

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

Isabela Fernanda Rossi

**Análise de amidas de *Piper arboreum* por espectrometria de
massas: uma comparação entre as técnicas leaf-spray-EM e CLAE-
EM/EM**

ARARAQUARA
2019

ISABELA FERNANDA ROSSI

Análise de amidas de *Piper arboreum* por espectrometria de massas: uma comparação entre as técnicas leaf-spray-EM e CLAE-EM/EM

Monografia apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Co-orientadora: Profa. Dra. Lidiane Gaspareto Felippe

Araraquara

2019

ISABELA FERNANDA ROSSI

Análise de amidas de *Piper arboreum* por espectrometria de massas: uma comparação entre as técnicas leaf-spray-EM e CLAE-EM/EM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Co-orientadora: Profa. Dra. Lidiane Gaspareto Felipe

Araraquara, 11 de dezembro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maysa Furlan

Instituto de Química – UNESP Araraquara

Profa. Dra. Angela Regina Araújo

Instituto de Química – UNESP Araraquara

Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Instituto de Química – UNESP Araraquara

*Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã,
e toda à minha família, por não terem medido
esforços para que meu sonho se tornasse
realidade, por sempre acreditarem em mim, e me
apoiarem com muito amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e perseverança a mim concedida.

Agradeço aos meus pais, minha irmã e meus avós por sempre acreditarem em mim e, pelo apoio, amor, carinho, e todas as palavras de incentivo que me deram nesses anos.

À Profa. Dra. Maysa Furlan, pela oportunidade de realizar este trabalho, por sua confiança, paciência, incentivo, apoio e ensinamentos.

À Aline, pela disponibilidade, paciência e compreensão.

Ao João Bronzel, pela colaboração na realização deste trabalho, sua paciência, dedicação, disponibilidade e compreensão.

À Profa. Lidianne pelo apoio e disponibilidade no início desse trabalho.

Aos meus amigos, Ana, Flávia, Gabriel, Gabriela, Laíze, Larissa, Mayara, Thaís e Ysabela, por todo tempo que passamos juntos resultando em muitos aprendizados, risadas e lições que irei levar para o resto da vida e, pelo apoio e incentivo que eles sempre me deram.

Aos meus amigos Gabriel, Murilo e Isabela, que mesmo distantes, se fizeram presentes e me ajudaram ao longo desses anos.

Ao Instituto de Química, por todo espaço e incentivo que oferece aos seus alunos.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

O estudo e a descoberta de novas técnicas analíticas acopladas a espectrometria de massas (EM) é um tema de relevância e abrangência, uma vez que a busca por melhor seletividade, detecção e menor tempo de análise são geralmente vantajosos para a maioria das técnicas. Concomitantemente a esse aspecto, os avanços em instrumentação analítica, especialmente nas duas últimas décadas, têm contribuído para o aprimoramento de estratégias direcionadas a investigação de substâncias oriundas de fontes naturais com propriedades farmacológicas. Nessa perspectiva de bioprospecção de substâncias com alto valor agregado, a espécie *Piper arboreum* se configura em uma alternativa viável, especialmente, devido a presença de amidas bioativas. Assim, as amidas produzidas por *P. arboreum*, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CL-EM/EM) e os resultados comparados, em termos de eficiência, detecção, rapidez de análise e simplicidade, com uma técnica mais atual conhecida como *leaf-spray*, também acoplado a EM (LS-EM/EM).

Palavras-chave: Espectrometria de massas, *leaf-spay*, *Piper arboreum*, amidas.

ABSTRACT

The study and discovery of new analytical techniques coupled to mass spectrometry (MS) show relevance once the search for better selectivity, detection and run time is generally advantageous for most techniques. Therefore, advances in analytical instrumentation, especially in the last two decades, have contributed to the improvement of strategies aimed the analysis of natural compounds, which show pharmacological properties. From this perspective, *Piper arboreum* is a viable alternative, especially, due to the accumulation of bioactive amides. Thus, the amides produced by *P. arboreum* were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS / MS) and the results were compared in terms of efficiency, detection, speed of analysis and simplicity with a more current technique known as leaf-spray, also coupled with MS (LS-MS / MS).

Keywords: mass spectrometry, *leaf-spay*, *Piper arboreum*, amides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de um espectrômetro de massas.....	11
Figura 2 - Representação da fonte de IES	13
Figura 3 - ilustração de um experimento de leaf-spray.....	15
Figura 4 - Folhas e frutos de <i>P. arboreum</i>	16
Figura 5 - Estruturas químicas de amidas isoladas de espécies do gênero <i>Piper</i>	17
Figura 6 - Amostragem de corte triangular para análise por LS-MS.....	21
Figura 7 - Cromatograma de pico base do extrato etanólico de <i>P. arboreum</i>	23
Figura 8 - Estruturais de amidas detectadas por CL-EM/EM.....	24
Figura 9 - Espectro IES-EM/EM do íon de m/z 288,12, modo positivo (pentilamida do ácido piperico)	24
Figura 10 - Mecanismo de fragmentação do íon de m/z 288,12, modo positivo.....	25
Figura 11 - Espectro IES-EM/EM do íon de m/z 274,14, modo positivo (4,5-diidropiperilina)	25
Figura 12 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 274, modo positivo.....	26
Figura 13 - IES-EM/EM do íon de m/z 272,12, modo positivo (piperilina)	27
Figura 14 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 272, modo positivo.....	27
Figura 15 – IES-EM/EM do íon de m/z 288,16, modo positivo (piperanina)	28
Figura 16 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 288, modo positivo.....	28
Figura 17 - IES-EM/EM do íon de m/z 286,12, modo positivo (piperina)	29
Figura 18 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 286, modo positivo.....	29
Figura 19 - IES-EM/EM do íon de m/z 300,15, modo positivo (sarmetosina)	30
Figura 20 - Mecanismo de fragmentação do íon de m/z 300, modo positivo	30
Figura 21 - IES-EM/EM do íon de m/z 276,22, modo positivo (tetraidropiperilina) ...	31
Figura 22 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 276, modo positivo.....	32
Figura 23 - Espectro full scan de três folhas de <i>P. arboreum</i>	33
Figura 24 - LS-EM/EM e CL-EM/EM do íon de m/z 274,12, modo positivo (4,5-diidropiperilina)	34
Figura 25 - LS-EM/EM e CL-EM/EM do íon de m/z 288,16, modo positivo (piperanina).	34
Figura 26 - LS-EM/EM e CL-EM/EM do íon de m/z 286,11, modo positivo (piperina)	35

Figura 27 - LS-MS/MS e LC-MS/MS do íon de m/z 276,16, modo positivo (tetraidropiperilina).....	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectrometria de Massas
H ₂ O	Água
IES	Ionização por <i>eletrospray</i>
LS	<i>Leaf spray</i>
LS-EM/EM	<i>Leaf spray</i> acoplado a espectrometria de massas
m/z	Razão massa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Milílitro
ms	Milissegundos
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

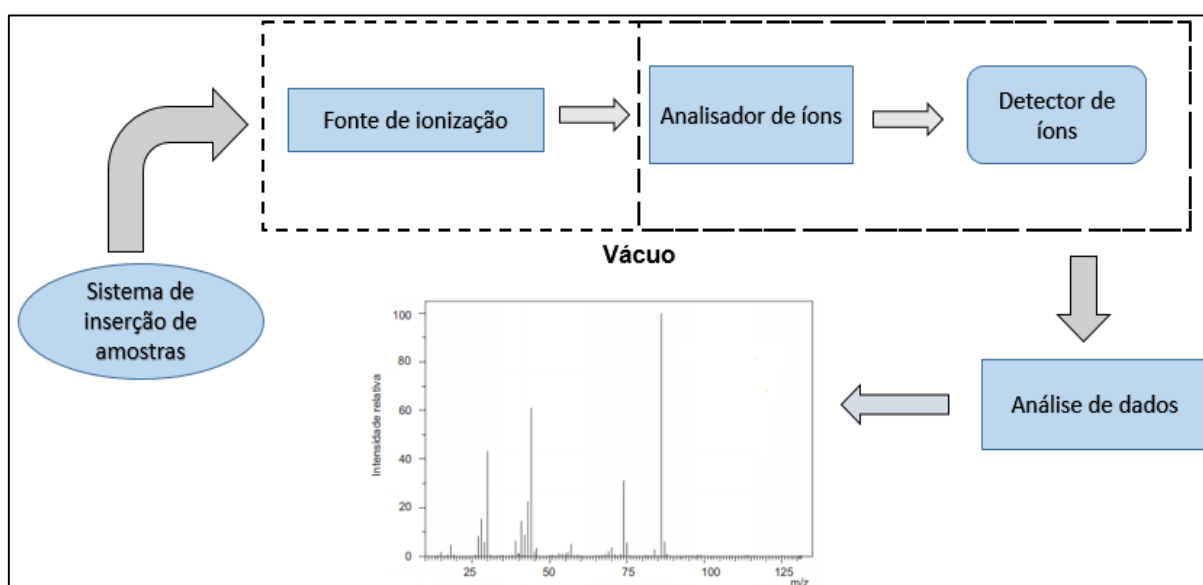
1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Espectrometria de massas (EM).....	11
1.2	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial – CLAE-EM/EM.....	13
1.3	<i>Leaf spray</i> (LS).....	15
1.4	Espécie <i>Piper arboreum</i>	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivos específicos:	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1	Coleta do material botânico	19
3.2	Obtenção do extrato e preparo de amostras para CL-EM/EM	20
3.3	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial	20
3.4	<i>Leaf spray</i> – EM (LS-EM)	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1	CLAE-EM/EM.....	23
4.2	LS-EM/EM	32
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	APÊNDICE	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espectrometria de massas (EM)

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que mede a razão massa/carga (m/z) de íons gerados a partir de moléculas neutras. Para realizar tal medida, o espectrômetro de massas, cujo esquema encontra-se representado na figura 1, é constituído de um sistema de inserção de amostras; uma fonte de ionização, responsável pelo processo de transformação de moléculas neutras em íons; um analisador de íons, que separa as espécies carregadas em termos de suas razões m/z ; e um detector, cuja função é gerar um sinal elétrico que será convertido por um sistema de aquisição de dados em um espectro de massas. Este espectro é apresentado na forma de um gráfico contendo no eixo y a intensidade absoluta ou relativa dos sinais e no eixo x a razão m/z dentro da faixa de aquisição. A técnica tem ganhado enorme relevância pois é capaz de fornecer a m/z dos íons gerados a partir de moléculas compreendidas em uma grande faixa de polaridade e massa molecular, inclusive para os íons relacionados a molécula intacta como proteínas e ácidos nucleicos (CORREA CEBALLOS; NIESSEN, 2017)

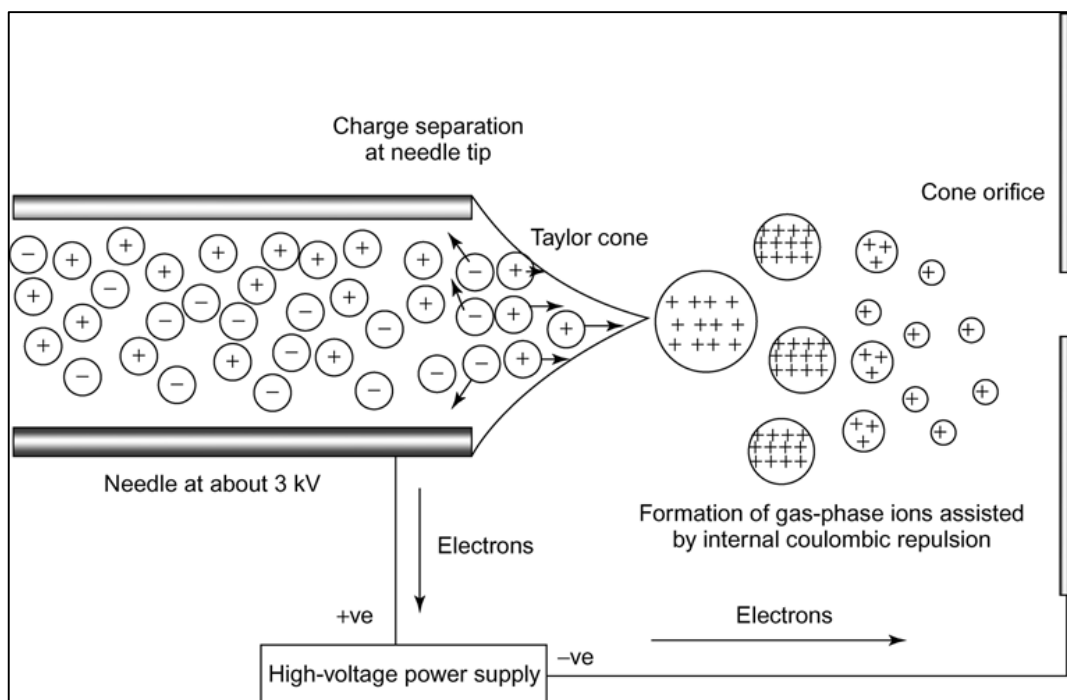
Figura 1 - Representação esquemática de um espectrômetro de massas



Fonte: Autoral

A EM surgiu em 1913 quando Joseph John Thompson demonstrou que o neon consistia de diferentes espécies atômicas (isótopos) de massas molares de 20 e 22 Da (KITSON; LARSEN; MCEWEN, 1996). Posteriormente, em 1929, Bleakney modificou a fonte de ionização por elétrons criada por Dempster, possibilitando a análise de moléculas orgânicas em fase gasosa (MAHER; JJUNJU; TAYLOR, 2015). A partir de 1974, ocorre um grande progresso das técnicas de ionização com o surgimento da técnica de ionização química a pressão atmosférica (APCI) (NIESSEN, 2006), na qual o processo é alcançado pelo aquecimento da solução dentro de uma sonda de APCI e então uma descarga corona gera os elétrons responsáveis pela ionização do analito, por de uma série de reações íon/molécula em fase gasosa a pressão atmosférica (NACHTIGALL, 2009), o que permite que as moléculas de maior massa molecular sejam ionizadas, aumentando portanto a aplicabilidade da técnica. Em 1984, ocorre um novo avanço nas técnicas de ionização com o trabalho de John Fenn para o desenvolvimento de uma nova técnica de ionização por *eletrospray* (IES) (YAMASHITA; FENN, 1984).

Na ionização por IES, uma solução da amostra passa por um tubo capilar no qual é aplicado um elevado potencial elétrico, em torno de 4000 V. A ação do potencial aplicado faz com que a solução seja nebulizada, gerando gotículas superficialmente carregadas que seguem uma trajetória em direção à entrada do espectrômetro de massas. Um fluxo de gás aquecido, denominado gás de dessolvatação, em direção oposta à trajetória das gotículas faz com que elas sofram um processo de evaporação que ocasiona um aumento da densidade superficial de cargas até o ponto em que a repulsão entre estas cargas seja maior que a força de coesão do líquido que constitui a gota. Neste ponto ocorre o processo de eclosão da gota, denominado explosão coulômbica, que gera gotículas menores. Este processo se repete até que os íons da amostra, isentos de solvente, estejam em fase gasosa (PAVIA, 2010).

