



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO PARÁ MARAJÓ-BREVES
FACULDADE DE CIÊNCIAS NATURAIS

GABRIELA BARBOSA DOS SANTOS

ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DAS PARTES AÉREAS
DE *PEPEROMIA PELLUCIDA*

BREVES-PA

2019

GABRIELA BARBOSA DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DAS PARTES AÉREAS
DE *PEPEROMIA PELLUCIDA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Manolo Cleiton Costa de Freitas

BREVES-PA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237a Santos, Gabriela Barbosa dos
Análise do perfil químico dos extratos das partes aéreas de
Peperomia pellucida / Gabriela Barbosa dos Santos. — 2019.
30 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Manolo Cleiton Costa de Freitas
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de
Ciências Naturais, Campus Universitário de Breves, Universidade
Federal do Pará, Breves, 2019.

1. Peperomia pellucida. 2. CCDAE. 3. Perfil químico . I.
Título.

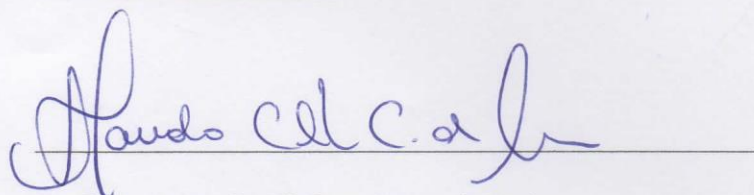
CDD 543.17

GABRIELA BARBOSA DOS SANTOS

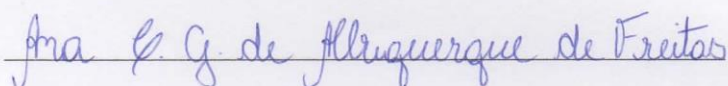
**ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DAS PARTES AÉREAS
DE *Peperomia pellucida***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
faculdade de Ciências Naturais da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Licenciado em Ciências
Naturais, aprovado com Conceito EXCELENTE.

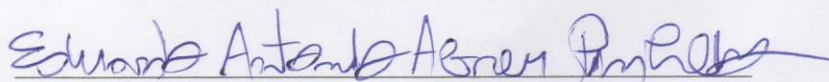
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Manolo Cleiton Costa de Freitas
UFPA-FACIN-BREVES (ORIENTADOR)



M.Sc. Ana Carolina Gomes de Albuquerque de Freitas
IFPA-BREVES (MEMBRO EXTERNO)



Prof. Dr. Eduardo Antonio Abreu Pinheiro
IFPA-BREVES (MEMBRO EXTERNO)

Breves (PA), 13 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar meu caminho e me permitir alcançar mais um grande objetivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Manolo Cleiton Costa de Freitas pela ajuda, paciência, confiança, incentivo e apoio no decorrer do desenvolvimento dessa pesquisa, tudo isso certamente foi fundamental para realização desse estudo. Além disso, agradeço também pelo apoio e ajuda durante a graduação, pelos projetos que participei recebendo as suas orientações e todos os aprendizados que com certeza serão levados para vida.

Aos membros da banca por aceitarem participar e pelas críticas construtivas que ajudarão a melhorar o trabalho.

Aos meus pais Adabel Alcantara dos Santos e Catiane Barbosa Paiva por tudo que sempre fizeram, por servirem de inspiração e nunca desistirem de lutar apesar das dificuldades.

Aos meus avós Maria da Conceição Barbosa Paiva e Vanildo Freitas Paiva, por terem me acolhido e por toda ajuda que deram durante minha vida estudantil. Ter alcançado o nível superior em parte foi por causa da ajuda deles. Gratidão por tudo que já fizeram e por serem também exemplos de pessoas guerreiras.

Ao meu namorado Yran Rodrigo Dias Santos por toda ajuda, apoio, paciência, amor e carinho ao longo dos anos da graduação. Com certeza ter tido seu companheirismo durante esses anos foi muito importante e essencial para lidar com as dificuldades ao longo do caminho. Agradeço também por ter me apoiado durante a execução da parte principal dessa pesquisa, sem dúvida foi muito importante.

À minha amiga de graduação Valéria Martins de Andrade pela ajuda, apoio e principalmente pela amizade construída ao longo dos anos do curso. Também agradeço bastante por ter me ajudado nos momentos que precisei e por ser uma grande amiga.

À minha irmã Isabela Barbosa dos Santos por todo apoio e ajuda que sempre deu, gratidão por tudo o que fez quando precisei de algo. Ao meu irmão Gabriel Barbosa dos Santos pelos momentos que ajudou.

Aos meus colegas de turma Douglas dos Santos Marcelino e Robert Ronald Soares dos Santos por serem prestativos e me ajudarem em alguns momentos da graduação. Ao colega Rodrigo Dias de Melo pela ajuda durante a realização de uma das etapas da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Manolo Cleiton, a Prof. M.Sc. Ana Carolina Gomes de Albuquerque de Freitas e a sua família pela ajuda que foi fundamental durante os dias de realização da pesquisa em Belém. A gratidão é enorme por todo o suporte e acolhimento que recebi que com certeza

foram essenciais para a concretização da principal etapa desse estudo.

Ao Laboratório Central de Extração da UFPA Campus do Guamá, aos estudantes e professores que trabalham nesse espaço que contribuíram para a concretização dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Ciências Naturais por ter oferecido suporte para realização das primeiras etapas desse estudo.

À Faculdade de Ciências Naturais pela ajuda ao longo dos anos de graduação.

À Universidade Federal do Pará Campus Universitário do Marajó-Breves pelo suporte ao longo dos anos do curso.

RESUMO

As plantas medicinais são usadas pela humanidade no tratamento de várias doenças. Dentre as espécies existentes utilizadas para tal finalidade, destaca-se a espécie *Peperomia pellucida*. Dentro do gênero *Peperomia* a *P. pellucida* é uma das plantas mais estudadas devido as aplicações na medicina popular, sua ampla distribuição, produção de substâncias químicas e potencial biológico. Levando-se em consideração esses fatos, esse estudo utilizou Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) para análise simultânea dos extratos das partes aéreas de *Peperomia pellucida* para verificar o perfil químico da espécie. A coleta, higienização e maceração do material botânico ocorreu no Laboratório de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará Campus Universitário do Marajó-Breves. Os métodos de obtenção, preparação e tratamento dos extratos, assim como a revelação das placas cromatográficas, foram realizados no Laboratório Central de Extração da UFPA Campus do Guamá. Não foi possível realizar a análise isocrática dos extratos devido a problemas de funcionamento de um dos equipamentos. Os resultados obtidos através das revelações mostraram a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos nos extratos de *P. pellucida*, além de sinais que indicam a presença de flavonóides. Na verificação da atividade antioxidante os resultados foram negativos. Isso está relacionado as condições nas quais foram realizadas a extração de *P. pellucida*, como a baixa quantidade de massa utilizada para a produção dos extratos. Portanto, estudos dessa natureza são necessários pois é importante trazer informações químicas de plantas, principalmente as do tipo medicinal, tendo em vista os efeitos terapêuticos proporcionados por esses tipos de vegetais, como é o caso de *P. pellucida*. Para além disso, essas informações são contribuições relevantes para estudos fitoquímicos dessa espécie e são dados que poderão ser usados por futuras pesquisas de caráter semelhante.

