



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA

LUIS ALVES DE ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Piper nigrum* L.

FORTALEZA

2017

LUIS ALVES DE ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Piper nigrum* L.

Monografia apresentada ao Curso de
Química do Departamento de Ciências
Exatas da Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial para a obtenção
do Título de Bacharel em Química com
Habilitação Industrial

Orientadora Pedagógica: Prof^a. Dr^a. Ruth
Maria Bonfim Vidal

Orientador Vocacional: Prof. Dr. Kirley
Marques Canuto

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A448c Almeida, Luis Alves de.
CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Piper nigrum* L. / Luis Alves de Almeida. – 2017.
57 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Ruth Maria Bonfim Vidal.
Coorientação: Prof. Dr. Kirley Marques Canuto.

1. Pimenta-do-reino. 2. compostos fenólicos. 3. espectrofotometria UV-Vis. 4. RMN. I. Título. CDD

LUIS ALVES DE ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Piper nigrum* L

Monografia apresentada ao Curso de
Química do Departamento de Ciências
Exatas da Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial para a obtenção
do Título de Bacharel em Química com
Habilitação Industrial

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ruth Maria Bonfim Vidal
(Orientadora Pedagógica)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Kirley Marques Canuto
(Orientador Profissional)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Mestre Juliana Monteiro da Silva
(Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe e irmãos, Valderina,
Leonardo e Victor.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial minha mãe Valderina Alves, por sempre ter estado ao meu lado e ser uma mulher incrível, forte e batalhadora. Por ter me apoiado mesmo nas vezes que não compreendia minhas decisões, tendo travado batalhas diárias para dar uma educação de qualidade a mim e meus irmãos, Leonardo Alves e Victor Alves, na qual tenho muito carinho e consideração.

À Resiliência, que sempre esteve ao meu lado me ajudando adaptar-se a todos os momentos vividos durante o curso de graduação em Química. Por todas as vezes que, sob toda dificuldade, o acaso me ajudou a lidar com situações diversas.

À Prof^a. Dr^a. Ruth Maria Bonfim Vidal, pela orientação, dedicação e disponibilidade para comparecer com sua competência e incrível pedagogia durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador profissional Dr. Kirley Marques Canuto, pela orientação, paciência e capacidade profissional, sempre disposto a me auxiliar quando necessário nesse processo de aquisição de novos conhecimentos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, pela oportunidade e infraestrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho.

À Equipe Técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, pela recepção e convivência ao longo dos dias.

Agradeço em especial aos analistas Lorena Mara e Paulo Riceli, pela grande ajuda que recebi durante o trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos companheiros do LMQPN, em especial a Rose, Amanda, Ana Sheila, Márcia, Liana, Régis e Kaline, pela amizade e apoio nesta trilha.

Aos meus grandes e verdadeiros amigos de graduação das turmas 2012.1 e 2013.1 do curso de Química Bacharelado. Pessoas que estão presentes em todos os momentos importantes da minha vida, enchendo-me de críticas e reflexões, mas sempre mostrando o quão importante é o apoio de um sorriso e abraço amigo para o crescimento pessoal e profissional.

Agradeço aos grandes amigos Caroline Sales, Karoline Alves, Elias Leite, Igor Alves, Luiza Sena, Grazielly Cardoso, Lícia Luz, Davi Rabelo e Lucas Catunda na qual cresci junto durante esses anos da formação acadêmica.

Agradeço imensamente a Amanda Lemos e Thiago Matos, não apenas parceiros de trabalho, mas confidentes que já fazem parte da minha família.

Agradeço aos companheiros Sarah Hannahe, Rafael Andrade e Lorena Monique que durante todo curso estiveram ao meu lado sempre dispostos a me ajudar.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado. Aos amigos que vieram e que foram; aos antigos e atuais. Aos amigos descobertos em todos os grupos que participei durante a graduação. A todos os membros da administração da Universidade Federal do Ceará que me ajudaram quando necessário. Desde o professor ao zelador, o meu muito obrigado.

“Quando eu morrer voltarei para buscar
os instantes que não vivi junto do mar.”

Sophia de Mello Breyner Andresen

RESUMO

Piper nigrum L. (Piperaceae), conhecida popularmente como pimenta-do-reino, é uma planta utilizada como condimento alimentar. Este trabalho tem por finalidade a avaliação do perfil cromatográfico, quantificação e metodologia rápida e eficiente para identificação e caracterização dos constituintes químicos dos tecidos vegetais da espécie. Para isto, os extrato das folhas, talo, frutos maduro e frutos verde de *P. nigrum* foram obtidos através de extração líquido-líquido (ELL) usando solução hidroalcoólica de Et-OH/H₂O como solvente de extração, posteriormente submetidos a Cromatografia Líquida Alta Eficiência (CLAE-DAD) e Espectrofotometria UV-Vis. Uma das frações extraídas foi analisada com Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A análise cromatográfica dos extratos permitiu aquisição de 53 diferentes componentes na espécie de pimenta-do-reino. A análise espectrofotométrica resultou na quantificação polifenólica dos extratos de tecidos vegetais de *P. nigrum* estudados. A quantificação mostrou devida reprodutibilidade e robustez para as análises polifenólicas. A investigação química resultou na caracterização de uma substância: piperina. A estrutura da substância majoritária no extrato de Fruto Maduro foi elucidada através de métodos espectrométricos (RMN ¹H) além de comparação com dados disponíveis na literatura.

Palavras-chave: Pimenta-do-reino; compostos fenólicos; espectrofotometria UV-Vis; RMN.

ABSTRACT

Piper nigrum L. (Piperaceae), popularly known as black pepper, is a plant used as a food condiment. This study aims to evaluate the chromatographic profile, it was performed the evaluation of the chromatography profile, the quantification and a fast and efficient methodology to identify and characterize of the chemical constituents of the plant tissues of the species. For this, extract of leaves, stalk, ripe fruits and green fruits of *P. nigrum* were obtained using a liquid-liquid extraction (LLE) via a hydroalcoholic solution of EtOH/H₂O as the extracting solvent, they were then submitted to a chromatography study using the High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC-DAD) and Ultraviolet-Visible Spectrophotometry study as well. One of the fractions extracted was analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The chromatographic analysis of the extracts allowed the acquisition of 53 different components in the pepper species. The spectrophotometry analysis resulted in the polyphenolic quantification of the studied *P. nigrum* vegetal tissues extracts. Quantification showed adequate reproducibility and robustness for polyphenolic analysis. The chemical investigation resulted in the characterization of one substance: Piperine. The structure of the major substance present in the ripe fruit was elucidated through spectrometric methods (¹H-NMR) and comparison with literature.

Keywords: black pepper; phenolic compounds; spectrophotometry UV-Vis; NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura das principais substâncias anticancerígenas presentes no gênero <i>Piper</i>	18
Figura 2	– Representação esquemática da espécie <i>Piper nigrum</i>	19
Figura 3	– Gráfico da constituição percentual dos componentes químicos da espécie <i>Piper nigrum</i> divididos em suas respectivas classes (próprio autor, com base em levantamentos bibliográficos).....	21
Figura 4	– Esquema representativo de um sistema de cromatografia.....	32
Figura 5	– Esquema representativo de um espectrofotômetro UV/Vis de feixe único.	33
Figura 6	– Curva de calibração para determinação de polifenólicos em concentrações de 0,007 mg mL ⁻¹ a 0,070 mg mL ⁻¹ de Ácido Gálico.....	39
Figura 7	– Cromatogramas CLAE-AFD 200-400 nm para <i>Piper nigrum</i> Folha, Talo, Fruto Maduro e Fruto Verde.....	44
Figura 8	– Espectro UV-Vis da Piperina relatados na literatura comparados com o composto majoritário no ExtHA de Fruto Maduro e Verde.....	50
Figura 9	– Estrutura da piperina com hidrogênios sinalizados.....	51
Figura 10	– Espectro de RMN de ¹ H [600 MHz, CDCl ₃] do ExtHA <i>P. nigrum</i> Fruto Maduro.....	52
Figura 11	– Expansão do espectro de RMN de ¹ H [600 MHz, CDCl ₃] do ExtHA <i>P. nigrum</i> Fruto Maduro.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Principais cultivares da espécie <i>Piper nigrum</i> , características e composição química dos respectivos frutos.....	20
Tabela 2	– Estrutura das principais substâncias relatadas para a espécie <i>Piper nigrum</i> .	22
Tabela 3	– Porcentagem m/m da composição química dos grãos de pimenta-do-reino exploradas no Brasil.....	30
Tabela 4	– Dados referentes à extração do ExtHA.....	38
Tabela 5	– Dados de absorbância para polifenólicos totais das soluções de branco, Fruto Maduro, Fruto Verde, Talo e Folha.....	39
Tabela 6	– Dados das Amostras analisadas via Espectrofotometria UV-Vis para polifenólicos totais.....	40
Tabela 7	– Tempo de Retenção dos constituintes químicos apresentados nos tecidos vegetais de <i>Piper nigrum</i>	41
Tabela 8	– Tempo de Retenção dos constituintes químicos apresentados nos tecidos vegetais de <i>Piper nigrum</i> a fim de comparar os perfis fitoquímicos.....	42
Tabela 9	– Espectros UV-Vis para os picos dos constituintes químicos apresentados nos tecidos vegetais <i>Piper nigrum</i> e tempo de retenção.....	45
Tabela 10	– Dados de deslocamento químico em RMN ^1H (150 MHz, CDCl_3) da Piperina relatados na literatura comparados com o ExtHA de Fruto Maduro.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Considerações da família Piperacea.....	16
2.2	O gênero Piper.....	16
2.2.1	<i>Aspectos químicos do gênero Piper.....</i>	17
2.3	A espécie <i>Piper nigrum</i> L.....	18
2.3.1	<i>Constituintes químicos da espécie <i>Piper nigrum</i> L.....</i>	21
2.4	Fundamentações teóricas das técnicas de extração, quantificação e identificação de compostos orgânicos.....	30
2.4.1	<i>Extração líquido-líquido.....</i>	30
2.4.2	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....</i>	31
2.4.3	<i>Espectrofotometria UV-Vis.....</i>	32
2.4.4	<i>Arranjo de Fotodiodo.....</i>	33
2.4.5	<i>Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Extração e Caracterização de Pimenta-do-Reino.....	35
3.1.1	<i>Obtenção e preparo do extrato hidroalcoólico das folhas, frutos e talo de <i>P. nigrum</i>.....</i>	35
3.1.2	<i>Análise do perfil cromatográfico por CLAE analítico.....</i>	36
3.1.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....</i>	36
3.1.4	<i>Espectrofotometria UV-Vis.....</i>	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Extração Líquido-líquido.....	38
4.2	Determinação de Polifenólicos Totais.....	39
4.3	CLAE-DAD.....	41
4.4	Caracterização química da piperina	50
5	CONCLUSÃO.....	54
6	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais estão entre os recursos terapêuticos de maior interesse científico por apresentarem diversidade química rica em metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, representando uma importante fonte de fitofármacos para o desenvolvimento de novos medicamentos, para as mais diversas doenças (PINTO *et al.*, 2002; ALVES, 2001).

O progresso recente de técnicas analíticas hifenadas permitiu obter amplo conhecimento sobre o metabolismo secundário dos organismos vivos. O Brasil se situa em posição privilegiada para a ciência de produtos naturais, em decorrência de ser um dos países mega-biodiversos e ter constituído um grande corpo de pesquisadores de química de produtos naturais (BERLINCK *et al.*, 2017).

A pimenta-do-reino *Piper nigrum* L. – Piperaceae, também conhecida como pimenta-da-Índia, é uma planta trepadeira de grande produtividade e uma das mais valorizadas condimentares do mundo, com grande valor econômico, permitindo que essa atividade desenvolvida pelos pipericultores brasileiros seja altamente rentável (EMBRAPA 2016).

O Brasil é um dos maiores produtores de pimenta-do-reino, oscilando entre a segunda e terceira posição no mercado mundial. Em termos de relevância mundial, o Brasil é o quarto maior exportador de pimenta-do-reino, com mais de 30 mil ton anuais, sendo o Pará responsável por cerca de 80% dessa produção seguido pelo Espírito Santo (EMBRAPA 2016; SECUNDINO, 2003).

A pimenta-do-reino é vendida no mercado externo como pimenta-preta, pimenta-branca e pimenta-verde ou em salmoura, ao passo que no mercado interno, ela é comercializada como pimenta-preta e branca, pimenta em pó e misturada a outros condimentos, principalmente cominho. Subprodutos como piperina e oleoresina – extraídos de grãos chochos de pimenta – são utilizados nas indústrias de embutidos, perfumaria e farmacêutica, cujos preços podem atingir até três vezes o valor obtido do produto comercializado na forma de grãos (EMBRAPA, 2006).

Seus extratos foram utilizados na medicina popular em uma variedade de culturas. Na literatura sânscrita antiga, o uso de pimenta-do-reino para fins medicinais foi documentado. Na Índia, foi uma das ervas mais comumente usadas na medicina ayurvédica e tem sido empregada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e, ain-

da mais recentemente, de malária crônica. A pimenta preta também foi usada para o tratamento da epilepsia na medicina tradicional chinesa (SINGLETARY, 2010).

As caracterizações químicas de alimentos ou de matérias-primas são de grande importância para a ciência de alimentos e bioquímica, uma vez que através destas que se pode compreender a natureza dos diferentes constituintes dos alimentos, os processos químicos e bioquímicos envolvidos com suas transformações bem como seus atributos de qualidade (BENDAOUD et al. 2010).

Comumente, nos extratos obtidos a partir de pimenta-do-reino e de pimenta rosa estão presentes alcalóides, flavonoides, taninos e terpenos, substâncias com reconhecidas atividades biológicas (BENDAOUD et al. 2010).

Tendo em vista que os componentes químicos mais importantes encontrados nos grãos da pimenta-do-reino são a piperina, responsável pela pungência (ardor), e os óleos essenciais, responsáveis pelo aroma característico dessa pimenta, a caracterização para confirmação e quantificação desses constituintes são importantes estratégias para o comércio e estudo de *Piper nigrum*.

Para realizar o mapeamento da constituição química da espécie, utiliza-se a extração líquido-líquido, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H 1D) a fim de elucidar as estruturas identificadas na via cromatográfica e determinar a composição dos extratos analisados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações da família Piperaceae

A família Piperaceae abrange uma das mais relevantes e antigas especiarias do mundo. Estudos taxonômicos vêm sendo desenvolvidos em Piperaceae no Brasil com base nas pesquisas realizadas por T.G. Yuncker, especialista na família, que estabeleceu as diretrizes para o entendimento desse grupo (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Essa família abrange vários gêneros, cujos principais são: *Lepianthes*, *Sarchorhachis*, *Ottonia*, *Pothomorphe*, *Peperomia* e *Piper*. Destes, os maiores gêneros são os dois últimos citados. O gênero *Piper* é composto por plantas lenhosas, incluindo arbustos, trepadeiras e pequenas árvores (DYER *et al.*, 2004).

O nordeste brasileiro conta com quatro gêneros: *Ottonia* Spreng., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Piper* L. e *Pothomorphe* Miq., não tendo sido assinalado o gênero *Sarchorhachis* Trel., exclusivo das Regiões Sudeste e Sul do Brasil (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

No Ceará as espécies encontram-se representadas, principalmente, nas superfícies dos relevos residuais cristalinos mais proeminentes, cujas altitudes e a pequena distância do litoral determinam maiores índices pluviométricos, desenvolvendo solos mais profundos e, conseqüentemente, abrigando uma flora diferenciada. Estas regiões, denominadas serras úmidas, como Aratanha, Baturité e Maranguape, são as preferidas por espécies de *Peperomia* e certas espécies de *Piper*, que apresentam indivíduos à sombra (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

2.2 O gênero *Piper*

O gênero *Piper* tem mais de duas mil espécies distribuídas em ambos os hemisférios. São ervas eretas seja de arbustos ou árvores. A maior diversidade de espécies de *Piper* é no Neotrópico, onde são encontrados dois terços das espécies descritas. Cerca de 300 espécies são endêmicas do Sudeste Asiático, incluindo as ilhas do leste da Índia e o norte da Austrália. Apenas duas espécies são nativas da África. A maioria das espécies de *Piper* cresce em florestas tropicais molhadas, quentes e de planície (PARMAR *et al.* 1997; DYER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2014).

