



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

João Pedro Doelo Pereira Leite

Análise química e avaliação da atividade antioxidante de extratos de *Piper fuliginum* (galhos) e *Piper macedoi* (galhos e frutos)

Uberlândia – MG

2023

João Pedro Doelo Pereira Leite

Análise química e avaliação da atividade antioxidante de extratos de *Piper fuliginum* (galhos) e *Piper macedoi* (galhos e frutos)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de Bacharelado em Química Industrial.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientação: Prof^a. Dr^a. Raquel Maria Ferreira de Sousa

Uberlândia – MG

2023

João Pedro Doelo Pereira Leite

Análise química e avaliação da atividade antioxidante de extratos de *Piper fuliginum* (galhos) e *Piper macedoi* (galhos e frutos)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de Bacharelado em Química Industrial.
Área de concentração: Química Orgânica

Uberlândia, Minas Gerais, 23 de junho de 2023

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Raquel Maria Ferreira de Sousa (Orientador- UFU)

Ma. Tiara da Costa Silva (Examinador – UFU)

Prof. Dr. Alberto de Oliveira (Examinador – UFU)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por possibilitar a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Donizzetti Tavares Leite e Eloisa Pereira Leite, aos meus tios e tias por todo esforço, apoio e dedicação para a realização dos meus sonhos e aos meus primos, Isaac Pereira Simas e Enzo Pereira Simas, que são como irmãos para mim, por todo companheirismo. Amo muito vocês.

Agradeço em especial minha vó, Dolorinda Lopes Pereira, que infelizmente não pode ver a conclusão desse trabalho, pela paciência, palavras de conforto e conhecimento, nos momentos mais difíceis, para sempre amarei a senhora.

Aos professores pelos ensinamentos adquiridos em especial a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Raquel Sousa pela orientação, dedicação, compreensão e enorme paciência durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Só tenho a agradecer. Obrigado por tudo!

A todos os meus amigos, aqueles que se mantem até hoje e aqueles que infelizmente a vida afastou. Agradeço pelos bons momentos que vivemos juntos ao longo de toda a graduação.

A todos os pesquisadores e amigos do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPPeN), em especial o doutorando Diego Godina e ao doutorando Augusto Hubaide Nozella, por toda paciência e conhecimento que contribuíram para a construção desse trabalho.

Ao CNPQ pelas bolsas de pesquisa que foram de grande ajuda durante o desenvolvimento do trabalho. À FAPEMIG e CAPES pelo auxílio à pesquisa.

E por fim agradeço também à UFU e ao Instituto de Química por ter me dado à chance e todas as ferramentas que permitiram chegar hoje ao final desse ciclo de maneira satisfatória.

RESUMO

O Brasil apresenta uma flora muito vasta, classificada em seis biomas de características diferentes entre si, o que torna as pesquisas na área de produtos naturais muito promissoras. O Cerrado, que é o segundo maior bioma da América do Sul, se destaca por apresentar grande biodiversidade e espécies muito distintas. Neste contexto, o gênero *Piper* apresenta diversos usos na medicina popular e estudos farmacológicos vem sendo desenvolvidos para avaliar as atividades biológicas reportadas. Neste trabalho, extratos de galhos de *Piper fuliginum* e de galhos e frutos de *Piper macedoi* foram preparados e avaliados quando a prospecção fitoquímica através da cromatografia em camada delgada (CCD), onde foi possível anotar as seguintes classes de compostos: flavonoides, antraquinonas, antronas e cumarinas com o uso de reagentes colorimétricos, bem como análise por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (CLAE-EM-IES) para anotação dos compostos presentes nos extratos através da comparação com a literatura. Também foi avaliada a atividade antioxidante, pelo método de sequestro de DPPH, obtendo resultados de CE_{50} inferiores a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ que indicam uma boa atividade antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE: Piperaceae; anotação de compostos; atividade antioxidante; produtos naturais; Cerrado; DPPH; compostos fenólicos; CLAE-EM.

ABSTRACT

Brazil presents a very vast flora, classified into six biomes with different characteristics, which makes research in the area of natural products very promising. Cerrado, which is the second largest biome in South America, stands out for its great biodiversity and highly distinct species. In this context, the *Piper* genus has various uses in folk medicine, and pharmacological studies have been developed to evaluate the reported biological activities. In this work, extracts from branches of *Piper fuliginum* and branches and fruits of *Piper macedoi* were prepared and evaluated through phytochemical prospecting using thin-layer chromatography (TLC), where the following classes of compounds were observed: flavonoids, anthraquinones, anthrones, and coumarins, using colorimetric reagents, as well as analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) to annotate the compounds present in the extracts by comparison with the literature. Antioxidant activity was also evaluated using the DPPH scavenging method, obtaining EC50 values lower than 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, indicating good antioxidant activity.

KEYWORDS: Piperaceae; compound annotation; antioxidant activity; natural products; Cerrado; DPPH; phenolic compounds; LC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Exemplos de medicamentos antibacterianos inspirados em produtos naturais reportados por Newman e Cragg (2020)	11
Figura 2:	Exemplos de kavalactona (1), derivado prenilado do ácido benzoico (2) e cromanona (3) identificados em <i>P. fuliginum</i>	16
Figura 3:	Estrutura da <i>trans</i> - β -ocimene	17
Figura 4:	Classificação dos artigos sobre <i>P. arboreum</i> em relação ao tipo de estudo	18
Figura 5:	Classificação dos artigos sobre <i>P. arboreum</i> de acordo com o tipo de atividade biológica avaliada	19
Figura 6:	Distância entre os pontos de coleta das espécies	21
Figura 7:	Extratos hexânicos e etanólicos obtidos dos galhos e frutos das espécies <i>P. fuliginum</i> e <i>P. macedoi</i>	23
Figura 8:	Estrutura do DPPH na forma radicalar e na forma reduzida	29
Figura 9:	Mecanismo da reação entre compostos fenólicos e o radical DPPH	30
Figura 10:	Compostos anotados nos extratos hexânicos e etanólicos dos galhos e frutos da <i>Piper macedoi</i> e galhos da <i>Piper fuliginum</i>	39
Figura 11:	Classificação dos compostos anotados nos extratos da <i>Piper macedoi</i> e <i>Piper fuliginum</i>	40
Figura 12:	Classificação dos compostos anotados nos extratos hexânicos e etanólicos da <i>Piper macedoi</i> e <i>Piper fuliginum</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Trabalhos realizados com a espécie <i>P. fuliginum</i>	15
Tabela 2:	Dados sobre os materiais vegetais utilizados na extração e volume de solvente	22
Tabela 3:	Rendimento da extração	26
Tabela 4:	Prospecção fitoquímica dos extratos dos galhos de <i>Piper fuliginum</i> e dos galhos e frutos de <i>Piper macedoi</i>	28
Tabela 5:	Relação entre os valores CE ₅₀ e a intensidade de atividade antioxidante	31
Tabela 6:	Valores de CE ₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH dos extratos da <i>P. macedoi</i> e <i>P. fuliginum</i>	31
Tabela 7:	Proposta de anotação dos compostos via LC-MS nos extratos de <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i> (continua)	34
Tabela 8:	Compostos anotados via LC-MS nos extratos de <i>Piper fuliginum</i> e <i>Piper macedoi</i>	37

LISTA DE ABREVIACOES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC ₅₀	Concentrao citotóxica que inibe 50% da viabilidade das células
CCD	Cromatografia de camada delgada
CE ₅₀	Concentrao efetiva que inibe 50% da resposta avaliada
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EE	Extrato etanólico
EH	Extrato hexânico
EM	Espectrometria de massas
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
IES	<i>Electrospray</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentrao inibitória que inibe 50% da viabilidade das células
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
NuPPeN	Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais

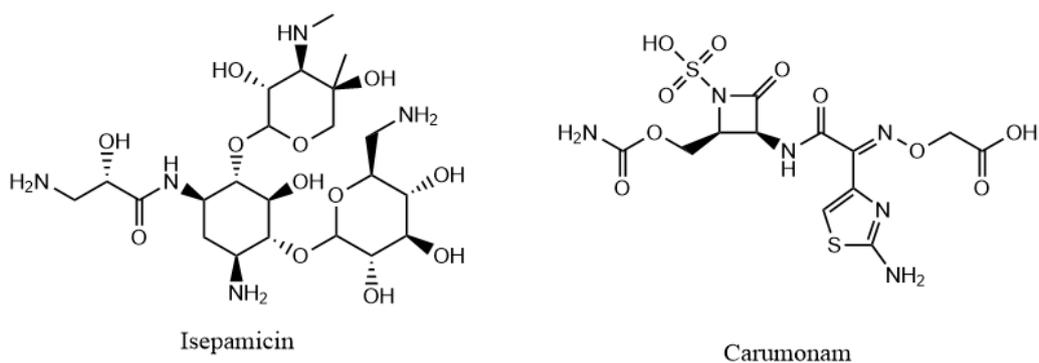
SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVO	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3.	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	14
3.1	Espécies do Gênero <i>Piper</i>	14
3.1.1	<i>Piper fuliginum</i>	15
3.1.2	<i>Piper macedoi</i>	16
3.1.3	<i>Piper arboreum</i>	18
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
4.1	Instrumentação	20
4.2	Materiais e Reagentes	20
4.3	Coleta e Preparo do Material Vegetal	20
4.4	Avaliação do Teor de Umidade	22
4.5	Preparo de Extratos	22
4.6	Prospecção Fitoquímica	23
4.7	Atividade Antioxidante (DPPH)	24
4.8	Análise de Composição Química dos Extratos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1	Teor de Umidade e Preparo de Extratos	26
5.2	Prospecção Fitoquímica	27
5.3	Atividade Antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH	29
5.4	Análise da Composição Química dos Extratos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas	33
6.	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	APENDICE	49

1. INTRODUÇÃO

A importância dos produtos naturais dentro da sociedade moderna é indiscutível, entretanto é área mais antiga da química orgânica (TORSSELL, 1983; BERLINCK et al, 2017). O uso dos produtos naturais vem desde os tempos da alquimia, é natural que seja bem consolidada e possua um grande desenvolvimento, visto todos os avanços adquiridos por toda a sociedade (HENDRICKSON, 1965). Em uma revisão, no ano de 2019, sobre produtos naturais utilizados como fármacos, os pesquisadores Newman e Cragg indicam que a maioria dos medicamentos aprovados pela FDA tem alguma origem em produtos naturais, na Figura 1, observa-se alguns exemplos (NEWMAN; CRAGG, 2020). A pesquisa em produtos naturais se destaca, uma vez que vários pesquisadores, que trabalham diretamente ou indiretamente na área, foram laureados com o Nobel. Emil Fischer, por exemplo, foi reconhecido pelo seu trabalho com os princípios ativos do chá, café e cacau. Robert Robinson, foi reconhecido por sua investigação sobre produtos vegetais de importância biológica, especialmente os alcaloides. Robert B. Woodward, foi reconhecido por conseguir preparar clorofila de forma artificial. Richard Kuhn, foi reconhecido por seus trabalhos com vitamina A e por sintetizar riboflavina em laboratório (MAZALI, 2020).

Figura 1: Exemplos de medicamentos antibacterianos inspirados em produtos naturais reportados por Newman e Cragg (2020)



O Brasil apresenta um cenário muito favorável para o estudo de produtos naturais. O país apresenta seis biomas diferentes, sendo esses: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal. Cada bioma de características únicas, o que permite que cada um possua uma flora diversificada, permitindo uma variedade de espécies, que possam possuir potencial para aplicação farmacológica (IBGE Educa, 2023). Ao analisar a flora nacional, é notável uma grande variedade de espécies, existem mais de 46.000 espécies conhecidas de vegetais, dentre essas existem milhares das quais ainda não existem estudos (IBGE Educa, 2023). Porém, existem algumas espécies das quais existem diversos estudos promissores, dentre elas o gênero *Piper* se destaca, possuindo diversas espécies com muitos estudos envolvidos e outras com poucos, mas devido ao histórico do gênero acabam sendo consideradas potenciais produtos naturais (VALENTIN-SILVA, 2023).

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, a família compreende cerca de três mil e quinhentas espécies distribuídas em cinco gêneros. O gênero citado se destaca como fonte de substâncias farmacológicas, possuindo diversos estudos de diversas espécies, como a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e espécies usadas em sistemas tradicionais de medicina, como *Piper longum*, *Piper cubeba*, dentre outras. O gênero é de ampla ocorrência no Brasil, com cerca de 220 espécies já caracterizadas, onde diversas dessas são usadas pela população para tratamento de diversas enfermidades (MELO et al, 2014).

Quando se fala de produtos naturais, as técnicas de extração de metabólitos do material vegetal são extremamente importantes, para que as substâncias bioativas sejam descobertas, estudadas e isoladas de acordo com a necessidade. Uma técnica muito utilizada para extrair as substâncias presentes nas partes vegetais é a maceração em que solvente é adicionado direto ao material, dessa maneira os compostos se solubilizam no solvente, permitindo o estudo e caracterização dessas substâncias (DOS SANTOS et al. 2013).

Os extratos de espécies do gênero *Piper* já tiveram várias atividades biológicas avaliadas. Dentre as atividades relatadas na literatura, uma das que mais se destacam é a atividade antioxidante, que é uma propriedade química intrínseca a diversas moléculas (VALENTIM-SILVA, 2023). Moléculas que apresentam tal tipo de atividade são muito interessantes, pois o organismo humano apresenta radicais livres, moléculas essas que são instáveis. De forma geral, o corpo humano utiliza dessas moléculas como parte da atividade celular, porém esses tipos de moléculas em excesso no corpo causam Estresse oxidativo. Diversas doenças são associadas a esse tipo de Estresse, como a doença de Parkinson, Alzheimer, aterosclerose, alguns tipos de câncer, dentre outras (AMES et al. 1993; AMES et

al. 1995). Para evitar esse problema, o corpo utiliza moléculas oxidantes, que através de processos enzimáticos e não enzimáticos, reparam danos ou removem a presença dos radicais livres no organismo (AMES et al. 1993).

A atividade antioxidante de moléculas pode ser avaliada por diversas técnicas dentre elas, um método que se destaca é o método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocação do elétron desemparelhado por toda molécula, o que concede a essa molécula uma coloração púrpura característica (PIMENTEL et al. 2006). Essas características, permitem determinar a atividade antioxidante de moléculas, quanto a técnica ela será discutida mais a frente, em outro tópico.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Identificar a composição química dos extratos hexânicos e etanólicos obtidos dos galhos de *Piper fuliginum* e de galhos e frutos de *Piper macedoi*, além de avaliar a atividade antioxidante por meio da técnica de sequestro de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre a *Piper arboreum* para utilizar como referência;
- Preparar o extrato hexânico e etanólico dos galhos de *P. fuliginum*
- Preparar os extratos hexânico e etanólico dos galhos e frutos de *P. macedoi*
- Analisar a composição química dos extratos por prospecção fitoquímica e por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray (CLAE-EM-IES);
- Avaliar a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical de DPPH;

3. REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

3.1 Espécies do Gênero *Piper*

Como comentado anteriormente, o gênero *Piper*, faz parte da família Piperaceae e compreende mais de 2000 espécies, das quais, cerca de 220 espécies já foram catalogadas no Brasil (BARDELLI et al, 2008). O gênero é presente na América do Sul, América Central e Ásia, em regiões mais quentes, com baixa pluviosidade. Alguns estudos relatam o uso do gênero como antiviral, antioxidante, antibacteriana, ovicida, etc (VALENTIM-SILVA, 2023).

Previamente a esse trabalho, entre os anos de 2020/2021, foi realizado uma revisão bibliográfica dos artigos publicados, em duas plataformas de divulgação científica “*Scopus*” e “*Web of Science*”, sobre as espécies *Piper fuliginum* e *Piper macedoi*. Foi verificado que tais espécies apresentavam poucos estudos por isso foi relacionada para a pesquisa uma espécie referência que apresentava um maior volume de artigos publicados *Piper arboreum*. A espécie referência foi escolhida por apresentar um volume bem maior de artigos publicados, ou seja, é uma espécie que já foi bastante estudada, e por ser do mesmo gênero, dessa forma seria referência sobre compostos já identificados.

Uma espécie referência foi selecionada a fim de entender o que esperar das espécies foco do trabalho, como: metabólitos secundários, atividades, melhores métodos de extração, etc. A *Piper arboreum* foi selecionada devido a der uma espécie com volume maior de estudos publicados e por ter ocorrência em regiões semelhantes as duas espécies trabalhadas (GUIMARÃES et al, 2023).