Palavras-chave: *Peperomia pellucida*, CCDAE, Perfil químico.

ABSTRACT

Medicinal plants are used by humanity in the treatment of various diseases. Among the species used for such use, select it in the species *Peperomia pellucida*. Within the Peperomia genus, *P. pellucida* is one of the most studied plants due to its applications in folk medicine, its wide distribution, chemical production and biological potential. Taking into account these facts, this study used High Performance Thin Layer Chromatography (CCDAE) for simultaneous analysis of extracts of the aerial parts of *Peperomia pellucida* to verify the chemical profile of the species. The collection, cleaning and maceration of botanical material took place at the Natural Sciences Laboratory of the Federal University of Pará, Marajó-Breves University Campus. The methods of obtaining, preparation and treatment of extracts, as well as the revelation of the chromatographic plates, were carried out at the Central Extraction Laboratory of UFPA Campus of Guamá. Unable to perform isocratic analysis of extracts due to malfunctioning of one of the equipment. The results obtained through the revelations shown in the presence of terpenes, steroids and phenolic compounds in the extracts of *P. pellucida*, besides signs showing the presence of flavonoids. In the verification of antioxidant activity, the results were negative. This is related to conditions under which *P. pellucida* extraction was performed, such as a low amount of mass used for extract production. Therefore, studies of this nature are necessary because chemical information of plants, especially the type of medicinal, is important, considering the therapeutic effects provided by these types of vegetables, such as *P. pellucida*. In addition, this information is important for fictional studies of this species and is data that can be used by similar research.

Keywords: *Peperomia pellucida*, CCDAE, Chemical profile.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 - <i>Peperomia pellucida</i> no Campus Universitário do Marajó-Breves	12
Figura 2 - A. Extratos dentro da capela depois de produzidos. B. Extratos após a realização de SPE	18
Figura 3 - Imagem fotodocumentada em 254 nm da placa cromatográfica	18
Figura 4 - Imagem fotodocumentada em 366 nm da placa cromatográfica	18
Tabela 1 - Padrões utilizados nas revelações das placas cromatográficas	19
Figura 5 - Bandas cromatográficas indicando a presença de substâncias esperadas para a revelação com VAS	19
Figura 6 - Bandas cromatográficas indicando a presença de compostos fenólicos na revelação com FBS	20
Figura 7 - Bandas cromatográficas indicando a presença de substâncias para revelação com NP/PEG	21
Figura 8 - Placa cromatográfica na revelação com Dragendorff	22
Figura 9 - Placa cromatográfica com DPPH	23

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACE	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
ACT	Acetona
AMD-2	<i>Automated Multiple Development</i>
ATS-4	<i>Automatic TLC Sampler</i>
CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CCDAE-DAD	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diodo
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diodo
DCM	Diclorometano
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
FBS	Fast Blue B Salt
° C	Graus Celsius
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
µL	Microlitro
nm	Nanômetro
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina/Polietilenoglicol
R_f	Fator de Retenção
SPE	Extração em Fase Sólida
UV	Ultravioleta
VAS	Vanilina Ácido Sulfúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Equipamentos	14
3.1.2 Solventes	15
3.2 MÉTODOS	15
3.2.1 Coleta, higienização, secagem e moagem das partes aéreas da planta	15
3.2.2 Condições para extração	15
3.2.3 Produção dos extratos	16
3.2.4 Pré-tratamento dos extratos	16
3.2.5 Desenvolvimento cromatográfico por CCDAE-DAD	16
3.2.6 Método de eluição desenvolvido	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é considerada uma prática milenar que vem sendo repassada de uma geração a outra ao longo da história da humanidade. Que por vez esta utiliza essa prática para o alívio de dores e o combate de diversas doenças. Isso vem sendo adotado desde o início de nossa civilização (Dignani, 2009), principalmente, pela população carente que utiliza as plantas medicinais devido ao baixo custo e a fácil disponibilidade.

De acordo com Souza e Sousa (2018, p. 148) “as plantas medicinais estão sendo cada vez mais estudadas devido à necessidade e ao interesse de se obter novas descobertas terapêuticas com o intuito de prevenir e tratar patologias distintas”. Isso se deve ao fato de as plantas medicinais produzirem através do metabolismo substâncias denominadas de metabólitos primários e secundários (Mazzeu, 2014). Os metabólitos secundários são de grande relevância, pois são substâncias que podem ser empregadas na elaboração de fitoterápicos, medicamentos derivados de plantas medicinais, sendo de grande interesse para estudos fitoquímicos e para a indústria farmacêutica.

O Brasil apresenta uma das maiores diversidades vegetais do mundo (SILVA, 2010). Dentre as regiões brasileiras que possuem grande diversidade, a região norte na sua totalidade apresenta como principal representante a Floresta Amazônica. De acordo com Mendes *et al.* (2011, p. 121) “o ecossistema amazônico, detentor de uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, apresenta inúmeras espécies vegetais com propriedades medicinais relatadas e outras em que seus efeitos terapêuticos são desconhecidos”.

A espécie alvo desse trabalho possui muitas aplicações na medicina popular. Devido a isso e a outros fatores, como por exemplo sua ampla distribuição, a espécie *Peperomia pellucida* é a mais estudada dentro do gênero *Peperomia* (MORAES, 2016). A *P. pellucida* faz parte da família Piperaceae que é considerada uma das angiospermas mais antigas que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, como a América do Sul (DIGNANI, 2009). No Brasil essa família pode ser encontrada em várias regiões, tendo como principais gêneros *Piper* e *Peperomia*, com mais de mil espécies cada, ocorrendo com maior abundância na Mata Atlântica e Floresta Amazônica (SOUZA & SOUSA, 2018).