As espécies de *Piper* são bastante uniformes morfologicamente, com folhas simples, alternadas e hastes articuladas com nós ampliados. Os ramos quebram facilmente nesses nós, seja quando estragados ou quando em decaimento. A maioria das espécies de *Piper* são aromáticas devido à presença de óleos essenciais nos seus tecidos, principalmente nas folhas. Assim, o gênero é uma das mais fáceis plantas para reconhecer, devido o típico cheiro picante ou aromático das folhas esmagadas ou hastes quebradas (DYER *et al.*, 2004).

Antes de 1980, a maioria dos trabalhos sobre o gênero *Piper* tinha origem indiana e dizia respeito aos seus constituintes químicos e ao potencial que esses produtos químicos tinham como agentes pesticidas (por exemplo, piperina). Com a explosão da pesquisa ecológica nos trópicos nas últimas duas décadas, particularmente no Neotrópico, as espécies de *Piper* têm sido usadas para estudar herbivoria, distribuição e abundância, padrões fenológicos, dispersão de sementes por morcegos e aves, capacidade fotossintética, reciprocismos, fitoquímica e muito mais (DYER *et al.*, 2004).

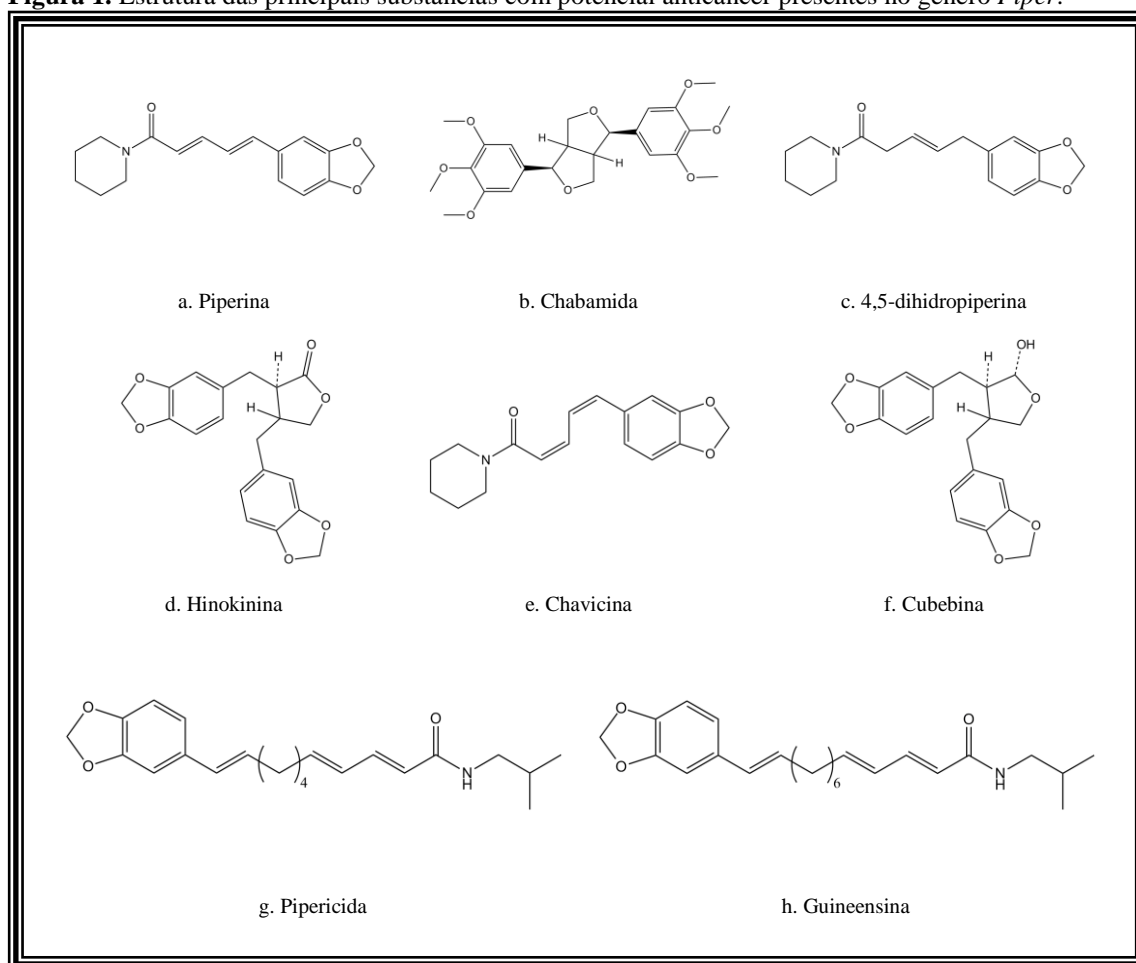
As espécies de *Piper* têm alta importância comercial, econômica e medicinal. Economicamente, as *Piperaceae* são importantes para a pimenta nos mercados mundiais de especiarias. O fruto amadurecido de *Piper nigrum* é a fonte de pimenta branca, enquanto o fruto não maduro da mesma espécie é a fonte de pimenta preta. Originalmente da Índia, a pimenta-do-reino era importante no início da negociação entre a Europa e a Ásia; hoje é cultivada em todo o trópico úmido (PARMAR *et al.* 1997; DYER *et al.*, 2004).

2.2.1 Aspectos químicos do gênero *Piper*

A fitoquímica do gênero *Piper* é rica em termos de números de compostos descobertos. Apenas cerca de 10% de todas as espécies de *Piper* (112 de mais de 2000 espécies conhecidas em todo o mundo) foram investigadas fitoquimicamente. Essas 112 espécies apresentaram 667 compostos diferentes distribuídos da seguinte forma: 190 alcalóides/amidas, 49 lignanas, 70 neolignanas, 97 terpenos, 39 propenilfenóis, 15 esteróides, 18 kavapironas, 17 chalconas/dihidrochalconas, 16 flavonas, 6 flavanonas, 4 piperolídeos e 146 compostos diversos que não se enquadram nos principais grupos comuns de metabólitos secundários (SENGUPTA; RAY, 1987; PARMAR *et al.* 1997; DYER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2014).

A eficácia de extratos de *Piper* como agentes anticancerígenos, antimalárgicos e antimicrobianos são bem documentadas. Amidas e alcalóides são os principais constituintes de espécies de *Piper* que suprimem o crescimento de linhas celulares de câncer. A Piperina, responsável pelo aroma pungente em espécies de *Piper*, foi relatada ser um inibidor do crescimento tumoral e metástase pulmonar em camundongos. Chabamida, 4,5-Dihidropiperina, Hinokinina, Chavicina, Cubebina, Pipericida e Guineensina são demais compostos com propriedade anticancerígena (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017).

Figura 1. Estrutura das principais substâncias com potencial anticâncer presentes no gênero *Piper*.



2.3 A espécie *Piper nigrum* L.

A pimenta-do-reino, como é conhecida a *Piper nigrum*, é nativa das montanhas costeiras tropicais do sudoeste da Índia, onde o comércio marítimo e terrestre com o mundo antigo começou há pelo menos 3.500 anos atrás. Durante o período romano, foi recolhido em grande parte de plantas florestais selvagens. No século 20, vários paí-

ses da América do Sul e da África começaram a produzir pimenta preta. Hoje a Índia, a Indonésia e o Brasil são as principais fontes mundiais (MCGEE, 2004).

Figura 2. Representação esquemática da espécie *Piper nigrum* (Eugen Köhler, 1914).



No Brasil, a produção de pimenta preta é de cerca de 52 mil toneladas e ocupa uma área plantada de 22384 hectares (IBGE, 2015).

Apesar da pouca participação no mercado nacional, sabe-se que a pimenta-do-reino se adapta e cresce bem em diversos tipos de solo, especialmente os bem drenados e com teor de argila suficiente para reter umidade durante o período mais seco do ano. As cultivares adotadas nas principais áreas produtoras, considerando também suas características e composição química (Embrapa Amazônia Oriental, 2004), são as seguintes:

Tabela 1. Principais cultivares da espécie *Piper nigrum*, características e composição química dos respectivos frutos (Embrapa Amazônia Oriental, 2004).

CULTIVARES	Rendimento médio (kg/ha)	Ciclo maturação	COMPOSIÇÃO QUÍMICA
APRA	3100	Set/Nov	5,41% de óleos essenciais, 14,8% de oleorresina, 8,97% de resina e 55,06% de piperina
BRAGANTINA	2700	Jun/Out	4,75% de óleos essenciais, 14,01% de oleorresina, 10,06% de resina e 41,56% de piperina
CINGAPURA	2300	Jun/Out	2,37% de óleos essenciais, 8,37% de oleorresina, 6,0% de resina e 69,09% de piperina
GUAJARINA	2900	Jun/Out	4,22% de óleos essenciais, 11,28% de oleorresina, 7,06% de resina e 39,37% de piperina
IAÇARÁ	2500	Set/Nov	3,48% de óleos essenciais, 10,03% de oleorresina, 6,85% de resina e 45,09% de piperina
KOTTANADAN-1	2800	Set/Nov	5,33% de óleos essenciais, 12,70% de oleorresina, 7,37% de resina e 56,16% de piperina
KUTHIRAVALLY	2700	Set/Nov	5,7% de óleos essenciais, 11,65% de oleorresina, 5,98% de resina e 56,39% de piperina

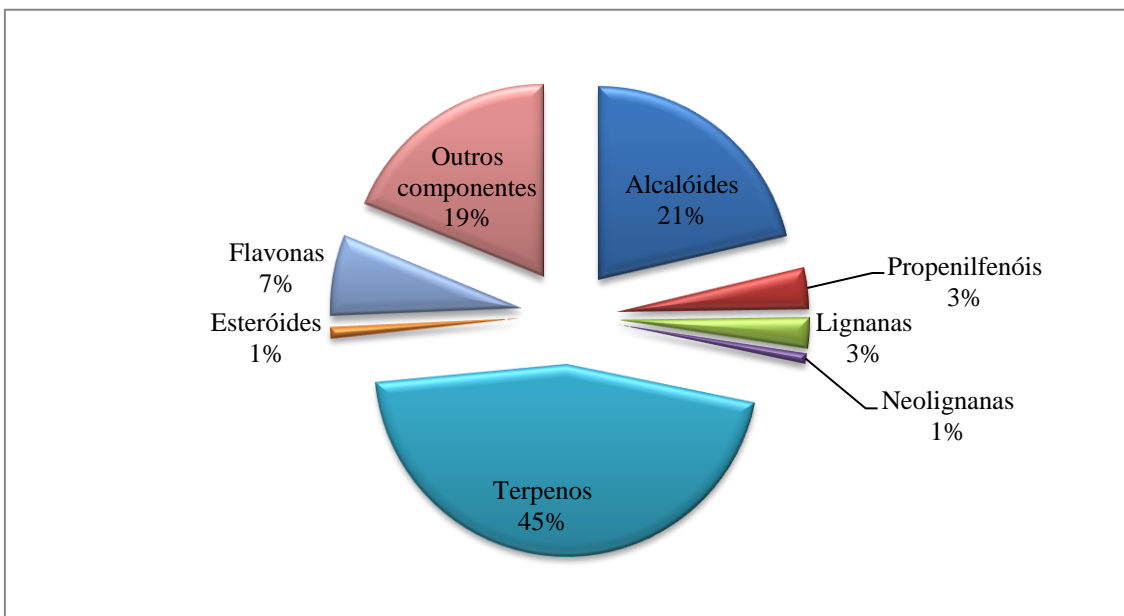
O conhecimento acerca dos mais diversos tipos de cultivares é importante para avaliação quanto à adaptação dessas nas diferentes regiões produtoras, uma vez que a espécie possui elevada exigência nutricional e alto grau de resposta à aplicação de fertilizantes (CHAVES *et al.*, 2006; KATO,1978; VELOSO *et al.*1998; CHEPOTE *et al.*, 1986).

Os diversos cultivares de pimenta-do-reino possuem características parecidas quanto à composição química dos frutos, ciclo de maturação e rendimento por hectare. (Embrapa Amazônia Oriental, 2004).

2.3.1 Constituintes químicos da espécie *Piper nigrum* L.

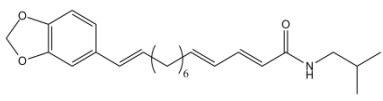
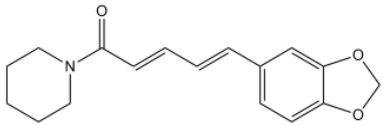
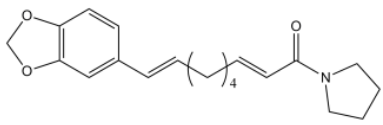
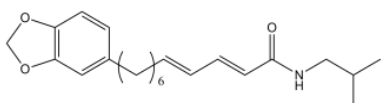
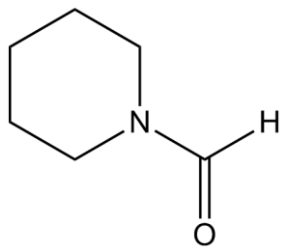
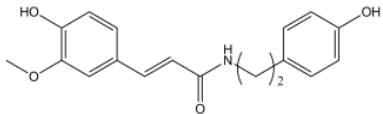
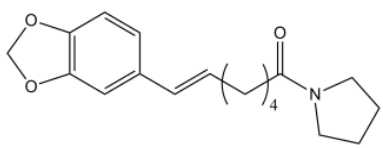
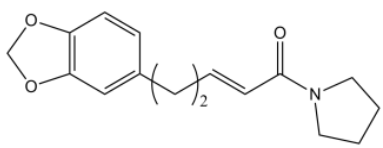
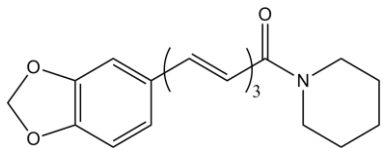
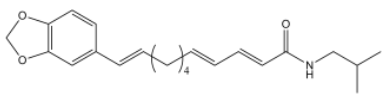
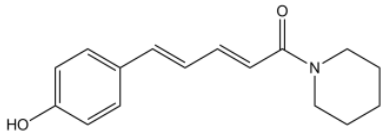
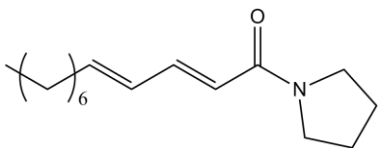
Estudos fitoquímicos sobre a *Piper nigrum* L. têm evidenciado a presença de 25 alcalóides, 4 propenilfenóis, 3 lignanas, 1 neolignana, 53 terpenos, 1 esteróide, 8 flavonas, e 22 componentes diversos não adequados às classes supracitadas (PARMAR *et al.*, 1997; DYER *et al.*, 2004; SCOOT *et al.*, 2008). Em percentual, esses constituintes se enquadram no seguinte modo:

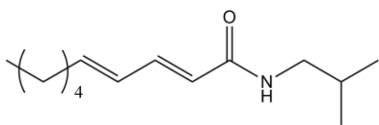
Figura 3. Gráfico da constituição percentual dos componentes químicos da espécie *Piper nigrum* divididos em suas respectivas classes (próprio autor, com base em levantamentos bibliográficos).