3.1.1 *Piper fuliginum*

Como dito anteriormente, o trabalho prévio concluiu que a espécie *Piper fuliginum* é uma espécie “inérita” do ponto de vista de estudos químicos, possuindo apenas quatro artigos publicados nas bases de dados avaliadas. Um fato interessante é o país onde as pesquisas foram realizadas, todos os artigos são de pesquisadores brasileiros, o que condiz com a ocorrência da espécie, que se concentra no Brasil e em alguns poucos países da América Latina (GBIF SECRETARIAT, 2019). Os trabalhos foram organizados na Tabela 1:

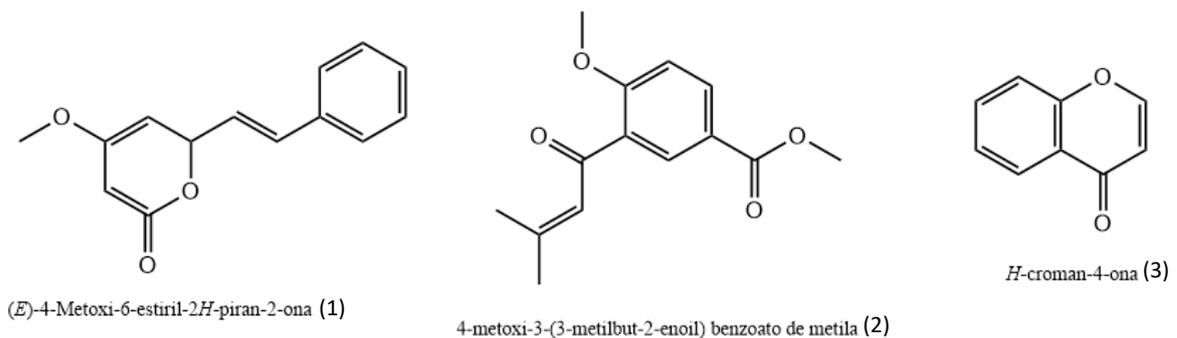
Tabela 1: Trabalhos realizados com a espécie *P. fuliginum*

Base de Dados	Material Trabalhado	Destaques	Tipo de Atividade	Referência
Web of Science + Scopus	Descrição de botânica	-	-	(POTT et al., 2019)
Web of Science + Scopus	Extrato da Folha	Substâncias Isoladas	-	(MAZZEU et al., 2018)
Scopus	Óleo Essencial	Extrato	Ovicida (<i>in vitro</i>)	(KRINSKI et al., 2018)
Scopus	Compostos previamente isolados	Extrato	Antiviral (<i>in vitro</i>)	(JARDIM et al., 2015)

Dentre os artigos sobre *P. fuliginum*, um estudo preliminar mostrou que essa espécie é bem interessante do ponto de vista químico, por apresentar uma variedade de classes de metabólitos, dentre elas kavalactonas, cromononas e derivados prenilados do ácido benzoico. Exemplos identificados na espécie podem ser vistos na Figura 2. Outros estudos mostram que algumas substâncias presentes na planta apresentam atividades ovicida e antiviral promissoras.

Como um dos objetivos desse trabalho foi anotar metabólitos presentes no extrato etanólico e hexânico da espécie *P. fuliginum* por CL-EM/EM, o artigo de Mazzeu et al (2018) foi selecionado para uma revisão mais aprofundada, por ser o mais recente e mais completo. De forma geral, este artigo avaliou extratos etanoicos, metanoicos, hexânicos e clorofórmicos das folhas da espécie sendo anotados, através de ESI-MS, classes de substâncias que compõem esses extratos. Dessas se destacam as Kavalactonas e os derivados de ácido benzoico, além da descoberta de uma nova substância, a 4-metoxi-3-(3-metilbut-2-enoil) benzoato de metila, pode-se ver essa substância na Figura 2. Dessa forma, temos um panorama geral do que é esperado de se encontrar nos extratos, porém com a diferença da parte da planta escolhida para se realizar o estudo. O artigo de Mazzeu et al. (2018) analisou extratos de folhas, enquanto nesse trabalho, a pesquisa foi realizada com os galhos de *Piper fuliginum*.

Figura 2: Exemplos de kavalactona (1), derivado prenilado do ácido benzoico (2) e cromanona (3) identificados em *P. fuliginum*



Fonte: autor

3.1.2 *Piper macedoi*

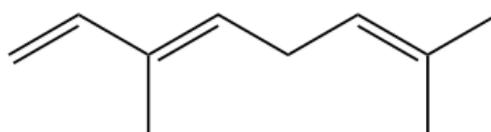
A *Piper macedoi* é uma espécie endêmica do Brasil, sendo natural do Cerrado, da Caatinga e da Mata Atlântica, ou seja, natural das regiões sudeste e nordeste do Brasil (GUIMARÃES et al, 2023). Ela também pertence à família Piperaceae e é muito parecida com a *Piper fuliginum*, onde em muitas vezes são confundidas, onde acreditava-se que a *P. macedoi* seria uma variante da *P. fuliginum*, porém a análise genética mostrou que são espécies distintas (NOZELLA, 2021).

Em relação aos estudos com a espécie, apenas dois artigos foram encontrados na base de dados *Scopus*, os quais desenvolveram estudos com óleos essenciais feitos a partir das folhas de *P. macedoi*, e ambos são estudos complementares, realizados pelo mesmo grupo de pesquisa da UFSB (Universidade Federal do Sul da Bahia).

O primeiro artigo, publicado em 2016, estudou as diferenças constitucionais dos óleos essenciais, feitos a partir de folhas de *P. macedoi*, onde um óleo foi feito de folhas da planta cultivada em vasos de cultura, outro foi feito a partir de folhas retiradas de plantas encontradas em seu habitat natural. O estudo concluiu que existem diferenças, porém não são suficientemente relevantes para a constituição dos óleos essenciais (OLIVEIRA et al, 2016).

Ainda sobre o artigo de Oliveira et al (2016), foram identificados os principais grupos moleculares que constituem os óleos, sendo eles: monoterpenos (> 45%), sesquiterpenos (> 20%) e arilpropanóides (> 23%), onde a principal molécula encontrada no óleo foi a *trans*- β -ocimene, onde mais de 24% do óleo é constituído dessa molécula.

Figura 3: Estrutura da *trans*- β -ocimene



Fonte: o autor

No segundo artigo de Dos Santos et al (2021), foi avaliada a atividade do óleo essencial de *P. macedoi* contra o protozoário *Leishmania*. O estudo foi realizado *in vitro* contra a amastigota de *Leishmania infantum*, onde foi determinado o IC_{50} , que foi de $222,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, um resultado considerado bom, ou seja, o óleo se mostrou efetivo contra esse protozoário. Além disso foram avaliados sua citotoxicidade, frente à, macrófagos, células de hepatoma humano e células renais de macacos. As concentrações citotóxicas (CC_{50}) foram de: 316,8, 194,8 e $300,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para macrófagos, células de hepatoma humano e células renais de macacos, respectivamente (DOS SANTOS et al, 2021).

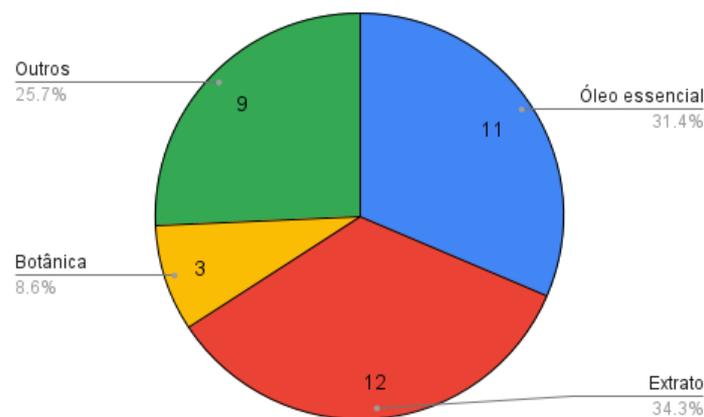
Em resumo, a espécie apresenta pouquíssimos estudos, sendo considerada, também, uma espécie “inédita” do ponto de vista de estudos químicos. Porém ao analisar os dois artigos publicados é visto que, aquele que avalia algum tipo de atividade, no caso frente a um protozoário específico, é perceptível um resultado positivo, mesmo com um CC_{50} baixo, o resultado de IC_{50} é bem interessante. Dado isso, novos estudos para a espécie são justificados.

3.1.3 *Piper arboreum*

Como dito anteriormente a revisão bibliográfica também abrangeu uma espécie referência, nesse caso, a *Piper arboreum*, essa por sua vez, como esperado, apresentou um volume bem maior de artigos publicados, totalizando 35 artigos nas duas plataformas. Essa espécie já é estudada a bastante tempo, pois é comumente usada na medicina popular para tratamento de reumatismo, bronquites, gripes fortes, também sendo usada por indígenas como sudorífera e afrodisíaca (GUIMARÃES et al, 2005). Por isso o interesse nessa espécie e por ser da mesma família que as espécies foco desse trabalho e por ser encontrada em um mesmo ambiente, podemos usar os trabalhos realizados para nortear à pesquisa.

Os artigos de *Piper arboreum* foram classificados de acordo com o material vegetal ou produto (óleo essencial, extrato, planta [características morfológicas, folhas, caules, etc]), também houve aqueles trabalhos que não se enquadraram nos três tipos de materiais escolhidos, como destaque e foram colocados como outros, no gráfico da Figura 4.

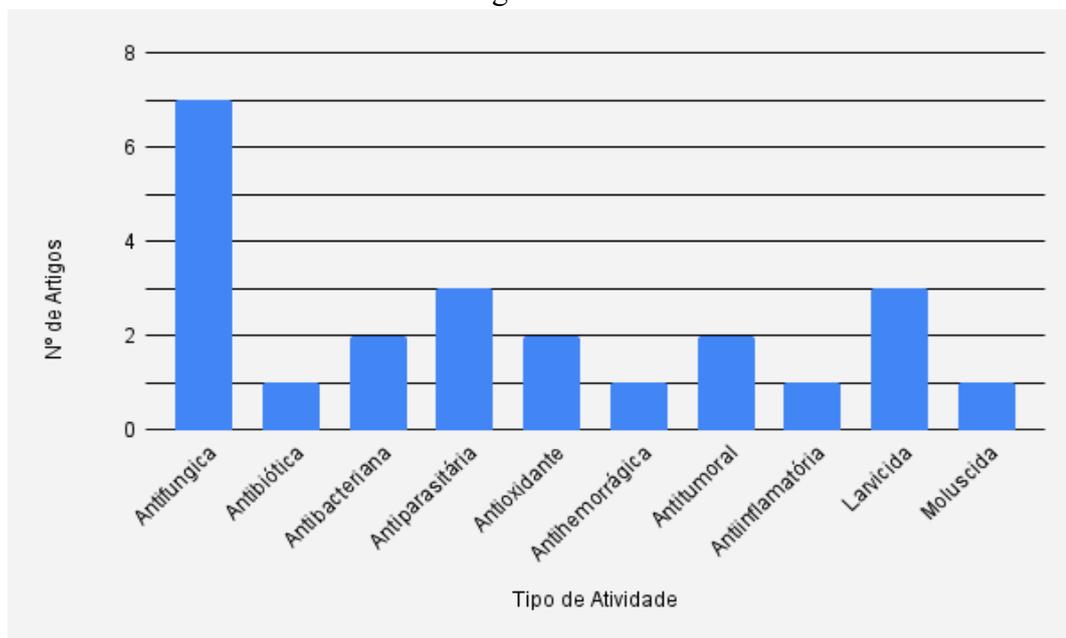
Figura 4: Classificação dos artigos sobre *P. arboreum* em relação ao tipo de estudo



Fonte: o autor

Posteriormente, para um estudo mais aprofundado foram selecionados os artigos que relatam algum estudo quanto a atividade biológica, seja como um possível fármaco ou como um controlador de pragas. Ao todo foram selecionados 18 artigos sobre *Piper arboreum*, os quais estudavam um tipo de atividade ou duas. Para entender melhor quais estudos já foram realizadas com espécie e para entender quais podem ser abordados futuramente para a *Piper fuliginum*, o gráfico da Figura 5 mostra as principais atividades já avaliadas sobre *P. fuliginum*.

Figura 5: Classificação dos artigos sobre *P. arboreum* de acordo com o tipo de atividade biológica avaliada



Fonte: o autor

Como podemos ver, diversos tipos de atividade foram avaliados para *Piper arboreum*, sendo a principal a atividade antifúngica. Outras avaliações biológicas que se mostraram promissoras foram larvicida e para atividade antiparasitária. Em relação aos estudos de atividade antioxidante, foram encontrados dois artigos sobre óleo essencial das folhas de *P. arboreum*, onde os resultados determinaram a concentração efetiva (CE₅₀), a atividade antioxidante para o óleo essencial, nos dois trabalhos, foi de cerca de 240,00 µg mL⁻¹. Esse resultado é considerado uma atividade inativa, portanto, esse óleo essencial dessa parte da espécie, não apresenta atividade antioxidante (SILVA et al, 2014; WANG et al, 2021).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação

- Balança analítica SHIMAFZU modelo ATX224.
- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade Quimis modelo Kett FD-600.
- Evaporador rotatório IKA modelo RV10.
- Liofilizador TERRONI modelo LS3000.
- Espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Genesys 10S UV-Vis
- Lavadora Ultrassônica UNIQUE modelo USC 750.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent modelo Infinity 1260, acoplado a um espectrômetro de Massas de alta resolução tipo *Quadropole (Time of Flight) Q_TOF* da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES).

4.2 Materiais e Reagentes

- Solventes utilizados para extração e cromatografia: hexano, etanol, acetato de etila e metanol foram de marcas diversas: Synth, Vetec, Merck, Neon. O hexano, etanol e acetato de etila foram destilados para maior grau de pureza.
- Os ácidos: sulfúrico e fórmico também foram de marcas diversas: Synth, Merck, Vetec.
- Placa de alumínio com sílica gel 60, para cromatografia em camada delgada (CCD) contendo indicador de fluorescência da marca Macherey-Nagel.
- Reveladores utilizados na prospecção fitoquímica: vanilina sulfúrica, sulfato cérico, reagente de Lieberman – Burchard, NP-PEG, Dragendorff, ninidrina e KOH foram preparados segundo Wagner e Bladt (1996), usando reagentes e solventes de grau analítico, de marcas diversas: Synth, Vetec, Merck, Neon.

4.3 Coleta e Preparo do Material Vegetal

A coleta dos galhos e frutos das espécies *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* foi realizada pelo colaborador mestre Augusto Hubaide Nozella do NuPPeN-UFU, na reserva ecológica localizada na Fazenda Experimental do Glória pertencente à Universidade Federal de Uberlândia (18°57'23.0"S 48°12'30.5"W) no dia 3 de novembro de 2020. Ambos os indivíduos

foram coletados a poucos metros de distância (Figura 6), próximos às margens de um lago, sob condições similares de solo e incidência solar.

Os materiais vegetais foram secos em estufa, reduzidos a pó através de moinho de facas e armazenados em freezer. Todo esse processo foi realizado também pelo colaborador Augusto Hubaide Nozella.

Figura 6: Distância entre os pontos de coleta das espécies



Fonte: NOZELLA, 2021

As plantas foram identificadas pela Professora Doutora Micheline Carvalho Silva da Universidade de Brasília especialista no estudo de Piperáceas e depositadas no Herbário da Universidade de Brasília sob o código 311774 para *Piper fuligineum* e 311780 para *Piper macedoi*.

Esse trabalho utilizou três materiais vegetais sendo eles, os galhos da *Piper fuligineum*, galhos e frutos da *Piper macedoi*, espécies com leves diferenças morfológicas como discutido anteriormente. Os procedimentos que serão descritos a seguir foram feitos com cada um dos três materiais, de forma igualitária.

4.4 Avaliação do Teor de Umidade

O teor de umidade foi realizado em uma balança de luz infravermelha para determinação de umidade Quimis modelo Kett FD-600, onde 1,0 g do material vegetal foi pesado e posteriormente submetido ao teste, a porcentagem obtida foi anotada e o teste foi repetido ao todo três vezes para cada material. Os valores obtidos podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2: Dados sobre os materiais vegetais utilizados na extração e volume de solvente

Material Vegetal	Massa de material vegetal (g)	Umidade (%)	Volume de Hexano (mL)	Volume de Etanol (mL)
<i>P. fuliginum</i> galhos	51,51	10,8 ± 0,27	370	230
<i>P. macedoi</i> galhos	29,20	11,9 ± 0,06	300	200
<i>P. macedoi</i> frutos	15,80	12,0 ± 0,32	260	170

4.5 Preparo de Extratos

O material vegetal foi pesado, reservando uma parte para avaliação do teor de umidade. Em seguida, os extratos brutos foram preparados, submetendo o material vegetal à extração por maceração em hexano. A solução obtida foi filtrada e o solvente removido em um evaporador rotativo sob pressão reduzido a 40 °C. O processo de maceração com os materiais vegetais, com hexano, foi repetido 3 vezes. O sólido restante foi submetido à extração por maceração em EtOH (etanol), e ao final desse procedimento o solvente do extrato foi evaporado no evaporador rotatório à pressão reduzido a 40 °C. O processo foi repetido 3 vezes. Ao final, para cada extrato foi realizado um cálculo quanto ao rendimento (visto na Tabela 2).

Para garantir que não houvesse água no meio, os extratos foram liofilizados por cerca de 16 horas, com o liofilizador TERRONI modelo LS3000. Após essa etapa durante todo o tempo em que os extratos foram trabalhados, eles ficavam armazenados a baixas temperaturas. E quando foram utilizados, aguardava-se até que atingissem temperatura ambiente, antes de fazer qualquer análise. Ao todo foram obtidos seis extratos, dois de cada material vegetal, sendo um hexânico e um etanólico.

Figura 7: Extratos hexânicos e etanólicos obtidos dos galhos e frutos das espécies *P. fuligineum* e *P. macedoi*



Nota: Linha superior – extratos etanólicos, da esquerda pra direita, extrato dos galhos de *P. fuligineum*, extrato dos galhos de *P. macedoi* e Extrato dos frutos de *P. macedoi*; Linha inferior - – extratos hexânicos, da esquerda pra direita, extrato dos galhos de *P. fuligineum*, extrato dos galhos de *P. macedoi* e Extrato dos frutos de *P. macedoi*

Fonte: o autor

4.6 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica dos extratos obtidos foi realizada, com o objetivo de identificar as classes de metabólitos secundários presentes. Os extratos foram solubilizados em metanol a uma concentração de 2 mg mL^{-1} e aplicados em placas comerciais de CCD (cromatografia em camada delgada). Como fase móvel foi utilizada: hexano, acetato de etila, ácido fórmico (2;1;0,4). Um total de sete reveladores químicos foram utilizados: vanilina sulfúrica, sulfato cérico, reagente de Lieberman – Burchard, NP-PEG, Dragendorff, ninidrina e KOH. Reagentes preparados segundo a metodologia proposta por Wagner (1996) Além dos reveladores químicos, foi utilizada uma câmera de luz-UV para revelar as placas.