A espécie *P. pellucida* (Figura 1) é uma planta herbácea que está presente na América do Sul, América do Norte e América Central, sendo facilmente encontrada em ambientes úmidos e sombreados (SOUZA & SOUSA, 2018). No Brasil, essa espécie encontra-se

amplamente distribuída, ocorrendo desde a Amazônia até o Paraná (SILVA, *et al.*, 2013). A *P. pellucida* é conhecida popularmente por várias denominações, que variam de acordo com a região brasileira. Na Amazônia, essa espécie é conhecida como erva-de-jabutí, em outras regiões é conhecida como erva-de-vidro, alfavaquinha-de-cobra, coraçãozinho ou língua-de-sapo.

Figura 1 - *Peperomia pellucida* no Campus Universitário do Marajó-Breves.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na medicina popular das comunidades da região amazônica, a *P. pellucida* é utilizada, por exemplo, no tratamento de diversas doenças como tosse, dor de garganta e arritmias cardíacas (Silva *et al.*, 2013). Além disso, a mesma também possui aplicações populares no tratamento de hemorragia, feridas, dores abdominais, abscessos, acne, furúnculos, cólicas, problemas renais, hipertensão e colesterol (Mendes *et al.*, 2011)

A espécie possui um grande potencial para produção de fitoterápico devido aos relatos na literatura sobre seu potencial biológico. Estudos mostram que atividades antibacteriana, antimicrobiana, anti-inflamatória, antipirética, antifúngica, antipruriginosa, diurética e analgésica, são encontradas em diferentes extratos da *P. pellucida* (Mutee *et al.*, 2010; Silva, 2010; Mendes *et al.*, 2011; Wey *et al.*, 2011; Phongtongpasuk & Poadang, 2014; Mohamad *et al.*, 2015; Souza & Sousa, 2018).

A *P. pellucida* pode apresentar atividade antioxidante, como pode ser comprovado através do método que elimina o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) utilizado para detectar a presença de compostos antioxidantes (Oliveira, 2015). Tendo em vista que esse trabalho busca também utilizar extratos de *P. pellucida* para analisar atividade antioxidante com DPPH é importante ressaltar que os antioxidantes provenientes de plantas, podem desempenhar papel importante no tratamento de algumas doenças, tais como: artrite (Taraza *et al.*, 1997), arteriosclerose (Singh & Jialal, 2006) e doenças neurodegenerativas (Dumont & Beal, 2010). Isso é extremamente importante, tendo em vista que antioxidantes de

fontes naturais são considerados mais seguros e benéficos quando comparados aos antioxidantes sintéticos (Phongtongpasuk & Poadang, 2014).

Estudos fitoquímicos apontam que *P. pellucida* fornece inúmeras substâncias das mais diversas classes, além de compostos bioativos. No estudo feito por Silva *et al.* (2013) foram encontradas substâncias como flavonóides, esteróides, triterpenóides, fenóis e saponina espumídica nos extratos secos de *P. pellucida*.

Existem técnicas que podem ser utilizadas para analisar o perfil fitoquímico de uma planta. Pode-se mencionar as técnicas cromatográficas que são utilizadas para análise de substâncias. De acordo com Salazar (2017, p. 15) “os métodos cromatográficos realizam a separação, identificação e quantificação das espécies químicas de matrizes complexas”. Dentre as técnicas cromatográficas pode-se mencionar a Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) que é uma técnica consolidada que apresenta inúmeras vantagens e muitas aplicações, inclusive para tarefas analíticas envolvendo a produção de fitoterápicos. A CCDAE é uma técnica que possui aprimoramentos que permitem aumentar a resolução de compostos a serem separados, permite análises quantitativas dos compostos, sendo usada também na identificação de constituintes e determinação de impurezas (Attimarad *et al.*, 2014). Para além disso, a CCDAE utiliza tecnologias de ponta, como por exemplo aparelhos modernos de *scanners*, além de ser uma técnica cromatográfica onde pode-se observar os resultados através de imagens.

Em estudo fitoquímico realizado com a espécie *P. pellucida*, pelo grupo de Química de Produtos Naturais da UFPA, foram isoladas duas substâncias, identificadas como derivados ArC₂ do ácido cinâmico, denominadas pellucidina A e pellucidina B, além de três flavonóides. Posteriormente, deu-se continuidade ao estudo dessa espécie, buscando-se desenvolver um método, via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com detecção por Arranjo de Diodo (CLAE-DAD), para quantificar o dímero pellucidina A presente nas partes aéreas de *P. pellucida*. Assim, o método foi desenvolvido gerando a dissertação de mestrado defendida por Freitas (2012). Freitas (2017) realizou um estudo para quantificar pellucidina A nas partes aéreas de *P. pellucida* através do desenvolvimento e validação de método via CCDAE. Esta técnica permite a análise simultânea de várias amostras ao mesmo tempo, além de ser altamente confiável e reprodutível, sendo recomendada por algumas farmacopeias como *American Herbal Pharmacopoeia*, *Chinese Drug Monograph and Analysis*, *Pharmacopoeia of People's Republic of China* (Freitas, 2017).

Levando-se em consideração a aplicação de *Peperomia pellucida* na medicina popular, seus efeitos terapêuticos e os estudos fitoquímicos realizados sobre a espécie, é indispensável e relevante a realização dessa pesquisa para fornecer mais informações acerca do seu perfil químico. Além disso, esse estudo é importante pois irá contribuir também com o conhecimento sobre o potencial biológico da espécie ao trazer informações sobre sua atividade antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil químico dos extratos das partes aéreas de *Peperomia pellucida* via CCDAE-DAD.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar qual o melhor solvente de extração a partir das partes aéreas de *P. pellucida*.
- Realizar o perfil químico dos extratos produzidos.
- Realizar o teste com extrato das partes aéreas da planta utilizando DPPH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Os materiais utilizados para o desenvolvimento dessa pesquisa estão dispostos e divididos em duas subseções, a saber:

3.1.1 Equipamentos

Utilizou-se os seguintes equipamentos: Aplicador automático ATS-4 (*Automatic TLC Sampler*) e TLC *Visualizer*.

3.1.2 Solventes

Os solventes manuseados foram os seguintes: acetonitrila (C_2H_3N), acetona (C_3H_6O), acetato de etila ($C_4H_8O_2$), ácido fórmico (HFO), diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (MeOH).

3.2 MÉTODOS

Este trabalho foi realizado através de uma parceria realizada entre o Laboratório de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará (UFPA) Campus Universitário do Marajó-Breves e o Laboratório Central de Extração da UFPA Campus do Guamá.