Figura 2 - Representação da fonte de IES

Fonte: Zancanaro (2012)

Os sistemas de inserção de amostra podem ser constituídos desde seringas que promovem a infusão direta da amostra na fonte de ionização até cromatógrafos líquidos ou gasosos que promovem a separação de misturas complexas em substâncias puras ou frações mais simplificadas antes de promover sua introdução no espectrômetro de massas. O acoplamento da técnica de espectrometria de massas à cromatografia gasosa ou líquida, respectivamente CG-EM e CL-EM, é uma ferramenta analítica amplamente utilizada em diversas áreas da química, biologia, farmácia dentre outros campos (PAVIA, 2010).

1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial – CLAE-EM/EM

Cromatografia é uma técnica físico-química que utiliza a interação de substâncias com duas fases (estacionária e móvel) para realizar separação, identificação e quantificação de espécies químicas de uma determinada mistura. Esta técnica foi reportada pela primeira vez em 1906, pelo botânico russo Mikhail

Semyonovich Tswett, que utilizou o método em seus experimentos para a separação dos componentes de extratos de folhas, utilizando colunas de vidro recheadas com diversos sólidos finamente divididos, arrastando os diferentes componentes com éter de petróleo (COLLINS, 2006).

Quando uma mistura é submetida a análise cromatográfica, seus componentes são difundidos em duas fases imiscíveis, sendo que a fase móvel irá fluir através fase estacionária, promovendo a condução dos compostos que constituem a mistura. Esses componentes interagem diretamente com ambas as fases através de ligações de hidrogênio, força de Van der Waals ou interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Estas interações fazem com que cada substância que compõe a amostra desenvolva uma velocidade de eluição específica, ocasionando a separação da mistura em seus componentes puros (ZANCANARO, 2012).

A classificação mais importante dessa técnica é baseada no mecanismo de separação, podendo se dar por processos químicos (troca iônica), físicos (adsorção ou absorção) ou mecânicos (por exclusão) (COLLINS, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais importantes técnicas, pois é capaz de realizar a separação de misturas complexas que possuem um grande número de compostos estruturalmente similares. Os instrumentos utilizados neste procedimento podem ser totalmente automatizados, e é um tipo de cromatografia que emprega colunas recheadas com materiais previamente preparados e uma fase móvel eluída sob altas pressões. A CLAE tem a capacidade de separar e analisar quantitativamente um grande número de compostos presentes em diferentes tipos de amostras, com alta resolução, eficiência e detectabilidade e em escala de tempo de poucos minutos (COLLINS, 2006).

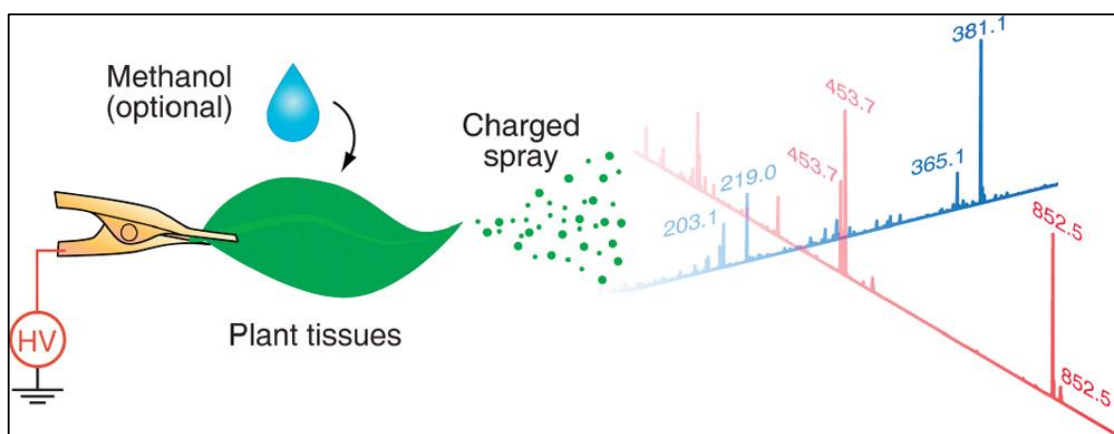
Os equipamentos normalmente acoplados a um cromatógrafo líquido podem ser, dentre os mais utilizados, detectores espectrofotométricos nas regiões ultravioleta e visível, o de fluorescência, detectores por índice de refração, por espalhamento de luz, eletroquímicos e o espectrômetro de massas. Este último acoplamento por sua vez, oferece diversas vantagens por ser de alta seletividade, permitindo a quantificação de picos sobrepostos, avaliação da pureza dos picos, confirmação da presença do analito, devido a informação de massa molar e estrutural, e também boa capacidade detecção (COLLINS, 2006).

1.3 Leaf spray (LS)

Os métodos diretos para determinação de biomarcadores em tecidos vegetais se tornaram um desafio, principalmente por que a espectrometria de massas convencional não permite analisar diretamente amostras brutas, como folhas e frutos (LI et al., 2019). Dessa forma, é de extrema importância estabelecer uma técnica para análise breve e direta de produtos naturais (ZHANG et al., 2013).

A técnica de *leaf-spray* consiste em uma análise direta de plantas vivas, na qual um corte triangular da folha de uma determinada planta é acoplado à fonte de alta tensão do espectrômetro de massas e disposta nas proximidades da entrada do equipamento. Para realizar a análise, aciona-se a alta voltagem sobre a amostra e adiciona-se solvente sobre sua superfície. A partir disto, o solvente realiza a extração dos metabólitos e um spray é gerado contendo gotículas superficialmente carregadas nas quais substâncias endógenas encontram-se solubilizadas. A ionização destas substâncias ocorre segundo os mesmos princípios que governam a ionização por *eletrospray* (LIU et al., 2011).

Figura 3 - Ilustração de um experimento de *leaf-spray*



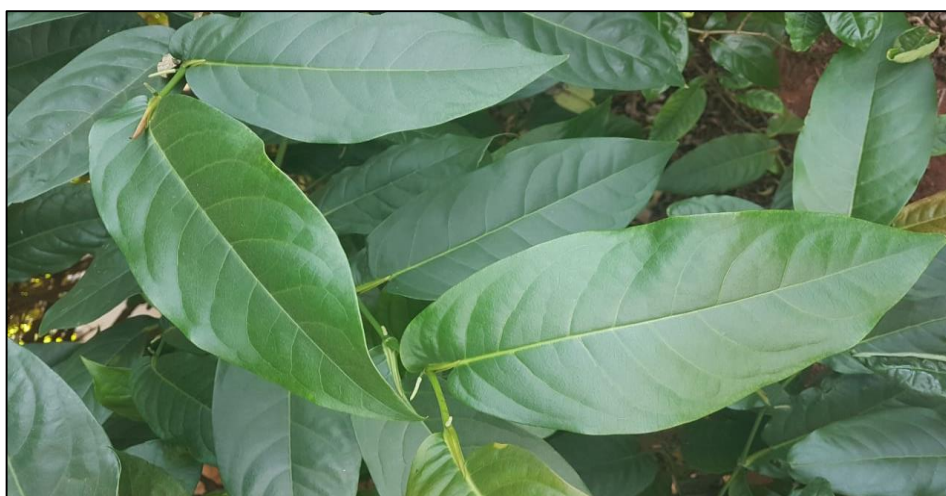
Fonte: Liu et al. (2011)

Dentre as espécies estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, a *Piper arboreum* ainda é pouco explorada por espectrometria de massas, despertando, assim, o interesse em estudá-la sob diferentes formas de aplicação da técnica.

1.4 Espécie *Piper arboreum*

A espécie *Piper arboreum*, também conhecida como pimenta longa, condorcillo (DUKE; VÁSQUEZ, 1994), alecrim-de-angola ou pau-de-angola (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004), é um arbusto que pode chegar a cerca de 2 a 4 metros de altura, com hastes cilíndricas e nodosas e folhas com base assimétrica (SOUZA et al., 2009; (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Figura 4 - Folhas e frutos de *P. arboreum*



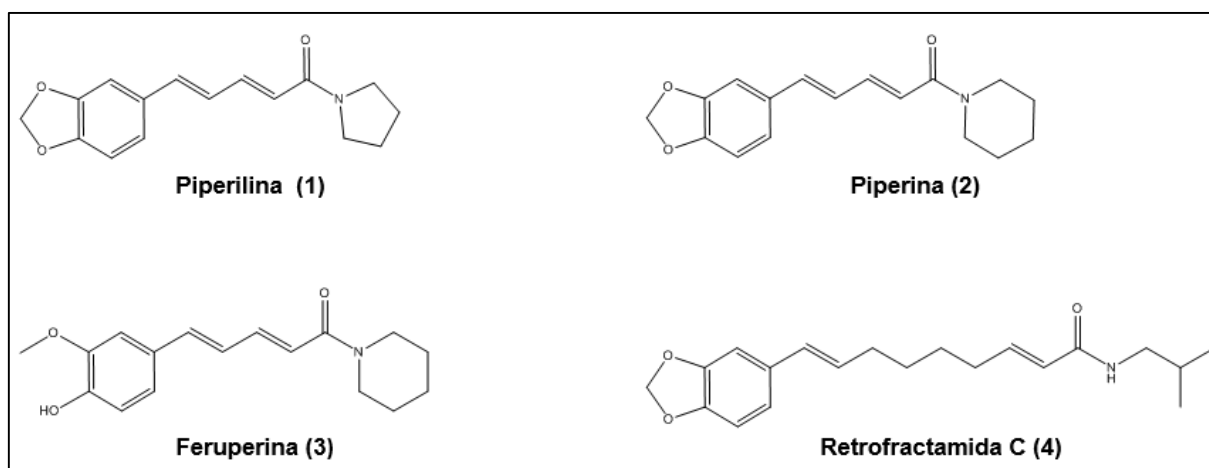
Fonte – Autoral

Na medicina tradicional brasileira, especificamente na Amazônia, essa espécie é utilizada na forma de chá para o tratamento de reumatismo, bronquite, resfriados e gripes fortes. (VAN DEN BERG, 1993).

As amidas constituem um grupo de substâncias que apresenta alta diversidade estrutural e as espécies do gênero *Piper* são caracterizadas por promover um acúmulo das mesmas (KATO; FURLAN, 2007, Figura 5). A *Piper arboreum* tem relatos de estudos químicos que demonstram o isolamento de metabólitos de diversas classes, incluindo, amidas pirrolidínicas e alifáticas. Essas amidas foram submetidas a ensaios biológicos e apresentaram atividades biológicas importantes, como por exemplo, antifúngica contra o fungo fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum* (SILVA et al., 2002), bem como os fungos patógenos humanos, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* (REGASINI et al., 2009a). A amida piperetina, isolada das raízes da

espécie, mostrou atividade biológica contra os fungos *Microsporium gypseum* e *Epidermophyton floccosum*, além da bactéria *Staphylococcus aureus*, realçando sua importante atividade antibacteriana e antifúngica.

Figura 5 - Estruturas químicas de amidas isoladas de espécies do gênero *Piper*



Fonte: Autoral

Sendo a espectrometria de massas uma ferramenta analítica que possui uma alta especificidade, sensibilidade e versatilidade, é uma das muitas técnicas utilizadas para a análise de produtos naturais (LI et al., 2019). Neste trabalho as técnicas de CL-EM e *leaf-spray*-EM (LS-EM) foram aplicadas na análise de folhas de *P. arboreum*.

2 OBJETIVOS

Este trabalho apresenta como objetivo geral a comparação das técnicas de CL-EM/EM e LS-EM/EM na detecção e identificação de amidas produzidas em plantas da espécie *Piper arboreum*.

2.1 Objetivos específicos:

Estão entre os objetivos específicos deste trabalho:

- (A) Elaboração de um banco de dados de amidas produzidas por plantas da família *Piper* para utilização na identificação de substâncias desta classe em folhas de *P. arboreum*;
- (B) Avaliação da eficiência, da capacidade de detecção, da rapidez de análise e da simplicidade da metodologia empregada em cada uma das técnicas utilizadas nas análises folhas de *P. arboreum*, a citar CL-EM/EM e LS-EM/EM.
- (C) Proposição de mecanismos de dissociação para as amidas detectadas nas técnicas utilizadas

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes solventes: etanol absoluto grau P.A (Êxodo) para a extração, acetonitrila e metanol Lichrosolv® Merck, grau de pureza gradiente para cromatografia líquida, além de água ultra-pura (produzida no equipamento Milli-Q, Millipore), que foi utilizada no preparo de fases móveis.

Um banho de ultrassom da marca Elma® (S 60 H) foi utilizado no preparo do extrato e uma minicentrífuga Eppendorf® MiniSpin foi utilizada em sua centrifugação. A concentração da solução do extrato foi realizada em evaporador rotativo Heidolph® (Laborota 4000 efficient). O extrato obtido foi submetido a um processo de “*clean-up*” em cartuchos de extração em fase sólida (EFS) Chromabond® C₁₈ (500 mg, 3 mL, Macherey-Nagel), em modo reverso.

Para a técnica de CL-EM, foi utilizado um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu® Prominence, constituído de um sistema modular binário que contém duas bombas LC-20AD, um desgaseificador de fase móvel DGU-20A_{3R}, um amostrador automático SIL-20AHT, forno modelo CTO-20A para colunas e um detector de arranjo de diodos SPD-M20A. O sistema cromatográfico encontra-se acoplado a um espectrômetro de massas Bruker® Amazon, com configuração ESI-IT-MS. A análise foi realizada utilizando uma coluna Phenomenex Luna® C₁₈ (150 × 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 µm e poro de 100 Å.

Para as análises de LS-EM/EM, foi utilizado o mesmo espectrômetro de massas equipado com um analisador do tipo *ion trap* e com uma fonte de ionização por *eletrospray* modificada, permitindo a aplicação desta técnica.

3.1 Coleta do material botânico

Folhas de *Piper arboreum* foram coletadas nas dependências do Instituto de Química da UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Araraquara. Após a coleta, uma parte do material foi seco na estufa e então macerado e pesado, resultando em aproximadamente 120 g, para a preparação do

extrato analisado posteriormente por CL-EM. A outra parte do material coletado, de folhas ainda frescas, foi utilizado para a realização da análise por *leaf-spray*-EM.