4.7 Atividade Antioxidante (DPPH)

A análise de atividade antioxidante dos extratos dos galhos e dos frutos de *P. macedoi* e *P. fuligineum*, foi realizada de forma adaptada, segundo QUARESMA et al. (2020), pelo método espectrofotométrico em 517 nm. Uma solução de DPPH foi preparada em metanol na concentração de 38 mg mL⁻¹, verificou-se sua absorvância e diluiu-se a solução até apresentar uma absorvância de 0,99. As soluções dos extratos foram preparadas em metanol nas concentrações de 66,67 a 0,67 µg mL⁻¹ para os extratos etanólicos, concentrações de 333,3 a 50 µg mL⁻¹ para os extratos hexânicos e de 60,00 a 5,00 µg mL⁻¹ para o ácido ascórbico. Foram adicionados 0,2 mL destas soluções e 2,8 mL de DPPH em tubos de ensaio, protegidos da luz e mantidos em repouso por 1 hora, em temperatura ambiente. Após este intervalo, as absorvâncias das amostras foram medidas em 517 nm no espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Genesys 10S UV-Vis. O controle foi realizado usando 0,2 mL de metanol no lugar dos extratos. O branco foi realizado usando 2,8 mL de metanol no lugar do DPPH. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo.

O cálculo da porcentagem da atividade antioxidante (AA) que corresponde à porcentagem de DPPH sequestrado foi feito a partir da Equação 01:

$$AA = DPPH_{sequestrado} (\%) = \left(\frac{Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \right) 100 \quad \text{Equação 01}$$

em que Abs_{controle}, Abs_{amostra} e Abs_{branco} são, respectivamente, absorvância inicial da solução metanoica de DPPH, absorvância da mistura reacional (extrato + DPPH) após 1 hora de reação e absorvância da amostra em metanol.

As medidas das concentrações eficientes (CE₅₀), que representam a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, foram calculadas através da regressão linear da curva analítica do gráfico da porcentagem de DPPH sequestrado após uma hora de reação pelas concentrações dos extratos.

4.8 Análise da Composição Química dos Extratos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

A cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray CLAE-EM-IES, foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU) em um cromatógrafo líquido (marca Agilent® modelo Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES), utilizando coluna Agilent® modelo Zorbax C18 3,0 mm de diâmetro interno, 100,0 mm de comprimento, partículas de 2,7 µm. Os parâmetros cromatográficos para análise dos extratos e partições foram: fase móvel (A) composta por água acidificada com ácido fórmico (0,1% v.v⁻¹) e fase móvel (B) metanol, com gradiente: 10% de B (0 min), 98% de B (0 – 15 min), 100% de B (15 – 17 min), volume de injeção foi 0,4 mL min⁻¹. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 58 psi, gás secante a 8 L min⁻¹ a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KVA.

As amostras injetadas foram preparadas pela solubilização dos extratos em metanol grau HPLC, usando a concentração de 5 mg mL⁻¹. As amostras dos extratos hexânicos, foram filtradas em filtros de seringa com membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) 45 µm antes de serem injetadas no massas.

Foi realizada as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) em diferentes energias de colisões para os modos positivo e negativo para cada íon molecular. A partir do estudo dos fragmentos e da massa de alta resolução foi possível propor a estrutura dos compostos das amostras. A fórmula molecular proposta de cada composto foi selecionada de acordo com uma lista sugerida pelo Software Agilent MassHunter® seguindo a mais baixa diferença entre a massa experimental e a massa exata, erro em ppm (Equação 2), equivalência de insaturações e regra do nitrogênio. A análise foi direcionada para as moléculas relatadas na dissertação de Nozella (2021), o qual trabalhou com as folhas das mesmas espécies, sendo usado um banco de dados fornecido pelo autor. As possíveis estruturas foram propostas utilizando de banco de dados como o Pubchem e artigos acadêmicos, analisando, principalmente, sistemas de solventes, tempos de retenção e espectro de massas.

$$E_{ppm} = \frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \times 10^6 \quad \text{Equação 2}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Teor de Umidade e Preparo de Extratos

O material vegetal foi seco em estufa até que a umidade estivesse menor que 15% para evitar a proliferação de microrganismos no material vegetal (PIMENTEL et al, 2006).

O preparo dos extratos por maceração teve duração de cerca de um mês, sendo feitos seguindo o processo descrito na parte experimental. Todos os extratos passaram por liofilização para retirada total de água e foram armazenados no freezer para serem usados nas próximas etapas do projeto. Os dados quanto a rendimento podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3: Rendimento da extração

Material Vegetal	Extrato hexânico		Extrato etanólico	
	Massa de extrato (g)	Rendimento da extração (%)	Massa de extrato (g)	Rendimento da extração (%)
<i>P. fuligineum</i> galhos	0,721	1,40	1,447	2,81
<i>P. macedoi</i> galhos	0,701	2,40	0,958	3,28
<i>P. macedoi</i> frutos	1,259	7,97	2,095	13,36

Nota: material com umidade < 15% (Tabela 2)

Como esperado os rendimentos são relativamente baixos, visto que, galhos apresentam um volume grande de macromoléculas, que são responsáveis pela sustentação e proteção da planta, a técnica de extração escolhida, não é capaz de solubilizar tais moléculas, porém o rendimento dos extratos dos frutos foi relativamente alto, indicando que os solventes foram capazes de solubilizar um volume grande de substâncias presentes nos mesmos. Quando comparados aos extratos das folhas (EE – 16,18% *P. fuligineum*, 11,20% *P. macedoi*; EH – 5,89% *P. fuligineum*, 6,81% *P. macedoi*) da espécie preparados pelo Nozella (2021), notamos um rendimento muito inferior dos galhos, o que indica uma menor proporção de substâncias capazes de solubilizar nesses solventes, resultado já esperado, visto que o grande volume de clorofila presente nas folhas se solubiliza nesses solventes, além de outras substâncias, que

estão presentes só nas folhas. Já nos frutos vemos rendimentos próximos as folhas, porém inferior ao obtido pelo autor citado.

5.2 Prospecção Fitoquímica

Ao final do processo de preparo dos extratos e após a liofilização dos mesmos, foi realizada a prospecção fitoquímica. Por mais que os extratos apresentassem diferentes compostos, com diferentes polaridades, a fase móvel foi capaz de separar em classes a maioria dos compostos presentes, permitindo entender quais classes de substâncias estão presentes no metabolismo de cada parte das espécies.

Tabela 4: Prospecção fitoquímica dos extratos dos galhos de *Piper fuliginum* e dos galhos e frutos de *Piper macedoi*

Extratos		Flavonoides	Aminoácidos	Alcaloides	Antraquinonas Antronas Cumarinas	Terpenos, Esteroides, Açúcares, Fenóis, Taninos, Flavonoides		
		NP/PEG	Ninidrina	Dragendorff	KOH	Lieberman Burchard	Sulfato Cérico	Vanilina Sulfúrica
<i>P. fuliginum</i> – galhos	Hexano	-	-	-	+	+	+++	+
	Etanol	+++	+	-	+++	+	++	++
<i>P. macedoi</i> – galhos	Hexano	-	-	-	+	+	+++	+
	Etanol	+++	+	-	+++	+	++	++
<i>P. macedoi</i> - frutos	Hexano	-	-	-	+	-	+++	+
	Etanol	++	-	-	-	-	+	-

Nota: (-) não identificado; (+) pouco intenso; (++) intenso; (+++) muito intenso

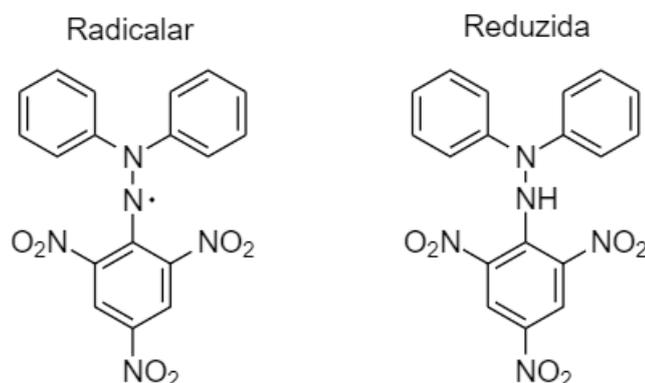
Com os dados obtidos é possível perceber uma semelhança muito grande entre os perfis químicos dos galhos de ambas as espécies, isso confirma um problema enfrentado no início da pesquisa, por muito tempo acreditou-se devido as semelhanças físicas e química, que se tratavam da mesma espécie, sendo a *Piper macedoi*, tratada como uma variante da *Piper fuliginum*, com o avançar do trabalho prévio realizado pelo Nozella (2021), comprovou-se tratar-se de espécies diferentes.

Quando comparamos os resultados de uma mesma espécie, porém de partes diferentes da planta, vemos que o perfil de cada uma das partes é bem diferente entre si, o que de fato é esperado segundo a literatura.

5.3 Atividade Antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH

A análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH é baseado na medida do consumo do radical DPPH pelos compostos antioxidantes presentes no extrato. Para isso, mede-se a capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil em reagir com substâncias doadoras de hidrogênio (MENSOR et al., 2001). A reação que ocorre é de oxirredução, onde a forma radicalar DPPH possui uma coloração violeta, a forma radicalar é reduzida para DPPH-H, que possui coloração amarela (BADARINATH et al., 2010).

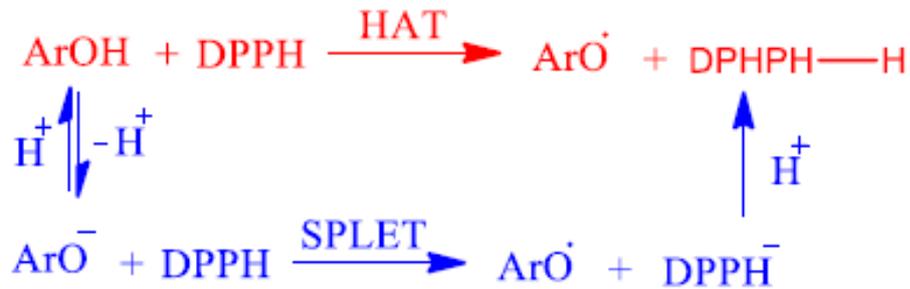
Figura 8: Estrutura do DPPH na forma radicalar e na forma reduzida



Fonte: o autor

As reações entre o DPPH e os compostos antioxidantes também podem ocorrer pelo mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (*HAT – Hydrogen atom transfer*) ou pelo método de perda sequencial de próton na transferência de elétron (*SPLET – Sequential proton loss electron transfer*), como descrito na Figura 9.

Figura 9: Mecanismo da reação entre compostos fenólicos e o radical DPPH



Nota: ArOH = fenol

Adaptado de: DE LIMA, 2023

No mecanismo *HAT*, mede-se a capacidade da molécula antioxidante em sequestrar radicais livres pela doação do hidrogênio do composto fenólico para o radical DPPH (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005), enquanto pelo mecanismo *SPLET* é medida a capacidade do ânion (ArO^-) de transferir um elétron ao radical DPPH, após a hidroxila do grupo fenólico ter desprotonado (FOT; DAQUINO; GERACI, 2004).

Os extratos hexânicos e etanólicos foram avaliados quanto sua capacidade de reação com o radical DPPH. Os resultados foram expressos em concentração eficiente (CE_{50}), em $\mu\text{g mL}^{-1}$, que é a concentração de extrato necessária para reagir com 50% do radical DPPH. Quanto menor for este valor, maior é a atividade antioxidante.

De acordo com REYNERTSON; BASILE; KENNELLY (2005), a intensidade da atividade antioxidante de um extrato pode ser relacionada com o valor obtido de CE_{50} , conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5: Relação entre os valores CE_{50} e a intensidade de atividade antioxidante

DPPH (CE_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intensidade de atividade antioxidante
< 50	Elevada
50 - 100	Moderada
100 – 200	Baixa
>200	Inativa

As absorvâncias da reação entre 0,2 mL dos extratos preparados em diferentes concentrações (50 a 333,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos hexânicos, 0,67 a 66,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5 a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com 2,8 mL do reagente DPPH, foram medidas em 517 nm em triplicata. Os valores de CE_{50} foram determinados por regressão linear e se obteve o gráfico no qual a abscissa apresenta a concentração do extrato testado e a ordenada a proporção da porcentagem da atividade antioxidante.

Na Tabela 6 são apresentados os valores de CE_{50} da análise de sequestro do radical DPPH dos extratos etanólicos, hexânicos e do ácido ascórbico.

Tabela 6: Valores de CE_{50} da análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH dos extratos da *P. macedoi* e *P. fuligineum*

Extrato	DPPH (CE_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$)
EE – Galhos <i>Piper fuligineum</i>	49,89 \pm 0,10
EH - Galhos <i>Piper fuligineum</i>	>200
EE – Galhos <i>Piper macedoi</i>	29,75 \pm 0,12
EH - Galhos <i>Piper macedoi</i>	>200
EE – Frutos <i>Piper macedoi</i>	38,22 \pm 0,08
EH - Frutos <i>Piper macedoi</i>	>200
Ácido Ascórbico	3,95 \pm 0,01

Nota: EH: Extrato hexânico; EE: Extrato Etanólico

A partir dos dados das Tabelas 5 e 6, pode-se verificar que os extratos etanólicos apresentaram valores de CE_{50} inferiores à 50, ou seja, apresentam atividade antioxidante elevada. Quando comparados ao valor do ácido ascórbico é perceptível que a diferença da

intensidade de atividade é bem grande. O ácido ascórbico é uma das principais substâncias usada na indústria alimentícia como antioxidante, prolongando a vida útil de prateleira dos alimentos, além de ser usado para fortalecer o sistema imunológico das pessoas (MORÁN et al. 2006).

Quando comparamos os extratos etanólicos de diferentes espécies para a mesma parte das plantas, vemos que o extrato de *P. macedoi* apresentou um resultado melhor que o extrato da *P. fuligineum*, que por sua vez, apresentou o menor resultado entre os três. Analisando os perfis das classes de metabólitos obtido na prospecção fitoquímica é perceptível que os três extratos apresentam grupos de moléculas pertencentes aos compostos fenólicos, resultado que será comprovado posteriormente pela análise do massas, quando comparamos o extrato dos frutos e dos galhos, observa-se que os galhos apresentaram maior intensidade com os reveladores que identificam moléculas fenólicas, resultado comprovado pela análise de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH.

Os extratos hexânicos apresentam valores de $CE_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, não possuem boa atividade antioxidante. Isso pode ser explicado pelo fato de possuírem menor quantidade de compostos fenólicos em suas composições. Essa menor concentração de compostos fenólicos pode ser comprovada pela prospecção fitoquímica, onde os extratos não reagiram ou reagiram pouco com os reveladores NP/PEG e KOH, reveladores característicos de flavonoides, antraquinonas, antronas e cumarinas, que são grupos de moléculas, que apresentam fenóis em sua estrutura.

Baseado no mecanismo da redução da molécula de DPPH e nos resultados obtidos nos ensaios de prospecção fitoquímica, é possível relacionar esta alta atividade antioxidante dos extratos etanólicos, pelo menos em parte, à presença de substâncias com hidroxilas disponíveis, por exemplo, flavonoides (MENSOR et al, 2001).

Esse resultado mostra que, mesmo sendo espécies da mesma família da Piperaceae, os resultados foram completamente diferentes do relatado para a *Piper arboreum*, onde a atividade antioxidante, deu inativa. Cabe sempre lembrar, que a análise foi realizada em outra parte da planta, e usando outro material de origem. Todos esses pontos mostraram que, ao mudar a espécie, mudar a parte da planta, mudar o tipo de preparo etc., os resultados são completamente diferentes.

5.4 Análise da Composição Química dos Extratos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

A técnica de CLAE-EM-IES foi utilizada para análise dos compostos presentes nos extratos. Para a identificação foi utilizado o software MassHunter® onde foi possível observar os picos e as massas correspondentes. Com isso foi comparada a massa observada com uma biblioteca customizada, fornecida por Nozella (2021). A análise foi realizada no modo negativo, pois no modo positivo a análise apresentou problema com calibração. Esse problema também foi verificado no modo negativo, porém diferente do modo negativo, no modo positivo não foi verificado coinjeção de calibrante, o que impediu que o software calibrasse os espectros.

Os compostos anotados na biblioteca foram posteriormente reavaliados verificando os espectros de fragmentação de cada um, intensidade de sinal, utilizando de bancos de dados (Pubchen e MassBank) e artigos científicos. O resultado final se encontra na Tabela 7.