A metodologia a ser empregada para o desenvolvimento desta pesquisa dividiu-se em seis etapas:

3.2.1 Coleta, higienização, secagem e moagem das partes aéreas da planta

A coleta do material botânico foi realizada no Campus Universitário do Marajó-Breves (CUMB) da UFPA. O material coletado foi lavado em água corrente no Laboratório de Ciências Naturais (LACIN), posteriormente foi secado na estufa à uma temperatura de $55^\circ C$ durante dois dias.

Foi necessário realizar a moagem do material botânico. Para isso, as plantas secadas foram maceradas com as mãos, posteriormente foram trituradas no liquidificador. Em seguida, o material foi peneirado. Esses procedimentos foram essenciais para diminuir a superfície de contato durante a obtenção dos extratos.

O material botânico peneirado foi pesado em balança analítica, logo em seguida.

3.2.2 Condições para extração

Foi utilizado um método de extração com o banho ultrassônico, por ser uma técnica rápida e eficiente comparada com a maceração e centrifugação. Os solventes testados na extração foram os seguintes: acetato de etila, acetona, acetonitrila e diclorometano, e a seleção destes solventes foi feita com base no levantamento bibliográfico.

3.2.3 Produção dos extratos

O procedimento para estes testes consistiu na utilização de 50 mg da matriz vegetal seca e peneirada sendo pesada, em triplicada, diretamente dentro tubo de ensaio de 8 mL, ao qual, após a pesagem, foi adicionado 4 mL do solvente a ser testado.

A obtenção do extrato foi realizada de acordo com o método empregado por Freitas (2017) que consistiu em banho ultrassônico durante 10 min. na temperatura de 25° C. A solução, proveniente da extração, foi transferida para um frasco de boca larga. Em seguida, ao material residual de cada tubo de ensaio foram adicionados 4 mL do respectivo solvente de extração utilizado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, sendo que os quatro volumes foram reunidos no mesmo frasco. Após isso, os frascos foram colocados na capela para secagem do material. Posteriormente, foram utilizados os solventes da extração para retirar o material seco e transferi-lo para um frasco de penicilina que em seguida foi levado para a capela.

3.2.4 Pré-tratamento dos extratos

Na sequência todos os extratos secos foram submetidos à extração por SPE (Solid Phase Extraction), seguindo estes procedimentos: realização do condicionamento dos cartuchos Strata C₁₈ 50 mg/1 mL (analítico), passando 1 mL de ACN, em seguida 1 mL de H₂O. Em cada um dos extratos foram adicionados 800 µL de ACN e levados ao banho ultrassônico por 10 seg. Em seguida foram adicionados 200 µL de água e novamente levados ao banho ultrassônico por mais 10 seg. Cada solução foi transferida para um cartucho identificado, respectivamente, com o código do extrato. Posteriormente foi adicionado em cada cartucho um volume de 1 mL de uma solução de ACN:H₂O (8:2). A solução coletada (2 mL) foi evaporada em capela. O resíduo foi ressuspensão em 1000 µL do respectivo solvente de extração. E por fim ocorreu a análise por CCDAE-DAD, em sistema isocrático.

3.2.5 Desenvolvimento cromatográfico por CCDAE-DAD

Após obtenção dos extratos o desenvolvimento do método cromatográfico seguiu o recomendado no trabalho de Reich e Schibli (2006), que consiste em selecionar a forma de aplicação dos extratos, escolhas de placas cromatográficas, seleção de solventes de eluição e

escolha de comprimento de onda para monitorar as análises. E posterior fotodocumentação das placas cromatográficas. Essas foram fotodocumentadas nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, através do Fotodocumentor *Visualizer*.

3.2.6 Método de eluição desenvolvido

As placas cromatográficas utilizadas para fazer a inoculação e posterior eluição foram de tamanho 20x10 cm. Previamente limpas com metanol e secas em estufa a 50° C durante 30 min.

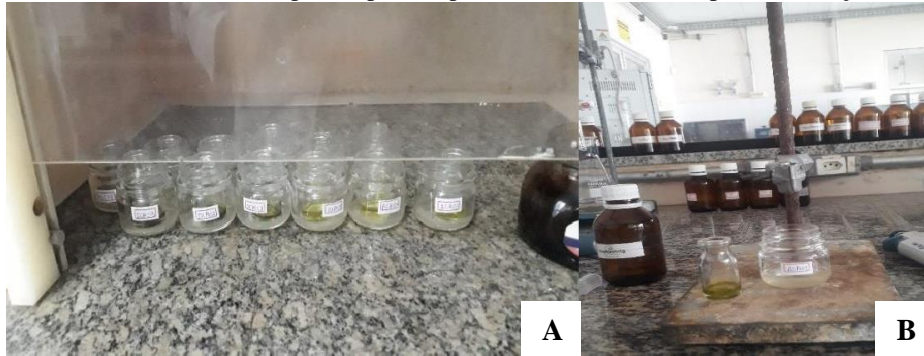
Foi necessário adequar o sistema de eluição devido à falta de funcionamento do *Automated Multiple Development* (AMD-2), sendo necessário utilizar o sistema de eluição em única corrida com DCM:MeOH:H₂O (97:2:1), não seguindo assim o sistema proposto por Freitas (2017). O comprimento de onda de monitoramento das análises foi de 292 nm, o volume de aplicação (25 µL), aplicação em banda de 6 mm em modo *spray-on*, altura de aplicação 10 mm, distância das bordas 25 mm, distância entre os *tracks* em modo automático como proposto no trabalho de FREITAS (2017).

As placas cromatográficas foram submetidas a revelações com VAS (Vanilina Ácido Sulfúrico) utilizado para verificar a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos nos extratos de *P. pellucida*. Além disso foi realizada revelação com DPPH para verificar a atividade antioxidante dos extratos, NP/PEG (Difenilboriloxietilamina/Poli(etileno)glicol) para verificar a presença de flavonóides, Dragendorff para verificação de alcaloides e FBS (Fast Blue B Salt) para verificar compostos fenólicos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção dos extratos seguiu conforme descrito no item 3.2.3 (Figura 2A) e posteriormente realizou-se o que está proposto no item 3.2.4 (Figura 2B). A análise isocrática não foi realizada de acordo com a proposta de Freitas (2017), pois devido o módulo AMD-2 está inoperante não foi possível utilizá-lo.