3.2 Obtenção do extrato e preparo de amostras para CL-EM/EM

A extração foi realizada utilizando-se como solvente extrator etanol absoluto grau P.A aproximadamente 360 mL. Para aumentar a eficiência de cada extração, a mistura solvente-material vegetal foi sonicada em banho ultrassônico por 30 minutos, em triplicata. Os extratos foram filtrados e secos com auxílio de rotaevaporador, obtendo-se 8,7644g de extrato. Este, por sua vez, foi submetido ao processo de “*clean-up*” com o objetivo de retirar qualquer material graxo presente na matriz que pudesse causar interferência na análise de CL-EM. Para este procedimento, utilizou-se cartuchos de extração em fase sólida contendo octadecilsiliano (C_{18}), a qual foi respectivamente condicionada e equilibrada com 5,0 mL de MeOH e 5,0 mL de MeOH/H₂O (95:05 v/v). Posteriormente, 12,20 mg de amostra foi dissolvida em 1,0 mL de MeOH/H₂O (95:05 v/v). Em seguida, essa amostra foi transferida para o cartucho EFS e sua eluição foi realizada com 4,5 mL da mesma mistura. Após esta etapa, a amostra foi ressuspensa em MeOH e sua concentração ajustada a 1 mg/mL, sendo que 1,0 mL da solução resultante foi centrifugada em minicentrífuga Eppendorf MiniSpin a 10000 rpm por 3 minutos. Posteriormente, 800 μ L do sobrenadante obtido foi transferido para o frasco de amostragem e analisado por CL-EM/EM

3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial

Na análise do extrato etanólico de *P. arboreum* por CL-EM/EM, a eluição foi realizada em modo gradiente, de 5 a 100% de acetonitrila em água por 40 minutos, mantendo-se a 100% por mais 10 minutos, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico, com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 2,0 μ L. No detector DAD, a detecção foi realizada na faixa de aquisição de $200 \leq \lambda \leq 800$ nm, a temperatura da

cela foi ajustada a 40°C, a frequência de amostragem utilizada foi de 4,1667 Hz e o tempo de aquisição foi de 50 minutos.

O monitoramento do analito foi efetuado na faixa de m/z 50 a 1500. Além disso, a aquisição foi realizada nos modos positivo e negativo. As condições utilizadas no espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar (fonte de IES) igual a 4500 V, pressão do gás nebulizador de 50,0 psi, vazão do gás de dessolvatação de 10,0 L/min, temperatura do capilar de transferência em 300 °C e uma tensão de 500 V aplicada na entrada do espectrômetro (*end plate offset*).

Os espectros de MS² foram adquiridos no modo auto EM/EM, fazendo-se uma varredura de valores de amplitude de fragmentação de 80% a 120%, com tempo de fragmentação de 20 ms e janela de isolamento de 3,0 m/z . O valor de intensidade absoluta mínima para isolamento e fragmentação dos íons foi ajustado a 50000.

3.4 Leaf spray – EM (LS-EM)

Para a execução desta técnica, foram cortados pedaços triangulares de folha medindo-se aproximadamente 1,0 cm de base por 1,5 cm de altura (Figura 6).

Figura 6 - Amostragem de corte triangular para análise por LS-EM



Fonte: Autoral

Estas amostras foram posicionadas a 8,0 mm de distância do cone de entrada do espectrômetro de massas. Posteriormente, foi adicionado sobre a superfície da amostra, 10,0 µL de MeOH, e o espectro foi prontamente adquirido. Os parâmetros

da fonte de ionização foram ajustados de modo que -4500 V foram aplicados na entrada do capilar de transferência para a aquisição do espectro no modo positivo.

A faixa de aquisição utilizada foi de m/z 50-1500. Utilizou-se uma vazão de gás de dessolvatação de 3,0 L/min a uma temperatura de 250 °C para impedir uma alta contaminação na entrada do espectrômetro. O tempo de acúmulo de íons no analisador foi ajustado para o máximo de 50 ms. Os espectros foram gerados de uma média de 5 espectros consecutivos.

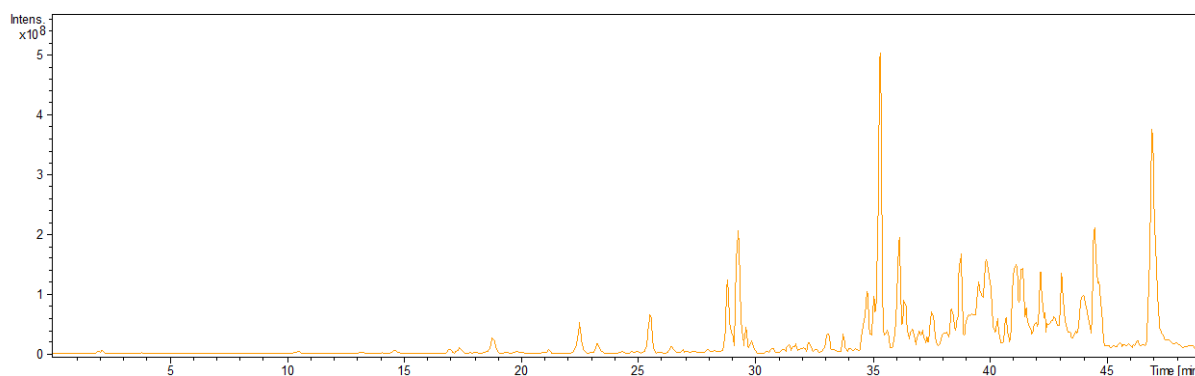
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizada pesquisa bibliográfica de espécies do gênero *Piper*, incluindo a *Piper arboreum*, que acumulam amidas. Com isso, foi elaborado um banco de dados, que consta no apêndice 1. Foi realizado também a comparação das amidas presentes no extrato etanólico das folhas de *P. arboreum*, utilizando duas técnicas de inserção de amostra em espectrometria de massas: CLAE-EM/EM e *leaf-spray*-EM.

4.1 CLAE-EM/EM

A análise do extrato etanólico obtido de folhas de *P. arboreum* foi realizada pela técnica de CL-EM o que possibilitou a obtenção do perfil cromatográfico apresentado na figura 7.

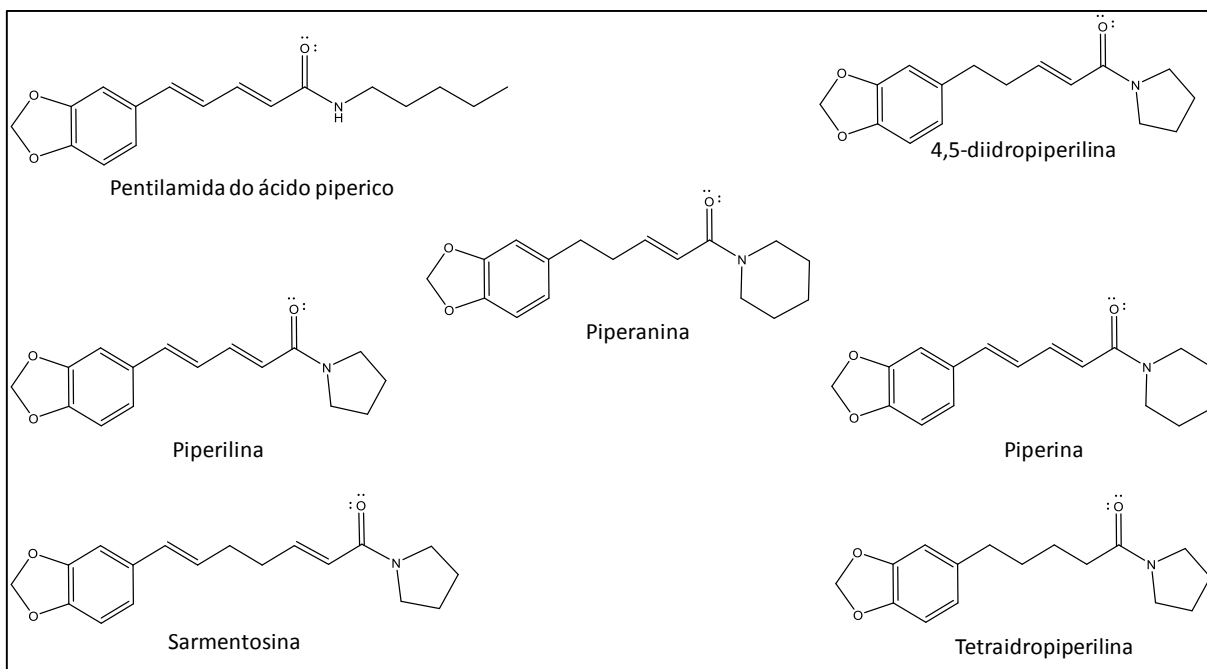
Figura 7 - Cromatograma de pico base do extrato etanólico de *P. arboreum*



De acordo com dados da literatura, 6 amidas foram relatadas na espécie de *P. arboreum*: piperetina (NASCIMENTO et al., 2015), arboreumina (SILVA et al., 2002), piperilina (DURANT-ARCHIBOLD; SANTANA; GUPTA, 2018), *N*-[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7(*E*),9(*Z*)-pentadienoil]-pirrolidina (DURANT-ARCHIBOLD; SANTANA; GUPTA, 2018), 4,5-diidropiperilina (REGASINI et al., 2009b) e tetraidropiperilina (DURANT-ARCHIBOLD; SANTANA; GUPTA, 2018). De acordo com os dados obtidos no experimento de CL-EM/EM e auxílio do banco de dados

elaborado previamente, foi possível propor a estrutura das amidas presentes na figura 8.

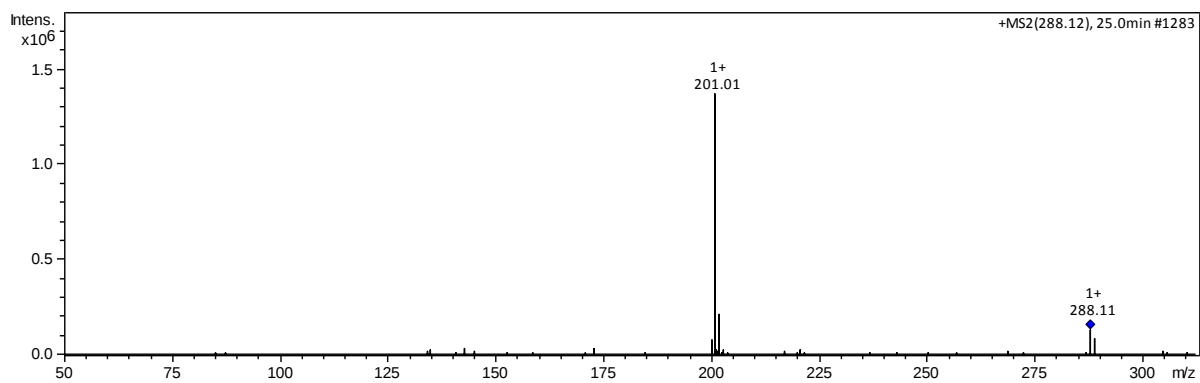
Figura 8 - Estruturas químicas das amidas detectadas por CLAE-EM/EM



Fonte: Autoral

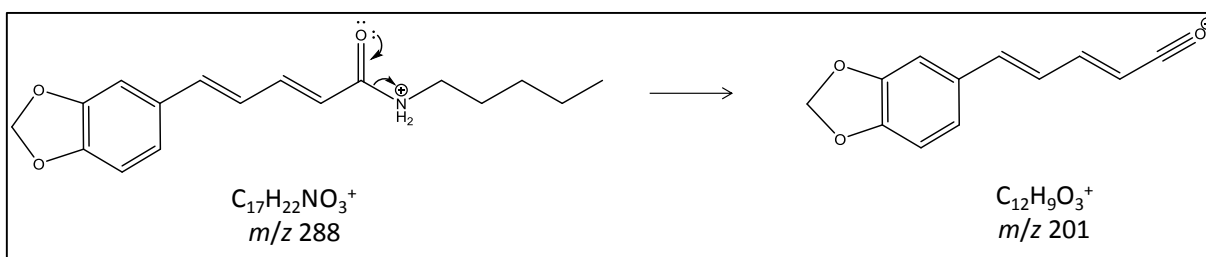
A começar pelo menor tempo de retenção, 25 minutos, o íon de m/z 288,12, de acordo com o espectro abaixo (Figura 9), gerou o fragmento m/z 201,01.

Figura 9 - Espectro IES-EM/EM do íon de m/z 288,12, modo positivo (pentilamida do ácido piperico)



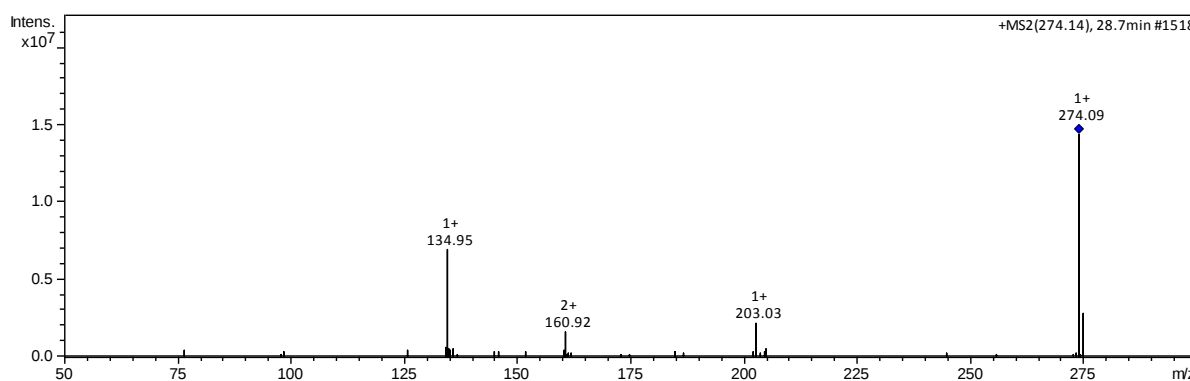
Esse fragmento pode corresponder a um íon acílio formado por clivagem indutiva assistida por um heteroátomo adjacente (DEMARQUE et al., 2016), conforme figura 10, ocorrendo a perda de um fragmento neutro.

Figura 10 - Mecanismo de fragmentação do íon de m/z 288,12, modo positivo

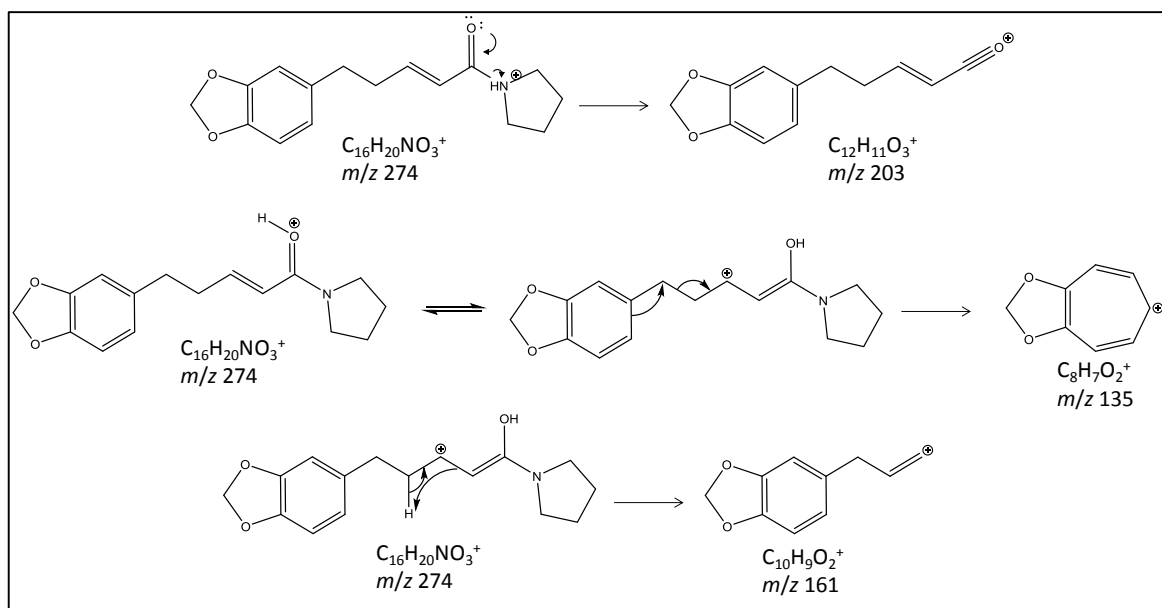


Aos 28,7 minutos, observa-se um sinal de m/z 274,14, o qual pode corresponder a amida 4,5-diidropiperilina, visto que esta substância já foi previamente reportada na *P. arboreum* (DURANT-ARCHIBOLD; SANTANA; GUPTA, 2018), como pode ser observado na base de dados (Apêndice 1).