Tabela 7: Proposta de anotação dos compostos via LC-MS nos extratos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* (continua)

Tr (min)	Composto	m/z calculado [M-H] ⁻	m/z experimental [M-H] ⁻	Erro (ppm)	Fragmentação
Extrato Hexânico dos Galhos de <i>Piper Fuliginum</i>					
9,051	Inuchinenolide A [8]	305,1394	305,1400	0,19	15eV (235, 217, 165, 121)
9,134	2-Methoxy-5-acetoxy-fruranogermacr-1(10)-en-6-one [2]	319,1551	319,1554	0,09	20eV (165, 150, 135, 121, 106, 83)
10,849	Stylosin [15]	303,1602	303,1608	0,19	20eV (121, 106, 57)
10,982	1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylpropan-1-one [1]	271,0976	271,0993	0,62	30eV (238, 210, 152, 124, 96, 65)
13,3801	Linolenic acid [10]	277,2173	277,2175	0,07	30eV (233, 200, 127, 71, 60, 59, 58)
Extrato Etanólico dos Galhos de <i>Piper Fuliginum</i>					
7,056	Kaempferol-7-O-L-rhamnoside [9]	431,0984	431,1000	0,37	20eV (341; 311; 283; 269)
8,787	Methyl 2,2-dimethyl-4-oxochromane-6-carboxylate [13]	233,0819	233,0823	0,17	20eV (189; 174; 159; 119; 91; 81)
9,22	4-Hydroxy-3-butylphthalide [4]	205,087	205,0869	-0,05	20eV (161, 150, 117, 106)
9,703	7,2',3'-Trihydroxy-4'-methoxy-isoflavan [5]	287,0925	287,0927	0,07	20eV (193, 181, 166, 152, 138, 124, 83)
10,103	Benzyl-2-hydroxy-6-methoxybenzoate [7]	257,0819	257,0826	0,27	10eV (213, 171, 151, 125)
10,935	1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylpropan-1-one [1]	271,0976	271,0982	0,22	30eV (238, 210, 152, 124, 96, 65)

Tabela 7: Proposta de anotação dos compostos via LC-MS nos extratos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* (continua)

T_R (min)	Composto	m/z calculado [M-H]⁻	m/z experimental [M-H]⁻	Erro (ppm)	Fragmentação
11,311	Arnebifuranone [6]	315,1238	315,1248	0,31	20eV (297, 283, 268, 178, 164, 136, 108)
Extrato Hexânico dos Galhos de <i>Piper macedoi</i>					
9,01	Inuchinenolide A [8]	305,1394	305,1404	0,33	15eV (235, 217, 165, 121)
9,11	2-Methoxy-5-acetoxy-fruranogermacr-1(10)-en-6-one [2]	319,1551	319,1555	0,12	20eV (165, 150, 135, 121, 106, 83)
10,975	1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylpropan-1-one [1]	271,0976	271,098	0,15	30eV (238, 210, 152, 124, 96, 65)
12,14	Vernolic acid [12]	295,2276	295,2285	0,30	25eV (277, 195, 183, 171, 113, 59)
13,988	Malvalic acid [16]	279,233	279,2341	0,39	30eV (261, 179, 113, 59)
Extrato Etanólico dos Galhos de <i>Piper macedoi</i>					
6,706	Spinosin [14]	607,1668	607,1689	0,35	30eV (487, 443, 323, 251, 221)
7,023	Kaempferol-7-O- α -L-rhamnoside [9]	431,0984	431,0997	0,30	30eV (285, 284, 257, 151, 107)
9,237	4-Hydroxy-3-butylphthalide [4]	205,087	205,0874	0,19	20eV (161, 150, 117, 106)
9,703	7,2',3'-Trihydroxy-4'-methoxy-isoflavan [5]	287,0926	287,0931	0,17	20eV (193, 181, 166, 152, 138, 124, 83)
11,019	1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylpropan-1-one [1]	271,0976	271,0986	0,37	30eV (238, 210, 152, 124, 96, 65)

Tabela 7: Proposta de anotação dos compostos via LC-MS nos extratos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* (conclusão)

T_R (min)	Composto	m/z calculado [M-H] ⁻	m/z experimental [M-H] ⁻	Erro (ppm)	Fragmentação
Extrato Hexânico dos Frutos de <i>Piper macedoi</i>					
8,962	Inuchinenolide A [8]	305,1394	305,1397	0,10	15eV (235, 217, 165, 121)
9,145	2-Methoxy-5-acetoxy-fruranogermacr-1(10)-en-6-one [2]	319,1551	319,1557	0,19	20eV (165, 150, 135, 121, 106, 83)
10,81	Stylosin [15]	303,1602	303,1613	0,36	20eV (121, 106, 57)
11,109	1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylpropan-1-one [1]	271,0976	271,0983	0,26	30eV (238, 210, 152, 124, 96, 65)
11,925	3-(3',7'-dimethyl-2',6'-octadienyl)-4-methoxybenzoic acid [3]	287,1653	287,1659	0,21	30eV (228, 217, 173)
Extrato Etanólico dos Frutos de <i>Piper macedoi</i>					
8,76	Methyl 2,2-dimethyl-4-oxochromane-6-carboxylate [13]	233,0819	233,0818	-0,04	20eV (189; 174; 159; 119; 91; 81)
9,342	4-Hydroxy-3-butylphthalide [4]	205,087	205,0875	0,24	20eV (161, 150, 117, 106)
9,675	7,2',3'-Trihydroxy-4'-methoxy-isoflavan [5]	287,0926	287,0938	0,41	20eV (193, 181, 166, 152, 138, 124, 83)
9,842	Liquiritigenin [11]	255,0663	255,0668	0,19	30eV (255, 153, 135, 91)
10,141	Benzyl-2-hydroxy-6-methoxybenzoate [7]	257,0819	257,0827	0,31	10eV (213, 171, 151, 125)

Nota: T_R – Tempo de Retenção

Tabela 8: Compostos anotados via CLAE-EM-IES nos extratos de *Piper fuligineum* e *Piper macedoi*

Nº	Composto	Extrato					
		GNH	GNE	GVH	GVE	FVH	FVE
1	1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylpropan-1-one	x	x	x	x	x	
2	2-Methoxy-5-acetoxy-fruranogermacr-1(10)-en-6-one	x		x		x	
3	3-(3',7'-dimethyl-2',6'-octadienyl)-4-methoxybenzoic acid					x	
4	4-Hydroxy-3-butylphthalide		x		x		x
5	7,2',3'-Trihydroxy-4'-methoxy-isoflavan		x		x		x
6	Arnebifuranone		x				
7	Benzyl-2-hydroxy-6-methoxybenzoate		x				x
8	Inuchinenolide A	x		x		x	
9	Kaempferol-7-O-L-rhamnoside		x		x		
10	Linolenic acid	x					
11	Liquiritigenin						x
12	Malvalic acid			x			
13	Methyl 2,2-dimethyl-4-oxochromane-6-carboxylate		x				x
14	Spinosin				x		
15	Stylosin	x				x	
16	Vernolic acid			x			

Nota: GNH – extrato hexânico dos galhos de *P. fuligineum*; GNE – extrato etanólico dos galhos de *P. fuligineum*; GVH – extrato hexânico dos galhos de *P. macedoi*; GVE – extrato etanólico dos galhos de *P. macedoi*; FVH – extrato hexânico dos frutos de *P. macedoi*; FVE – extrato etanólico dos frutos de *P. macedoi*

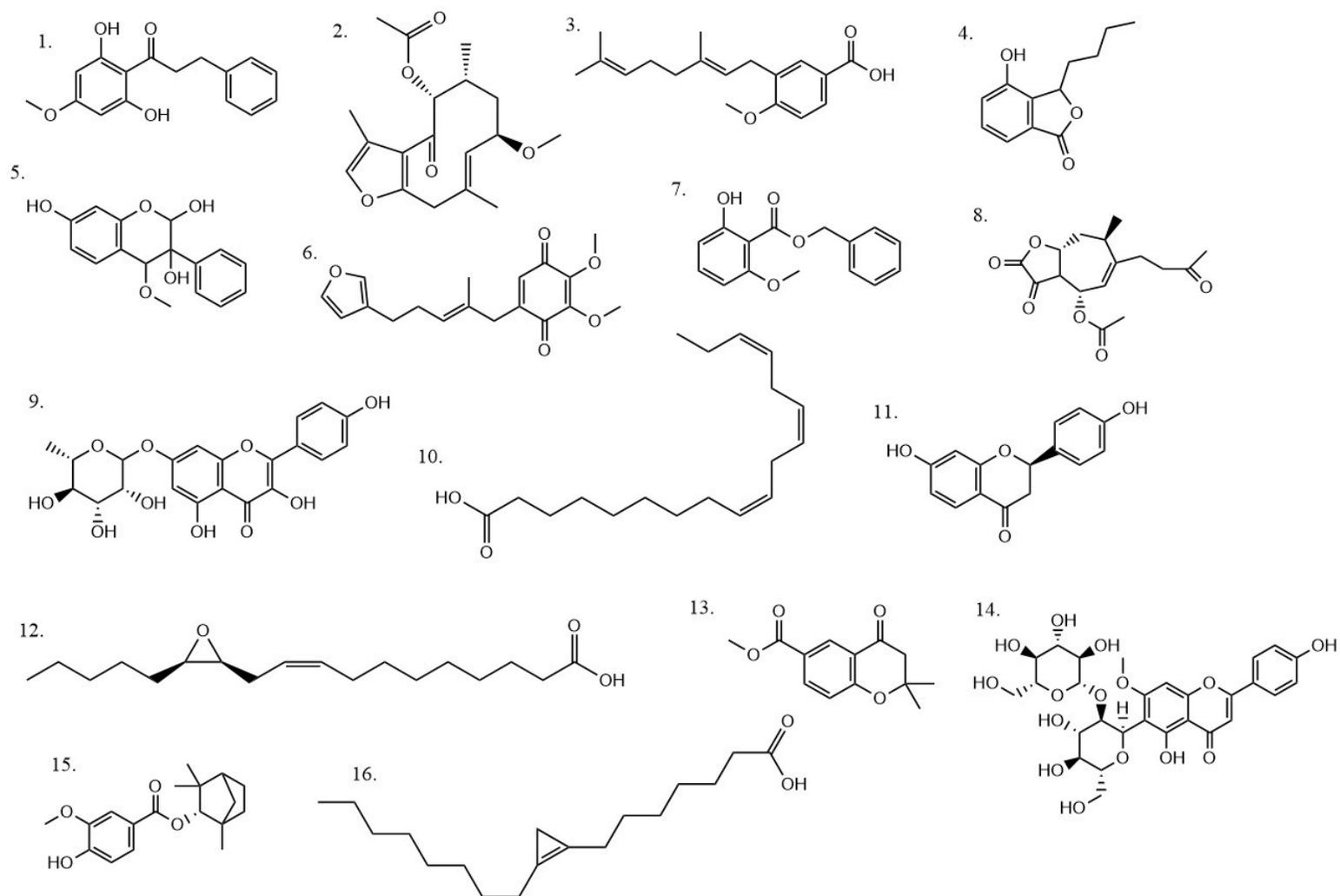
Comparando os compostos anotados na análise por CLAE-EM-IES observamos que certas moléculas estão presentes em extratos da mesma parte da planta de espécies diferentes, outras estão presentes nos dois extratos, outras estão presentes em extratos de partes diferentes da planta de mesma espécie, enquanto certas moléculas somente foram anotadas em um dos extratos, o que mostra a diferença entre elas, todos esses resultados podem ser vistos na Tabela 8.

O trabalho de identificação focou somente nas moléculas relatadas na dissertação de Nozella (2021), que trabalhou com as mesmas espécies, porém diferente dessa pesquisa onde o

foco foi os galhos e frutos, o trabalho de Nozella (2021) foi realizado com as folhas. Dessa forma é possível observar as diferenças na composição que as espécies apresentam em diferentes partes da mesma. Para exemplificar isso, no extrato etanólico das folhas de *P. fuligineum*, Nozella (2021) identificou cerca de 14 moléculas, enquanto no extrato dos galhos, dessas 14 moléculas, somente 5, estavam presentes. Isso elucida que as plantas, mesmo que sejam da mesma espécie, apresentam composição diferente de acordo com a parte selecionada, além de apresentarem compostos exclusivos para aquela espécie, mesmo sendo espécies do mesmo gênero.

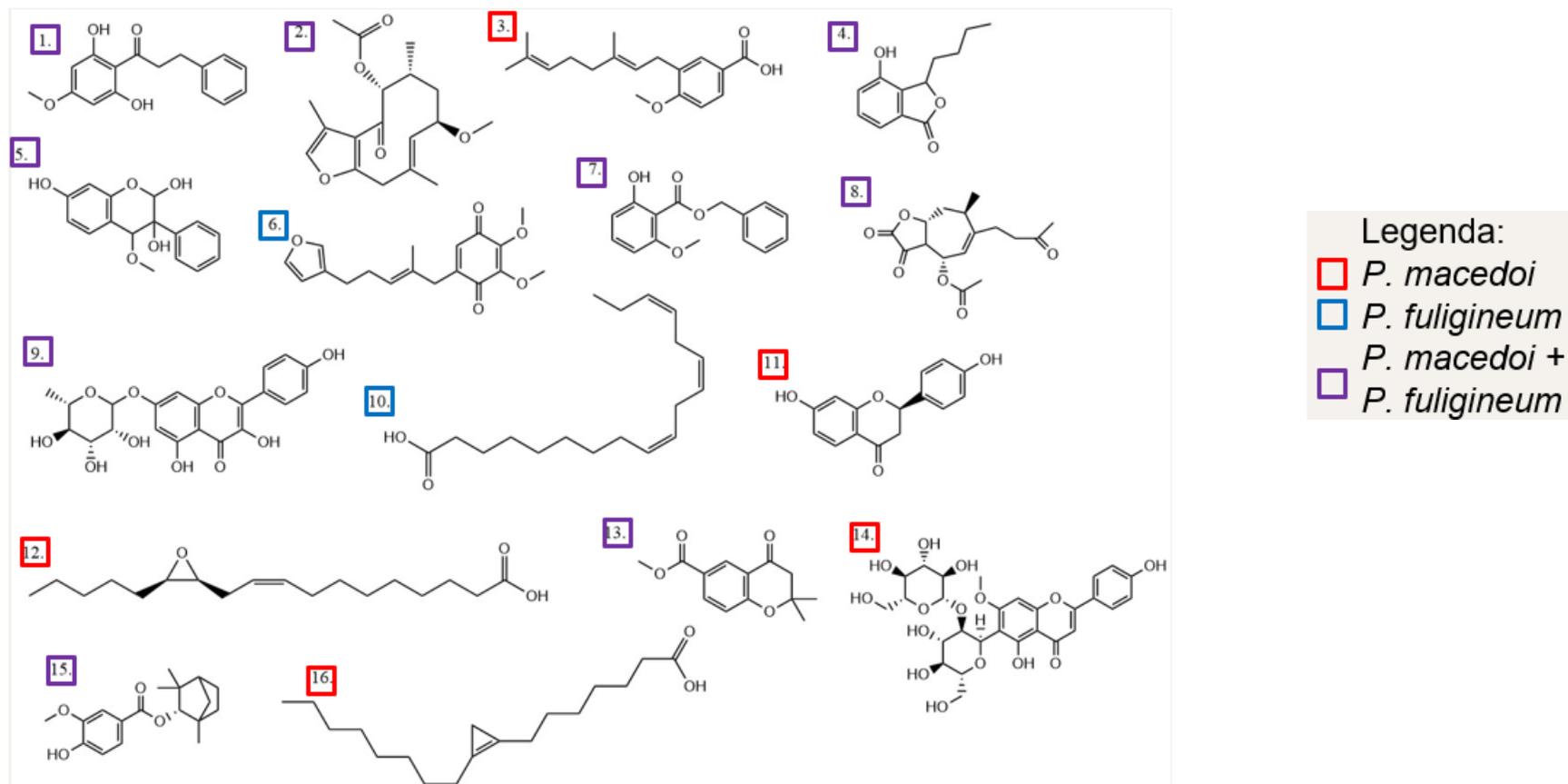
As Figuras 10, 11 e 12 ilustram as moléculas anotadas nos extratos hexânicos e etanólicos dos galhos e frutos da *Piper macedoi* e galhos da *Piper fuligineum*.

Figura 10: Compostos anotados nos extratos hexânicos e etanólicos dos galhos e frutos da *Piper macedoi* e galhos da *Piper fuliginum*



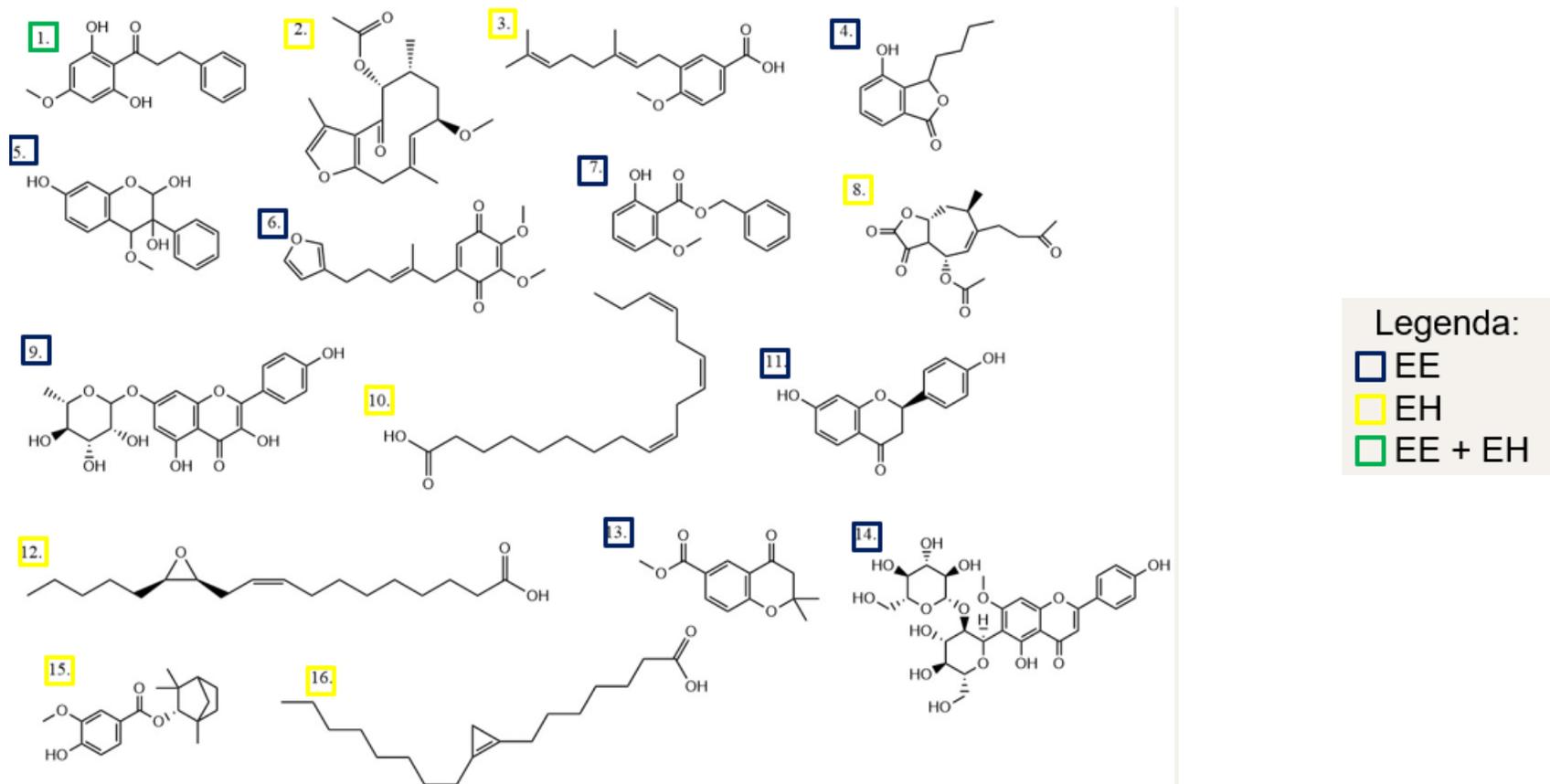
Fonte: o autor

Figura 11: Classificação dos compostos anotados nos extratos da *Piper macedoi* e *Piper fuligineum*



Fonte: o autor

Figura 12 – Classificação dos compostos anotados nos extratos hexânicos e etanólicos da *Piper macedoi* e *Piper fuliginum*



Fonte: o autor

Ao analisarmos os compostos anotados, vemos que os extratos etanólicos apresentam muitos compostos da classe dos flavonoides, resultado condizente com a prospecção fitoquímica realizada anteriormente, que indicou que tal classe de metabólitos era esperada para esses extratos.

