

- Huayani: perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 126, n. 1, p. 149-158. 2009.
- PINHEIRO, B. G.; SILVA, A. S. B.; SOUZA, G. E. P.; FIGUEREDO, J. G.; CUNHA, F. Q.; LAHLOU, S.; SILVA, J. K. S. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 138, p. 479-486. 2011.
- RHO, M-C.; LEE, S. W.; PARK, H. R.; CHOI, J-H.; KANG, J. Y.; KIM, K.; LEE, H. S.; KIM, Y. K. Acet inhibition of alkaloids identified in the fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**. v. 68, n. 6, p. 899-903. 2007.
- SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. **Phytochemistry**. v. 66, p. 573-579. 2005.
- SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L. GUIMARÃES, E. F. KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 *Piperaceae* species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**. v. 58, p. 547-551. 2001.
- SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 2, p. 153-166. 2007.
- SEERAM, N. P.; JACOBS, H.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. A prenylated benzopyran derivative from *Peperomia clusiifolia*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 5, p. 1389-1391. 1998
- SEERAM, N. P.; LEWIS, A. W.; JACOBS, H.; NAIR, M. G.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Proctoriones A-C: 2-Acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii*. **Journal of the Natural Products**. v. 63, p. 399-402. 2000.
- SILVA, D. R.; BARONI, S.; SVIDZINSKI, A. E.; BERSANI-AMADO, C. A.; CORTEZ, D. A. G. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (*Piperaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, n. 3, p. 569-573. 2008.
- SONGSIANG, U.; THONGTHOOT, T. BOONYARAT, C.; YENJAI, C. Claurailas A-D, Cytotoxic Carbazole Alkaloids from the Roots of *Clausena harmandiana*. **Journal of Natural Products**. v. 74, n. 2, p. 208-212. 2011.

SOUZA JÚNIOR, A. A. **Investigação da origem biossintética de cromenos e cromanos em *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química. 145 p. 2014.

SUSSA, F. V.; DAMATTO, S. R.; ALENCAR, M. M.; MAZZILLI, B. P.; SILVA, P. S. C. Natural radioactivity determination in samples of *Peperomia pellucida* commonly used as a medicinal herb. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 116, p. 148-151. 2013.

VELOZO, L. S.; FERREIRA, M. J.; SANTOS, M. I.; MOREIRA, D. L.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**. v. 67, n. 5, p. 492-496. 2006.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna, Chapecó: **Editora Universitária Argos**. p. 382-432. 2001.

VILLEGAS, L. F.; MARÇALO, A.; MARTIN, J.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. (+)-*epi-alfa-bisbolols* the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the *in vivo* wound-healing activity of related terpenoids. **Journal of Natural Products**. v. 64, n. 10, p. 1357-1359. 2001.

WANG, H.-z.; LIANG, J.-y.; WEN, H.-m.; SHAN, C.-x.; LIU, R. Qualitative and quantitative analyses of bioactive secolignans from folk medicinal plant *Peperomia dindygulensis* using UHPLC-UV/Q-TOF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 94, p. 1-11. 2014.

WU, J-L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J-I.; KAKUTA, S.; TANG, W.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**. v. 68, n. 11, p. 1656-1660. 2005.

YUN, J-Y.; ROH, E.; SON, J-K.; LEE, S. H.; SEO, C-S.; HWANG, B. Y.; HAN, S-B.; KIM, Y. Effect of saucerneol D on melanin production in cAMP-elevated melanocytes. **Archives of Pharmacal Research**. v. 34, n. 8, p. 1339-1345. 2011.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos: Chapecó. 523 p. 2001.

ZHANG, G-L.; LI, N.; WANG, Y-H. ZHENG, Y-T.; ZHANG, Z.; WANG, M-W. Bioactive lignans from *Peperomia heyneana*. **Journal of Natural Products**. v. 70, n. 4, p. 662-664. 2007.

ZHANG, J.; CHEN, J.; LIANG, Z.; ZHAO, C. New lignans and their biological activities. **Chemistry & biodiversity**. v. 11, p. 1-54. 2014.