Figura 11 - Espectro IES-EM/EM do íon de m/z 274,14, modo positivo (4,5-diidropiperilina)



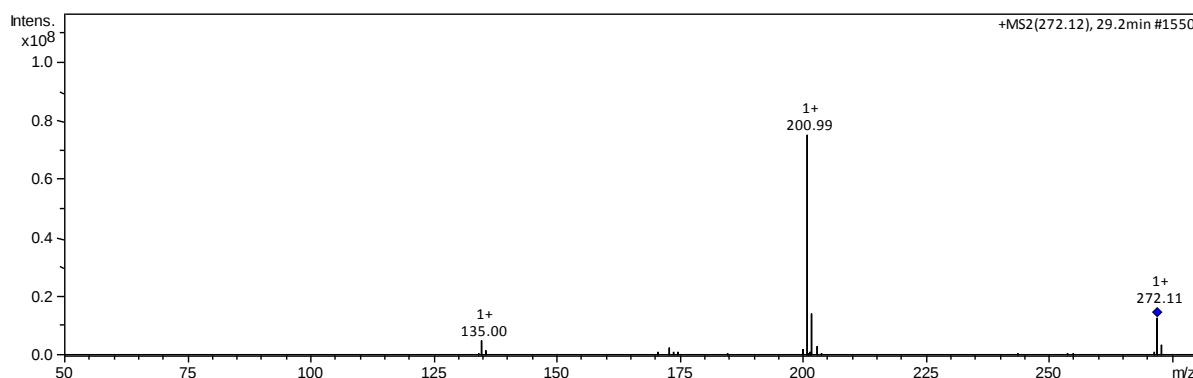
Como pode ser observado na figura 11, os principais fragmentos apresentam m/z 203,03, 160,92 e 134,95. Com base em tais informações, foram propostos os mecanismos de fragmentação descritos na figura 12.

Figura 12 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 274, modo positivo

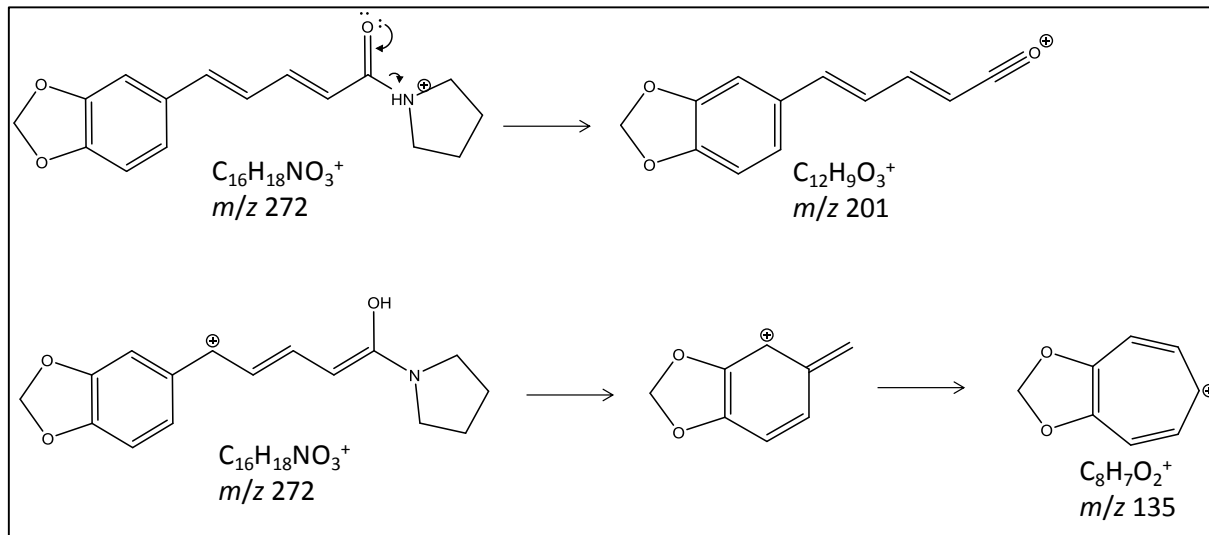
Propõe-se que o fragmento de m/z 203 é relativo ao íon acílio formado, novamente, por clivagem indutiva assistida por um heteroátomo adjacente. Em relação a formação do fragmento m/z 135, correspondente ao íon metilenodioxitropílio e pode-se sugerir a ocorrência de uma reação de deslocamento de carga (DEMARQUE et al., 2016). O fragmento de m/z 161, pode ter sido gerado por um rearranjo de hidrogênio a partir do íon de m/z 274.

A 4,5-diidropiperilina já foi reportada anteriormente, isolada do extrato etanólico das folhas de *P. arboreum*. Essa substância mostrou forte atividade antifúngica contra *Candida Krusei*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans* (DURANT-ARCHIBOLD; SANTANA; GUPTA, 2018). Além disso, essa amida também apresentou atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, o agente patogênico da doença de Chagas (REGASINI et al., 2009b)

Aos 29,2 minutos, o íon de m/z 272,12 gerou fragmentos de m/z 200,99 e 135,00, como pode ser observado no espectro abaixo (Figura 13).

Figura 13 - IES-EM/EM do íon de m/z 272,12, modo positivo (piperilina)

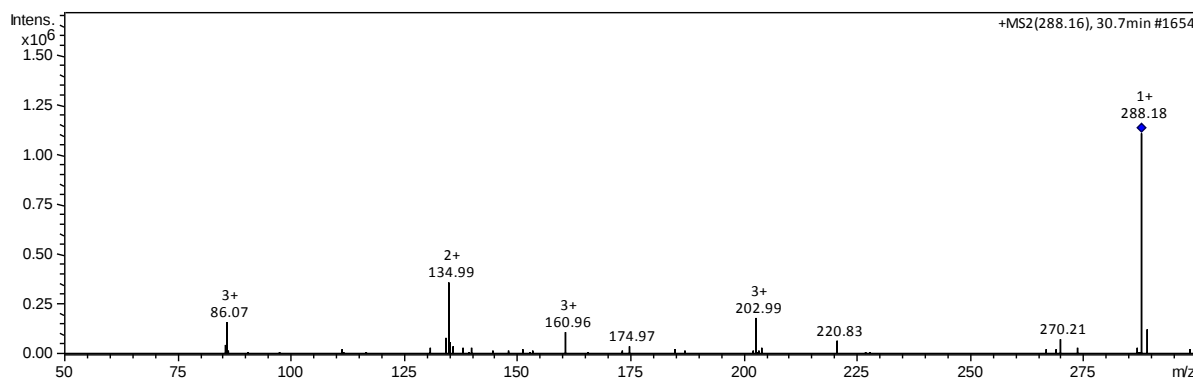
Pode-se propor novamente que os fragmentos em m/z 201 e 135 são: íon acílio, formado por clivagem indutiva assistida por um heteroátomo adjacente, e o íon metilenodioxitropílio, formado pela ocorrência de uma reação de deslocamento de carga, respectivamente (DEMARQUE et al., 2016), como é reportado na figura abaixo (Figura 14).

Figura 14 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 272, modo positivo

O íon protonado de m/z 272 corresponde a amida piperilina, a qual foi isolada do extrato das folhas de *P. arboreum* (REGASINI et al., 2009b). Em tal trabalho, foi relatado que essa substância também apresentou efeito tripanocida, porém sua atividade mostrou-se 30 vezes mais potente que seu análogo hidrogenado (4,5-diidropiperilina).

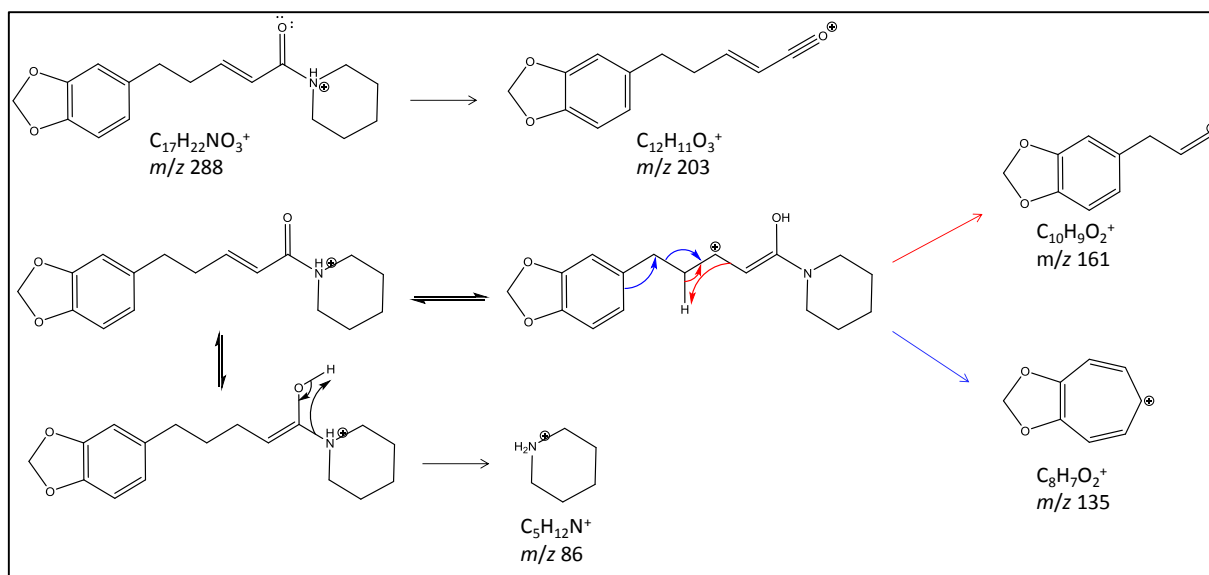
Já no tempo de retenção de 30,7 minutos, a amida correspondente pode ser a piperanina, com uma m/z 288,16. Os principais fragmentos são de m/z : 203, 161, 135 e 86 (Figura 15).

Figura 15 – IES-EM/EM do íon de m/z 288,16, modo positivo (piperanina)



Na figura 16, pode ser observado os mecanismos de fragmentação dos principais íons do espectro de MS^2 . O íon de m/z 203, correspondente a um íon acílio, e os íons de m/z 161 e 135 provavelmente foram gerados pelos mesmos mecanismos citados na fragmentação da 4,5-diidropiperilina. O íon de m/z 86 é resultante de um rearranjo de hidrogênio diretamente a partir do íon de m/z 288.

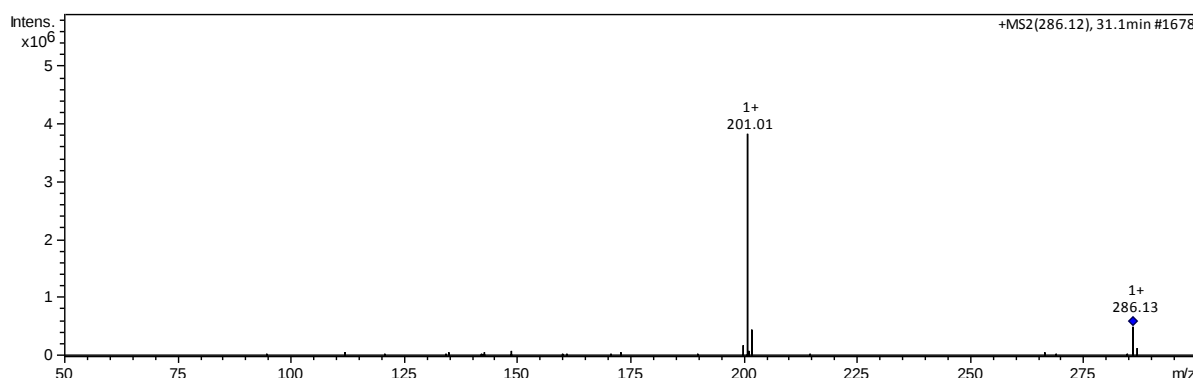
Figura 16 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 288, modo positivo



Essa amida já foi isolada de outra espécie do gênero *Piper*, a *P. tuberculatum*, e exibiu atividade antimicótica contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (DURANT-ARCHIBOLD; SANTANA; GUPTA, 2018).

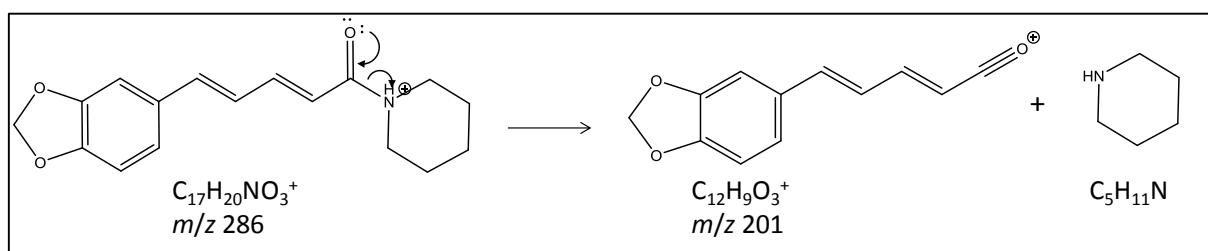
No tempo de retenção de 31,1 minutos, a amida protonada proposta é a piperina, cuja m/z é 286,12 (Figura 17).

Figura 17 - IES-EM/EM do íon de m/z 286,12, modo positivo (piperina)



O fragmento de m/z 201, correspondente a um íon acílio, provavelmente formado por uma clivagem indutiva assistida por um heteroátomo adjacente (DEMARQUE et al., 2016), gerando a perda de um fragmento neutro. O mecanismo de fragmentação proposto está representado na figura 18.

Figura 18 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 286, modo positivo.