Outro ponto interessante em relação aos compostos anotados é a grande presença de oxigênio, hidroxilas e fenóis nas moléculas. Uma presença ainda maior nos extratos etanólicos, resultado condizente com o esperado, pois o etanol é um solvente mais polar que o hexano, logo solubiliza melhor compostos mais polares, que é o caso dos fenóis. Isso é refletido diretamente na atividade antioxidante, onde uma maior concentração de fenóis, leva a um menor CE_{50} , resultado visto no ensaio com DPPH e reforçado pelo resultado da análise de composição dos extratos.

Nesse sentido, o resultado da prospecção fitoquímica indica que somente os extratos etanólicos apresentaram resultado positivo para o NP/PEG, logo apresentam flavonoides, molécula comum em espécies do Cerrado (DE BESSA et al., 2013), o que é corroborado com a análise do massas, onde somente os extratos etanólicos mostram flavonoides, enquanto o extrato hexânico, não apresentou nenhum composto desse tipo.

6. CONCLUSÕES

Os extratos dos galhos de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* e os extratos de frutos *Piper macedoi* foram avaliados em relação a composição química e o potencial antioxidante. A prospecção fitoquímica, mostrou diferenças entre os EE e os EH, onde os EE indicaram com mais intensidade a presença de compostos fenólicos, onde se destacou os flavonoides.

Através do CLAE-EM-IES foi possível anotar alguns compostos presentes nos EE e EH, além de elucidar as diferenças entre as partes das plantas. Foram identificados flavonoides, ácidos graxos e derivados, derivados de ácido benzoico, cromonas, dentre outros.

Em relação a atividade antioxidante, os EE apresentaram elevada atividade ($CE_{50} < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) através do método DPPH, a qual foi justificada pela presença dos compostos fenólicos identificados. Já os EH mostraram inatividade para esse tipo de atividade ($CE_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$), o que é justificado pela identificação de poucos compostos fenólicos.

De forma geral, o estudo mostrou a diferença entre as partes das plantas, onde a composição varia bastante de acordo com a parte selecionada. Além disso, em relação a atividade antioxidante as espécies *P. fuliginum* e *P. macedoi*, tiveram resultado elevado em relação aos seus EE e inatividade em relação a seus EH.

REFERÊNCIAS

ADEMIR BARBOSA JÚNIOR. **Guia Prática de Plantas Medicinais**. Universo dos Livros Editora. p. 18. São Paulo, 2005.

AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILET, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A. v. 92, p. 5258-5265, 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.12.5258.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A., v. 90, p. 7915-7922, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.17.7915

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília, 2010.

BADARINATH, A.; RAO, K. M.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T.; GNANAPRAKASH, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276-1285, 2010. ISSN: 0974-4304

BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; DE SOUSA, A. V. G. O gênero *Piper L. (Piperaceae)* da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S2236-89062008000400007>

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>

BRASILEIRO, A. M. M. **Manual de produção de textos acadêmicos e científicos**. São Paulo, 2007.

DE BESSA, N. G. F.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins.

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 15, n. 4, 2013. DOI: 10.1590/S1516-05722013000500010

DE LIMA, D. M. **ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DA ESPÉCIE *Lafoensia replicara* Pohl E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA COMO CONSERVANTES EM COSMÉTICOS**. Tese (mestrado em química) – Instituto de Química, Química Orgânica, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 121. 2023.

DI STASI, L. C., SANTOS, E. M. G., SANTOS, C. M., HIRUMA, C. A. **Plantas Mediciniais na Amazônia**. Editora Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São Paulo, 1989.

DOS SANTOS, P. L., PRANDO, M. B., MORANDO, R., PEREIRA, G. V. N., KRONKA, A. Z. **Utilização de Extratos Vegetais em Proteção de Plantas**, Centro Científico Conhecer. Botucatu, SP, 2013.

DOS SANTOS, V. N.; DE OLIVEIRA, G. L.; MOREIRA, D. L.; DE DEUS, R. G.; DE ALMEIRA, R. M.; FUJIWARA, R. T.; PIMEIRA, L. P. S.; FERREIRA, S. R. Leishmanicidal Activity of the Volatile Oil of *Piper macedoi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 3, p. 342-346, 2021. DOI: 10.1007/s43450-021-00155-4

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 7, p. 2309-2314, 2004. DOI: 10.1021/jo035758q

GUIMARÃES, E. F., MONTEIRO, D. **Piperacea na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro**. Brasil, 2005. DOI: 10.1590/2175-7860200657312

GUIMARÃES, E. F.; MEDEIROS, E.V.S.S.; QUEIROZ, G.A. ***Piper in Flora e Funga do Brasil***. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12810>>. Acesso em: 16 mai. 2023.

HENDRICKSON, J. B., **The Molecules of Nature**, W. A. Benjamin, Inc. New York, 1965.

IBGE Educa, Ministério do Meio Ambiente. **Biomass Brasileiros**. Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18307-biomass-brasileiros>. Acesso em: 12 fev. 2023.

IBGE Educa, Ministério do Meio Ambiente. **Flora Brasileira**. Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18311-flora-brasileira.html>. Acesso em: 12 fev. 2023.

JARDIM, A. C. G.; IGLOI, Z.; SHIMIZU, J. F.; SANTOS, V. A. F. F. M.; FELIPPE, L. G.; MAZZEU, B. F.; AMAKO, Y.; FURLAN, M.; HARRIS, M.; RAHAL, P. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C replication *in vitro*. **Antiviral Research**, v. 115, p. 39-47, 2015. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.12.018

KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A.; DESCHAMPS, C. Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian *piper* species: Controlling *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidae) at the initial stage of development, **Acta Scientiarum – Agronomy**, v. 40, n.1, 2018. DOI: 10.4025/actasciagron.v40i1.35273

MAZALI, I. O. **História e Laureados com o Prêmio Nobel de Química**. Instituto de Química – UNICAMP, LQES.

MAZZEU, B. F., FELIPPE, L. G., COTINGUIBA, F., KATO, M. J., FURLAN, M., Kavalactones and Benzoic Acid Derivatives from Leaves of *Piper fuliginum Kunth* (Piperaceae), **Brazilian Chemistry Society**, Ed. 29. Brasil, 2018. DOI: 10.21577/0103-5053.20170225

MELO, A.; GUIMARÃES, E. F.; ALVES, M. Piperaceae do Parque Nacional do Viruá, Caracaraí, Roraima, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S2175-78602014000200010>

MENSOR, L.; BOYLAN, F.; LEITAO, G.; REIS, A.; SANTOS, T.; COUBE, C.; LEITÃO, S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research: PTR**, v. 15, p. 127-130, 2001. DOI: 10.1002/ptr.687

MORÁN, G. A. G. et al. Aspectos bioclínicos e patobiológicos da vitamina C na espécie humana. **Revista CES Medicina**, v.20, n.2, p.53-72, 2006. ISSN: 0120-8705

MUNDINA, M., VILA, R., TOMI, F., GUPTA, M.T., ADZET, T., CASANOVA, J., CAÑIGUERAL, S., **Leaf Essential Oils of Three Panamanian *Piper* Spices**, Unidade de Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Barcelona, Espanha, 1997. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00762-0

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades, **Journal of Natural Products**. USA, 2020.

NOZELLA, A. H. **Identificação de metabólitos por espectrometria de massas em extratos das folhas de *Piper fuliginum* e *Piper macedoi* através de elucidação química e desrepliação cia redes moleculares e avaliação da atividade antiviral *in silico* contra o SARS-CoV-2**. Tese (mestrado em química) – Instituto de Química, Química Orgânica, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 100. 2021. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285

OLIVEIRA, G.L.; MATOS, C.C.; SANTOS, R.R.; MAIA, J.T.S.; MARTINS, E.R.; FIGUEIREDO, L.S.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C. Rooting of cuttings and analysis of essential Oils from wild and cultivated *Piper macedoi* Yunck. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 4, p. 782-790, 2016. DOI: 10.33448/rsd-v11i1.24610

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. P.; AGUIAR, P. M.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, p. 373-375, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000200031

Piper fuliginum Kunth in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset. 2019. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/7594451>

POTT, A.; POTT, V. J.; CATIAN, G.; SCREMIN-DIAS, E. Floristic elements as basis for conservation of wetlands and public polices in Brazil: The case of veredas of the Prata River. **Oecologia Australis**, v. 23, n. 4, p. 744 – 763, 2019. DOI: 10.4257/oeco.2019.2304.04

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005. DOI: 10.1021/jf0502698

QUARESMA, D.; JUSTINO, A.; SOUSA, R.; MUNOZ, R.; AQUINO, F.; MARTINS, M.; GOULART, L.; PIVATTO, M.; ESPINDOLA, F.; DE OLIVEIRA, A. Antioxidant compounds

from *Banisteriopsis argyrophylla* leaves as α -amylase, α -glucosidase, lipase, and glycation inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 105, p. 104335, 2020.

REYNERTSON, K.; BASILE, M.; KENNELLY, E. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 3, 2005. DOI: 10.17348/era.3.0.25-36

SILVA, J. A.; OLIVEIRA, F. F.; GUEDES, E.S.; BITTENCOURT, M. A. L.; BITTENCOURT, R.A. Antioxidant activity of *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* and *Piper divaricatum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, n. 3, p. 700 – 706, 2014. DOI: 10.1590/1983-084x/13_097

TORSSELL, K. B. G., **Natural Products Chemistry**, John Wiley and Sons Limited, Chichester, 1983.

VALENTIN-SILVA, A. Reproductive biology of *Piper* species (*Piperaceae*): a review to link the past to the future. **Rodriguésia**, v. 74, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860202374030>.

WAGNER, H. B., S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p. p.

WANG, Y.; WANG, L.; TAN, J.; LI, R.; JIANG, Z. T.; TANG, S. H. Comparative Analysis of Intracellular and in vitro Antioxidant Activities of Essential Oil From White and Black Pepper (*Piper nigrum* L.). **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.680754.

APÊNDICE

Imagem A1: (-)-IES-EM do pico de m/z 233,0818 do extrato etanólico dos frutos de *Piper macedoi*

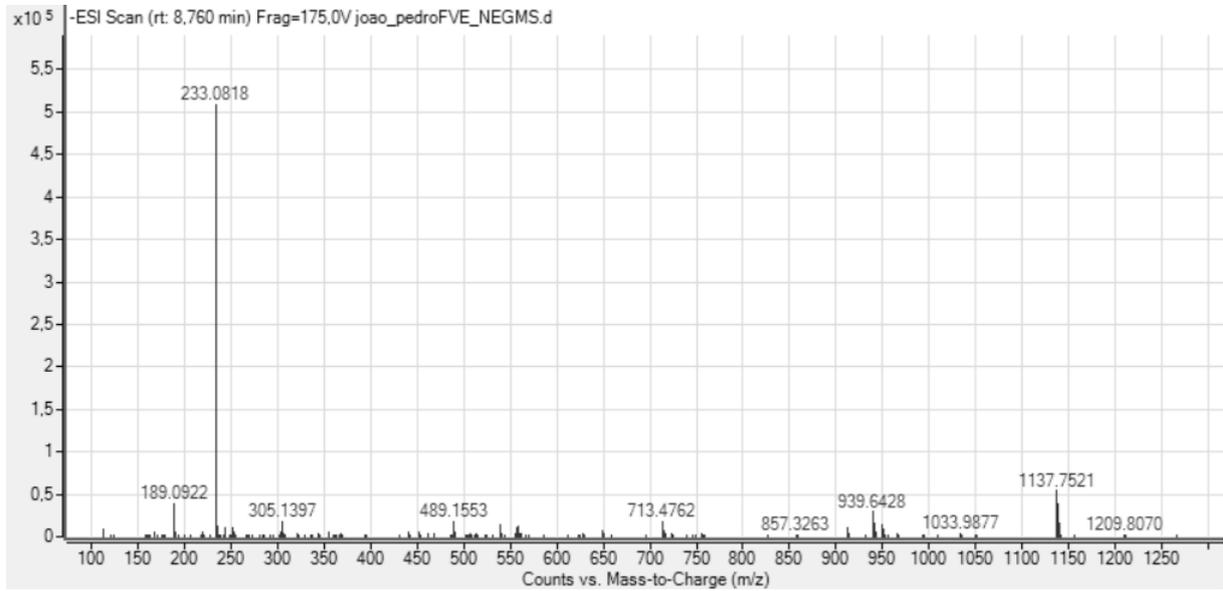


Imagem A2: (-)-IES-EM do pico de m/z 205,0875 do extrato etanólico dos frutos de *Piper macedoi*

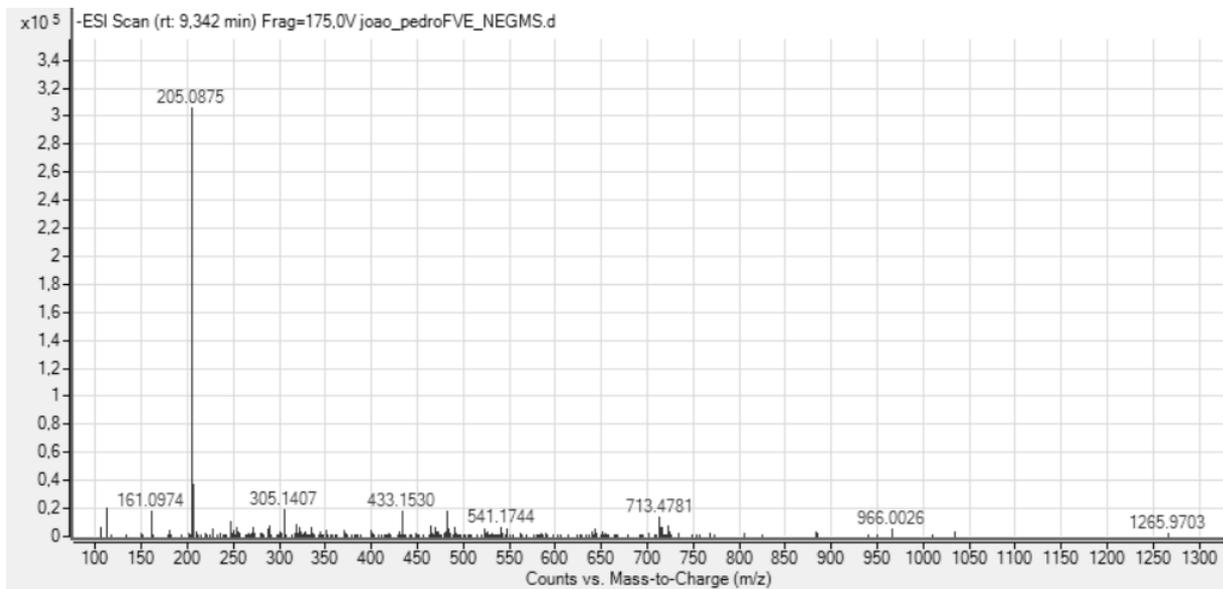


Imagem A3: (-)-IES-EM do pico de m/z 287,0948 do extrato etanólico dos frutos de *Piper macedoi*

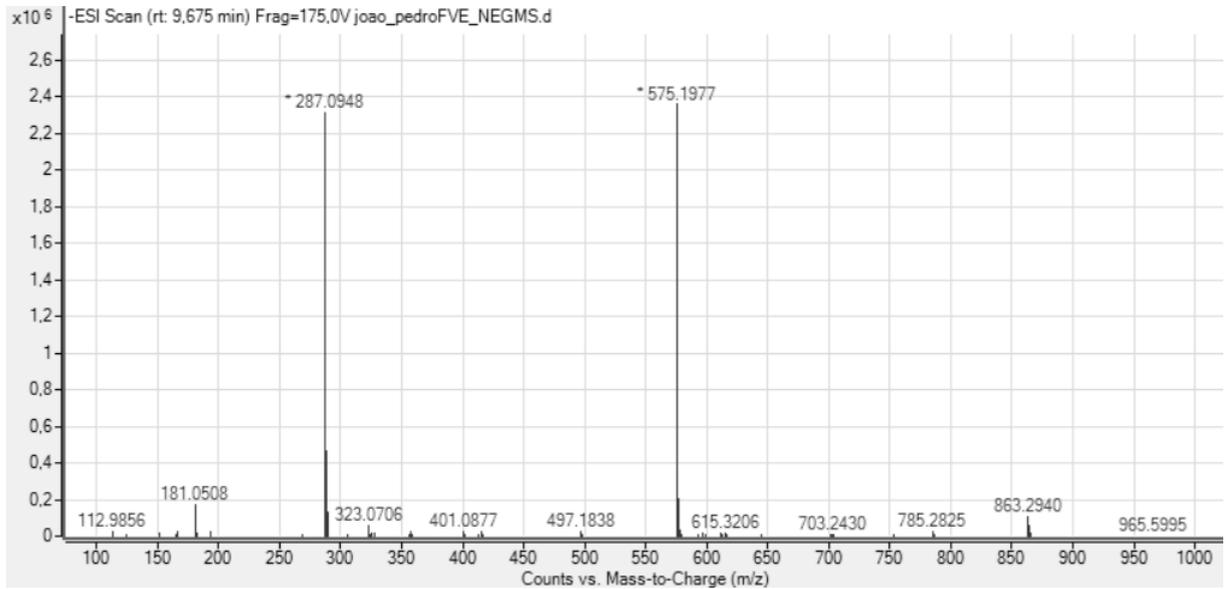


Imagem A4: (-)-IES-EM do pico de m/z 255,0668 do extrato etanólico dos frutos de *Piper macedoi*