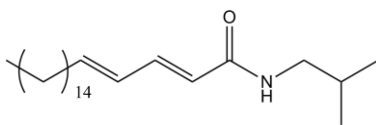
Na **Tabela 2** estão relacionadas às principais substâncias da espécie *Piper nigrum* relatadas nas literaturas pesquisadas.

Tabela 2. Estrutura das principais substâncias relatadas para a espécie *Piper nigrum*.

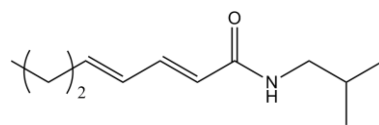
Estruturas	Estruturas	Estruturas
Alcaloides		
		
Guineensina	Piperina	Brachiamida B
		
Dihidropipericida	N-Formilpiperidina	N-trans-Feruloiltiramina
		
Piperamida	Piperamina	Piperettina
		
Pipericida	(2E,4E)-N-5-[(4-Hidroxifenil)-pentadienoil]piperidina	(2E,4E)-N-Dodecadienoil pirrolidina



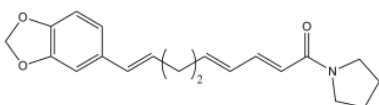
(2E,4E)-N-Isobutyldecadienamida



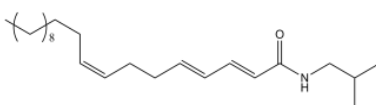
(2E,4E)-N-Isobutyleicosadienamida



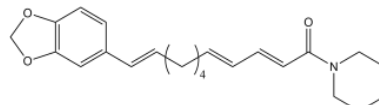
(2E,4E)-N-Isobutyl-octadienamida



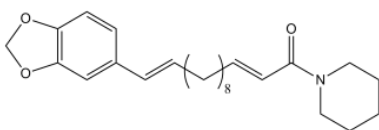
(2E,4E,8E)-N-9-(3,4-Metileno dioxifenil)nonatrienoilpirrolidina



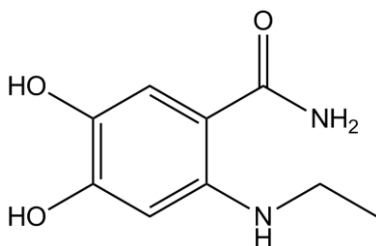
(2E,4E,8Z)-N-Isobutyl-eicosatrienamida



(2E,4E,10E)-N-11-(3,4-Metileno dioxifenil)undecatrienoilpiperidina

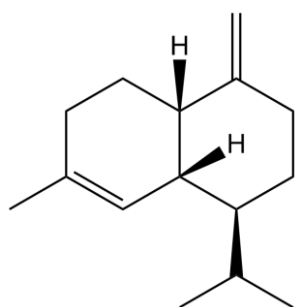


(2E,8E)-N-9-(3,4-Metileno dioxifenil)nonadienoilpiperidina

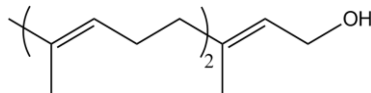


3,4-Dihidroxi-6-(N-etilamina)benzamida

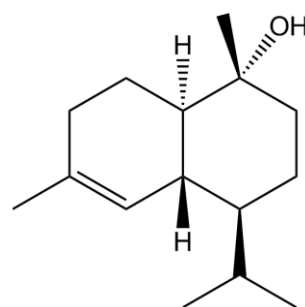
Terpenos



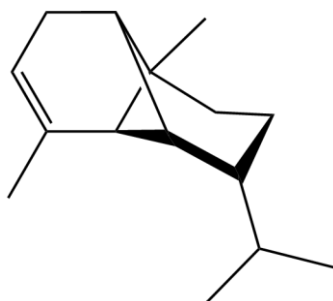
(-)-Muuroleno



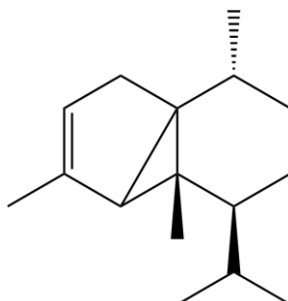
(2Z,6E)-Famesol



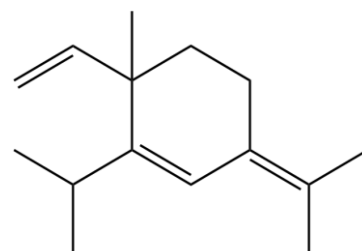
(α)-Cadinol



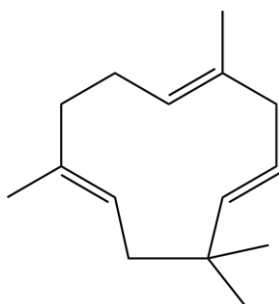
(α)-Copaeno



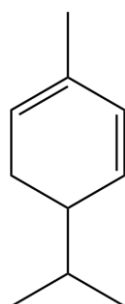
(α)-Cubebeno



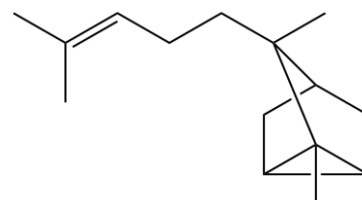
(α)-Elemeno



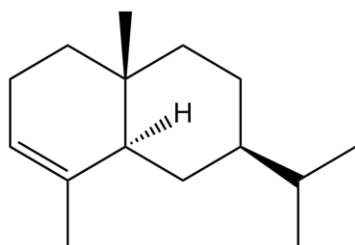
(α)-Humuleno



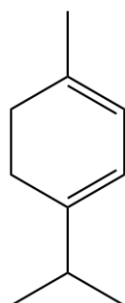
(α)-Fellandreno



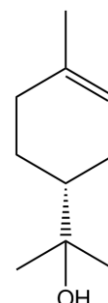
(α)-Santaleno



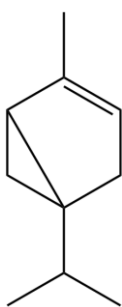
(α)-Selineno



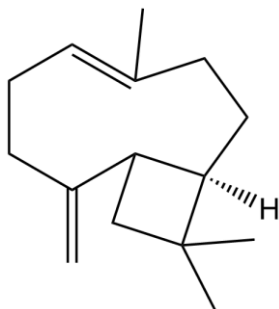
(α)-Terpineno



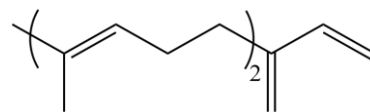
(α)-Terpineol



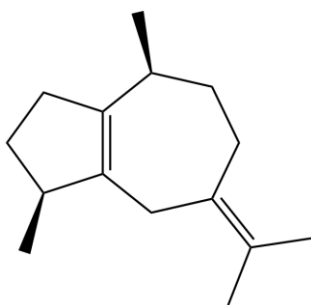
(α)-Tujeno



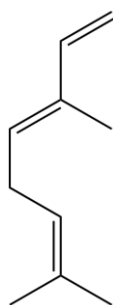
(β)-Cariofileno



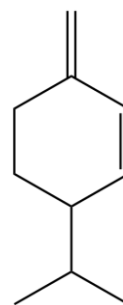
(β)-Fameseno



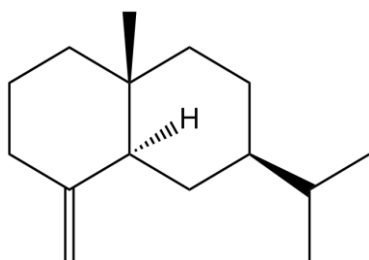
(β)-Guaieño



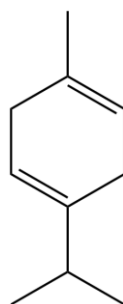
(β)-Ocimeno



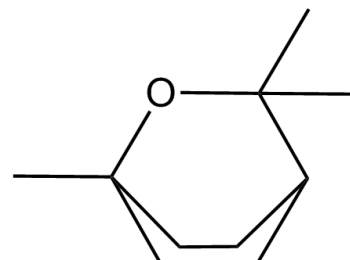
(β)-Felandreno



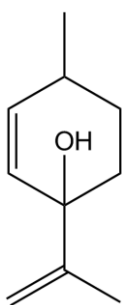
(β)-Selineno



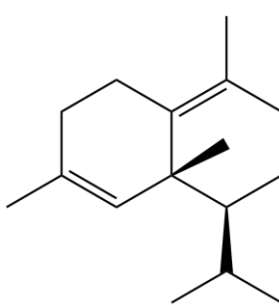
(γ)-Terpineno



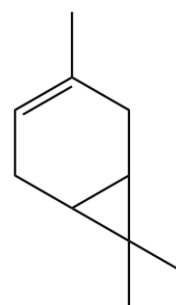
1,8-Cineol



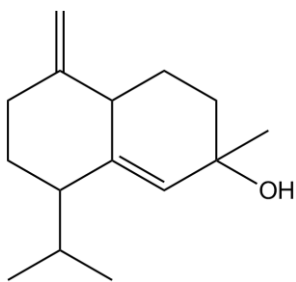
2,8(9)-p-Mentadien-4-ol



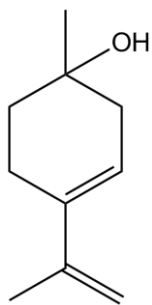
Calameneno



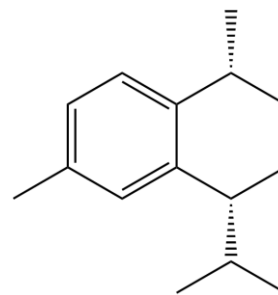
3-Careno



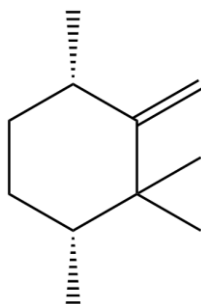
5,10(15)-Cadienen-4-ol



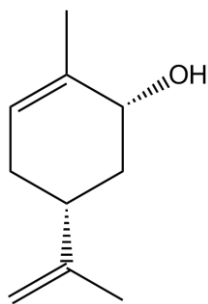
3,8(9)-p-Menthadien-1-ol



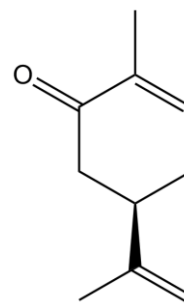
γ-Cadineno



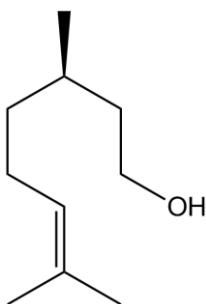
Canfeno



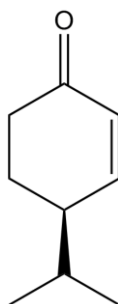
Carveol



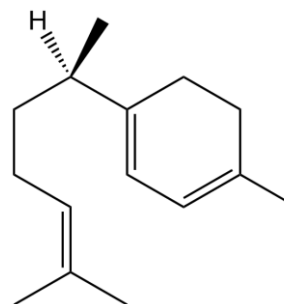
Carvona



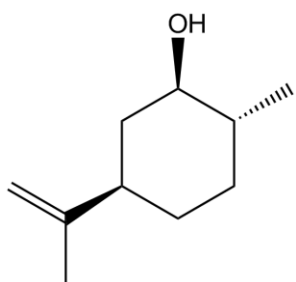
Citronellol



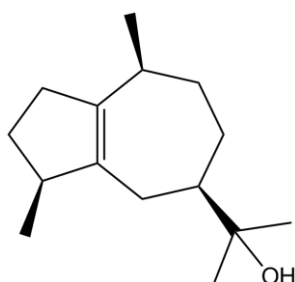
Criptona



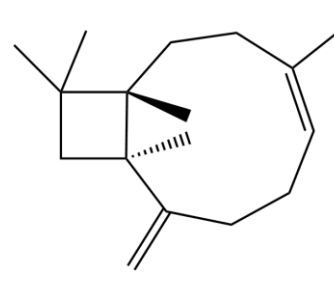
Curcumeno



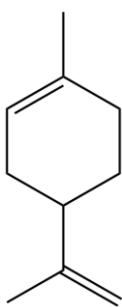
Dihidrocarveol



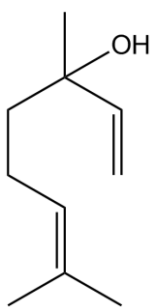
Guaiol



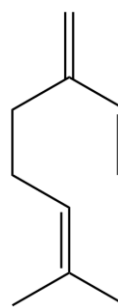
Isocariofileno



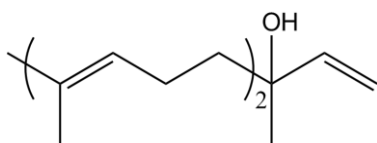
Limoneno



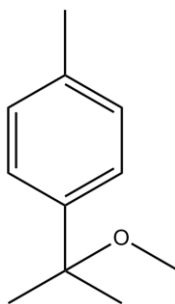
Linalool



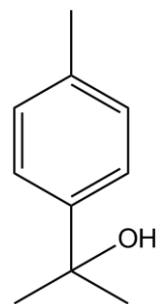
Mirceno



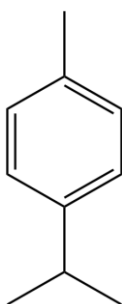
Nerolidol



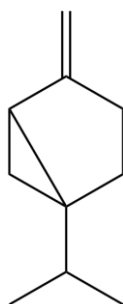
p-Cimen-8-ol



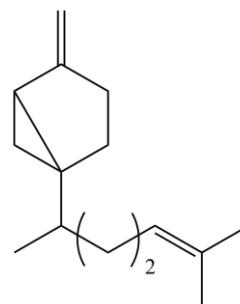
p-Cimen-8-ol metil éter



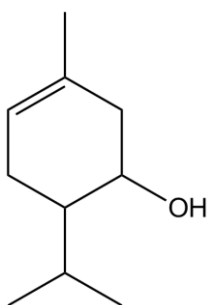
p-Cimeno



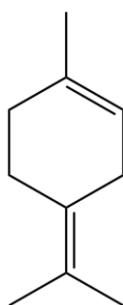
Sabineno



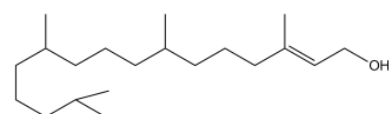
Sesquisabineno



Terpinen-5-ol



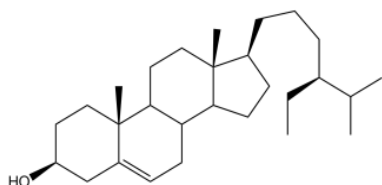
Terpinoleno



Transfitol

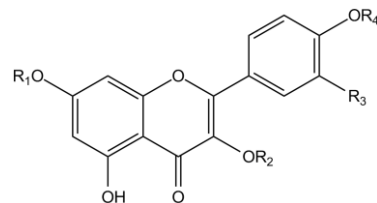
Estruturas	Classe	Estruturas	Classe
------------	--------	------------	--------

Esteróides, Flavonoides, Lignanas, Neolignanas e Propenilfenóis



Sitosterol

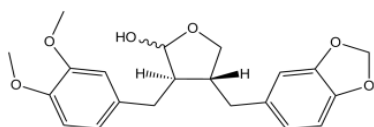
ESTEROIDE



Esqueleto Base

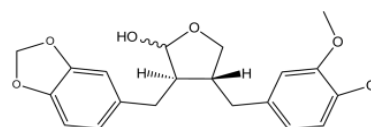
FLAVONAS

Isoquercitrin A	$R_1=R_4=H$; $R_2=\text{glucosil}$; $R_3=OH$
Isorhamnetin A 3-O-(beta)-D-rutinoside	$R_1=H$; $R_2=\text{rutinosil}$; $R_3=OH$; $R_4=CH_3$
Kaempferol 3-O-arabinosídeo-7-rhamnoside	$R_1=\text{rhamnosil}$; $R_2=\text{arabinosil}$; $R_3=R_4=H$
Kaempferol 3-O-(beta)glucosídeo	$R_1=R_3=R_4=H$; $R_2=\text{glucosil}$
Quercetin A 3-O-(beta)-D-galactosídeo	$R_1=R_4=H$; $R_2=\text{galactosil}$; $R_3=OH$
Quercetin A 3-O-(beta)-D-rhamnosídeo	$R_1=R_4=H$; $R_2=\text{rhamnosil}$; $R_3=OH$
Quercetin A 3-O-(beta)-D-rutinosídeo	$R_1=R_4=H$; $R_2=\text{rutinosil}$; $R_3=OH$
Rhamnetin A O-triglusosídeo	$R_1=CH_3$; $R_2=R_4=\text{glucosil}$; $R_3=O\text{-glucosil}$