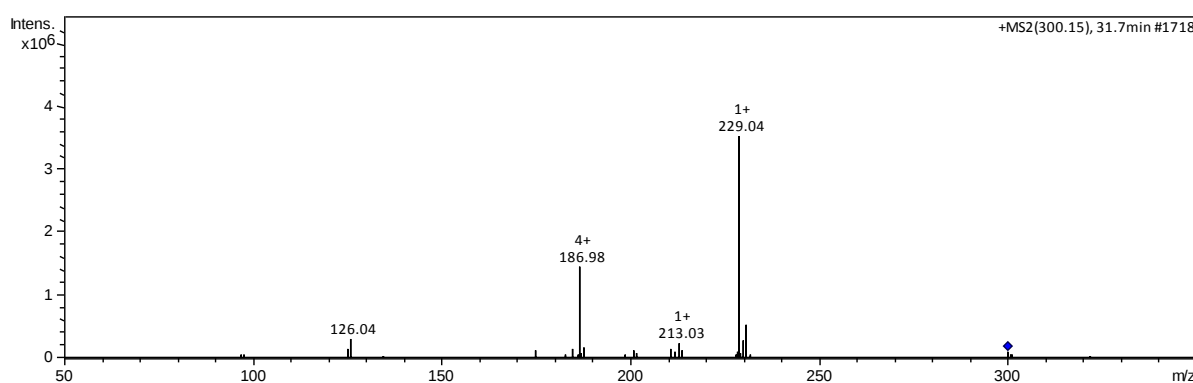


A amida piperina já foi isolada de diferentes espécies do gênero *Piper*, entre elas a *P. tuberculatum*, *P. nigrum* e *P. longum* (SCOTT et al., 2008), porém ainda não há relatos de sua presença na *P. arboreum*. Esta substância é conhecida por ser a responsável pelo efeito pungente da pimenta-do-reino (SRINIVASAN, 2007), e por sua atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (KATO; FURLAN, 2007). Além disso, já é

classificada como uma substância nutracêutica (alimentos, ou parte de um alimento, que ofereça benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de uma doença (DEFELICE, 1995), devido as diversas atividades biológicas atribuídas a esta amida, incluindo ação anticarcinogênica e preventiva de colesterol (COSTA, 2017).

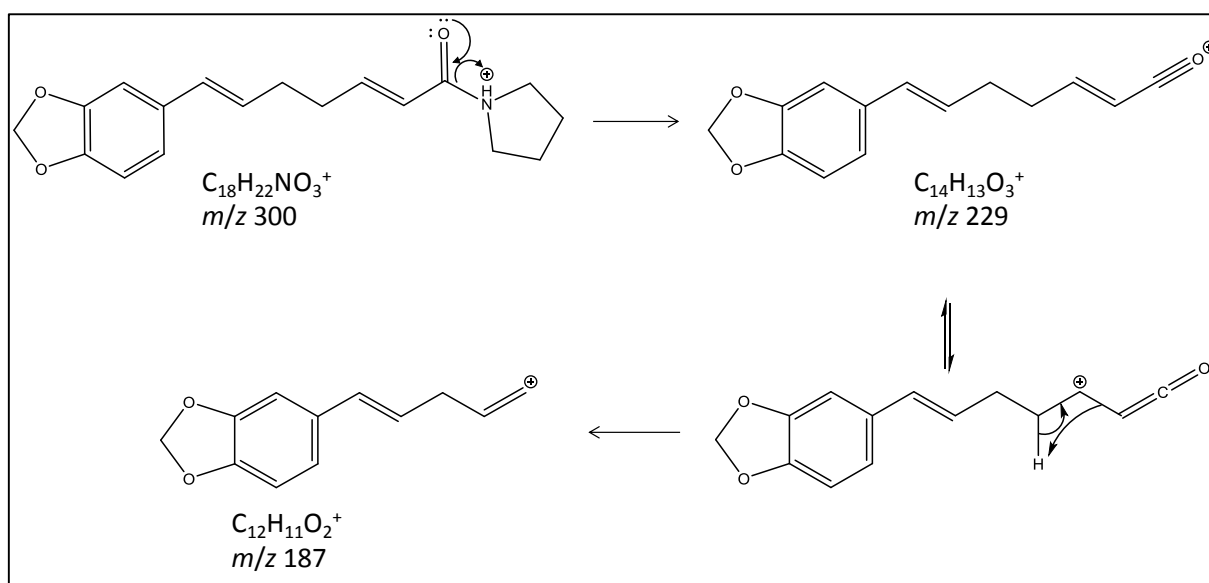
No tempo de retenção de 31,7 minutos, a amida protonada proposta de acordo com sua m/z 300,15 é a sarmentosina, cujo espectro é mostrado na figura 19.

Figura 19 - IES-EM/EM do íon de m/z 300,15, modo positivo (sarmentosina)



Observando-se o espectro gerado e seus fragmentos, pode-se sugerir os mecanismos de fragmentação contidos na figura 20.

Figura 20 - Mecanismo de fragmentação do íon de m/z 300, modo positivo

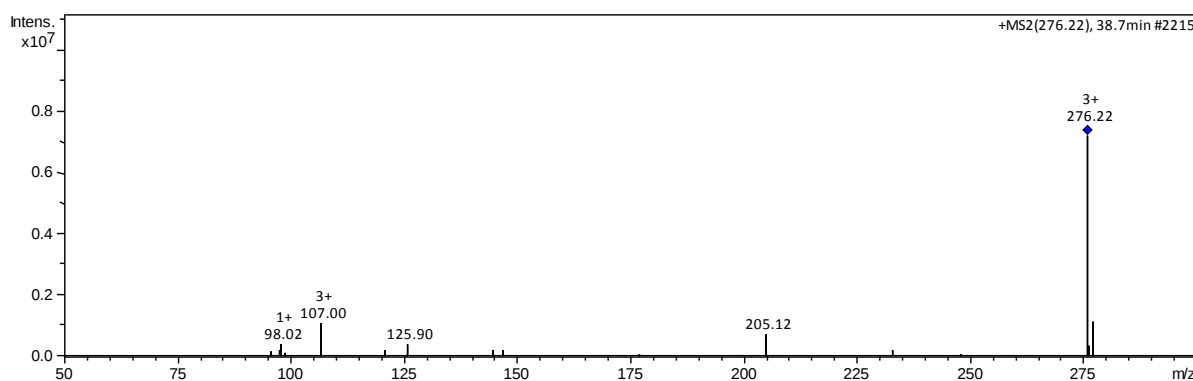


O íon de m/z 229, correspondente a um íon acílio, pode ter sido gerado por um mecanismo de fragmentação semelhante àquele mencionado anteriormente para a amida 4,5-diidropiperilina. O fragmento de m/z 187 foi gerado por um rearranjo de hidrogênio a partir do íon de m/z 229.

A amida sarmentosina foi isolada de diferentes espécies do gênero *Piper*, entre elas; a *P. nigrum* (WEI et al., 2004), e *P. sarmentosum* (TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2006), mas ainda não há relatos de sua presença na *P. arboreum*. Essa substância é conhecida por sua atividade *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*, e pela atividade contra a bactéria *Candida albicans* (TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2006).

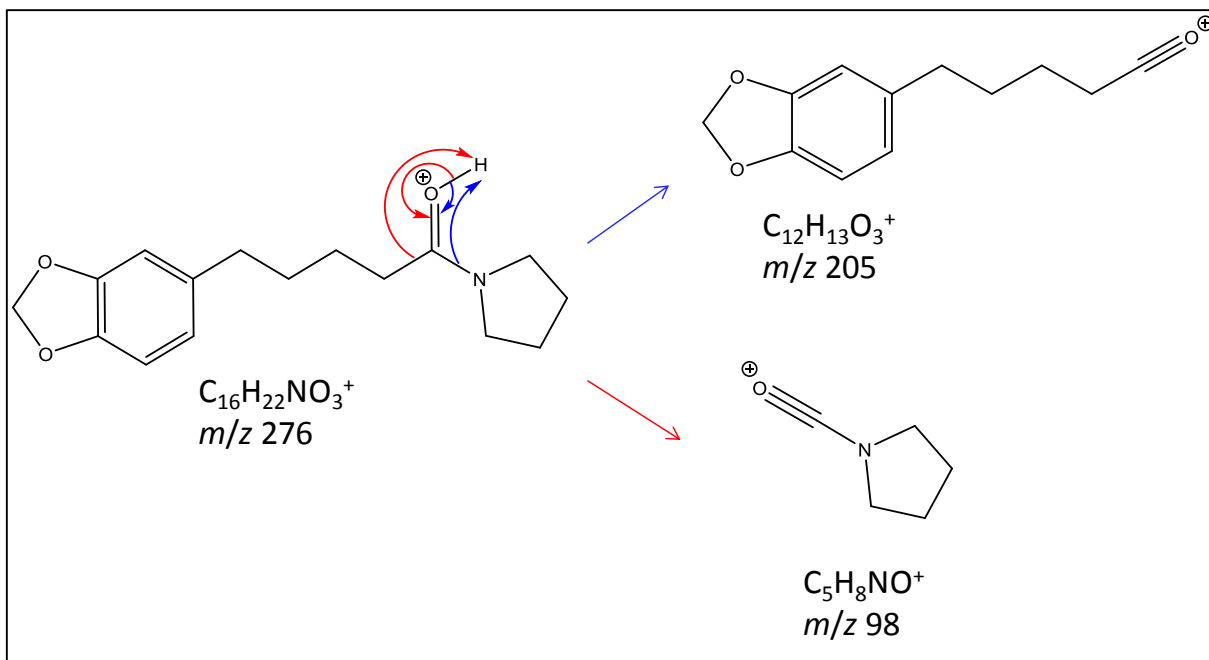
No tempo de retenção 38,7 minutos, para o íon de m/z 276,22 foi sugerida a amida tetraidropiperilina protonada. Seu espectro de massas apresentou como principais fragmentos os íons de m/z 205 e 98 (Figura 21).

Figura 21 - IES-EM/EM do íon de m/z 276,22, modo positivo (tetraidropiperilina)



Em relação aos mecanismos de fragmentação, observa-se novamente a formação de dois íons acílio de m/z 205 e 98.

Figura 22 - Mecanismos de fragmentação do íon de m/z 276, modo positivo

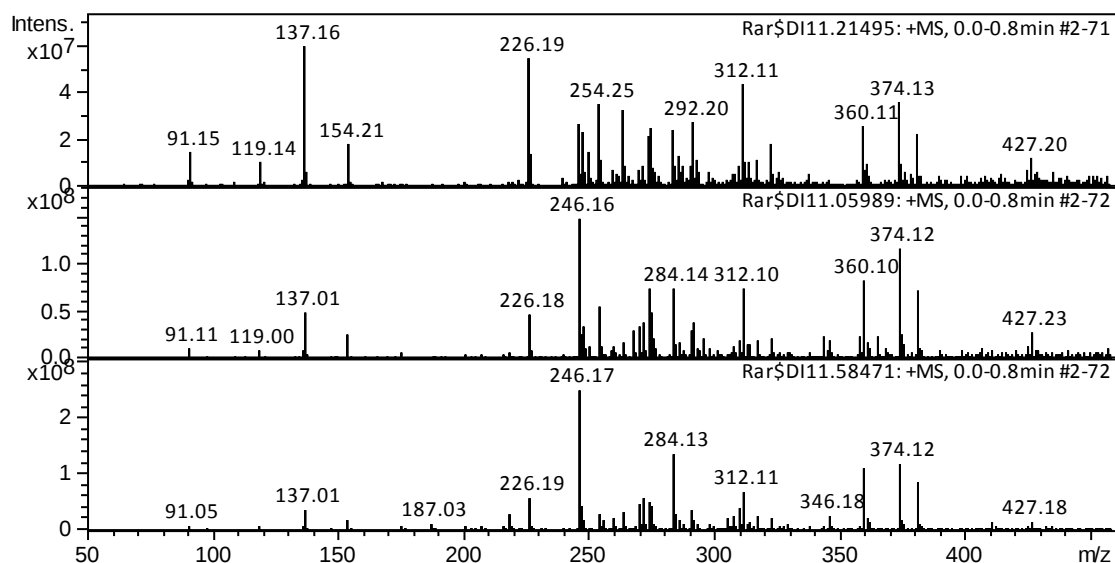


A tetraidropiperilina já foi reportada na espécie *P. arboreum*, mostrando potente atividade antifúngica frente a *Candida krusei*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans* (DURANT-ARCHIBOLD; SANTANA; GUPTA, 2018).

4.2 LS-EM/EM

A análise das folhas *in natura* por *leaf-spray* foi realizada e os dados foram comparados com aqueles obtidos via CL-EM. Após uma análise em triplicata das folhas, obteve-se os espectros *full scan* das mesmas (Figura 23).

Figura 23 - Espectro *full scan* de três folhas de *P. arboreum*.

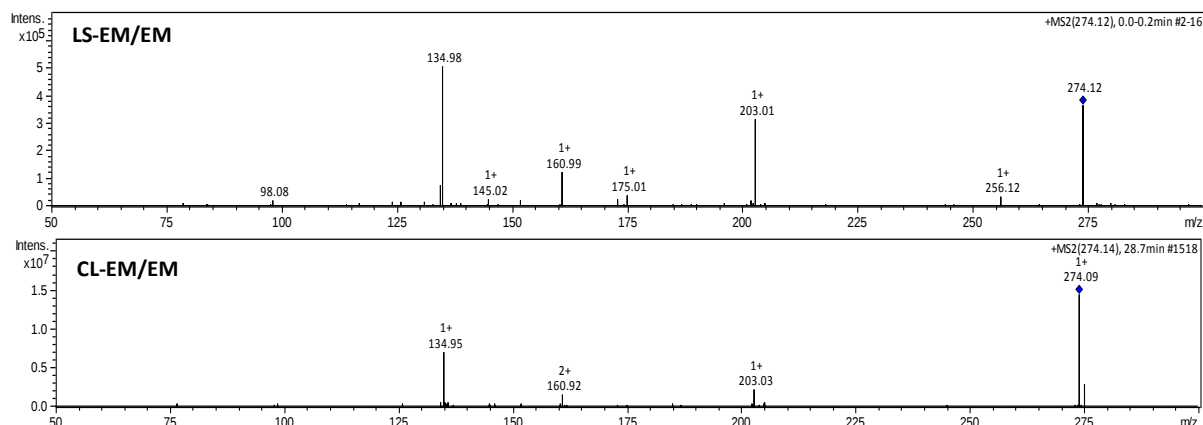


Ao observar os espectros acima, nota-se que não houve uma diferença significativa entre os principais picos de folhas diferentes, apenas uma pequena variação na intensidade.

Na técnica de LS-EM/EM, foram identificadas 4 amidas, 4,5-diidropiperilina, piperanina, piperina e tetraidropiperilina, as quais também foram propostas pela técnica de CL-EM/EM e estão representadas na figura 8.

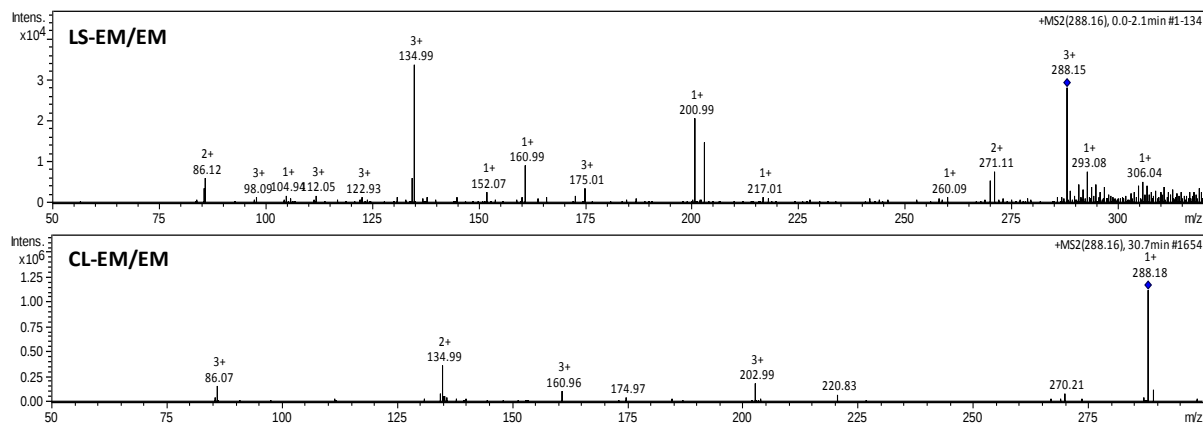
Na figura 24, referente ao íon de m/z 274, pode-se observar que os quatro sinais majoritários apareceram em ambas as técnicas e com sinais intensos. Desta forma, os sinais foram equivalentes, sendo válido sugerir que tenha ocorrido o mesmo mecanismo de fragmentação descrito anteriormente no item 4.1, e que a amida em questão seja a 4,5-diidropiperilina.