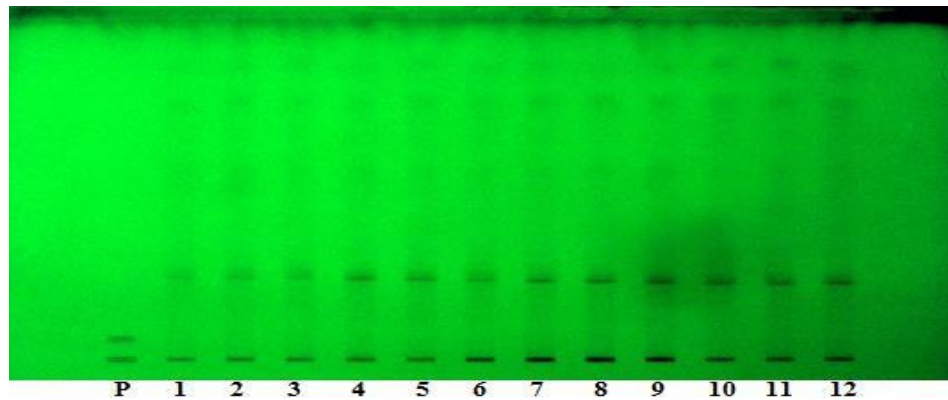
Figura 2. A. Extratos dentro da capela depois de produzidos. B. Extrato após a realização de SPE.



Fonte: Arquivo pessoal.

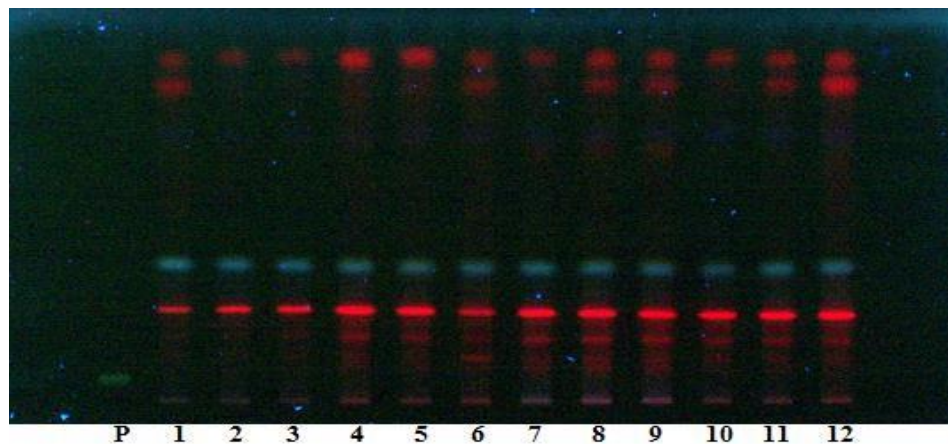
Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram inoculados nas placas cromatográficas. Previamente, sem análise da composição química, uma placa cromatográfica com o padrão β - amirina foi fotodocumentada em 254 nm e posteriormente em 366 nm, conforme ilustrada, respectivamente, nas figuras 3 e 4.

Figura 3. Imagem fotodocumentada em 254 nm da placa cromatográfica.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 4. Imagem fotodocumentada em 366 nm da placa cromatográfica.



Fonte: Dados da pesquisa.

Nas figuras 3 e 4 é possível observar o resultado do comportamento de absorção e emissão das substâncias quando são submetidas a diferentes comprimentos de ondas.

As placas cromatográficas foram submetidas a revelações com diferentes reagentes que apresentam colorações características para as classes específicas de compostos químicos. Nas revelações positivas, as classes tornaram-se visíveis resultando na formação de bandas quando as placas cromatográficas foram borrifadas com os reveladores. Além disso, durante as revelações foram utilizados padrões para cada classe de compostos químicos (Tabela 1).

Tabela 1. Padrões utilizados nas revelações das placas cromatográficas.

PADRÃO	CLASSES QUÍMICAS
β -amirina	Compostos fenólicos, esteróides e terpenos
Brucina	Alcalóides
Rutina	Compostos fenólicos
Rutina e Quercetina	Flavonóides

Fonte: Autoria própria.

A placa utilizada para revelação com VAS apresentou resultado positivo pois foram formadas bandas com coloração roxa/lilás indicando a presença de substâncias pertencentes as classes dos terpenos (Salazar, 2017 *apud* Jork *et al.*, 1990; Wagner & Bladt, 2001), esteróides e compostos fenólicos, como pode-se observar na figura 5. Dessa maneira, em todos os extratos produzidos, tendo com referência a coloração das bandas cromatográficas e o Fator de Retenção (R_f - Retention Factor) do padrão β -amirina é possível indicar a presença dessas classes.

Figura 5. Bandas cromatográficas indicando a presença de substâncias esperadas para revelação com VAS.

Índice: **P** (Padrão): β -AMIRINA, **1:** ACN01 (Acetonitrila), **2:** ACN02, **3:** ACN03, **4:** ACE01 (Acetato de etila), **5:** ACE02, **6:** ACE03, **7:** ACT01 (Acetona), **8:** ACT02, **9:** ACT03, **10:** DCM01 (Diclorometano), **11:** DCM02 e **12:** DCM03.



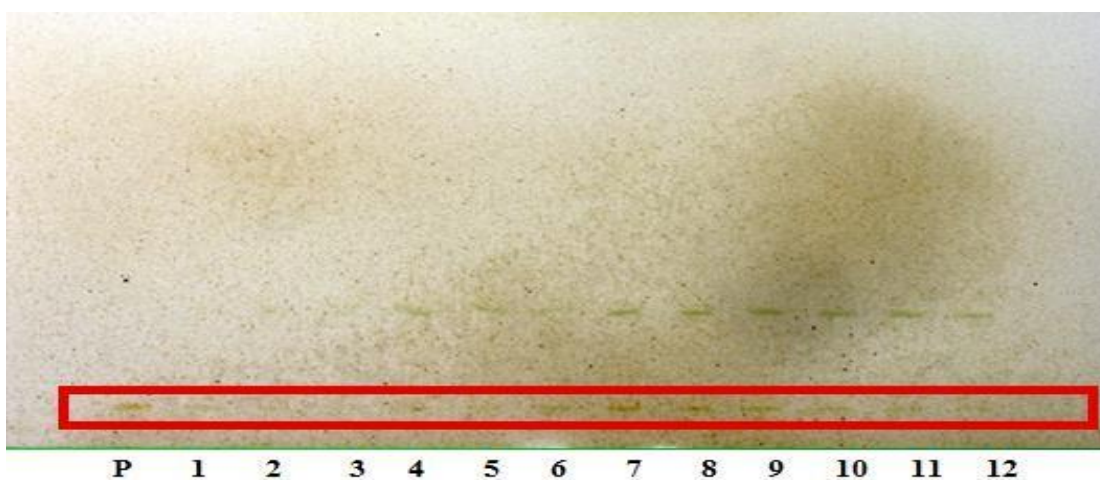
Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados apresentados na revelação com VAS ressaltam o fato das plantas da família Piperaceae produzirem uma considerável quantidade de substâncias (SOUZA & SOUSA, 2018). Levando-se em consideração essa produção de compostos, é esperado encontrar nos extratos de *P. pellucida* substâncias pertencentes à várias classes. Na revelação com VAS foi possível verificar a presença de algumas dessas classes como terpenos, esteróides e compostos fenólicos.