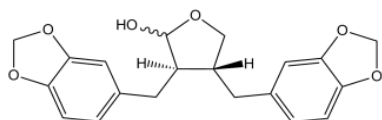
(-)-3,4-Dimetoxi-3,4-dimetilenodioxibebina

LIGNANA



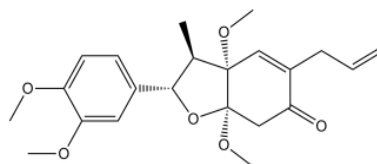
(-)-3',4'-Dimetoxi-3',4'-dimetilenodioxibebina

LIGNANA



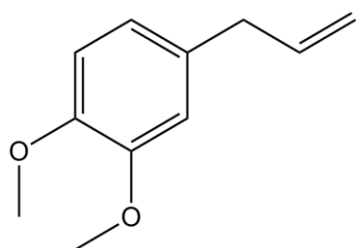
(-)-Cubebina

LIGNANA



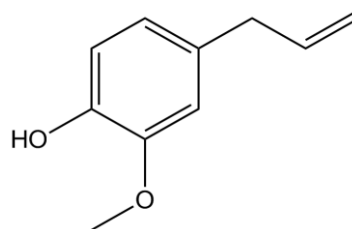
(-)-Piperenona

NEOLIGNANA



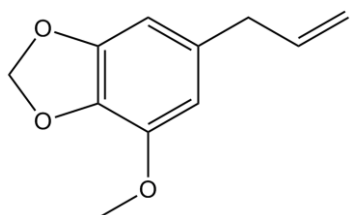
Eugenol

PROPENILFENOL



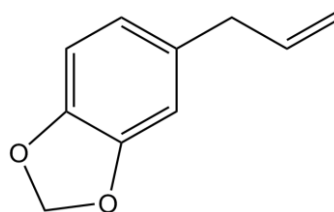
Eugenol metil éter

PROPENILFENOL



Miristicina

PROPENILFENOL



Safrol

PROPENILFENOL

O composto mais conhecido da semente de *P. nigrum* é a amida, a piperina. Ela é o metabólito secundário presente em maior concentração na semente da planta. A análise do germoplasma de *P. nigrum* de diferentes distribuidores da América do Norte mostrou que os níveis de piperina no material de sementes secas flutuavam juntamente com o conteúdo total de piperamida. A semente moída de *P. nigrum*, o grão de pimenta ou a baga seca contém 10,8% em peso de oleorresina, 5,7% em peso de piperina, 1,5% (v/m) de óleo essencial e 9% em peso de água. (SCOTT *et al.*, 2008).

A extração com etanol de frutos *Piper nigrum* resultou em 64,0 mg de extrato por grama de material de partida. Para identificar os constituintes do extrato. A percentagem de piperamina foi quantificada no extrato etanólico de *Piper nigrum* e os resultados foram $36,0 \pm 0,2\%$ para piperina e $4,2 \pm 0,2\%$ para piperilina (SOUZA GRINEVICIUS *et al.*, 2016).

Na Tabela 3 podemos ver a porcentagem m/m da composição química dos grãos explorados comercialmente no Brasil:

Tabela 3. Porcentagem m/m da composição química dos grãos de pimenta-do-reino exploradas no Brasil.

Componente Química	Teor Encontrado no Grão (%)
Amido	22,00-48,00
Cinza	5,00-6,00
Fibra Crua	10,30-18,30
Óleo-resina	10,03-14,80
Óleos essenciais	2,37-5,70
Piperina	39,37-69,09
Resina	5,98-10,06
Umidade	12-14

A partir destes dados, é importante a extração correta dos componentes de interesse para sua elucidação dos componentes químicos dos tecidos vegetais da pimenta-do-reino.

2.4 Fundamentações teóricas das técnicas de extração, quantificação e identificação de compostos orgânicos.

2.4.1 Extração Líquido-Líquido

As diferentes técnicas de extração podem estar baseadas em mecanismos químicos diferentes, como a solubilidade de substâncias no solvente utilizado em função sua polaridade (MOURE *et al.*, 2001; TSAO e DENG, 2004).

O preparo de amostra é uma das etapas críticas do processo analítico e tem sido um dos principais obstáculos para a obtenção de resultados adequados em termos de precisão e detectabilidade. Para minimizar estes problemas, diferentes métodos têm sido propostos a fim de aperfeiçoar e propor alternativas à extração líquido-líquido (L-LE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) convencional.

A LLE é um método clássico de extração e pré-concentração de analitos. No entanto, distingue-se pelo longo tempo de preparo, requer grandes volumes de solventes orgânicos, além de envolver várias etapas que estão associadas com as perdas de analito e ocorrência de contaminação (OJEDA e ROJAS, 2011).

A extração líquido-líquido pode ser assistida por ultrassom. O ultrassom pode acelerar a formação de uma solução turva fina, aumentando a eficiência de extração, porém, o tempo necessário para a extração é superior. Em contrapartida, tem-se redução no consumo de solventes e melhora na eficiência da extração (MOREIRA *et al.*, 2014).

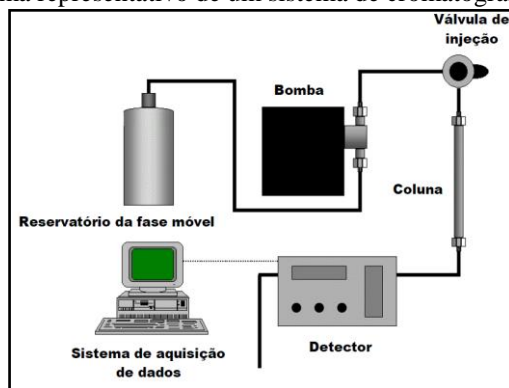
Assim como o uso de ultrassom, o uso de vórtex reduz o consumo de solventes e melhora a eficiência da extração. Comparado com a extração assistida por ultrassom, o vórtex é lento por conta da ausência de formação de gotículas submicrométricas, que no ultrassom aumenta significativamente a superfície de contato entre os dois líquidos, resultando em transferência de analito rápida e eficiente. No entanto, a extração assistida por ultrassom por longos períodos pode causar a decomposição dos analitos (M.-I. Leong *et al.*, 2014).

2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição (SKOOG, DOUGLAS *et al.*, 2013). Consiste em um método físico-químico de separação, que ocorre através de diferentes interações entre as substâncias presentes em uma mistura e a interface entre dois ambientes químicos imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel (HUIE, 2002).

Esta técnica emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua eficiência para efetuar a separação, a identificação e a quantificação das espécies químicas, isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como por exemplo a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (CEFET-RIO DE JANEIRO, 2010; PALOSCHI, 1998).

Figura 4. Esquema representativo de um sistema de cromatografia (Fraige, 2012).



2.4.3 Espectrofotometria UV-Vis

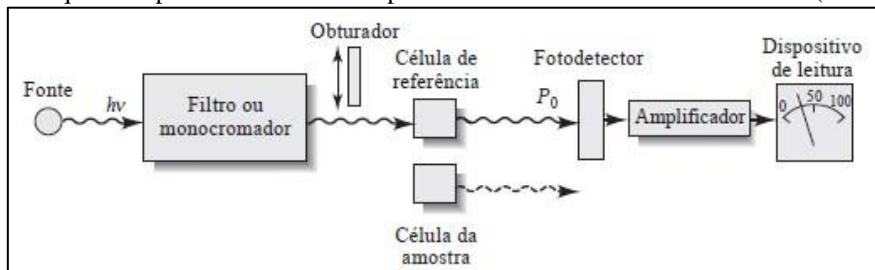
Um espectrômetro é um instrumento espectroscópico que utiliza um monocromador ou um policromador juntamente com um transdutor para converter as intensidades radiantes em sinais elétricos. Os espectrofotômetros oferecem a vantagem considerável de que o comprimento de onda pode ser alterado continuamente tornando possível registrar-se um espectro de absorção. Os fotômetros apresentam as vantagens da simplicidade, da robustez e do baixo custo. A maioria dos espectrofotômetros cobre a região do UV/visível.

A espectroscopia de absorção molecular nas regiões espectrais ultravioleta e visível é amplamente utilizada para a determinação quantitativa de um grande número de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas. A faixa de trabalho da espectroscopia UV-Vis fica na região de comprimento de onda de 190 a 800 nm (SKOOG, DOUGLAS *et al.*, 2013).

A espectroscopia de absorção molecular baseia-se na medição da transmitância T ou da absorbância A de soluções contidas em células transparentes com um comprimento de célula em b centímetros. Normalmente, a concentração de um analito absorvente é linearmente relacionada à absorvidade molar ϵ , conforme a lei de Beer:

$$A = -\log T = \epsilon b[\text{analito}]$$

Figura 5. Esquema representativo de um espectrofotômetro UV/Vis de feixe único (Skoog, 2013).



2.4.4 Arranjo de Fotodiodo

Os fotodiodos são dispositivos semicondutores de junção pn que respondem à luz incidente por meio da formação de pares elétron-vacâncias. Quando uma voltagem é aplicada a um diodo pn de forma que o semicondutor do tipo p seja negativo em relação ao semicondutor tipo n , o diodo é dito estar reversamente polarizado.

Um diodo de silício pode funcionar como um detector de radiação porque os fótons ultravioleta e visível são suficientemente energéticos para criar elétrons e vacâncias adicionais quando atingem a camada de depleção da junção pn . O aumento da condutividade é medido facilmente e é diretamente proporcional à potência radiante.

Os fotodiodos de silício tornaram-se importantes recentemente porque 1.000 ou mais deles podem ser fabricados lado a lado em uma única lâmina de silício. Com um ou dois arranjos de diodos colocados ao longo da extensão do plano focal de um monocromador, todos os comprimentos de onda podem ser monitorados simultaneamente, tornando assim possível a espectroscopia de alta velocidade. (SKOOG, DOUGLAS *et al.*, 2013).

2.4.5 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica que pode ser utilizada para a análise e elucidação estrutural de compostos químicos. A elucidação estrutural se baseia na detecção das propriedades magnéticas dos núcleos (LUZYANIN & ABRANTES, 2010).

Para que um determinado isótopo possa ser analisado por RMN é necessário que este tenha propriedades específicas de spin, massa ímpar ou número atômico ímpar ou ambos ímpar (PAVIA *et al.*, 2010).

Os núcleos dos átomos são vistos como pequenos cones com carga que giram em torno do seu eixo, gerando campo magnético local. Com base neste fenômeno, a

amostra é colocada sob efeito de intenso campo magnético onde os núcleos ficam alinhados com um campo B_0 e absorvem energia, mudando a orientação de spin em relação ao campo quando a frequência do aparelho corresponde exatamente à frequência de ressonância característica do núcleo (que se designa por frequência de Larmor). Desligando a fonte de radiação eletromagnética, os núcleos retomam a sua orientação original emitindo radiação que origina um sinal elétrico. Após tratamento matemático (como, por exemplo, transformação de Fourier - FT) é possível traçar um gráfico da intensidade do sinal em função da frequência aplicada a que chamamos espectro de RMN (CLARIDGE, 2009; PAVIA *et al.*, 2010).

A frequência da radiação de radiofrequência que é absorvida por um dado núcleo é fortemente afetada pelo seu ambiente químico, isto é, por elétrons e núcleos próximos, por isso cada núcleo analisado gera sinal elétrico característico e único (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Um espectro de RMN típico mostra aumento do deslocamento químico expresso em partes por milhão (ppm) da direita para esquerda. Isso implica que os prótons menos protegidos eletronicamente aparecerão mais à esquerda e os mais protegidos, à direita do espectro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração e Caracterização de Pimenta-do-Reino

3.1.1 Obtenção e preparo do extrato hidroalcoólico das folhas, frutos e talo de *P. nigrum*

A planta de espécie *P. nigrum* foi coletada no município de Porto Velho, Rondônia à data de 30 de maio de 2016. As folhas, frutos maduros, frutos verdes e talo foram separados, secos, pulverizados, pesados e recebidos pela Embrapa Agroindústria Tropical.

Pesaram-se em tubos de ensaio aproximadamente 50 mg da amostra pulverizada de cada tecido vegetal para o preparo do extratos. O preparo de cada extrato foi realizado em duplicata.

À amostra, adicionou-se 4 mL de Hexano, homogeneizado durante 1 min em Agitador de Tubos tipo Vortex com plataforma em Viton e Lavadora Ultrassônica modelo USC-1400 pelo período de 20 min.

À fração resultado da extração dos componentes apolares, adicionou-se 4 mL de solução Et-OH/H₂O-Milli-Q (70:30 v/v), homogeneizou-se durante 1 min em Agitador de Tubos e Lavadora Ultrassônica pelo período de 20 min. A fração foi centrifugada por 10 min sob rotação de 2500 rpm em Centrífuga Clínica Modelo 80-2b Ângulo Fixo para 12 Tubos 15 ml.

A fase inferior de cada duplicata, resultado da extração dos componentes polares, de Et-OH/H₂O foi coletada e reunida em frascos de vidro de 10 mL previamente tarados. A fase superior, Hexânica, foi descartada segundo POP (Procedimento de Operações Padrão) de descarte de resíduos da Embrapa.

Para análise em CLAE, filtrou-se uma alíquota de 1 mL com auxílio de filtro com membrana de PTFE hidrofóbico, diâmetro do filtro 13 mm, diâmetro do poro 0,22 µm da marca Allcrom. A alíquota foi coletada em vial transparente de 2 ml e diâmetro 9 mm com septo duplo PTFE/Silicone.

As frações hidroalcoólicas de Folha, Talo, Fruto Verde e Fruto Maduro em frascos de vidro de 10 mL foram secas e pesadas. Os extratos foram armazenados em local protegido contra umidade e calor.

3.1.2 Análise do perfil cromatográfico por CLAE analítica

Para avaliar as características de retenção dos compostos presentes em cada fração e absorção UV-Vis das amostras, as frações foram analisadas por CLAE. Os extratos analisados foram os de *Piper nigrum* Folha, Talo, Fruto Verde e Fruto Maduro. Aproximadamente 2,0 mg de cada fração foram solubilizados em 1,0 mL de EtOH/H₂O (70:30 v/v) e filtradas através de membranas de PTFE com poros de 0,22 µm de 13 mm de diâmetro da marca Simplepure™ Syringe filters (EUA). As análises das 4 frações foram realizadas em aparelho UFLC da marca Shimadzu, equipado com injetor automático, detector UV-Vis com arranjo de fotodiodo a uma faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, em fluxo de 2 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL.

Os solventes empregados apresentavam grau HPLC (CH₃CN e H₂O-Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Phenomenex). A fase móvel consistiu de solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila pura (solvente B), com gradiente de eluição do método utilizado variando de 5 % a 95 % de B de 0 a 25,0 min, em seguida elevando para 100 % de B durante 3 min, encerrando a 5 % do solvente B por 3 min para lavar, recondicionar e atingir o equilíbrio do sistema.