Figura 24 - LS-EM/EM e CL-EM/EM do íon de m/z 274,12, modo positivo (4,5-diidropiperilina)



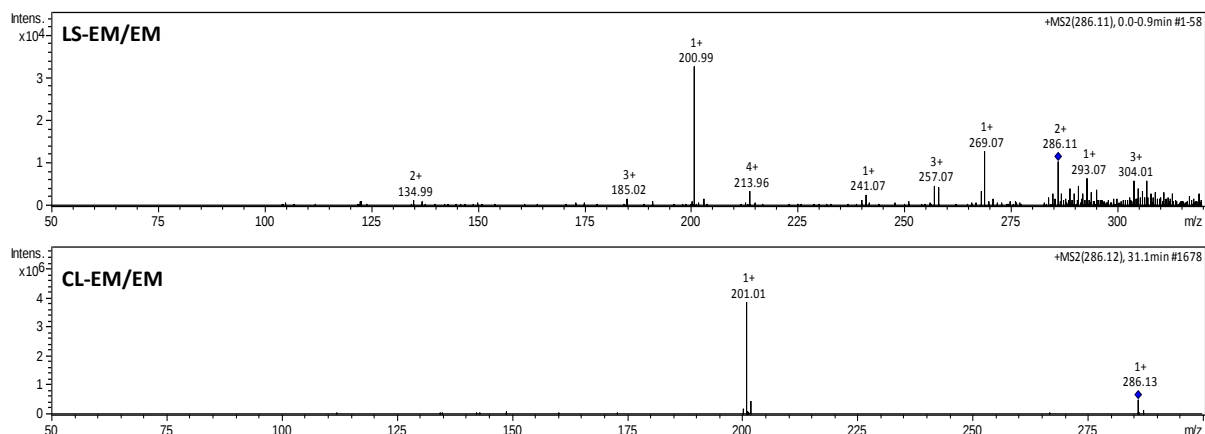
Outro íon detectado por LS-EM/EM foi o de m/z 288, possivelmente referente a amida piperanina. Comparando-se os espectros das técnicas utilizadas (Figura 25), observa-se que o sinal mais intenso (m/z 135) está presente em ambos os espectros de MS², bem como os íons de m/z 161 e 86. Assim, pode-se sugerir os mesmos mecanismos de fragmentação descritos para esta amida no item 4.1.

Figura 25 - LS-EM/EM e CL-EM/EM do íon de m/z 288,16, modo positivo (piperanina).



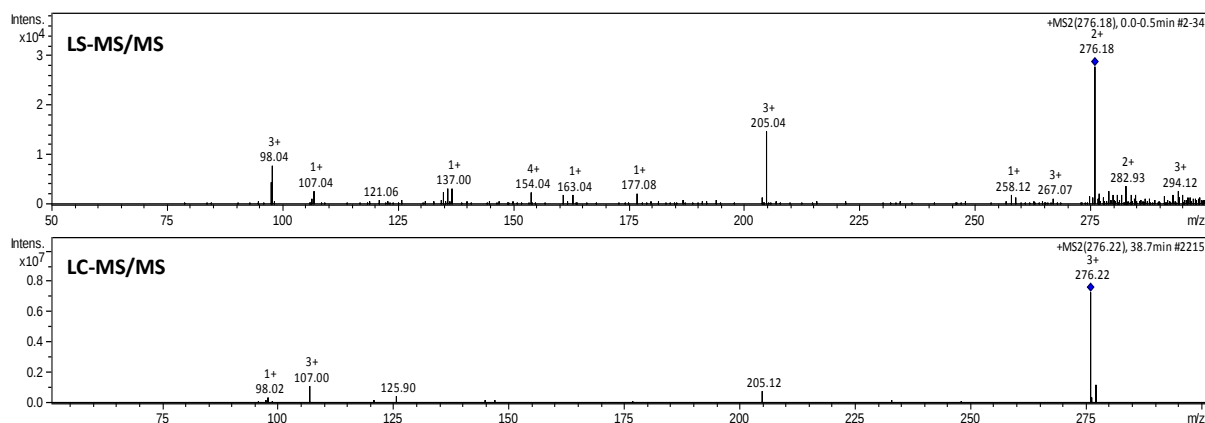
Um dos íons detectados por LS-EM/EM foi o de m/z 286, possivelmente referente a amida piperina. Ao comparar os espectros das técnicas utilizadas (Figura 26), foi observado que o sinal majoritário (m/z 201) está presente em ambos os espectros de MS². Assim, pode-se sugerir os mesmos mecanismos de fragmentação descritos para esta substância no item 4.1.

Figura 26 - LS-EM/EM e CL-EM/EM do íon de m/z 286,11, modo positivo (piperina)



Um dos íons detectados por LS-MS/MS foi o de m/z 276, possivelmente referente a amida tetraidropiperilina. Comparando-se os espectros das técnicas utilizadas (Figura 27), foi observado que os sinais de m/z 98 e 205 está presente em ambos os espectros de MS². Assim, é possível sugerir os mesmos mecanismos de fragmentação descritos para esta amida no item 4.1.

Figura 27 - LS-MS/MS e LC-MS/MS do íon de m/z 276,16, modo positivo (tetraidropiperilina)



5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizada uma comparação entre as técnicas de CLAE-EM/EM e LS-EM/EM baseando-se na detecção e identificação de amidas de *P. arboreum*. Os dados obtidos foram comparados com a literatura. O levantamento bibliográfico culminou na construção de um banco de dados de amidas biossintetizadas e acumuladas em espécies do gênero *Piper*. Com base no exposto, observou-se que a técnica de CLAE-EM/EM apresentou maior eficiência e capacidade de detecção das amidas, porém, a técnica de LS-EM/EM ofereceu uma maior rapidez de análise, por não necessitar de preparo de amostras, sendo, portanto, uma técnica que apresenta uma simplicidade maior quanto a metodologia empregada.

Pelos estudos realizados foi possível propor os mecanismos de dissociação das possíveis amidas detectadas. É válido destacar a importância das técnicas cujo objetivo das análises seja baseado em melhor detecção, eficiência ou menor tempo de execução, escolhendo assim aquela que mais se adequa ao processo que se deseja realizar.

REFERÊNCIAS

- COLLINS, C. H. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. da UNICAMP, 2006.
- CORREA CEBALLOS, R. A; NIESSEN, W. M. A. Introduction to LC–MS technology. *In*: CORREA CEBALLOS, R. A; NIESSEN, W. M. A. **Interpretation of MS-MS mass spectra of drugs and pesticides**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. Chap.1, p. 1-53.
- COSTA, J. P. da. A current look at nutraceuticals--key concepts and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 68–78, 2017.
- DEFELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 2, p. 59–61, 1995.
- DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.
- DUKE, J. A.; VÁSQUEZ, R. **Diccionario Etnobotánico de la Amazonia [Amazonian Ethnobotanical Dictionary]** FloridaCRC Press. Inc, 1994.
- DURANT-ARCHIBOLD, A. A.; SANTANA, A. I.; GUPTA, M. P. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 63–82, 2018.
- GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. DA S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21–46, 2004.
- KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529–538, 2007.
- KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; MCEWEN, C. N. **Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide**. San Diego: Academic Press, 1996.
- LI, W. et al. Detection and seasonal variations of Huanglongbing disease in navel orange trees using direct ionization mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 8, p. 2265–2271, 2019.
- LIU, J. et al. Leaf spray: direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 20, p. 7608–7613, 2011.
- MAHER, S.; JJUNJU, F. P. M.; TAYLOR, S. Colloquium: 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends. **Reviews of Modern Physics**, v. 87, n. 1, p. 113–135, jan. 2015.

NACHTIGALL, F. M. **Uso de técnicas de espectrometria de massas com ionização a pressão atmosférica no estudo de propriedades intrínsecas de líquidos iônicos imidazólicos**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

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

NIESSEN, W. M. A. **Liquid chromatography-mass spectrometry**. 3rd ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, c2006. (Chromatographic science series, 97).

PAVIA, D. L. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

REGASINI, L. O. et al. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 12, 2009a.

REGASINI, L. O. et al. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 199-203, 2009b.

SCOTT, I. M. et al. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 65, 2008. DOI: 10.1007/s11101-006-9058-5

SILVA, R. V. da et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521–527, 2002.

SOUZA, L. A. et al. Estudo morfo-anatômico da folha e do caule de *Piper arboreum* Aubl. (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 103–107, 2009.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, n. 8, p. 735–748, 2007.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P. et al. Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 2, p. 149–151, 2006.

VAN DEN BERG, M. E. Piperaceae. **Plantas Medicinais na Amazônia-contribuição ao seu conhecimento sistemático**, 1993.

WEI, K. et al. New amide alkaloids from the roots of *Piper nigrum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 6, p. 1005–1009, 2004.

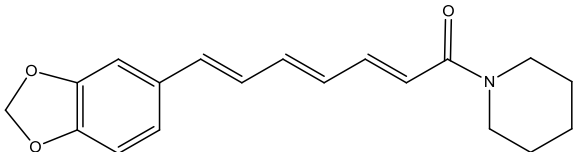
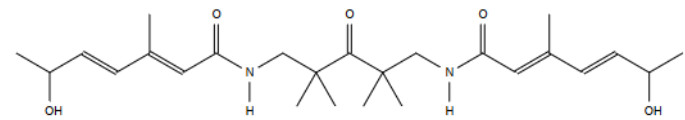
YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Negative ion production with the electrospray ion source. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4671–4675, 1984.

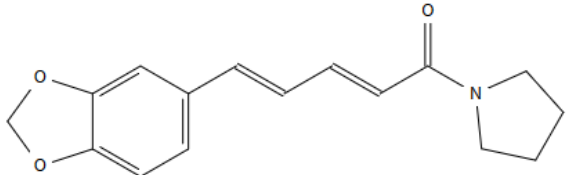
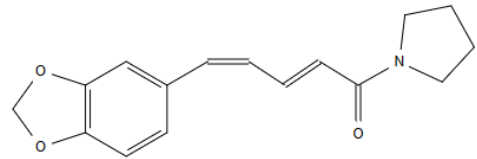
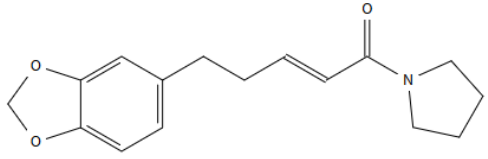
ZANCANARO, I. **Análise de substâncias psicoativas em fluido oral de condutores brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

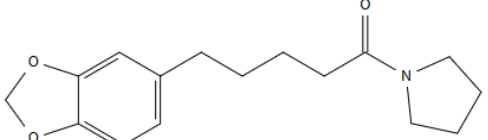
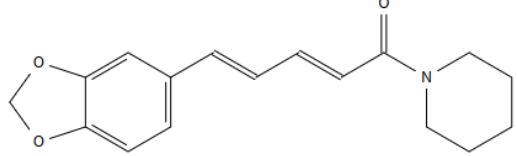
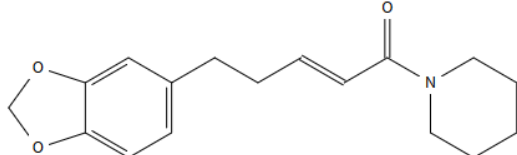
ZHANG, N. et al. Rapid detection of polyhydroxylated alkaloids in mulberry using leaf spray mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 5, n. 10, p. 2455–2460, 2013.

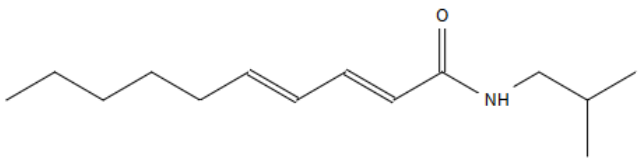
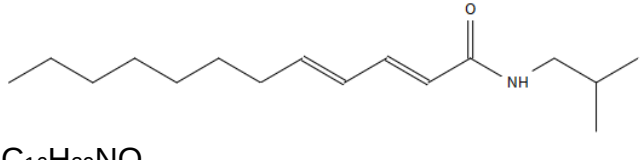
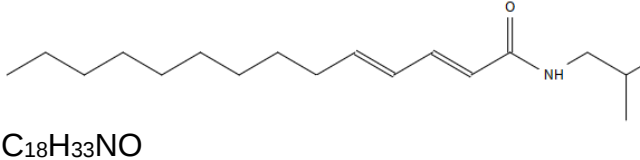
APÊNDICE

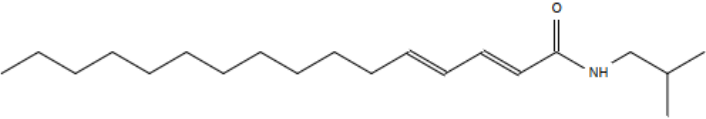
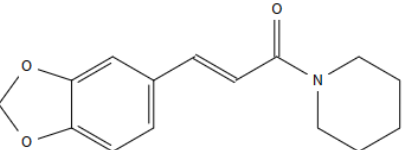
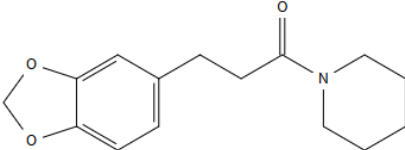
APÊNDICE 1 – Tabela de base de dados relatando estruturas químicas, massa molar e identidade das amidas isoladas de espécies do gênero *Piper*.