Entre as classes reveladas, os esteróides corroboram alguns estudos fitoquímicos que também apontam a presença desses na espécie *P. pellucida* (AZIBA, *et al.*, 2011; MENDES, *et al.*, 2011; OLOYEDE, *et al.*, 2011; SILVA, *et al.*, 2013).

A placa utilizada para revelação com FBS, como é possível observar na figura 6, apresentou a formação de bandas com coloração alaranjado indicando resultado positivo para presença de compostos fenólicos. Portanto, em todos os extratos produzidos, tendo com referência a coloração das bandas cromatográficas destacadas e o R_f do padrão rutina, é possível indicar a presença dos compostos fenólicos.

Figura 6 - Bandas cromatográficas indicando a presença de compostos fenólicos para revelação com FBS.
Índice: P (Padrão): RUTINA, **1:** ACN01 (Acetonitrila), **2:** ACN02, **3:** ACN03, **4:** ACE01 (Acetato de etila), **5:** ACE02, **6:** ACE03, **7:** ACT01 (Acetona), **8:** ACT02, **9:** ACT03, **10:** DCM01 (Diclorometano), **11:** DCM02 e **12:** DCM03.



Fonte: Dados da pesquisa.

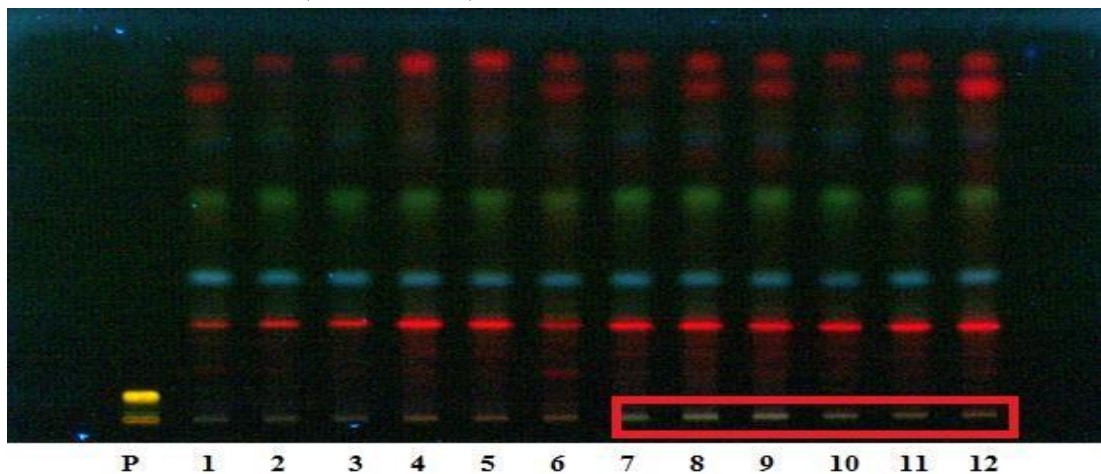
A presença de compostos fenólicos nos extratos de *P. pellucida* são esperados levando-se em consideração os relatos na literatura que mencionam a ocorrência dessa classe nessa planta. Investigações fitoquímicas como as de Bayma *et al.* (2000) e Li *et al.* (2003) verificaram a presença de compostos fenólicos em espécies do gênero *Peperomia*, inclusive nos extratos de *P. pellucida*.

No estudo realizado por Mendes *et al.* (2011) foram encontrados compostos fenólicos na forma de fenóis nos extratos etanólicos secos de *P. pellucida*. Pode-se mencionar também o estudo de Silva *et al.* (2013) que ao realizar uma prospecção química verificou nos extratos secos de *P. pellucida* a presença de algumas substâncias, como fenóis e taninos, os quais pertencem a classe dos compostos fenólicos.

A placa cromatográfica que utilizou a revelação com NP/PEG sinaliza a presença de flavonóides a partir do track 7, como ilustrado na figura 7 (p. 24). De acordo com Salazar (2017) quando a placa é revelada com NP/PEG e é visualizada em luz UV (Ultravioleta) em 366 nm os compostos dos extratos tornam-se fluorescentes ao serem excitados por essa radiação e o que indica a presença de flavonóides é a formação de bandas com coloração amarela. Portanto, nos extratos produzidos entre track 7 e 12, tendo com referência a coloração das bandas cromatográficas e o R_f do padrão quercetina, é possível sinalizar a presença de flavonóides.

Figura 7. Bandas cromatográficas indicando a presença de substâncias para revelação com NP/PEG.

Índice: P (Padrão): QUERCETINA E RUTINA, 1: ACN01 (Acetonitrila), 2: ACN02, 3: ACN03, 4: ACE01 (Acetato de etila), 5: ACE02, 6: ACE03, 7: ACT01 (Acetona), 8: ACT02, 9: ACT03, 10: DCM01 (Diclorometano), 11: DCM02 e 12: DCM03.



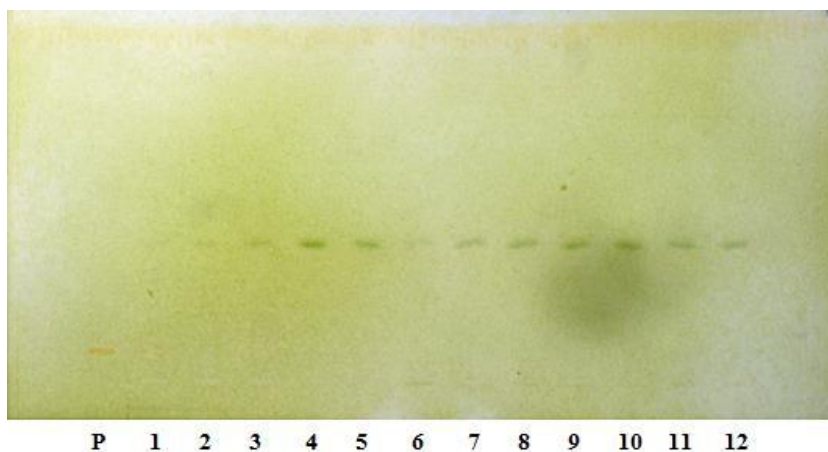
Fonte: Dados da pesquisa.