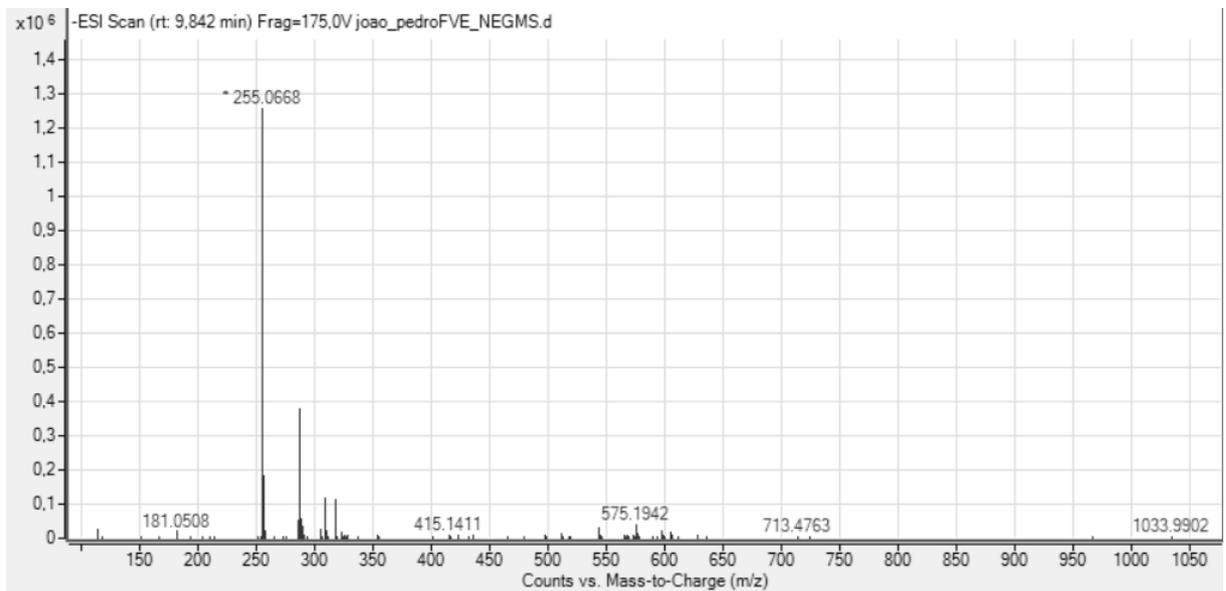


Imagem A5: (-)-IES-EM do pico de m/z 257,0827 do extrato etanólico dos frutos de *Piper macedoi*

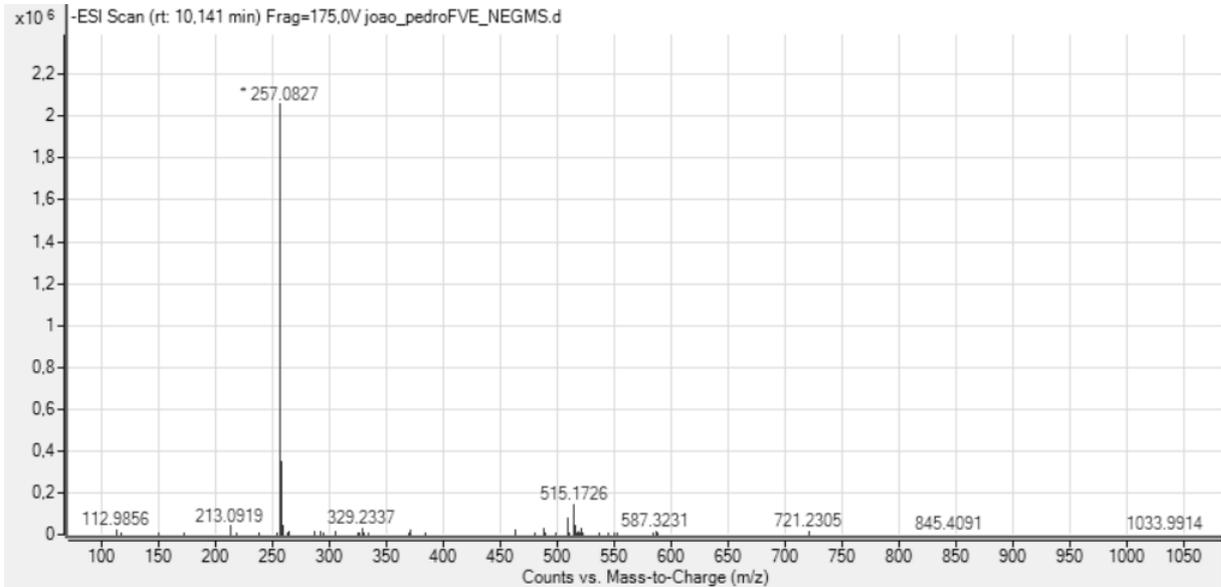


Imagem A6: (-)-IES-EM do pico de m/z 305,1397 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

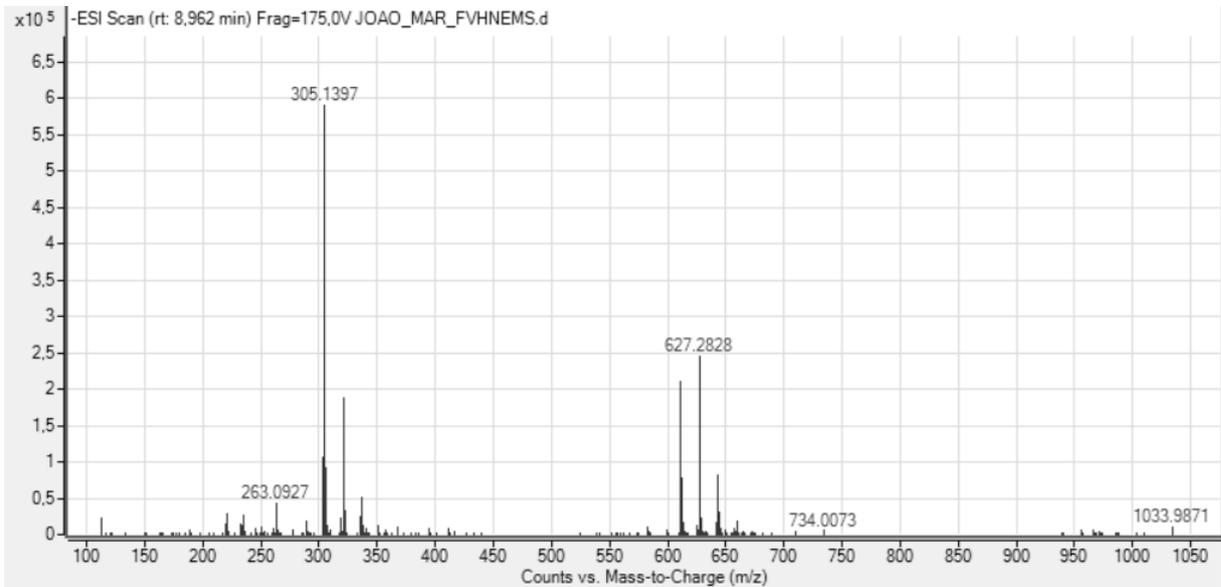


Imagem A7: (-)-IES-EM do pico de m/z 319,1557 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

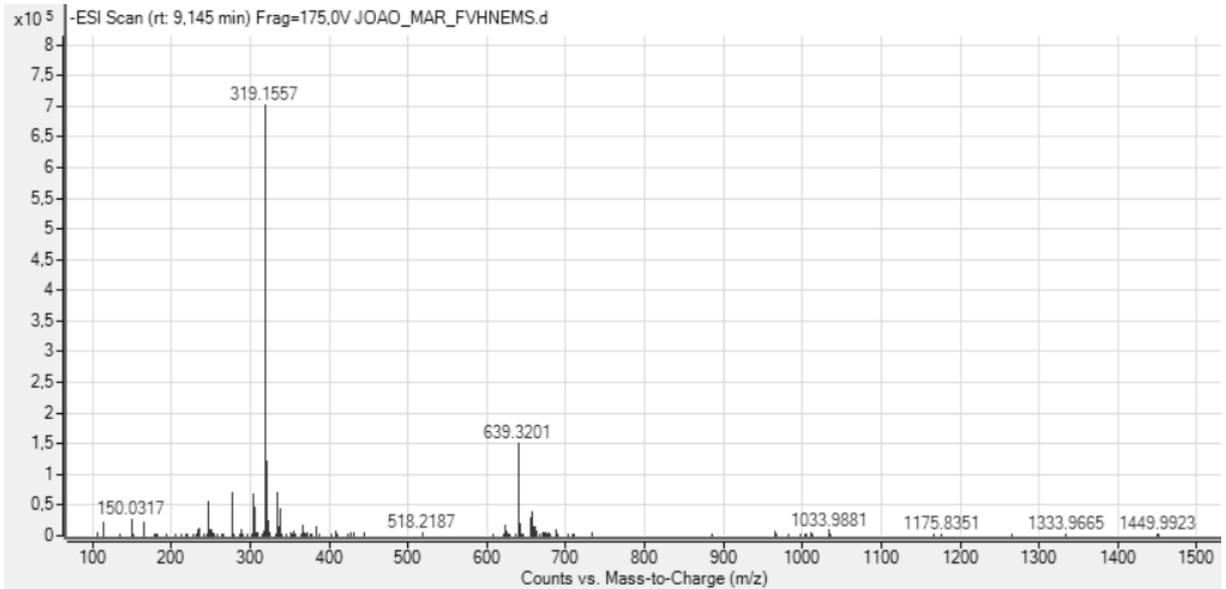


Imagem A8: (-)-IES-EM do pico de m/z 303,1620 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

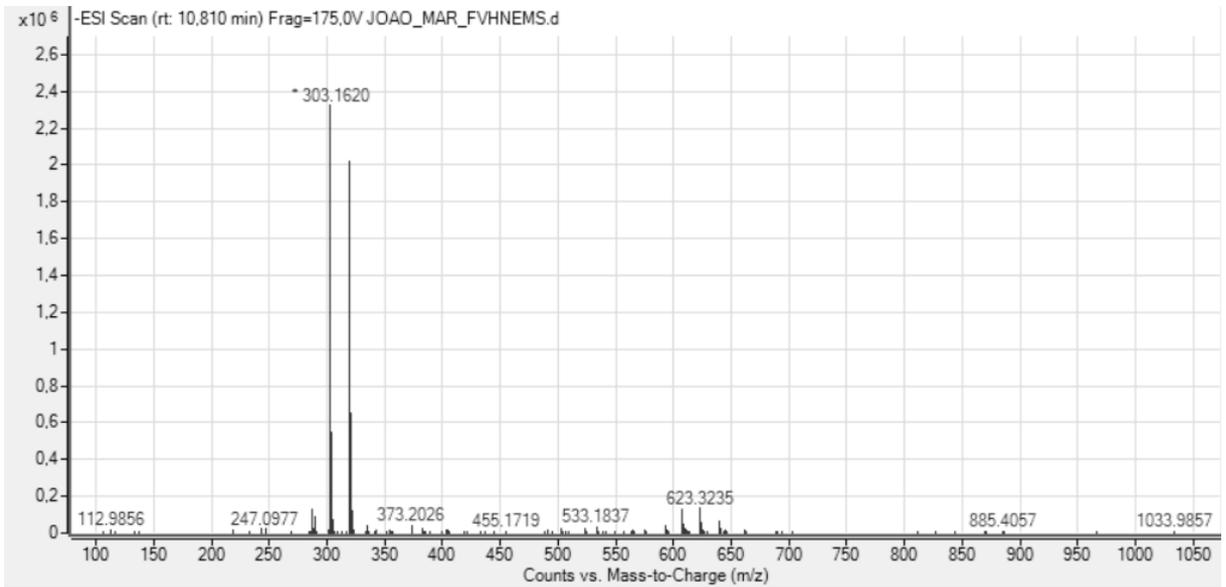


Imagem A9: (-)-IES-EM do pico de m/z 271,0983 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

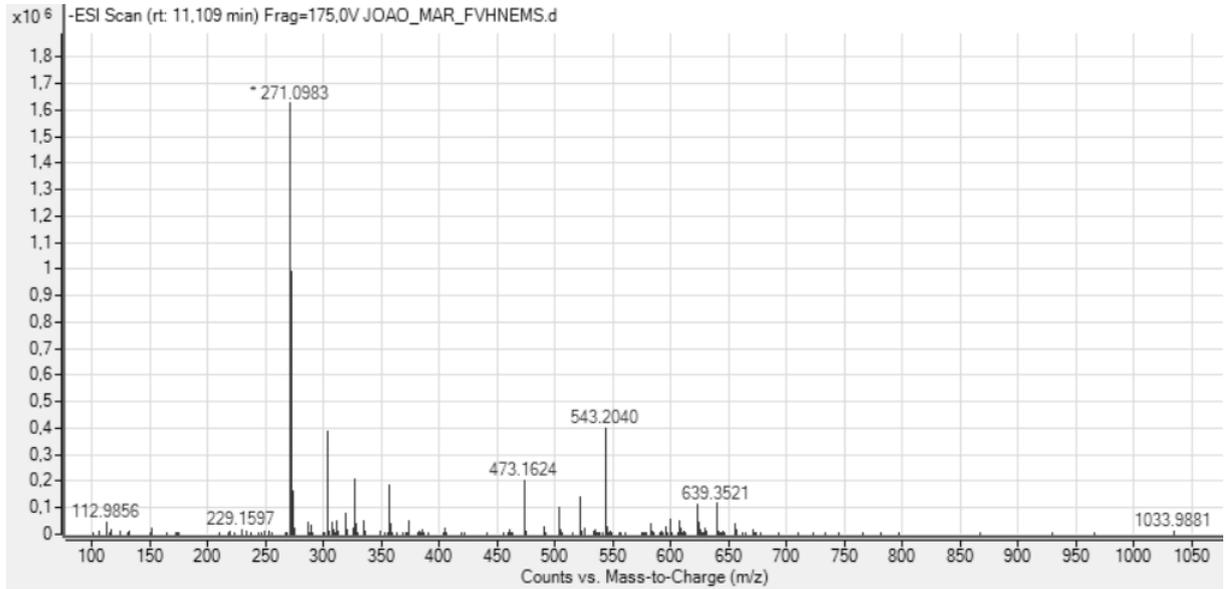


Imagem A10: (-)-IES-EM do pico de m/z 287,1659 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

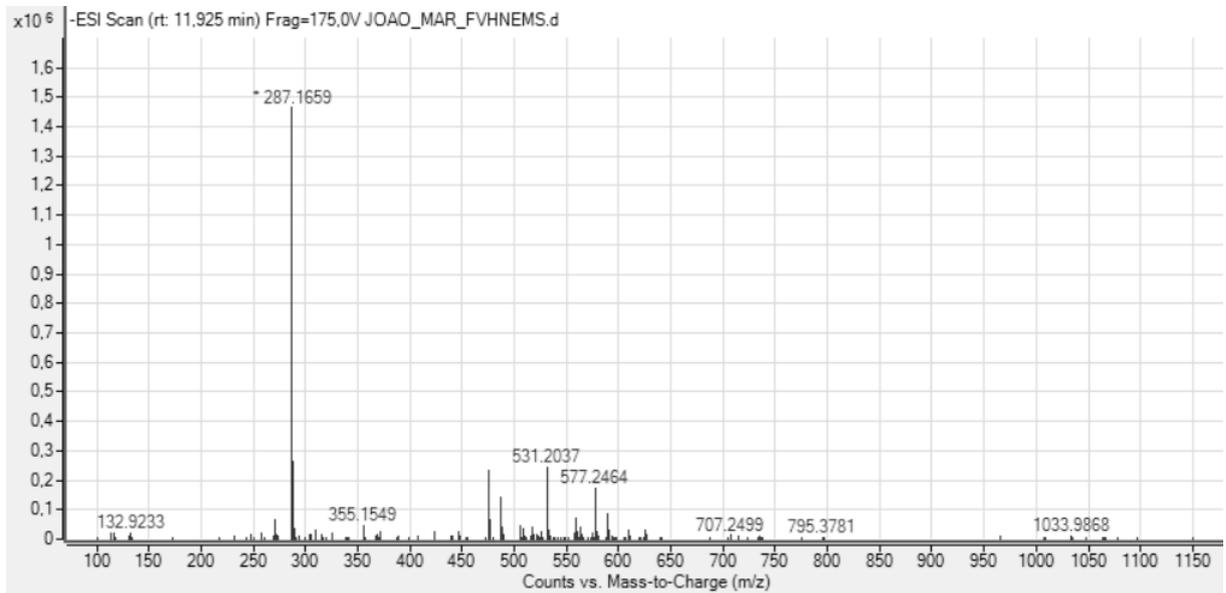


Imagem A11: (-)-IES-EM do pico de m/z 205,0907 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