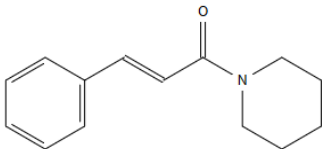
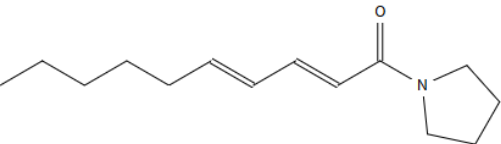
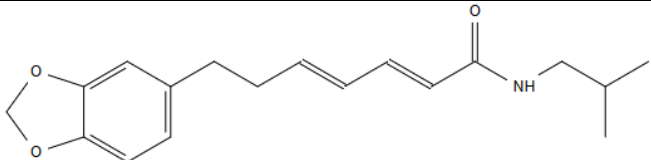
	Substância	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Espécies	Referências
1	 $C_{19}H_{21}NO_3$ piperetina 2,4,6-heptatrien-1-ona, 7-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-piperidinil)-, (2E,4E,6E)	MM: 311,375	<i>P. arboreum</i> <i>P. nigrum</i>	Nascimento et al. 2015 Yun et al. 2018
2	 $C_{25}H_{40}N_2O_5$ arboreumina 2,4-heptadienamida, N,N'-(2,2,4,4-tetrametil-3-oxo-1,5-pentanedil)bis[6-hidroxy-3-metil-, (2E,2'E,4E,4'E)	MM: 448,60	<i>P. arboreum</i>	Silva et al. 2002

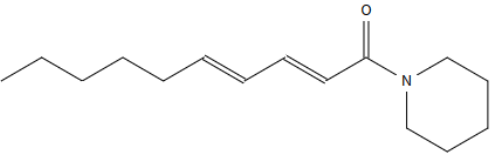
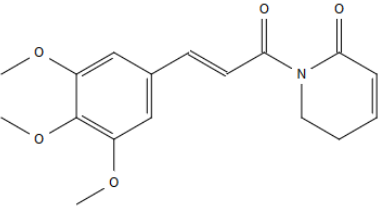
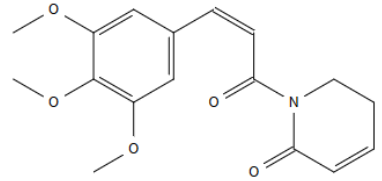
3	 $C_{16}H_{17}NO_3$ piperilina N-[10-(13,14-metilenedioxifenil)-7(E),9(E)-pentadienoil]-pirrolidina)	MM: 271,31	<i>P. arboreum</i> <i>P. tuberculatum</i> <i>P. nigrum</i>	Durant-Archibold et al. 2018 Silva et al. 2002 Yun et al. 2018
4	 $C_{16}H_{17}NO_3$ N-[10-(13,14-metilenedioxifenil)-7(E),9(Z)-pentadienoil]-pirrolidina 2,4-pentadien-1-ona, 5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(1-pirrolidinil)-, (2E,4Z)	MM: 271,31	<i>P. arboreum</i>	Durant-Archibold et al. 2018 Silva et al. 2002 Regasini et al. 2009
5	 $C_{16}H_{19}NO_3$ 4,5-diidropiperilina N-[10- (13,14-metilenedioxifenil)-7(E)-pentaenoil]-pirrolidina	MM: 273,33	<i>P. arboreum</i> <i>P. tuberculatum</i>	Durant-Archibold et al. 2018 Silva et al. 2002 Regasini et al. 2009

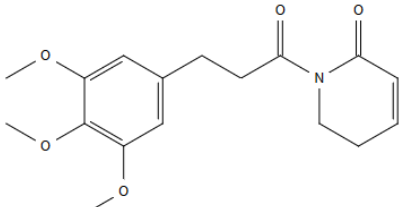
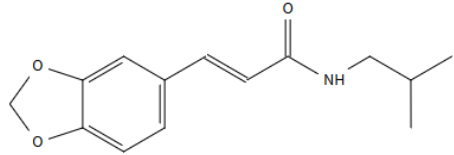
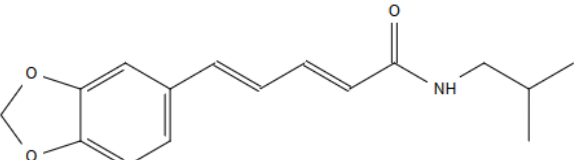
6	 $C_{16}H_{21}NO_3$ tetraidropiperilina N-[10-(13,14-metilenedioxifenil)-pentanoil]-pirrolidina	MM: 275,34	<i>P. arboreum</i>	Durant-Archibold et al. 2018
7	 $C_{17}H_{19}NO_3$ piperina	MM: 285,34	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Scott et al. 2002 Yun et al. 2018 Liu et al. 2015
8	 $C_{17}H_{21}NO_3$ piperanina / 10,11-diidropiperina	MM: 287,35	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. longum</i> <i>P. nigrum</i>	Silva et al. 2002 Scott et al. 2002 Liu et al. 2015

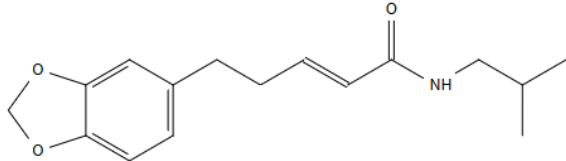
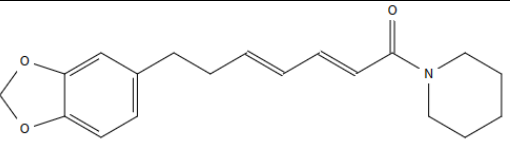
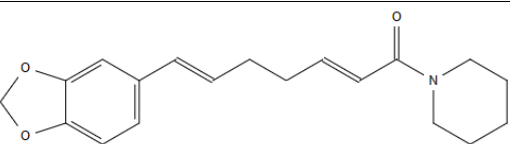
9	 $C_{14}H_{25}NO$ pelitorina	MM: 223,35	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Silva et al. 2002 Deboni et al. 2009 Liu et al. 2015
9a	 $C_{16}H_{29}NO$ kalecida 2,4-dodecadienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E,4E) N-isobutil-2E,4E-dodecadienamida	MM: 251,41	<i>P. guineense</i> <i>Macropiper excelsum</i>, <i>P. chaba</i> <i>P. longum</i>	Stohr et al. 2001 Obst et al. 2017 Sun et al. 2007
9b	 $C_{18}H_{33}NO$ 2,4-tetradecadienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E,4E) N-isobutil-2E,4E-tetradecadienamida	MM: 279,46	<i>P.sarmentosum</i> <i>P. longum</i>	Stohr et al. 2001 Sun et al. 2007

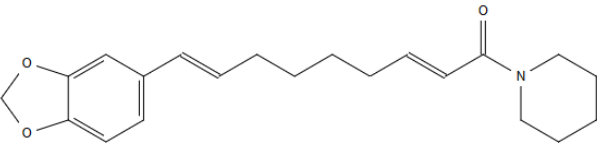
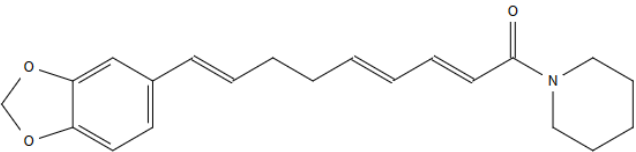
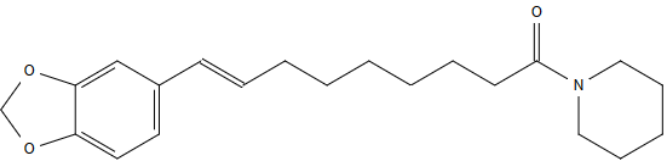
9c	 $C_{20}H_{37}NO$ N-isobutil-2E,4E-hexadecadienamida 2,4-Hexadecadienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E,4E)	MM: 307,51	<i>P. guineense</i> <i>P. longum</i>	Stohr et al. 2001 Sun et al. 2007
10	 $C_{15}H_{17}NO_3$ ilepcimide 2-Propen-1-ona, 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-piperidinil) N-piperidil-3,4-metilenedioicinnamoilamida	MM: 259,30	<i>Macropiper excelsum</i> , <i>P. nigrum</i>	Obst et al. 2017
10a	 $C_{15}H_{19}NO_3$ isômero hydrogenado da ilepcimide	MM: 261	Obtida por hidrogenação catalítica da ilepcimide	Adesina et al. 2003

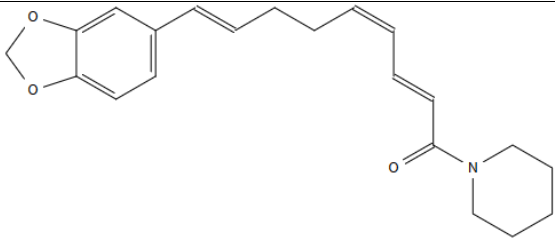
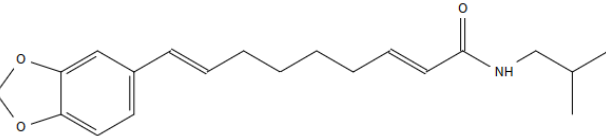
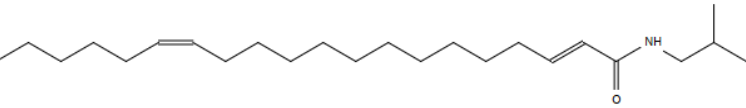
11	 $C_{14}H_{17}NO$ N-(trans-cinnamoyl)piperidina 2-Propen-1-ona, 3-fenil-1-(1-piperidinil)-, (2E) 1-Cinnamoylpiperidina	MM: 215,29	<i>P. chaba</i> <i>P. nigrum</i>	Obst et al. 2017
12	 $C_{14}H_{23}NO$ sarmentina 2,4-Decadien-1-ona, 1-(1-pirrolidinil)-, (2E,4E)	MM: 221,34	<i>P. sarmentosum</i> <i>P. longum</i> <i>P. nigrum</i>	Huang et al. 2010
13	 $C_{18}H_{23}NO_3$ chingchengenamida A 2,4-Heptadienamida, 7-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-, (2E,4E)	MM: 301,38	<i>Macropiper excelsum</i> , <i>P. falconeri</i> <i>P. piscatoru</i> <i>P. falconare</i> <i>Ottonia corcovadensis</i>	Obst et al. 2017 Facundo et al. 2004

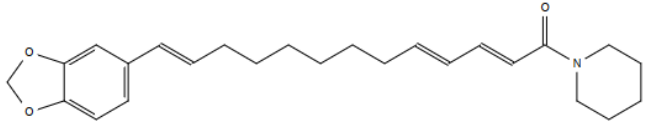
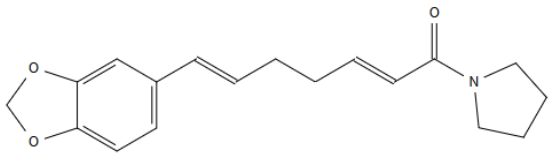
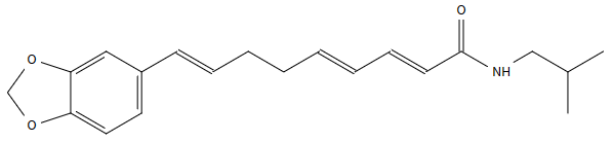
14	 $C_{15}H_{25}NO$ achilleamida neopelitorina B 2,4-Decadien-1-ona, 1-(1-piperidinil)-, (2E,4E)	MM: 235,37	<i>P. nigrum</i>	Obst et al. 2017
15	 $C_{17}H_{19}NO_5$ E-piplartina piperlongumina 2(1H)-Piridinona, 5,6-diidro-1-[(2E)-1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-il]	MM: 317,34	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. longum</i> <i>P. arborescens</i> <i>P. chaba</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. cenocladum</i> <i>P. alatabaccum</i> <i>P. puberulum</i>	Navickiene et al. 2000 Silva et al. 2002 Bezerra et al. 2013
16	 $C_{17}H_{19}NO_5$ Z-piplartina	MM: 317,34	<i>P. tuberculatum</i>	Silva et al. 2002 Navickiene et al. 2000

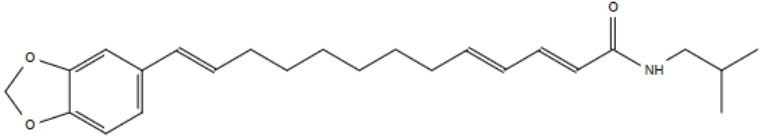
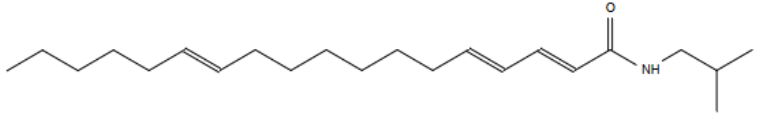
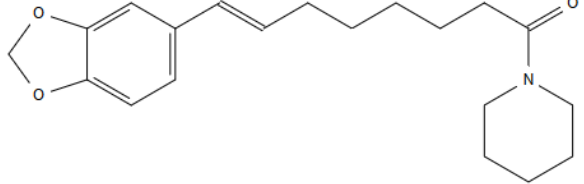
17	 $C_{17}H_{21}NO_5$ liddropiplartina	MM: 319,35	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. rugosum</i>	Silva et al. 2002 Navickiene et al. 2000
18	 $C_{14}H_{17}NO_3$ fagaramida 2-Propenamida, 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-, (2E)	MM: 247,29	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. excelsum</i>	Silva et al. 2002 Durant-Archibold et al. 2018
19	 $C_{16}H_{19}NO_3$ Piperlonguminina	MM: 273,33	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Scott et al. 2002 Beltran et al. 2017 Liu et al. 2015

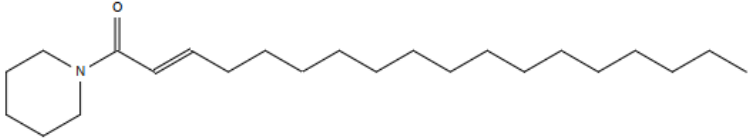
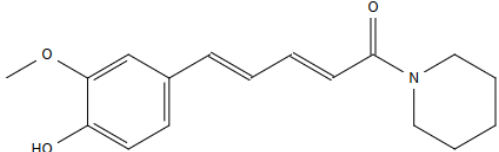
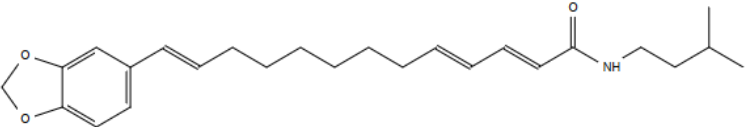
20	 $C_{16}H_{21}NO_3$ 4,5-diidropiperlonguminina	MM: 275,34	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Deboni et al. 2009. Scott et al. 2002 Liu et al. 2015
21	 $C_{19}H_{23}NO_3$ piperdardina 6,7-diidropiperetina	MM: 313,39	<i>P. tuberculatum</i> <i>P. sintenense</i>	Araujo-Junior et al. 1997. Stohr et al. 2001 Friedman et al. 2008 Chen et al. 2002
21a	 $C_{19}H_{23}NO_3$ pipersintenamida 4,5- diidropiperetina 2,6-Heptadien-1-ona, 7-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-piperidinil)-, (2E,6E)	MM: 313,39	<i>P. nigrum</i> <i>P. sintenense</i>	Zaugg et al. 2010 Chen et al. 2002