Essa sinalização deve ser levada em consideração devido a alguns relatos na literatura sobre a presença de flavonóides em extratos de *P. pellucida* (AQIL; AHMAD, 1993; MENDES, *et al.*, 2011; SILVA, 2010; SILVA, *et al.*; 2013). Além disso, a presença desses compostos são esperados para essa planta levando-se em consideração que nas espécies da família Piperaceae são encontrados flavonóides (MAZZEU, 2014).

A placa no qual foi utilizado revelador Dragendorff apresentou resultado negativo para a presença de alcalóides (Figura 8).

Figura 8. Placa cromatográfica na revelação com Dragendorff.

Índice: **P** (Padrão): BRUCINA, **1:** ACN01 (Acetonitrila), **2:** ACN02, **3:** ACN03, **4:** ACE01 (Acetato de etila), **5:** ACE02, **6:** ACE03, **7:** ACT01 (Acetona), **8:** ACT02, **9:** ACT03, **10:** DCM01 (Diclorometano), **11:** DCM02 e **12:** DCM03.



Fonte: Dados da pesquisa.

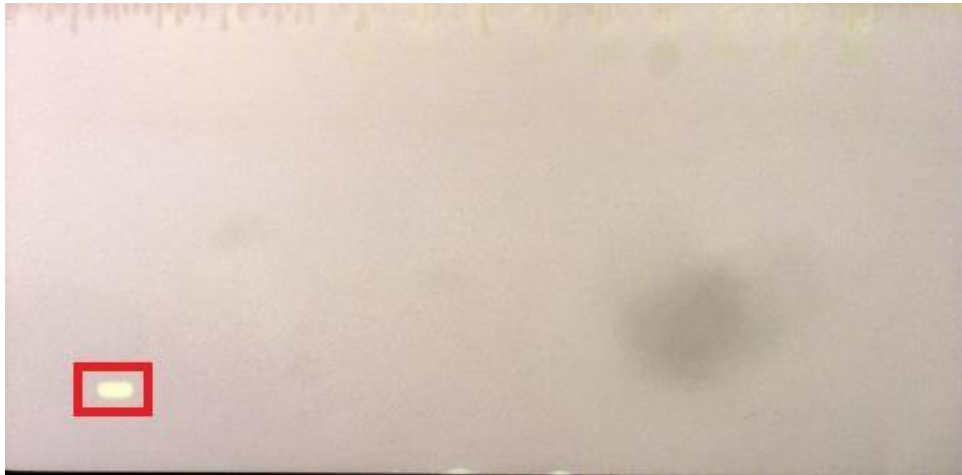
O resultado da revelação com Dragendorff não é definitivo pois deve-se levar em consideração o solvente de extração e a concentração do extrato. Para indicar uma revelação positiva para alcalóides deveria ter ocorrido a formação de bandas cromatográficas com a coloração apresentada pelo padrão brucina. Como pode-se observar na figura 8 (p. 24) nenhum extrato produzido indicou a presença desses compostos levando-se em consideração a coloração do padrão e seu R_f .

Apesar da presente pesquisa ter apresentado resultados negativos na revelação com Dragendorff, existem estudos como o de Silva (2010) que aponta a presença de alcalóides em *P. pellucida*. Nesse estudo ao realizar a caracterização microquímica da espécie *P. pellucida*, Silva (2010) verificou a presença de produtos do metabolismo secundário dessa planta, entre as classes reveladas foram encontrados alcalóides. Essa revelação ocorreu através da utilização do reagente Dragendorff. Além desse estudo, pode-se mencionar também o trabalho de Oloyede *et al.* (2011) que ao realizar a triagem fitoquímica de *P. pellucida* da Nigéria verificou a presença os alcalóides.

A placa submetida a revelação com DPPH não apresentou atividade antioxidante como pode-se observar o resultado com apenas a coloração fluorescente do padrão ácido ascórbico (Figura 9). Esse resultado pode estar relacionado a pequena quantidade de massa (50 mg) usada

na produção dos extratos. Além disso, Silva *et al.* (2013) ao realizar a produção do extrato seco de *P. pellucida* verificou que essa espécie apresenta baixo rendimento. Levando-se em consideração as condições nas quais os extratos foram preparados e o rendimento da planta, não foi possível verificar sua atividade antioxidante.

Figura 9. Placa cromatográfica com DPPH.



Fonte: Dados da pesquisa.

Apesar dos resultados terem sido negativo, é relevante ressaltar que existem estudos que relatam a ocorrência de atividade antioxidante nos extratos de *P. pellucida*. No estudo de Phongtongpasuk e Poadang (2014) foi investigado duas técnicas de extração para verificar a atividade antioxidante nos extratos de *P. pellucida*. Através da técnica de refluxo utilizando o ensaio com DPPH foi possível obter resultados positivos para atividade antioxidante nessa planta. Além desse estudo, pode-se mencionar também a pesquisa realizada por Wey *et al.* (2011) que verificou atividade antioxidante moderada em extratos metanólicos de *P. pellucida*.

Portanto, os resultados negativos para atividade antioxidante em *P. pellucida* apontados nessa pesquisa não são definitivos, pois existem possibilidades de verificar esse tipo de atividade em outras condições de extração da planta.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu com informações acerca do perfil químico da espécie *P. pellucida*. Foi possível verificar nos extratos dessa planta a presença de terpenos, esteróides, compostos fenólicos, além de sinais que indicam também flavonóides. Esses resultados são importantes levando-se em consideração que as substâncias químicas produzidas pelas espécies da família Piperaceae vem sendo empregadas na elaboração de fitoterápicos.

Nas condições que foram realizadas a extração de *P. pellucida* nesse estudo não foi possível verificar a atividade antioxidante dessa planta. Entretanto, esses resultados indicam que para verificar esse tipo de atividade é necessário que sejam realizadas outras condições de extração que utilizem maior quantidade de massa do material botânico, tendo em vista que *P. pellucida* possui baixo rendimento.

Portanto, estudos dessa natureza são necessários pois é importante trazer informações químicas de plantas, principalmente as do tipo medicinal, tendo em vista os efeitos terapêuticos proporcionados por esses tipos de vegetais, como é o caso de *P. pellucida*. Para além disso, essas informações são contribuições relevantes para estudos fitoquímicos dessa espécie e são dados que poderão ser usados por futuras pesquisas de caráter semelhante.