3.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ¹H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/¹⁵N-³¹P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”. A amostra escolhida para análise, Fruto Maduro de *P. nigrum*, apresentou sinal de maior intensidade para o provável composto: a piperina, detectada via cromatografia e correlação com dados UV-Vis da literatura. A amostra foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 5 mg da sua fração em 600 µL de solução hidrometanólica de clorofórmio deuterado.

3.1.4 Espectrofotometria UV-Vis

Para determinação dos polifenóis totais, utilizou-se a metodologia descrita por Obanda e Owuor (1997), com adaptações (SILVEIRA, 2010). Como solução padrão, utilizou-se ácido gálico nas concentrações de 0,007 a 0,070 mg mL⁻¹ em etanol 10%, na qual foi gerada uma curva de calibração. Os valores de absorbância de cada concentração foram lidos e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por 100g de amostra.

As 4 frações de *P. nigrum* obtidas na secagem dos frascos de penicilina foram previamente diluídos em 5 mL de Et-OH/H₂O (10:90 v/v), e realizadas medidas com alíquotas variando de 25 µL a 300 µL, para avaliação da concentração padrão de análise para todas as condições de extração.

Em tubos de ensaios, tomou-se alíquota de 50µL da solução amostral e adicionou-se 450µL de água destilada para o volume reacional de 0,5 mL. Adicionou-se 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e, após 3 minutos, 0,5 mL de Na₂CO₃/H₂O (20:80 m/v) e 3,5 mL de água destilada.

A solução de cor preparada repousou durante o período de 60 minutos em local escuro. Após o tempo de espera, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a comprimento de onda selecionado de 725 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido dos constituintes polares de cada tecido vegetal da espécie *P. nigrum*, mostra que o processo de extração empregado é viável para estudos de caracterização, uma vez que remove do extrato os constituintes apolares de pouco interesse.

No extrato hidroalcoólico da Folha, o rendimento percentual apresentado foi o maior obtido, valor de 45,8%. Dentre os quatro tecidos vegetais analisados, o Fruto Maduro apresentou o menor, a 29,0%.

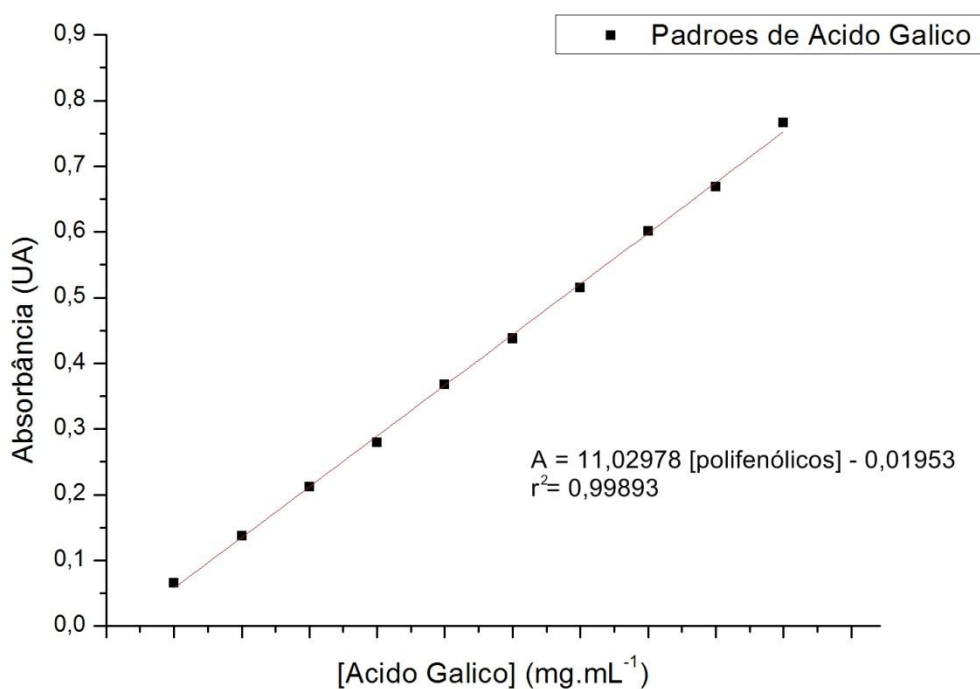
Tabela 4. Dados referentes à extração do ExtHA.

Descrição	Tecido Vegetal	Massa de Extrato Hidroalcoólico (mg)	Rendimento de Extração (%)
<i>Piper nigrum</i>	Folha	22,9000	45,8
<i>Piper nigrum</i>	Talo	15,3000	30,6
<i>Piper nigrum</i>	Fruto Verde	15,1000	30,2
<i>Piper nigrum</i>	Fruto maduro	14,5000	29,0

4.2 Determinação de Polifenólicos Totais

A curva de calibração para determinação de polifenólicos totais adquirida está apresentada abaixo.

Figura 6. Curva de calibração para determinação de polifenólicos em concentrações de 0,007mg mL⁻¹ a 0,070 mg mL⁻¹ de Ácido Gálico.



As amostras de *Piper nigrum* e o branco amostral preparado com água destilada e reagente de Folin-Ciocalteu obtiveram os seguintes valores de Absorbância experimental:

Tabela 5. Dados de absorbância para polifenólicos totais das soluções de branco, Fruto Maduro, Fruto Verde, Talo e Folha.

Amostra	BRANCO	Fruto Maduro	Fruto Verde	Talo	Folha
1	0,0016	0,0728	0,0943	0,1007	0,3281
2	0,0015	0,0658	0,0816	0,0938	0,3243
3	0,0018	0,0813	0,0990	0,01025	0,3239

Aplicando Teste Q¹, ou de Dixon, para todas as amostras da distribuição, observamos que nenhum dos valores apresentados é suspeito, portanto fazemos o trabalho estatístico para determinação da concentração de polifenólicos, representada por [polifenólicos], com uso de todos os valores.

Sabendo que:

$$A = Coef_{Linear} + Coef_{Angular} [Polifenólicos]_{diluída}$$

$$[Polifenólicos] = [Polifenólicos]_{diluída} Fator_{dilução}$$

$$[Polifenólicos]_{média} = \frac{\sum_{i=1}^N [Polifenólicos]_i}{N}, \text{ onde } N \text{ é o número de amostras}$$

$$S = \frac{\sum_{i=1}^N ([Polifenólicos]_i - [Polifenólicos]_{média})^2}{N - 1}$$

$$DV = \sqrt{S}$$

Tabela 6. Dados das Amostras analisadas via Espectrofotometria UV-Vis para polifenólicos totais.

AMOSTRA	[Polifenólicos] (mg 5mL ⁻¹)	[Polifenólicos] _{média} (mg 5mL ⁻¹)	Variância (S)	Desvio Padrão (mg 5mL ⁻¹)	[Polifenólicos] (% m/m)
Fruto	0,8223	0,8269	4,9525E-03	0,0704	5,7025
Maduro	0,7589				
	0,8994				
Fruto	1,0172	0,9931	6,6600E-03	0,0816	6,5766
Verde	0,9021				
	1,0599				
	1,0753	1,0599	1,7336E-03	0,0416	6,9272
Talo	1,0127				
	1,0916				
	3,1370	3,1128	4,4175E-04	0,0210	13,5930
Folha	3,1025				
	3,0989				

O ExtHA Folha possui maior teor de constituintes químicos de polifenólicos, apresentando o dobro percentual se comparado aos outros tecidos vegetais de *P. nigrum* analisados. Esse resultado é esperado uma vez que as folhas da espécie *Piper nigrum* são a maior

¹ Teste Q ou teste de Dixon determina se o valor mais extremo em uma amostra é um *outlier*.

fonte dos constituintes flavonoides e propenilfenóis, enquanto os Frutos Verde e Maduro são ricos em alcalóides.

A partir dos baixos valores de Desvio Padrão, o teste de Folin utilizado é reproduzível e robusto para os tecidos vegetais de *Piper nigrum* estudados.

4.3 CLAE-AFD

A análise de CLAE-DAD das 4 frações originadas do ExtHA dos tecidos vegetais estudados de *Piper nigrum* proporcionou a detecção de 53 compostos. A **Tabela 7** relaciona o tempo de retenção de cada constituinte e as respectivas frações em que o sinal UV-Vis característico é observado.

Tabela 7. Tempo de Retenção dos constituintes químicos apresentados nos tecidos vegetais de *Piper nigrum*.

Tempo de Retenção (min)	FRAÇÃO			
	FOLHA	FRUTO VERDE	FRUTO MADURO	TALO
5,35	—	—	—	SIM
5,50	—	—	—	SIM
5,70	SIM	—	—	—
6,61	—	—	—	SIM
6,77	—	—	—	SIM
6,82	SIM	—	—	—
6,94	—	—	—	SIM
7,40	SIM	—	—	SIM
10,89	SIM	—	—	—
12,06	SIM	—	—	—
12,15	—	SIM	SIM	—
12,43	—	—	SIM	—
12,58	—	—	SIM	—
12,78	—	SIM	—	—
12,84	—	—	SIM	—
12,87	—	—	—	SIM
13,20	—	SIM	SIM	—
13,35	—	—	—	SIM
13,42	SIM	—	—	—
13,42	—	SIM	SIM	—
13,51	—	—	—	SIM
13,72	—	SIM	SIM	SIM
14,46	—	SIM	—	SIM
14,51	SIM	—	—	—

14,70	—	—	—	SIM
15,02	—	SIM	SIM	—
15,19	—	SIM	SIM	—
15,34	SIM	—	—	—
15,47	—	SIM	SIM	—
15,47	—	—	—	SIM
15,50	—	—	—	SIM
15,69	—	SIM	SIM	—
15,80	—	—	SIM	—
15,82	—	—	SIM	—
15,83	—	—	—	SIM
15,99	—	SIM	—	—
16,67	—	SIM	—	—
16,69	—	—	—	SIM
16,82	—	—	SIM	—
17,26	—	—	SIM	—
17,42	SIM	SIM	—	—
17,55	SIM	SIM	SIM	SIM
17,86	—	SIM	—	—
17,96	—	—	SIM	—
18,14	—	SIM	SIM	—
19,10	—	SIM	SIM	SIM
19,27	SIM	—	—	—
19,71	—	—	SIM	—
19,86	SIM	SIM	—	—
19,91	—	—	—	SIM
20,08	—	SIM	SIM	—
23,54	SIM	—	—	—

A partir dos dados da tabela acima, determina-se que o tecido vegetal Folha apresenta 13 componentes químicos detectados; Fruto Verde, 19 componentes químicos; Fruto Maduro, 21 componentes químicos; e Talo, 19 componentes químicos detectados. Destes, um componente com $T_r = 17,55$ min aparece em todos os tecidos vegetais e outros 15 componentes aparecem simultaneamente em dois ou mais tecidos vegetais diversos. São esses:

Tabela 8. Tempo de Retenção dos constituintes químicos apresentados nos tecidos vegetais de *Piper nigrum* a fim de comparar os perfis fitoquímicos.

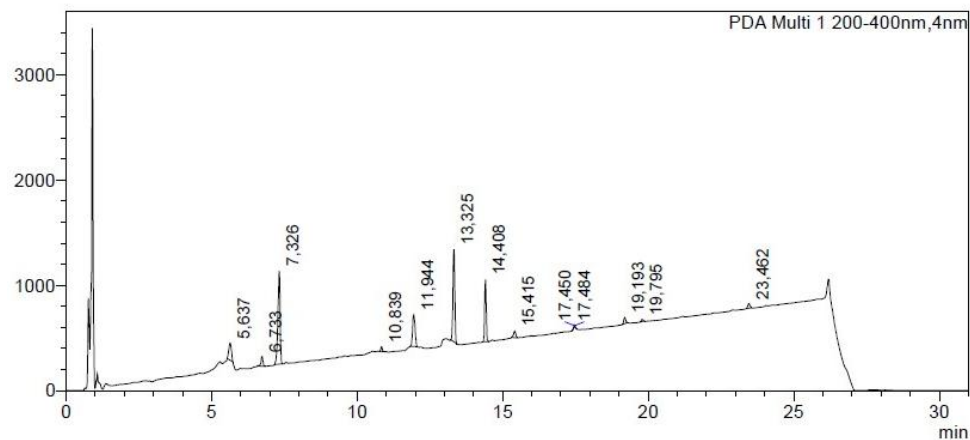
Tempo de Retenção (min)	FRAÇÃO			
	FOLHA	FRUTO VERDE	FRUTO MADURO	TALO
7,40	SIM	—	—	SIM
12,15	—	SIM	SIM	—

13,20	—	SIM	SIM	—
13,42	—	SIM	SIM	—
13,72	—	SIM	SIM	SIM
14,46	—	SIM	—	SIM
15,02	—	SIM	SIM	—
15,19	—	SIM	SIM	—
15,47	—	SIM	SIM	—
15,69	—	SIM	SIM	—
17,42	SIM	SIM	—	—
18,14	—	SIM	SIM	—
19,10	—	SIM	SIM	SIM
19,86	SIM	SIM	—	—
20,08	—	SIM	SIM	—

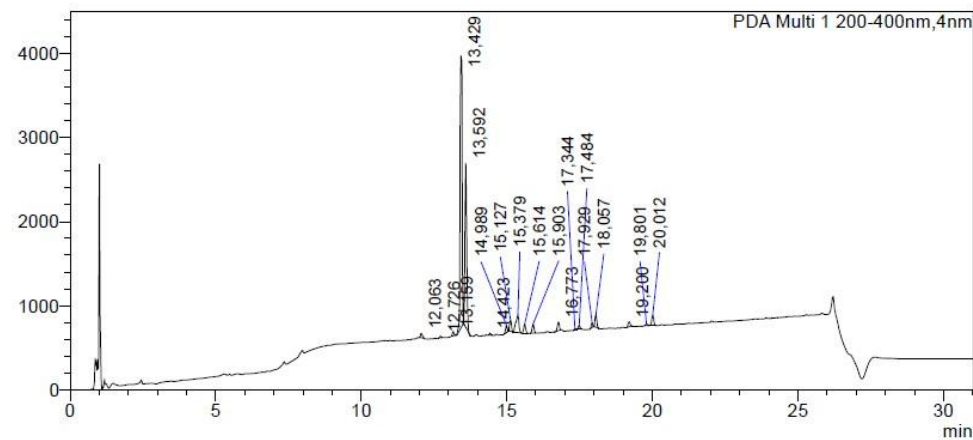
Os extratos hidroalcoólicos de Fruto Verde e Maduro, especificamente, possuem 12 constituintes químicos em comum. Os picos de maior intensidade destes extratos aparecem em $T_r = 13,42$ min e são característicos para a piperina, identificado a partir da comparação entre o espectro UV-Vis apresentado na Tabela 9 e o espectro da literatura segundo ADOS-RAKU (2013) na figura 8.

Para a identificação dos sinais da Tabela 7, utilizou-se os cromatogramas de CLAE-DAD apresentados abaixo com seus respectivos tempos de retenção.

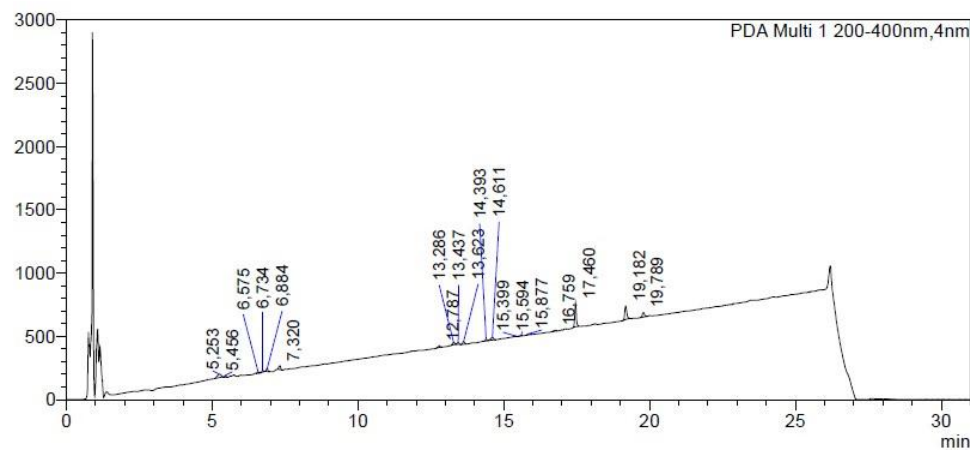
Figura 7. Cromatogramas CLAE-DAD 200-400 nm para *Piper nigrum* Folha (A), Talo (C), Fruto Maduro (B) e Fruto Verde (D).