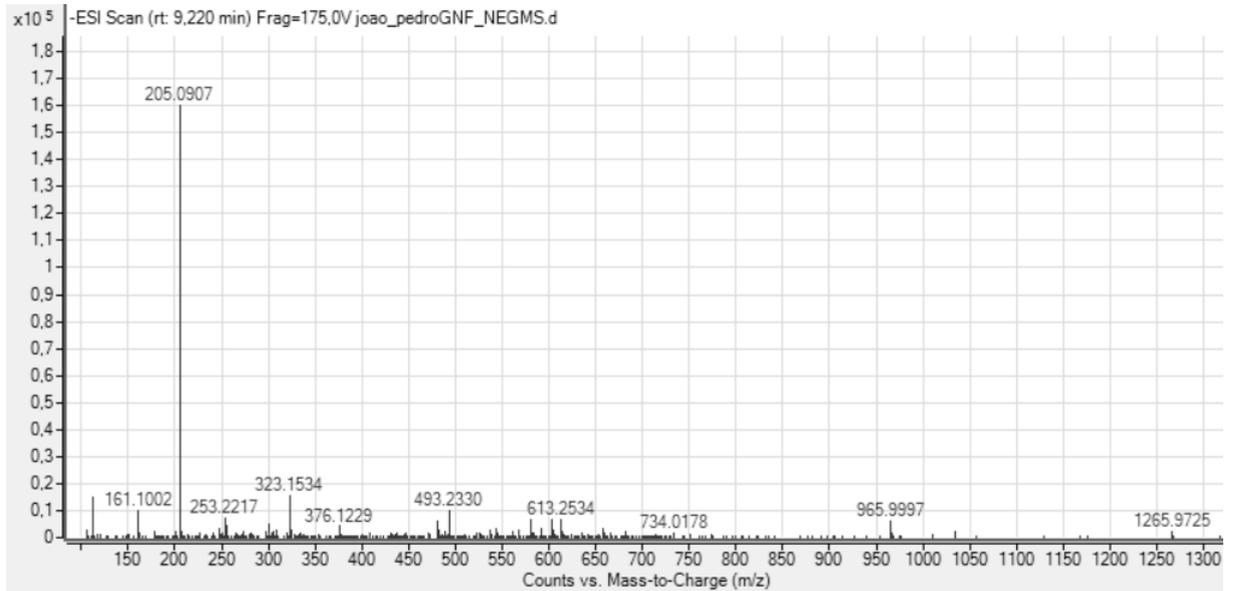


Imagem A12: (-)-IES-EM do pico de m/z 233,0857 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

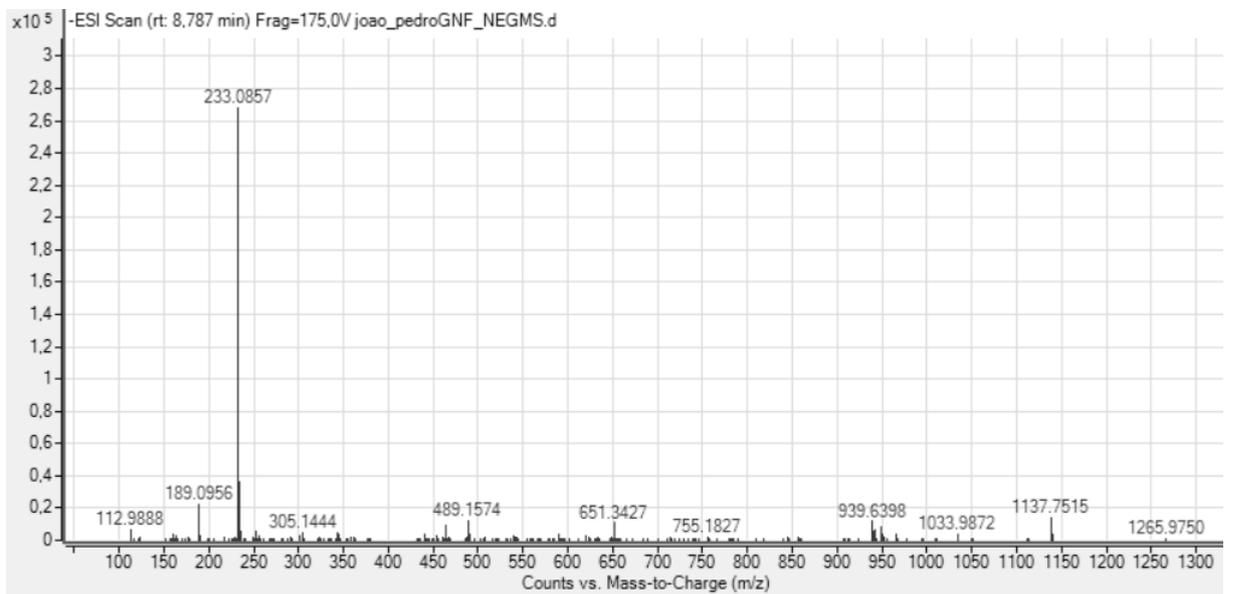


Imagem A13: (-)-IES-EM do pico de m/z 431,1000 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

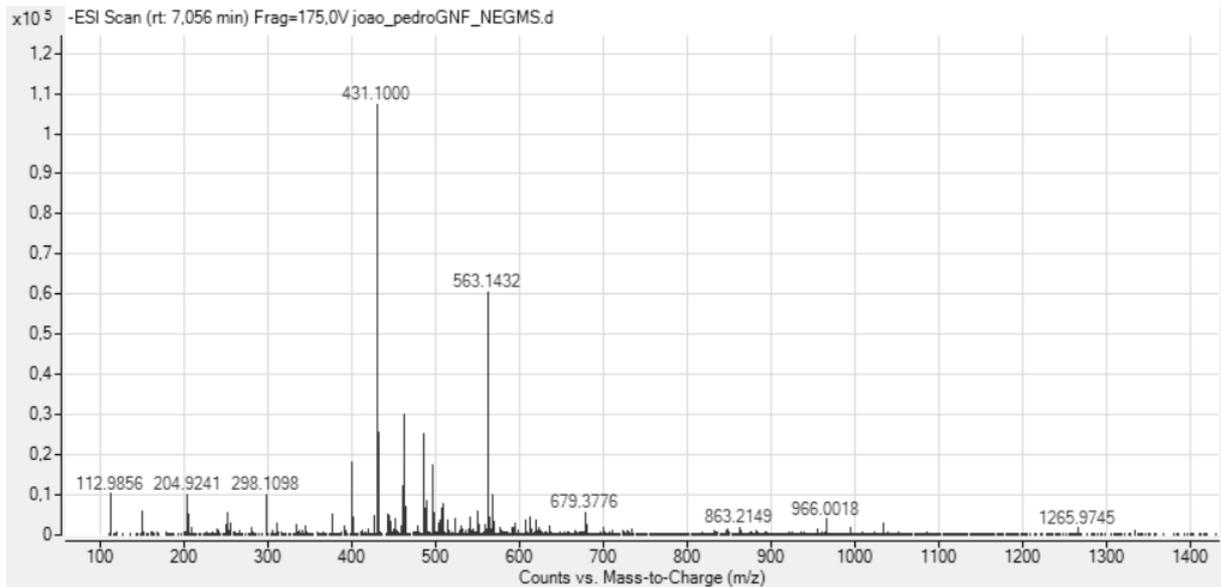


Imagem A14: (-)-IES-EM do pico de m/z 287,0927 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

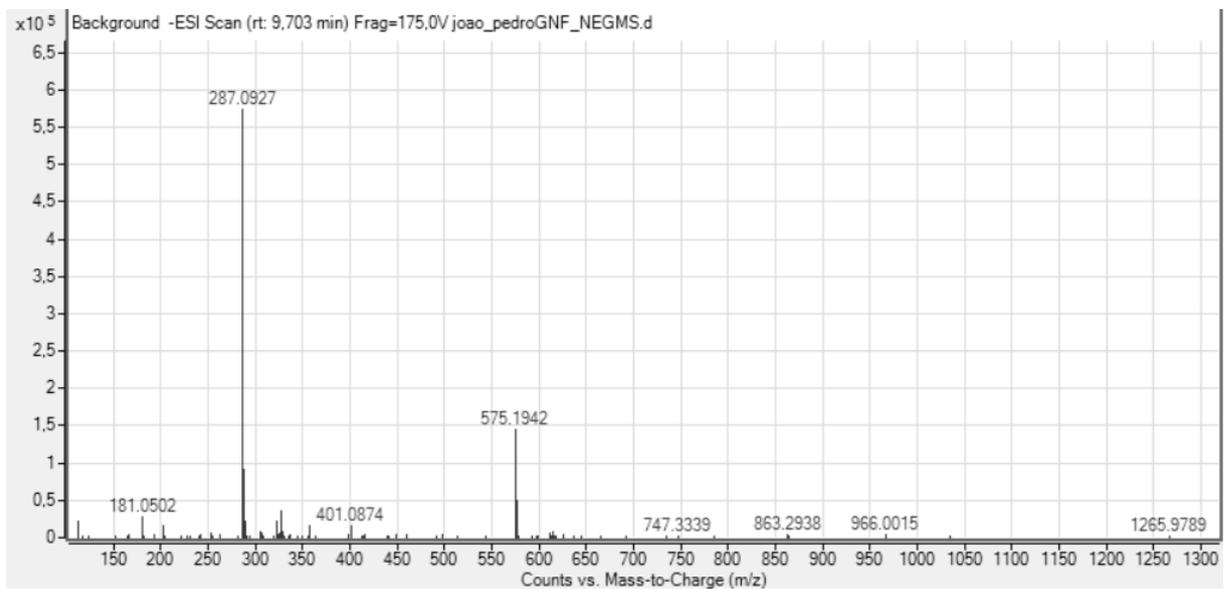


Imagem A15: (-)-IES-EM do pico de m/z 271,0982 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuligineum*

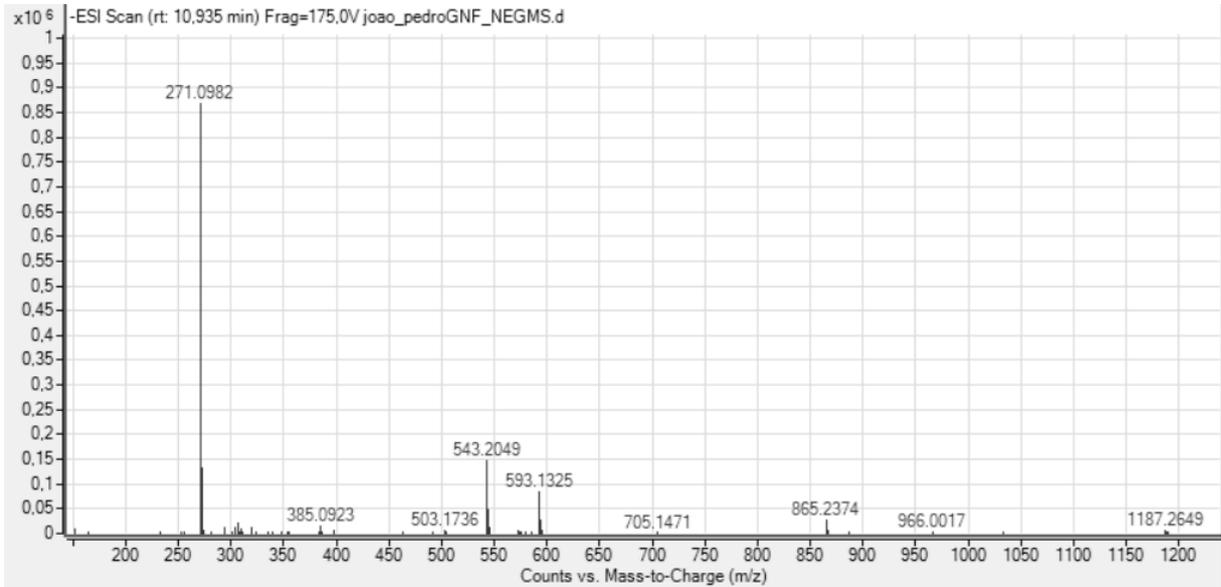


Imagem A16: (-)-IES-EM do pico de m/z 315,1244 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuligineum*

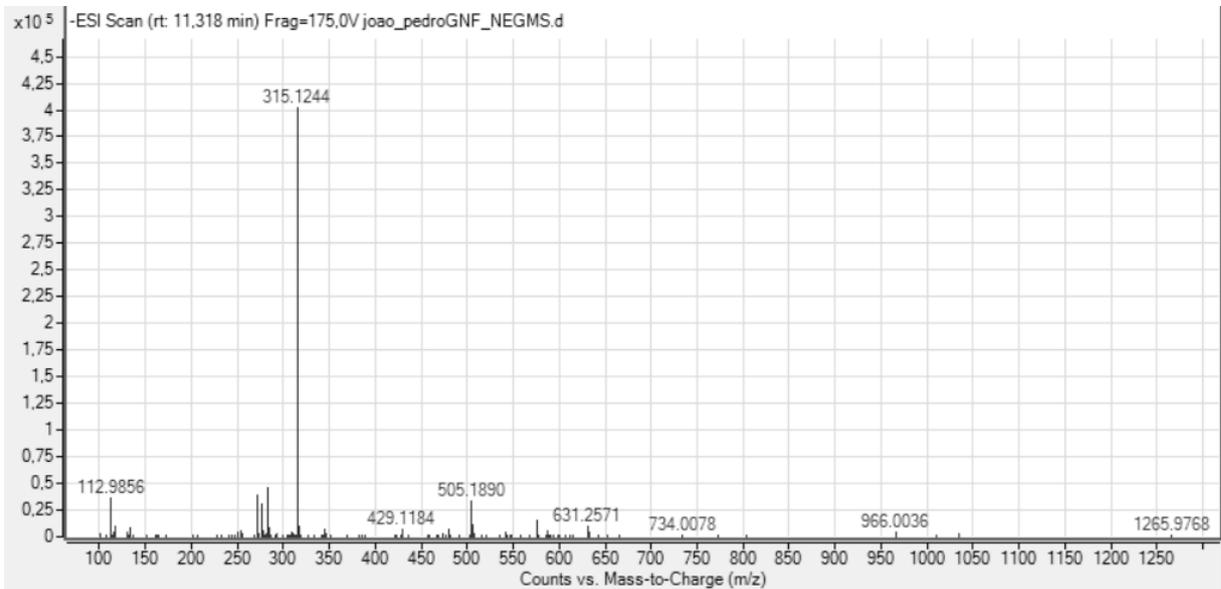


Imagem A17: (-)-IES-EM do pico de m/z 257,0826 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

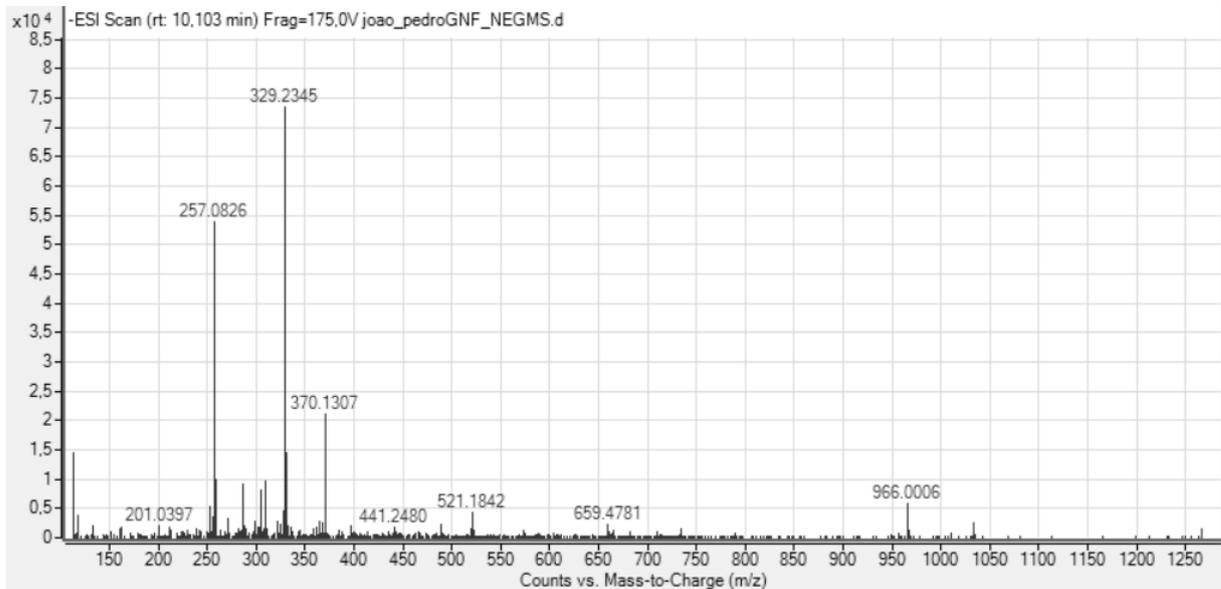


Imagem A18: (-)-IES-EM do pico de m/z 305,1404 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

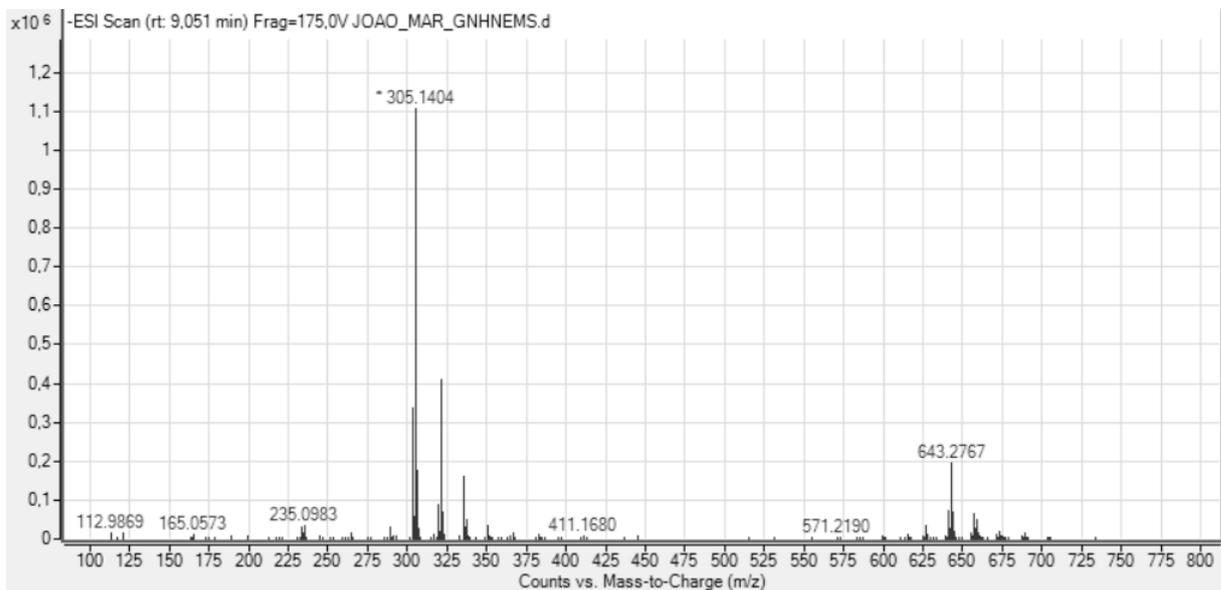


Imagem A19: (-)-IES-EM do pico de m/z 319,1553 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