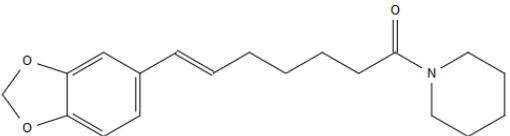
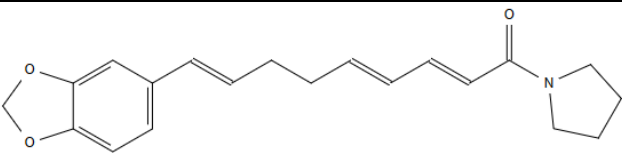
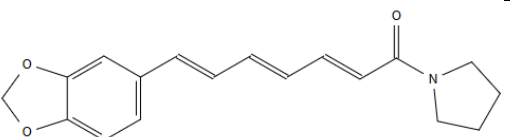
22	 $C_{21}H_{27}NO_3$ pipernonalina Piperidina, 1-[(2E,8E)-9-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2,8-nonadienil]	MM: 341,44	<i>P. nigrum</i> <i>P. retrofractum</i> <i>P. longum</i>	Yun et al. 2018 Beltran et al. 2017 Sun et al. 2007
23	 $C_{21}H_{25}NO_3$ desidropipernonalina 2,4,8-Nonatrien-1-ona, 9-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-piperidinil)-, (2E,4E,8E)	MM: 339,43	<i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Lee et al. 2006 Sun et al. 2007
24	 $C_{21}H_{29}NO_3$ piperolein B 8-Nonen-1-ona, 9-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-piperidinil)-, (8E)	MM: 343,46	<i>P. nigrum</i>	Lee et al. 2006 Yun et al. 2018

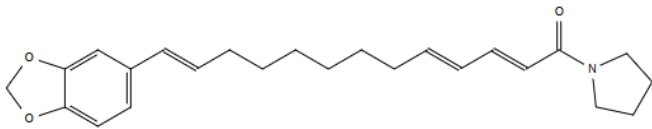
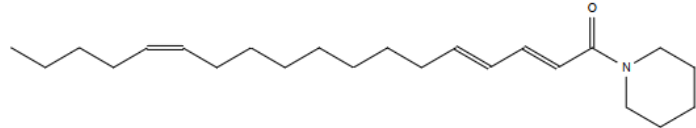
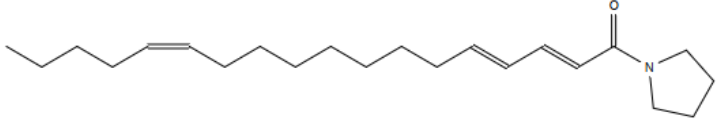
25	 $C_{21}H_{25}NO_3$ (2E,4Z,8E)-N-[9-(3,4-Metilenedioxifenil)-2,4,8-nonatrienoil]-piperidina 2,4,8-Nonatrien-1-ona, 9-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-piperidinil)-, (2E,4Z,8E)	MM: 339,43	<i>P. longum</i>	Lee et al. 2006
26	 $C_{20}H_{27}NO_3$ retrofractamida C Piperlongumina C	MM: 329,43	<i>P. longum</i>	Lee et al. 2006
27	 $C_{24}H_{45}NO$ (2E,14Z)-N-Isobutyleicosa-2,14-dienamida 2,14-Eicosadienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E,14Z)	MM: 363,62	<i>P. retrofractum</i>	Muharini et al. 2015

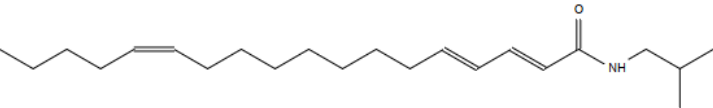
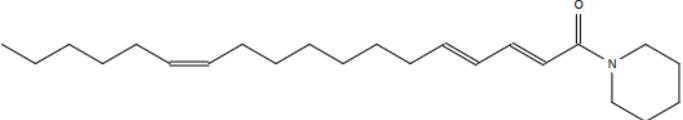
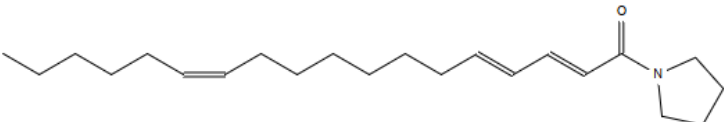
28	 $C_{25}H_{33}NO_3$ piperchabamida C 2,4,12-Tridecatrien-1-ona, 13-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-piperidinil)-, (2E,4E,12E)	MM: 395,53	<i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Yun et al. 2018 Sun et al. 2007
29	 $C_{18}H_{21}NO_3$ sarmentosina 2,6-Heptadien-1-ona, 7-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-pirrolidinil)-, (2E,6E)	MM: 299,36	<i>P. nigrum</i> <i>P. sarmentosum</i>	Wei et al. 2004
30	 $C_{20}H_{25}NO_3$ retrofractamida A Piperlongumina A 2,4,8-Nonatrienamida, 9-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-, (2E,4E,8E)	MM: 327,42	<i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Yun et al. 2018 Sun et al. 2007 Dawid et al. 2012

31	 $C_{24}H_{33}NO_3$ guinensina 2,4,12-Tridecatrienamida, 13-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-, (2E,4E,12E)	MM: 383,52	<i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Yun et al. 2018 Beltran et al. 2017 Sun et al. 2007
32	 $C_{22}H_{39}NO$ 2,4,12-Octadecatrienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E, 4E, 12E) N-isobutil-(2E,4E,12E)-octadecatrienamida	MM: 333,55	<i>P. longum</i>	Sun et al. 2007
33	 $C_{20}H_{27}NO_3$ pipertipina 7-Octen-1-ona, 8-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-piperidinil)-, (7E)	MM: 329,43	<i>P. nigrum</i>	Grienke et al. 2018 Siddiqui et al. 2010

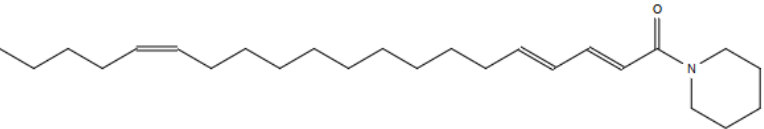
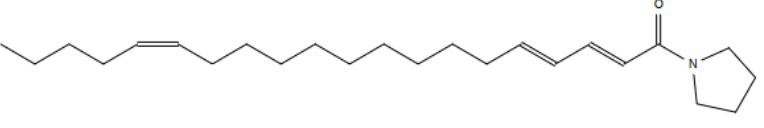
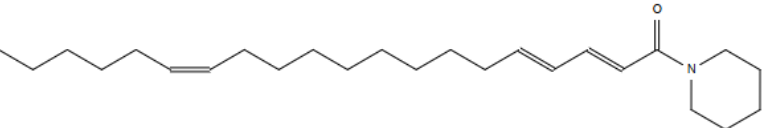
34	 $C_{23}H_{43}NO$ pipercitina 2-Octadecen-1-ona, 1-(1-piperidinil)-, (2E) (2E)-octadec-2-enoico ácido piperidido	MM: 349,59	<i>P. nigrum</i>	Siddiqui et al. 2010
35	 $C_{17}H_{21}NO_3$ feruperina Piperidina, 1-[(2E,4E)-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-oxo-2,4-pentadien-1-il] 5-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2E-4E-pentadien-piperidin amida	MM: 287,35	<i>P. nigrum</i>	Grienke et al. 2018
36	 $C_{25}H_{35}NO_3$ pipwaqarina 2,4,12-Tridecatrienamida, 13-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(3-metilbutil)-, (2E,4E,12E)	MM: 397,55	<i>P. nigrum</i>	Siddiqui et al. 2005

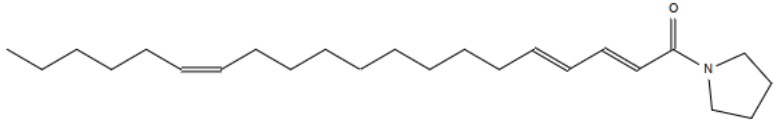
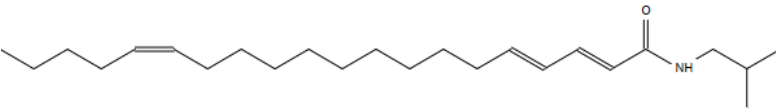
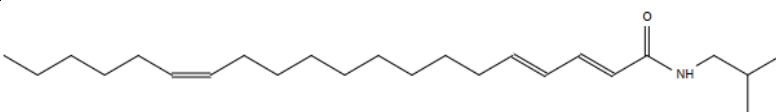
37	 $C_{19}H_{25}NO_3$ piperoleine A 6-Hepten-1-one, 7-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(1-piperidinyl)-, (6E)	MM: 315,41	<i>P. nigrum</i>	Grienke et al. 2018
38	 $C_{20}H_{23}NO_3$ 2,4,8-Nonatrien-1-ona, 9-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-pirrolidinil)-, (2E,4E,8E) 1-[1-oxo-9(3,4-metilenedioxifenil)-2E,4E,8E-nonatrienil]-pirrolidina	MM: 325,40	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017 Yun et al. 2018
39	 $C_{18}H_{19}NO_3$ piperetilina 2,4,6-Heptatrien-1-ona, 7-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(1-pirrolidinil)-, (2E,4E,6E) Piperoleina	MM: 297,35	<i>P. nigrum</i>	Dawid et al. 2012

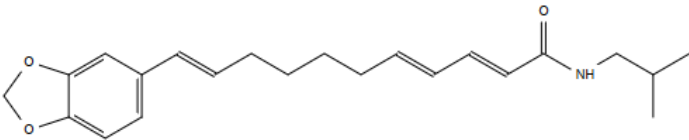
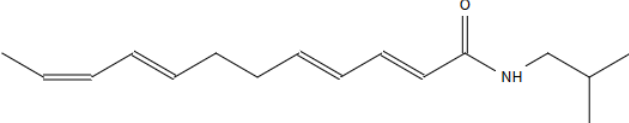
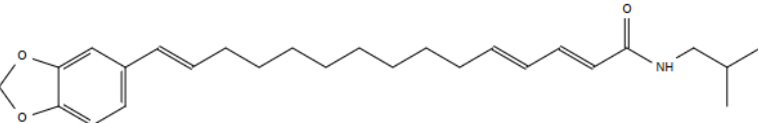
40	 $C_{24}H_{31}NO_3$ brachiamida A Pirrolidina, 1-[(2E,4E,12E)-13-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2,4,12-tridecatrienil]	MM: 381,51	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017 Dawid et al. 2012
41	 $C_{23}H_{39}NO$ 2,4,13-Octadecatrien-1-ona, 1-(1-piperidinil)-, (2E, 4E,13Z) 1-(octadeca-2E,4E,13Z-trienil)piperidina	MM: 345,56	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017
42	 $C_{22}H_{37}NO$ 2,4,13-Octadecatrien-1-ona, 1-(1-pirrolidinil)-, (2E, 4E,13Z) 1-(octadeca-2E,4E,13Z-trienil)pirrolidina	MM: 331,54	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017

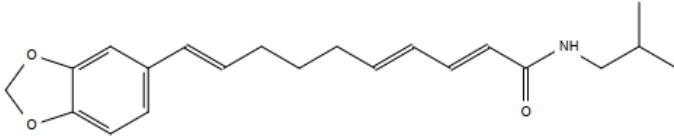
43	 $C_{22}H_{39}NO$ 2,4,13-Octadecatrienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E, 4E, 13Z) 1(2E, 4E, 13Z)-N-isobutil-octadeca-2,4,13-trienamida	MM: 333,55	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017
44	 $C_{23}H_{39}NO$ piperidina, 1-(1-oxo-2,4,12-octadecatrienil)-, (E,E,Z) 1-(octadeca-2E,4E,12Z-trienil)piperidina	MM: 345,56	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017
45	 $C_{22}H_{37}NO$ 2,4,12-Octadecatrien-1-ona, 1-(1-pirrolidinil)-, (2E, 4E, 12Z) 1-(octadeca-2E,4E,12Z-trienil)pirrolidina	MM: 331,54	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017

46	 $C_{22}H_{39}NO$ 2,4,12-Octadecatrienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E, 4E, 12Z) (2E, 4E, 12Z)-N-isobutil-octadeca-2,4,12-trienamida	MM: 333,55	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017 Yun et al. 2018
47a	 $C_{22}H_{41}NO$ pipericina 2,4-Octadecadienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E, 4Z)	MM: 335,57	<i>P. nigrum</i> <i>P. retrofractum</i>	Gulzar et al. 2013 Muharini et al. 2015
47b	 $C_{22}H_{41}NO$ N-isobutil-2E,4E-octadecadienamida 2,4-Octadecadienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E, 4E)	MM: 335,57	<i>P. guineense</i> <i>P. longum</i> <i>P. nigrum</i>	Stohr et al. 2001 Sun et al. 2007 Beltran et al. 2017 Dawid et al. 2012

48	 $C_{25}H_{43}NO$ 2,4,15-Eicosatrien-1-ona, 1-(1-piperidinil)-, (2E,4E,15Z) 1-(eicosa-2E,4E,15Z-trienoil)piperidina	MM: 373,61	<i>P. nigrum</i>	Dawid et al. 2012
49	 $C_{24}H_{41}NO$ 2,4,15-Eicosatrien-1-ona, 1-(1-pirrolidinil)-, (2E,4E,15Z) 1-(eicosa-2E,4E,15Z-trienoil)pirrolidina	MM: 359,59	<i>P. nigrum</i>	Dawid et al. 2012
50	 $C_{25}H_{43}NO$ 2,4,14-Eicosatrien-1-one, 1-(1-piperidinyl)-, (2E,4E,14Z) 1-(eicosa-2E,4E,14Z-trienoil)piperidina	MM: 373,61	<i>P. nigrum</i>	Dawid et al. 2012

51	 $C_{24}H_{41}NO$ 2,4,14-Eicosatrien-1-ona, 1-(1-pirrolidinil)-, (2E,4E,14Z) 1-(eicosa-2E,4E,14Z-trienoil)pirrolidina	MM: 359,59	<i>P. nigrum</i>	Dawid et al. 2012
52	 $C_{24}H_{43}NO$ 2,4,15-Eicosatrienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E,4E,15Z) (2E,4E,15Z)-N-isobutil-eicosa-2,4,15-trienamida	MM: 361,60	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017
53	 $C_{24}H_{43}NO$ 2,4,14-Eicosatrienamida, N-(2-metilpropil)-, (2E,4E,14Z) (2E,4E,14Z)-N-isobutil-eicosa-2,4,14-trienamida	MM: 361,60	<i>P. nigrum</i>	Beltran et al. 2017

54	 $C_{22}H_{29}NO_3$ piperida Piperlongumina B / Retrofractamida B 2,4,10-Undecatrienamida, 11-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-, (2E,4E,10E)	MM: 355,47	<i>P. nigrum</i> <i>P. longum</i>	Suzuki et al. 2018 Sun et al. 2007
55	 $C_{16}H_{25}NO$ 2,4,8,10-Dodecatetraenamida, N-(2-metilpropil)-, (2E,4E,8E,10Z) N-isobutil-2E,4E,8E,10Z-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida	MM: 247,38	<i>Echinaceae</i>	Matovic et al. 2011
56	 $C_{26}H_{37}NO_3$ brachiamida B 2,4,14-Pentadecatrienamida, 15-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-, (2E,4E,14E)	MM: 411,58	<i>P. longum</i> <i>P. chaba</i>	Sun et al. 2007

57	 $C_{21}H_{27}NO_3$ retrofractamida D / Norpipercida 2,4,9-Decatrienamida, 10-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-methylpropil)-, (2E,4E,9E)	MM: 341,44	<i>P. nigrum</i>	Siddiqui et al. 2005
----	---	------------	------------------	----------------------