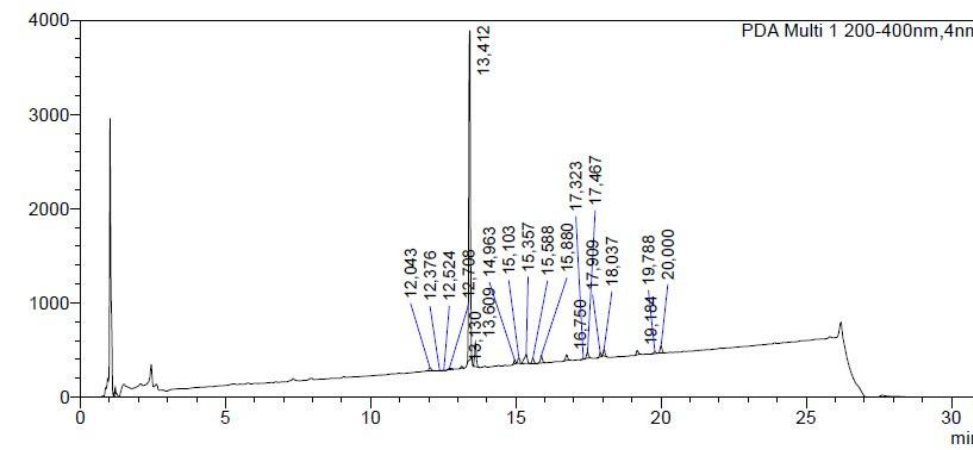
A



B



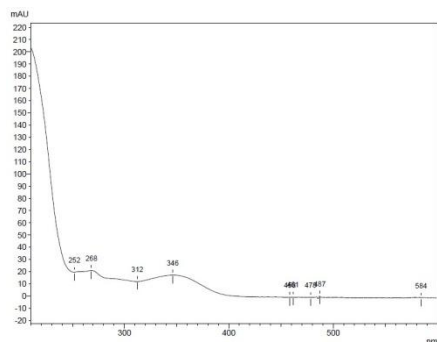
C



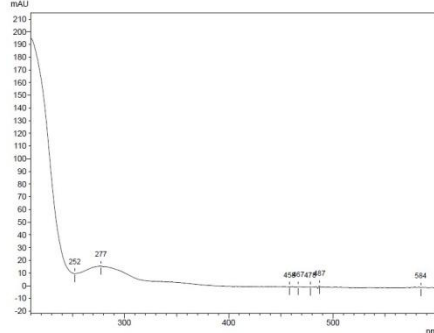
D

A **Tabela 9** abaixo apresenta os espectros de UV-Vis para os sinais obtidos de cada pico e seus tempos de retenção:

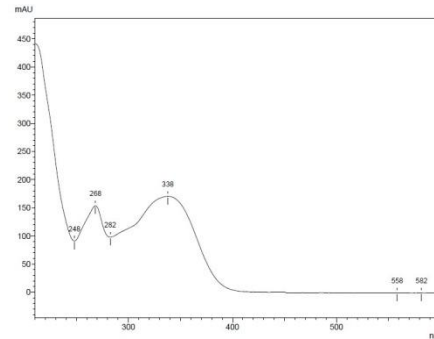
Tabela 9. Espectros UV-Vis para os picos dos constituintes químicos apresentados nos tecidos vegetais *Piper nigrum* e tempo de retenção.