REFERÊNCIAS

ATTIMARAD, M.; MUEEN AHMED, K. K.; ALDHUBAIB, B. E; HARSHA, S. **High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug Discovery.** 2014. Disponível em: <<http://www.phmethods.org>> Acesso em: 27 set. 2019.

AQIL, M. K.; AHMAD, M. B. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. **Scientist of Physical Sciences**, 5: 213-215. 1993.

AZIBA, P. I.; ADEDEJI, A.; EKOR, M.; ADEYEMI, O. Analgic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. **Fitoterapia**, 72: 57-58. 2001.

BAYMA, J.C.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C.; CANTO, W.C.C. A dimeric ArC2 compound from *Peperomia pellucida*. **Phytochemistry**, 55: 779–782. 2000.

DIGNANI, D. F. ***Peperomia blanda* (PIPERACEAE): Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, 2009. 109 f. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/91689/dignani_df_me_arafcf.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 05 abr. 2019.

DUMONT, M.; BEAL, M.F. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 51: 1014-1026. 2010. Disponível em: <www.sciencedirect.com> Acesso em: 13 jun. 2019.

FREITAS, M. C. **Desenvolvimento de um método, via HPLC-DAD, para a separação de dois dímeros ArC₂ de *Peperomia pellucida* e avaliação da atividade vasorelaxante.** Dissertação de Mestrado. Belém. Universidade Federal do Pará, 2012. 87 f.

FREITAS, A. C. G. A. **Desenvolvimento e validação de um método para quantificação de pellucidina A nas partes aéreas de *Peperomia pellucida*.** Dissertação de Mestrado. Belém. Universidade Federal do Pará. 2017.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. **Thin-Layer Chromatography.** New York: VCH. 1990.

LI, N.; WU, J.-L.; SAKAI, J.; ANDO, M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **J. Nat. Prod**, 66: 1421–1426. 2003.

MAZZEU, B. F. **Estudo de aspectos químicos, biológicos e biossintéticos em *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae).** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista,

2014. 142 f. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/110696>> Acesso em 07 out. 2019.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM NETO, P.J; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 32: 121-125. 2011. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/1216> Acesso em: 07 out. 2019.

MOHAMAD, H.; ANDRIANI, Y.; BAKAR, K.; SIANG, C. C.; SYAMSUMIR, D. F.; ALIAS, A.; RADZI, S. A. M. Effect of drying method on anti-microbial, anti-oxidant activities and isolation of bioactive compounds from *Peperomia pellucida* (L) Hbk. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 7: 578-584. 2015. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org>> Acesso em: 13 jun. 2019.

MORAES, M. M. **Biossíntese da pellucidina A em *Peperomia pellucida* (L.) HBK.** Tese de Doutorado. Instituto de Química da Universidade de São Paulo. 2016. 136 f. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-17082016-075333/pt-br.php>> Acesso em: 09 jul. 2019.

MUTEE, A. F.; SALHIMI, S. M.; YAM, M. F.; LIM, C. P.; LIM, G. Z.; ABDULLAH, O. Z.; AMEER, M. F.; ABDULKARIM, M. Z. In vivo Anti-inflammatory and in vitro Antioxidant Activities of *Peperomia pellucida*. **International Journal of Pharmacology**, 6: 686-690. 2010. Disponível em: <<http://www.researchgate.net>> Acesso em: 13 jun. 2019.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_165> Acesso em: 20 set. 2019.

OLOYEDE, G. K.; ONOCHA, P. A.; OLANIRAN, B. B. Phytochemical, toxicity, antimicrobial and antioxidant screening of leaf extracts of *Peperomia pellucida* from Nigeria. **Advances in Environmental Biology**, 5: 3700-3709. 2011. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/scholar?q=phytochemical,+toxicity,+antimicrobial+and+antioxidant+screening+leaf+extracts+of+Peperomia+pellucida+from+nigeria&hl=pt-BR&as_vis=1&oi=scholart#d=gs_qabs&u=%23p%3DLzWEKSL4JPYJ> Acesso em: 28 nov. 2019.

PHONGTONGPASUK, S.; POADANG, S. Extraction of antioxidants from *Peperomia pellucida* L. Kunth. **Thammasat International Journal of Science and Technology**, v. 19. 2014. Disponível em: <<https://www.tci-thaijo.org>> Acesso em: 13 jun. 2019.

REICH, E.; SCHIBLI, A. High Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. **Thieme Medical Publishers, Inc.** New York. 2006. p. 264.

SALAZAR, M. L. A. R. **Avaliação da Composição Química, Efeito Neuroprotetor e Anti-**

inflamatório de Extratos de Cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) Obtidos Via Extração Supercrítica. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Disponível em: <<http://ppgcta.propesp.ufpa.br/index.php/br/teses-e-dissertacoes/dissertacoes>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

SILVA, R. M. F.; RIBEIRO, J. F. A.; FREITAS, M. C. C.; ARRUDA, M. S. P.; NASCIMENTO, M. N.; BARBOSA, W. L. R.; ROLIM NETO, P. J. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, 15: 717-726. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-0572201300050012>> Acesso em: 20 set. 2019.

SILVA, R. M. F. ***Peperomia pellucida* L. (H.B.K.): obtenção tecnológica de formas farmacêuticas.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2010. 186 f. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br>> Acesso em: 09 jun. 2019.

SINGH, U.; JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. **Pathophysiol**, 13: 129-142. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com>> Acesso em 13 jun. 2019.

SOUZA, J. A.; SOUSA, Z. L. Estudo da atividade biológica do extrato etanólico da *Peperomia pellucida* (L.) Kunth. **Revista Cereus**, 10: 147-159. 2018. Disponível em: <<http://ojs.unirg.edu.br/index.php/1/article/view/2362>> Acesso em: 11 jun. 2019.

TARAZA, C.; MOHORA, M., VARGOLICI, B.; DINU, V. Importance of reactive oxygen species in rheumatoid arthritis. **Rom. J. Intern. Med.**, 35: 89-98. 1997. Disponível em: <<https://www.researchgate.net>> Acesso em: 13 jun. 2019.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drugs analysis: Thin-layer chromatography.** Atlas, 2. ed., Munchen: Springer. 2001.

WEY, L. S.; WEE, W.; SIONG, J. Y. F.; SYAMSUMIR, D. F. Characterization of Anticancer, Antimicrobial, Antioxidant Properties and Chemical Compositions of *Peperomia pellucida* Leaf Extract. **Acta Medicina Iranica**, 49: 670-674. 2011. Disponível em: <<http://www.researchgate.net>> Acesso em: 13 jun. 2019.