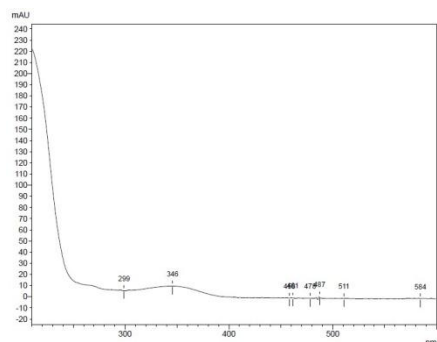
$T_r = 5,35$ min



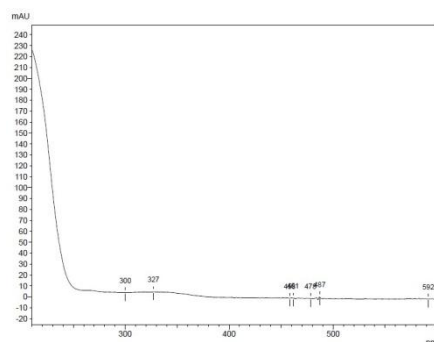
$T_r = 5,5$ min



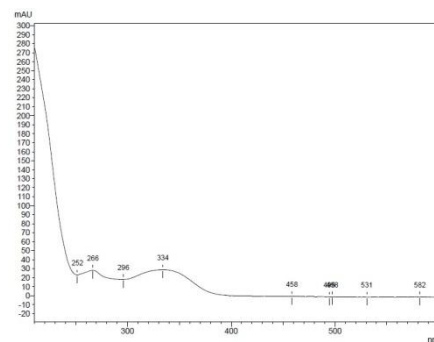
$T_r = 5,7$ min



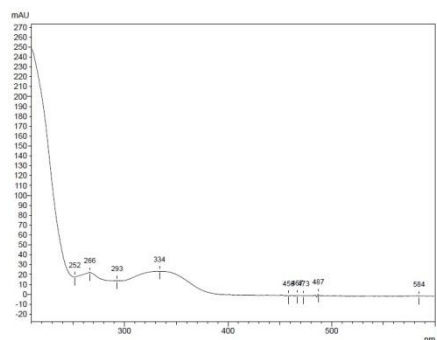
$T_r = 6,61$ min



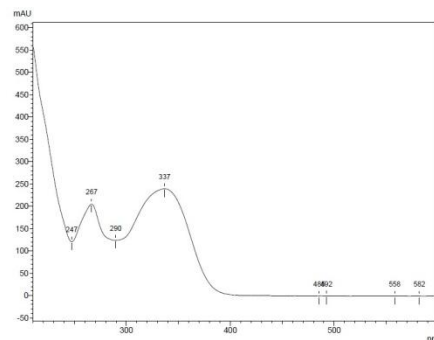
$T_r = 6,77$ min



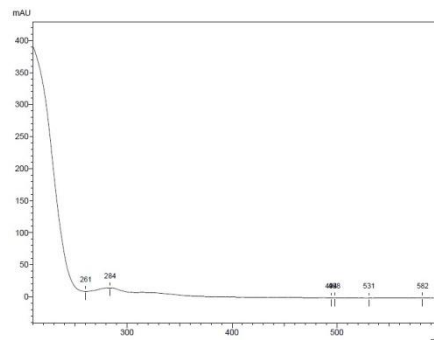
$T_r = 6,82$ min



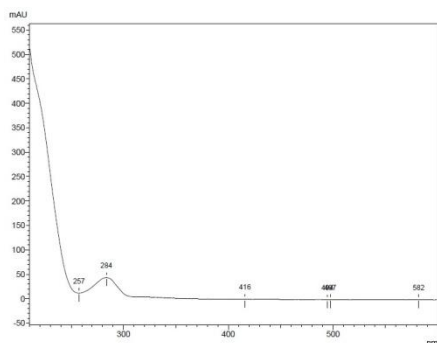
$T_r = 6,94$ min



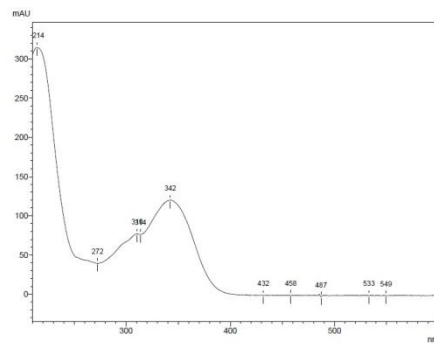
$T_r = 7,40$ min



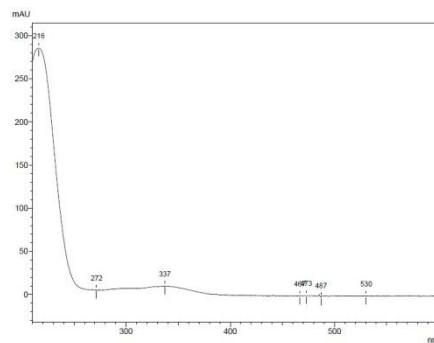
$T_r = 10,89$ min



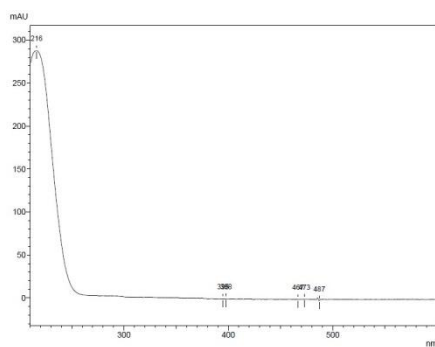
$T_r = 12,06$ min



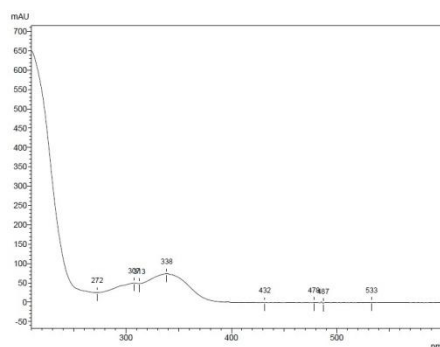
$T_r = 12,15$ min



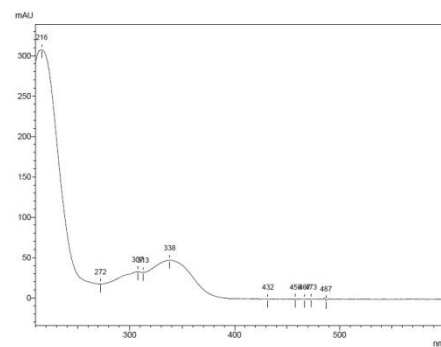
$T_r = 12,43$ min



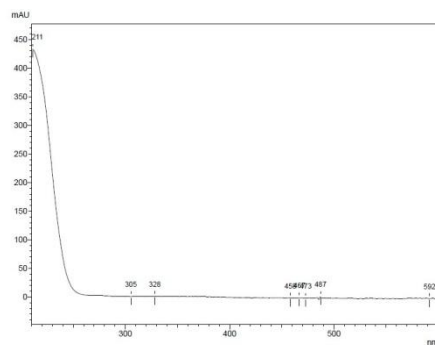
$T_r = 12,58 \text{ min}$



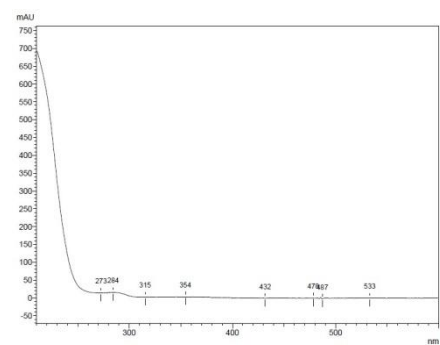
$T_r = 12,78 \text{ min}$



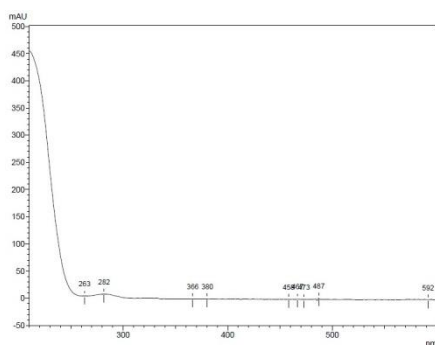
$T_r = 12,84$



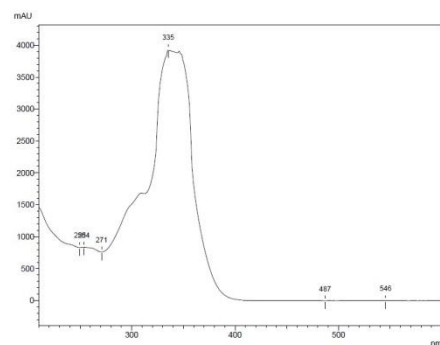
$T_r = 12,87 \text{ min}$



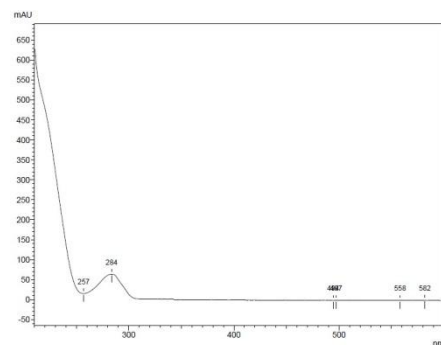
$T_r = 13,20 \text{ min}$



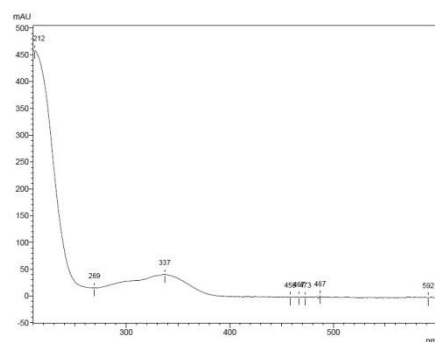
$T_r = 13,35 \text{ min}$



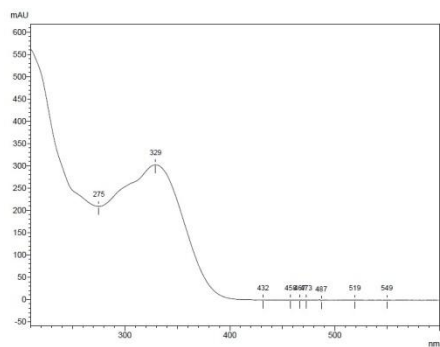
$T_r = 13,42 \text{ min}$



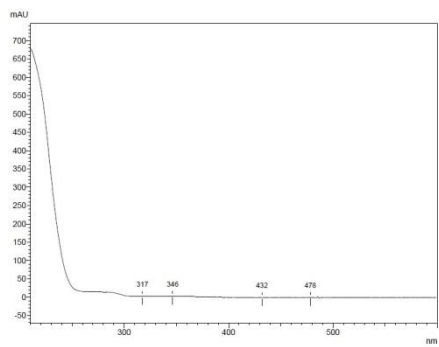
$T_r = 13,42 \text{ min}$



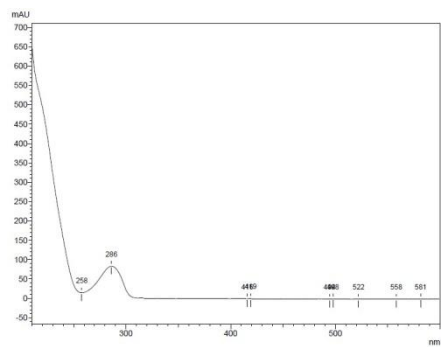
$T_r = 13,51$



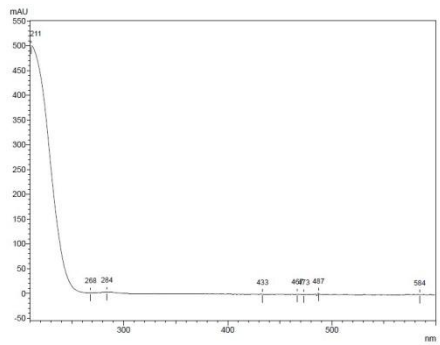
$T_r = 13,72$ min



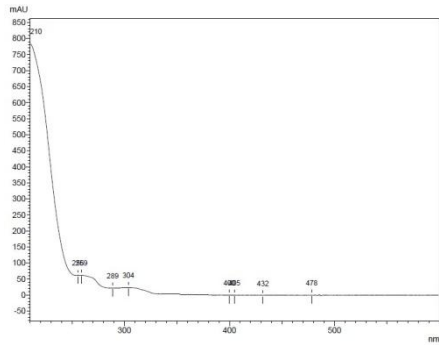
$T_r = 14,46$ min



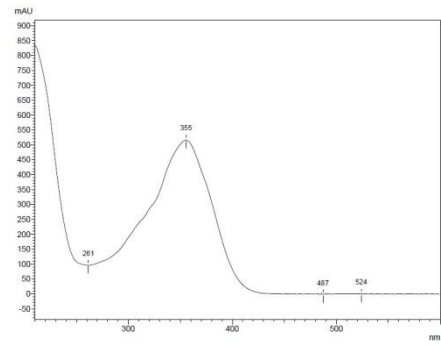
$T_r = 14,51$ min



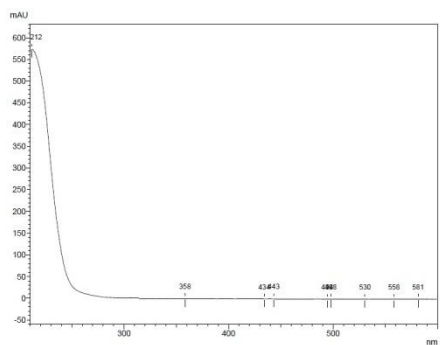
$T_r = 14,70$ min



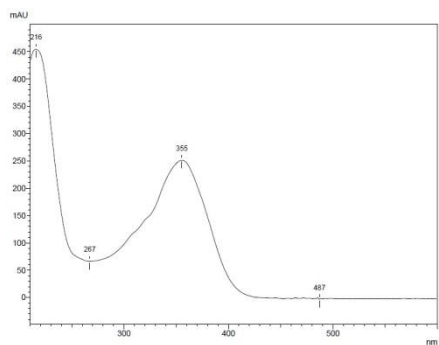
$T_r = 15,02$ min



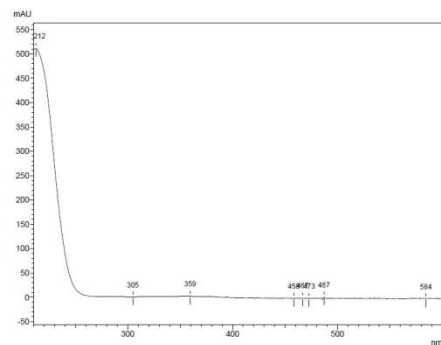
$T_r = 15,19$ min



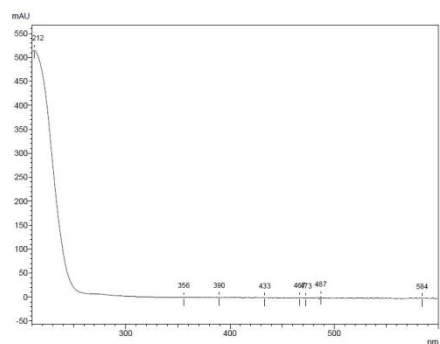
$T_r = 15,34$ min



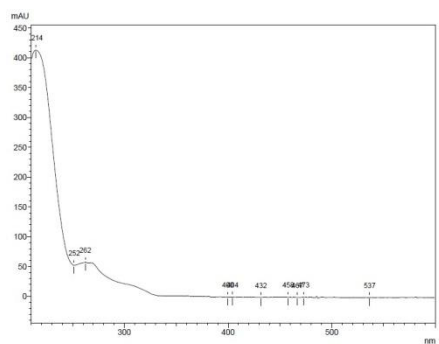
$T_r = 15,47$ min



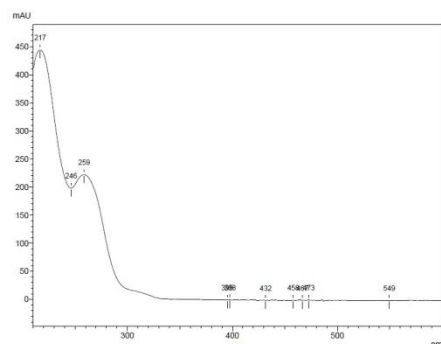
$T_r = 15,47$ min



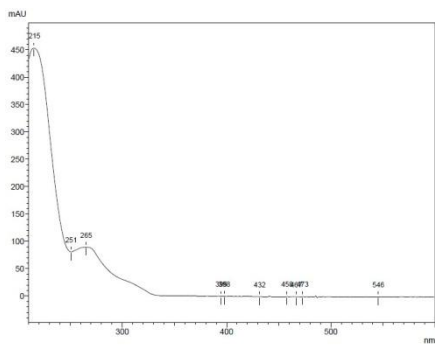
$T_r = 15,50$ min



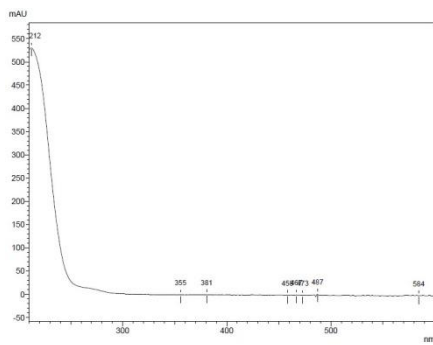
$T_r = 15,69$ min



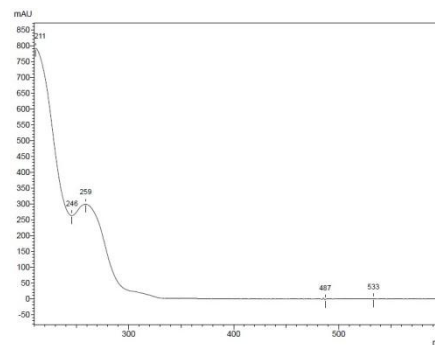
$T_r = 15,80$ min



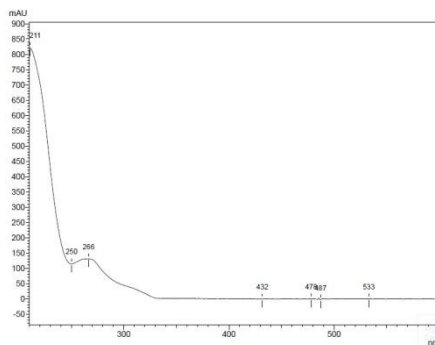
$T_r = 15,82 \text{ min}$



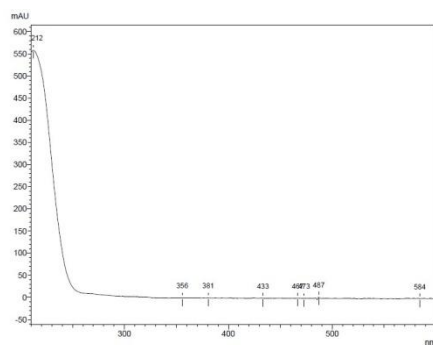
$T_r = 15,83$



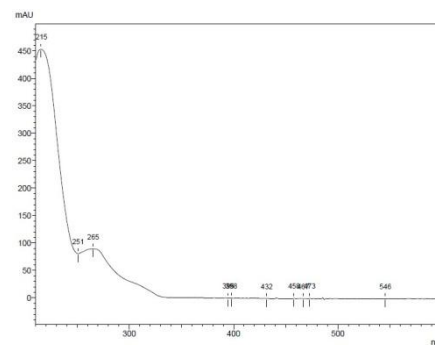
$T_r = 15,99 \text{ min}$



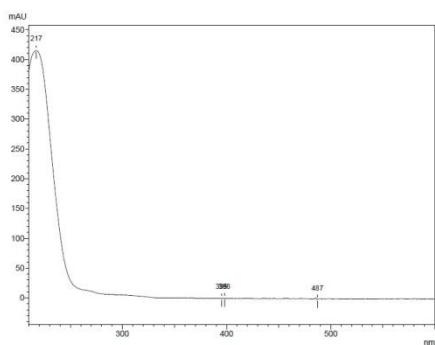
$T_r = 16,67 \text{ min}$



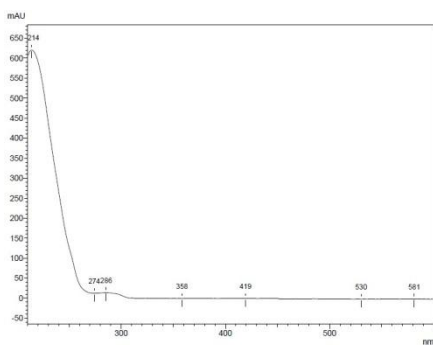
$T_r = 16,69 \text{ min}$



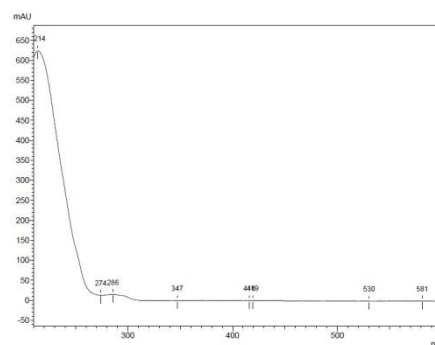
$T_r = 16,82 \text{ min}$



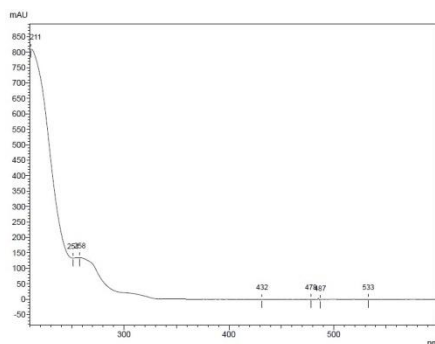
$T_r = 17,26 \text{ min}$



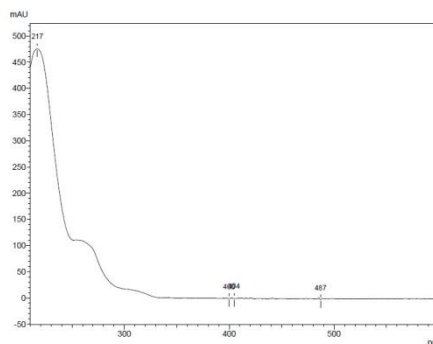
$T_r = 17,42 \text{ min}$



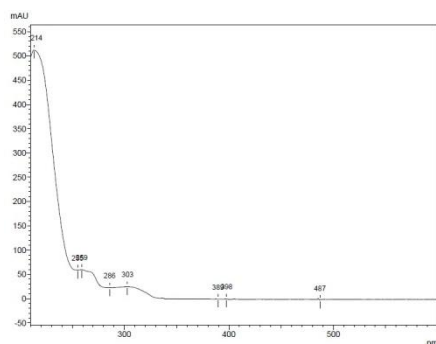
$T_r = 17,55 \text{ min}$



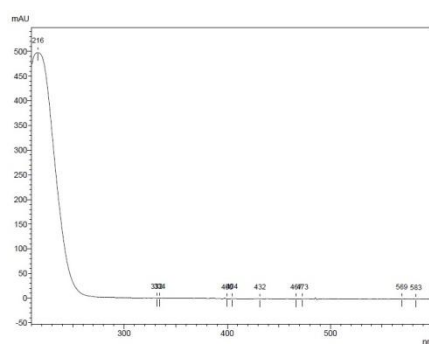
$T_r = 17,86 \text{ min}$



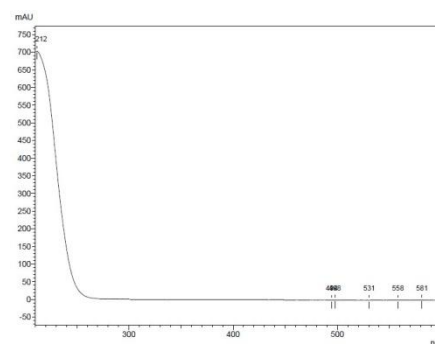
$T_r = 17,96 \text{ min}$



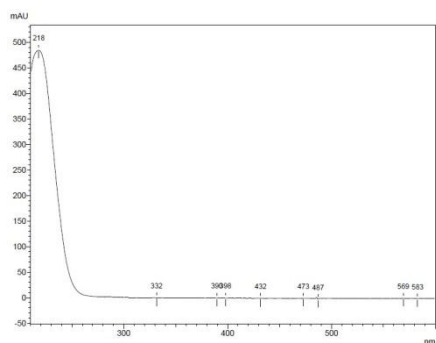
$T_r = 18,14 \text{ min}$



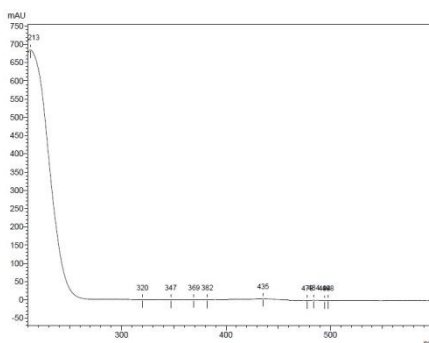
$T_r = 19,10 \text{ min}$



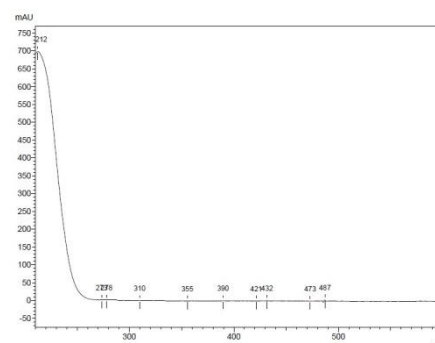
$T_r = 19,27 \text{ min}$



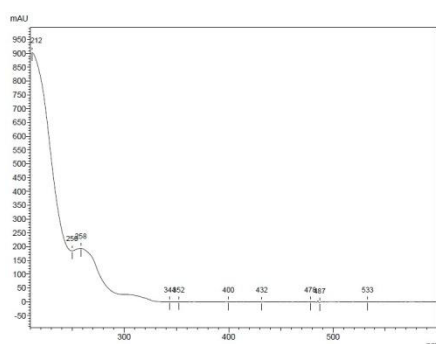
$T_r = 19,71 \text{ min}$



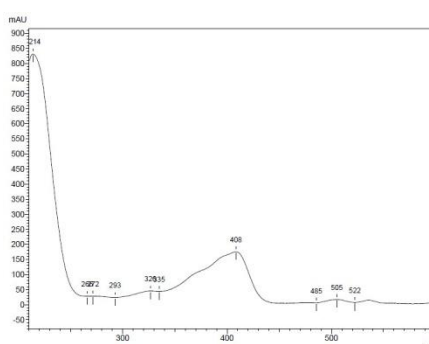
$T_r = 19,86 \text{ min}$



$T_r = 19,91 \text{ min}$



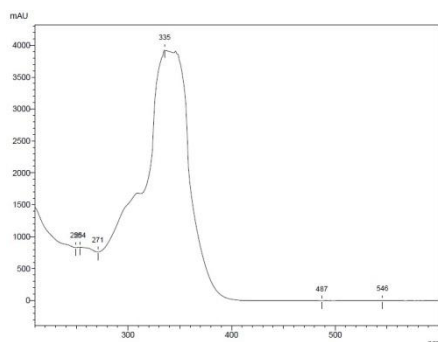
$T_r = 20,08 \text{ min}$



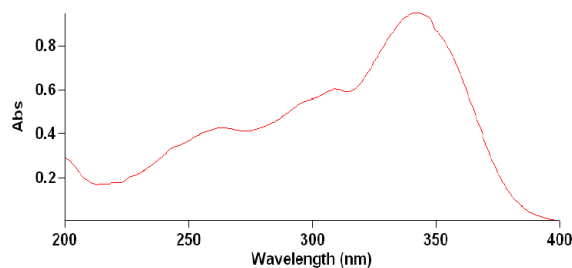
$T_r = 23,54 \text{ min}$

A partir dos T_r apresentados acima, podemos verificar a presença do componente químico piperina como majoritário nos ExtHA de Fruto Verde e Fruto Maduro de acordo com os dados da literatura para a substância e o espectro UV-Vis em $T_r = 13,42$.

Figura 8. Espectro UV-Vis da Piperina relatados na literatura (ADOSRAKU, 2013) comparados com o composto majoritário no ExtHA de Fruto Maduro e Verde.



$T_r = 13,42$ min



Espectro UV-Vis literatura

4.4 Caracterização química da piperina

O espectro de RMN de ^1H (600MHz, CDCl_3) apresentou sinais de 1,6 a 7,4 ppm. Os hidrogênios olefínicos aparecem em três dubletos largos, todos na faixa de δH 6,43-6,77 e um multipeto em δH 7,40, correspondentes aos hidrogênios 5, 6, 7 e 1. Foram observados também sinais para hidrogênios aromáticos em δH 6,87; 6,88 e 6,96 e dioximetilênicos em δH 5,95. Os hidrogênios do anel piperidínico aparecem na faixa δH 1,56 a 3,59.

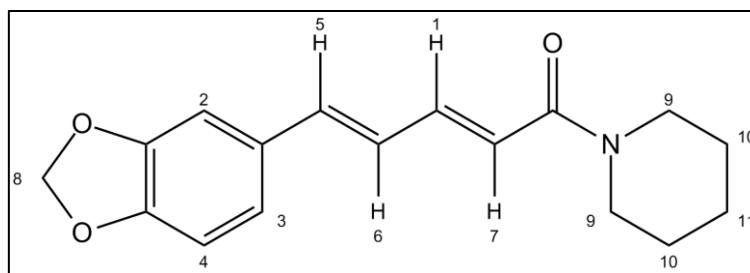
Através deste experimento foram atribuídos na **Tabela 10** os sinais dos hidrogênios do constituinte alcaloide majoritário da fração Fruto Maduro de *P. nigrum* foram devidamente identificados, compatíveis com os apresentados na literatura (WENKERT *et al.*, 1971).

Tabela 10. Dados de deslocamento químico em RMN ^1H (150 MHz, CDCl_3) da Piperina relatados na literatura (WENKERT *et al.*, 1971) comparados com o ExtHA de Fruto Maduro, respectivamente.

Posição	Piperina (Literatura)	Piperina (Fruto Maduro)
	δH	δH
1	7,38	7,40 (m)
2	6,93	6,96 (d)
3	6,71	6,73 (d)
4	6,81	6,88 (dd)
5	6,73	6,77 (d)
6	6,80	6,87 (s)
7	6,38	6,43 (d)
8	5,92	5,95 (s)
9	3,59	3,62 (d)
10	1,70	1,62 (m)
11	1,56	1,62 (m)

Abaixo, na **Figura 9** a estrutura e os espectros de RMN ^1H da fração de *Piper nigrum* Fruto Maduro, na qual demonstrou maior sinal para Piperina ($t_r = 13,42$ min).

Figura 9. Estrutura da piperina com hidrogênios sinalizados.



A partir da correspondência do δH das Figuras 10 e 11, em que se mostra os sinais de hidrogênio respectivos a cada hidrogênio sinalizado na Figura 9, a elucidação da estrutura da piperina é realizada.

Figura 10. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do ExtHA *P. nigrum* Fruto Maduro.

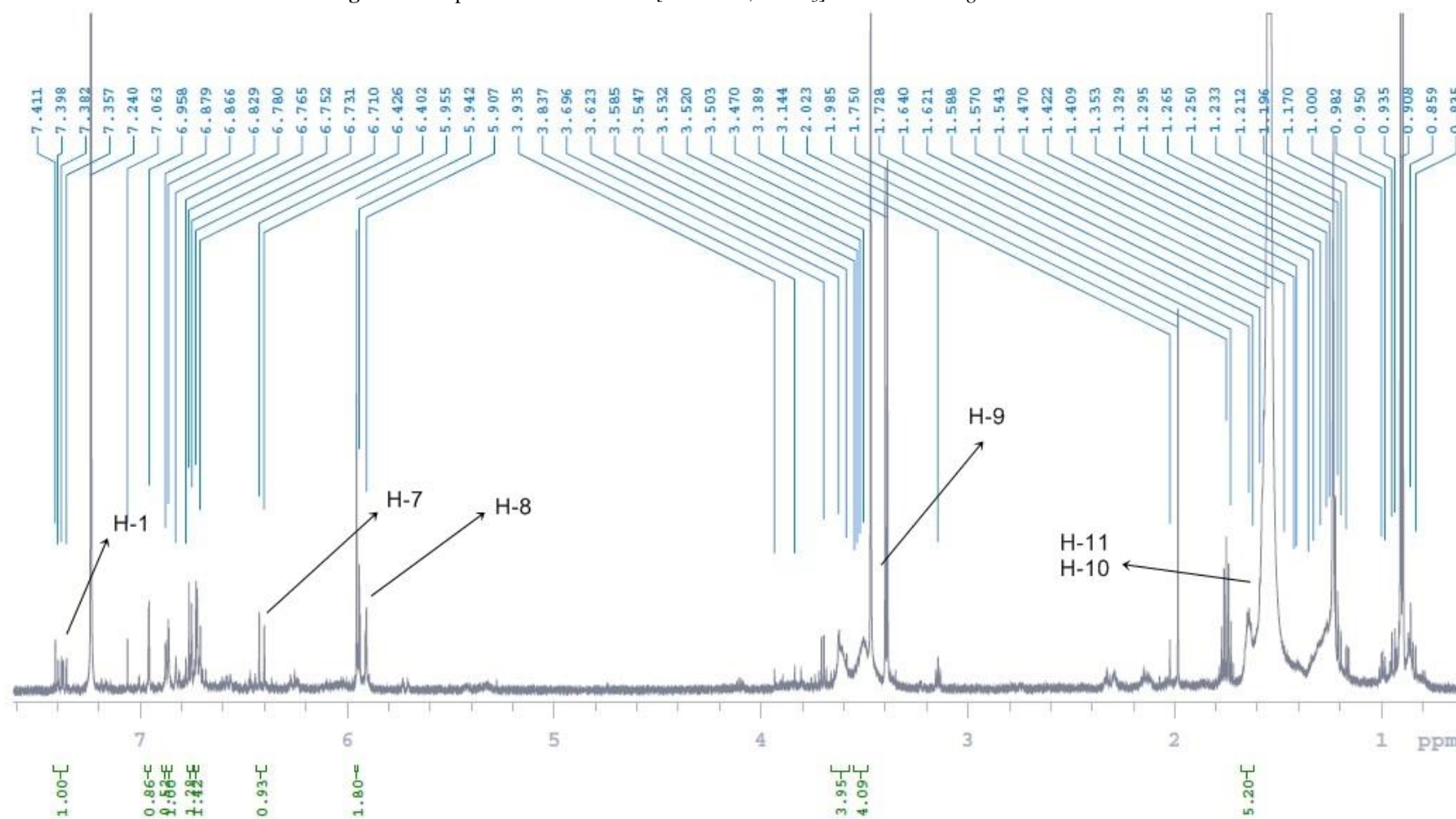
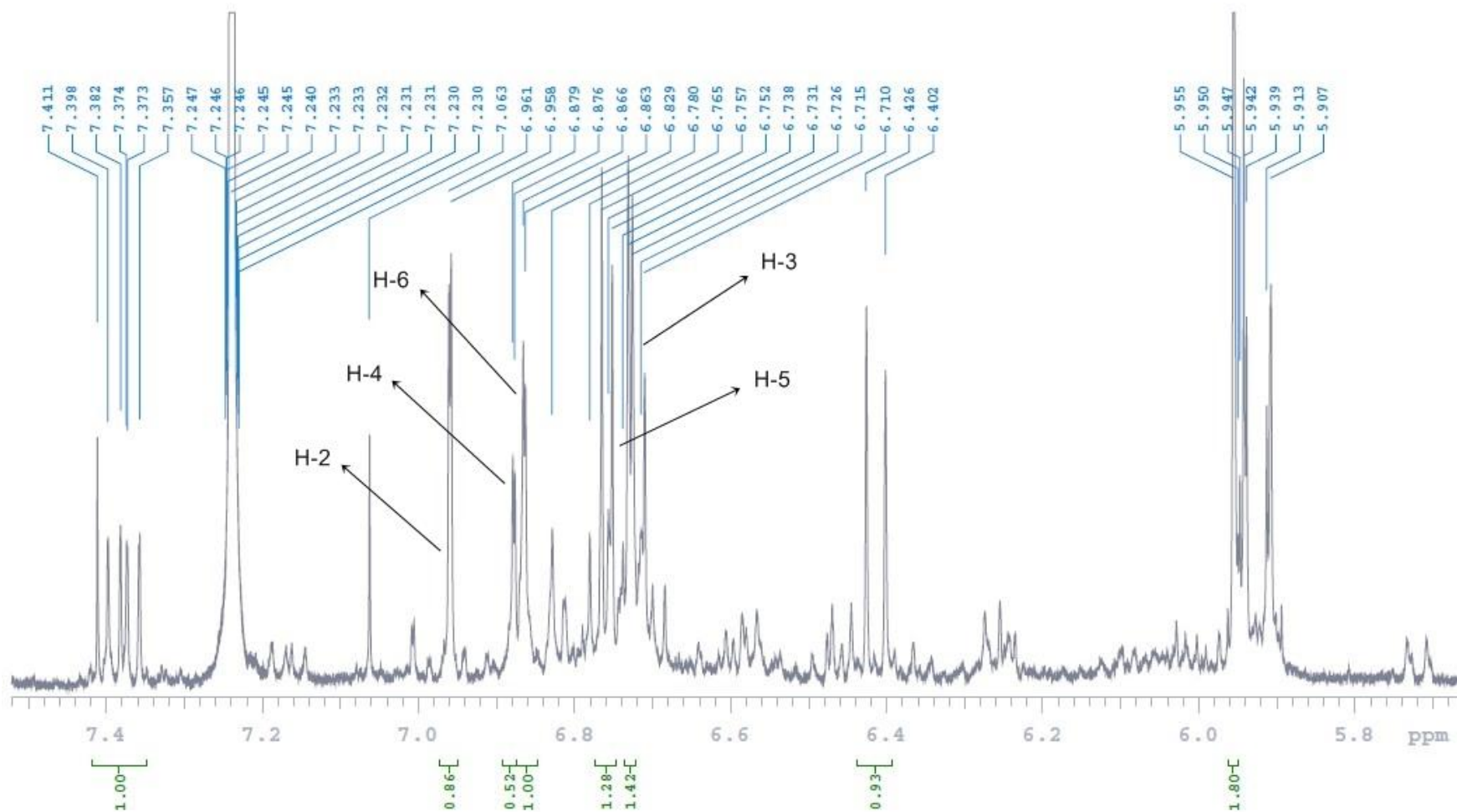


Figura 11. Expansão do espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do ExtHA *P. nigrum* Fruto Maduro.



5 CONCLUSÃO

O estudo de Cromatografia permitiu a elaboração do perfil fitoquímico dos extratos de *Piper nigrum* e posterior investigação via Espectrofotometria UV-Vis para a quantificação de polifenólicos totais nos extratos de *P. nigrum*, fornecendo dados sobre o teor da classe de Flavonas e Propenilfénois de cada tecido vegetal analisado, onde o tecido vegetal Folha apresentou maior teor de polifenólicos.

A análise cromatográfica permitiu a detecção de 53 compostos nos extratos de *Piper nigrum*, reunião dos compostos identificados comparando sua presença nos diversos tecidos vegetais estudados, das quais um desses constituintes foi identificado e 15 outros estão presentes simultaneamente em mais de um tecido vegetal.

Através da análise por Ressonância Magnética Nuclear da fração obtida do extrato hidroalcoólico dos frutos maduros de *Piper nigrum*, pode-se caracterizar um composto majoritário da espécie, derivado de alcaloide, classe de substâncias comum no gênero *Piper*. A estrutura caracterizada foi estabelecida como piperina.

Desta forma, por meio dos resultados obtidos no presente trabalho, vê-se necessária continuidade nas atividades com a intenção de caracterizar outras ou até mesmo novas substâncias.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, H. D. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10–15, 2001.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, Vol. 75, No. 6, 2010.

BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

CEFET-RIO DE JANEIRO. Análise instrumental - cromatografia líquida de alta resolução. **Apostila**, 2010.

CELIO, F. et al. Introdução de cultivares de pimenta-do-reino na Amazônia Ocidental. p. 11–14, [s.d.].

CLARIDGE, T. D. W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. **Tetrahedron organic chemistry series**; 27, n. 27, 2009.

DE SOUZA GRINEVICIUS, V. M. A. et al. Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 189, p. 139–147, 2016.

EPSTEIN, W. W.; NETZ, D. F.; SEIDEL, J. L. Isolation of piperine from black pepper. **Journal of Chemical Education**, v. 70, n. 7, p. 598, 1993.

FRAIGE, K. Estudo comparativo do perfil metabolômico e proteômico de uvas (Vitis HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 23–30, 2002.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. D. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21–46, 2004.

KELLNER, D. **Coleção Plantar Pimenta do reino**. [s.l: s.n.].

KÖHLER, F. E. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte. **Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur. Pharmacopoeia of the United States of America**, 1914.

LEE, D.; APARNA, P. **Piper: A model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution**. [s.l: s.n.]. v. 15

- LEE RAY, D. **On food and cooking (1984)**. [s.l: s.n.]. v. 13
- LEONG, M.; FUH, M.; HUANG, S. Beyond dispersive liquid – liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 2–14, 2014.
- LUZYANIN, K.; ABRANTES, M. Ressonância Magnética Nuclear - Ferramenta Versátil em Química Farmacêutica e Imaginologia Médica. **Química, Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 117, n. 2, p. 25–30, 2010.
- Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino. [s.d.].
- MGBEAHURUIKE, E. E. et al. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54–69, 2017.
- MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.
- NELSON, S. C.; CANNON, E. Black pepper. **Farm and Forestry Production**, v. 45, n. 1, p. 14, 2011.
- PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597–673, 1997.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 1. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002.
- RAIMUNDO JR, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjo de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83–88, 1997.
- SCOTT, I. M. et al. A review of Piper spp . (Piperaceae) phytochemistry , insecticidal activity and mode of action. p. 65–75, 2008.
- SIMMLER, C.; NAPOLITANO, J. G.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 51–59, 2014.
- SKOOG, DOUGLAS, A.; WEST, DONALD, M.; HOLLER, JAMES, F.; CROUCH, STANLEY, R. **Fundamentos da Química Analítica**. 8 ed, Cengage learning, 2013.
- TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **J. Chromatog. B**, v. 812, p. 85-99, 2004.
- Universidade de São Carlos. São Carlos, p. 210. 2012.
- vinífera) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bioanalíticas [Tese].

WANG, Y.-H. et al. Anticancer Principles from Medicinal Piper (胡椒 Hú Jiāo) Plants. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 8–16, 2014.

WENKERT, E. et al. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy with the Aid of a Paramagnetic Shift Agent. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 23, p. 6271–6273, 1971.