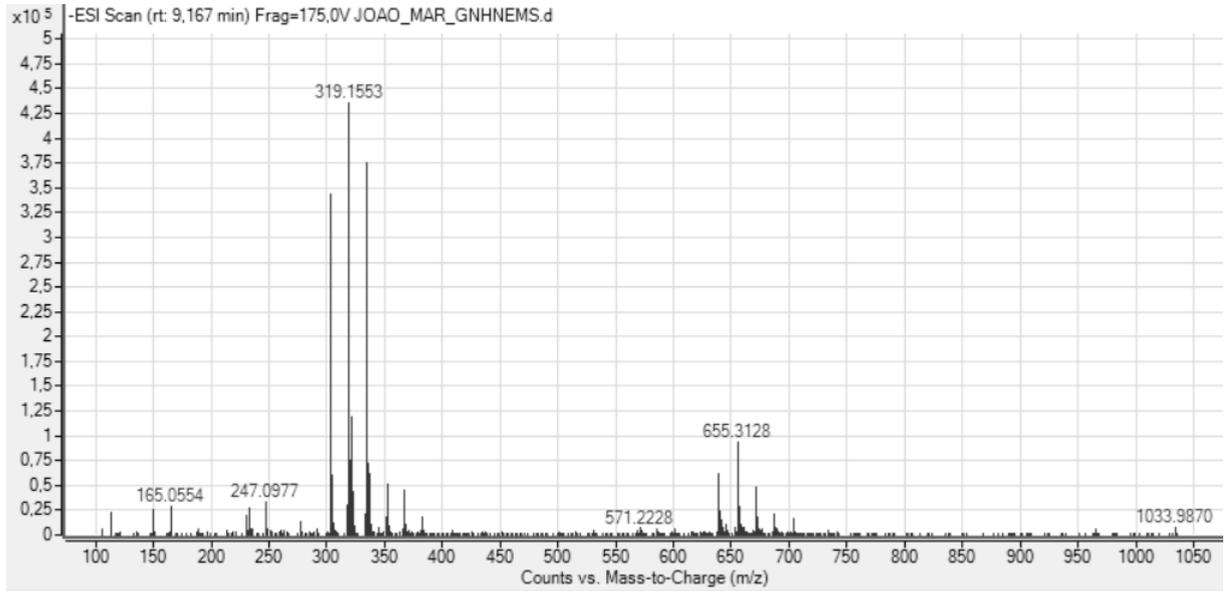


Imagem A20: (-)-IES-EM do pico de m/z 303,1204 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

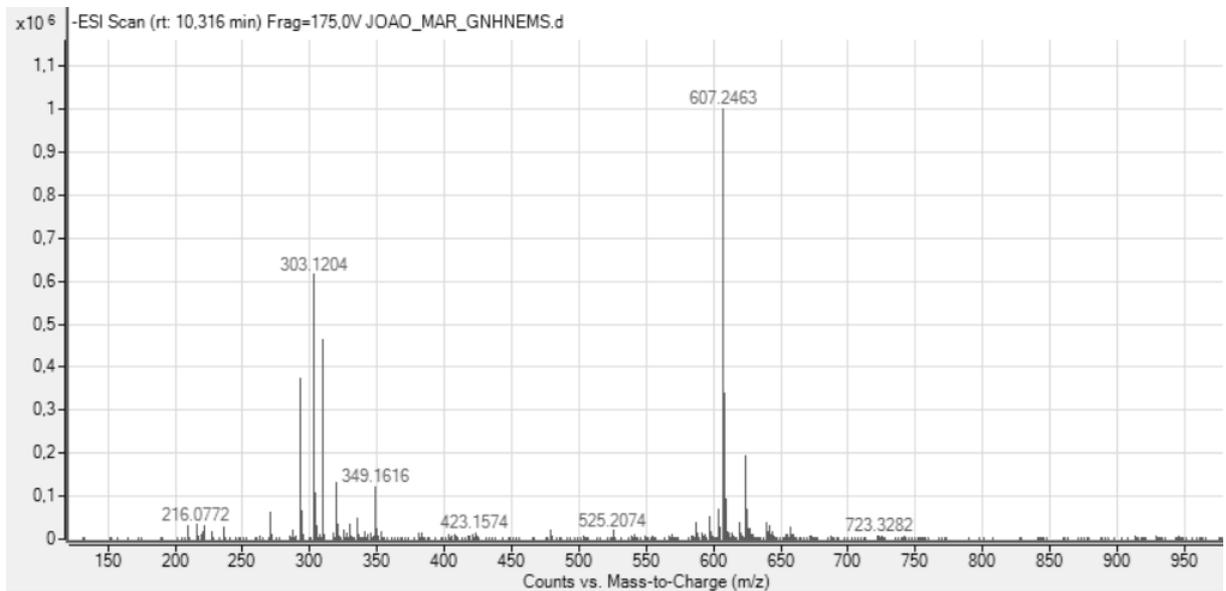


Imagem A21: (-)-IES-EM do pico de m/z 271,0997 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

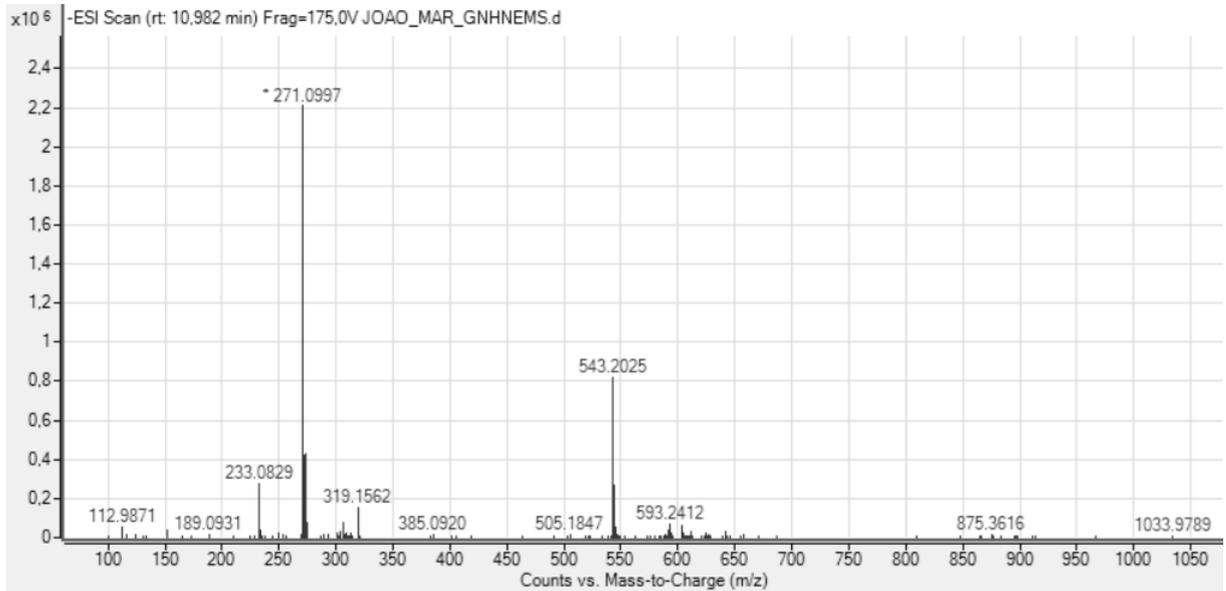


Imagem A22: (-)-IES-EM do pico de m/z 277,2175 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

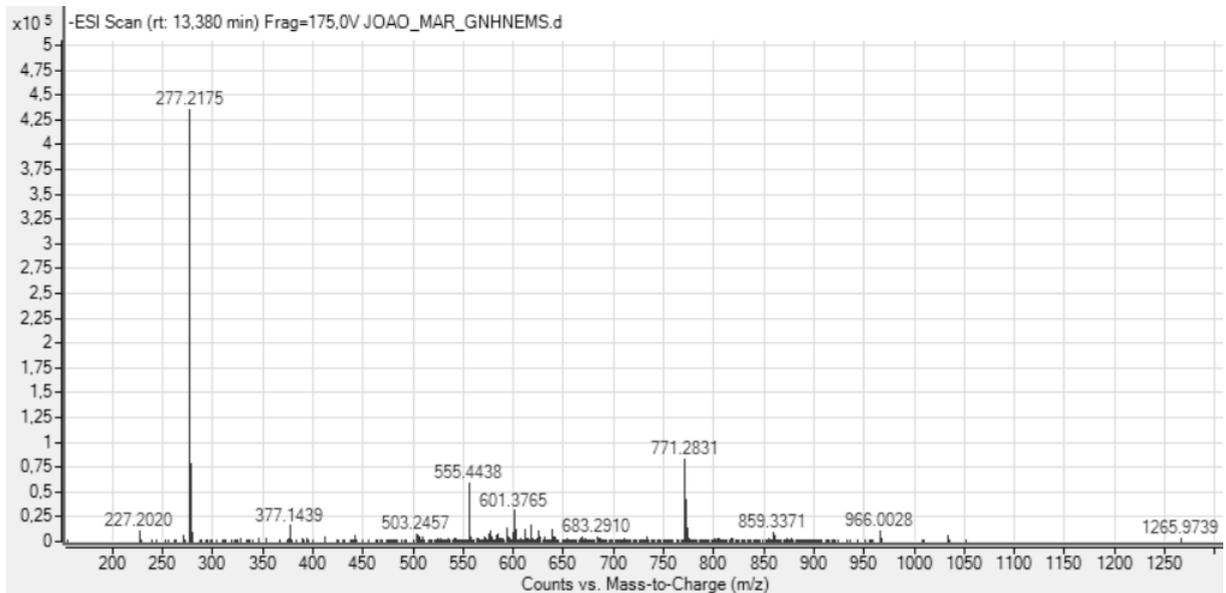


Imagem A23: (-)-IES-EM do pico de m/z 607,1689 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

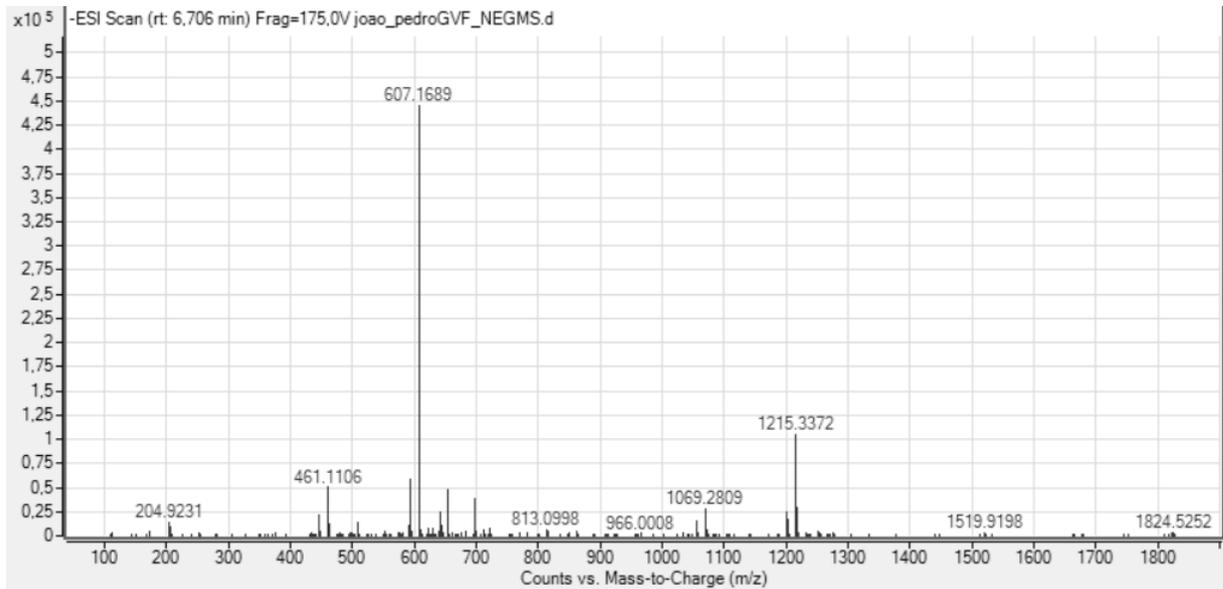


Imagem A24: (-)-IES-EM do pico de m/z 431,0997 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

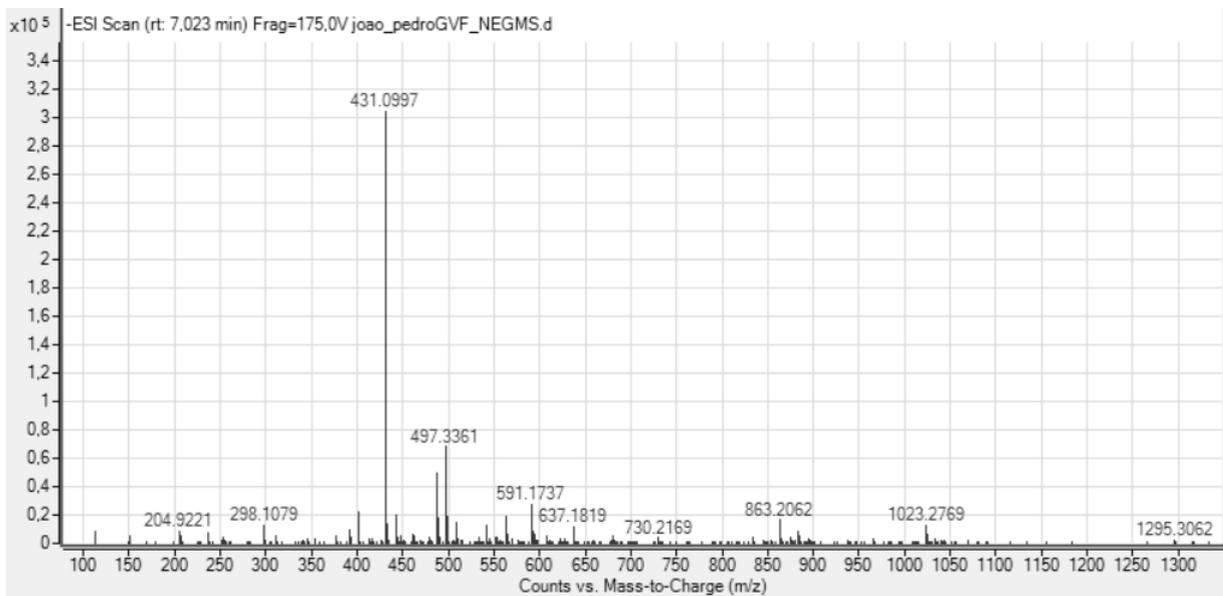


Imagem A25: (-)-IES-EM do pico de m/z 205,0874 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

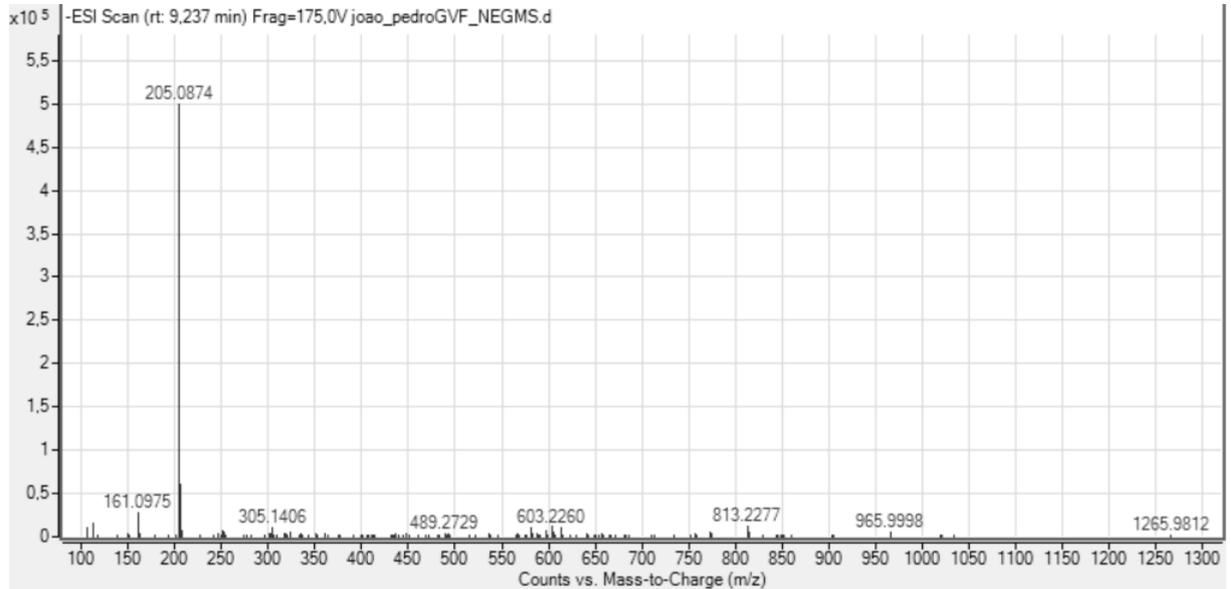


Imagem A26: (-)-IES-EM do pico de m/z 287,0931 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

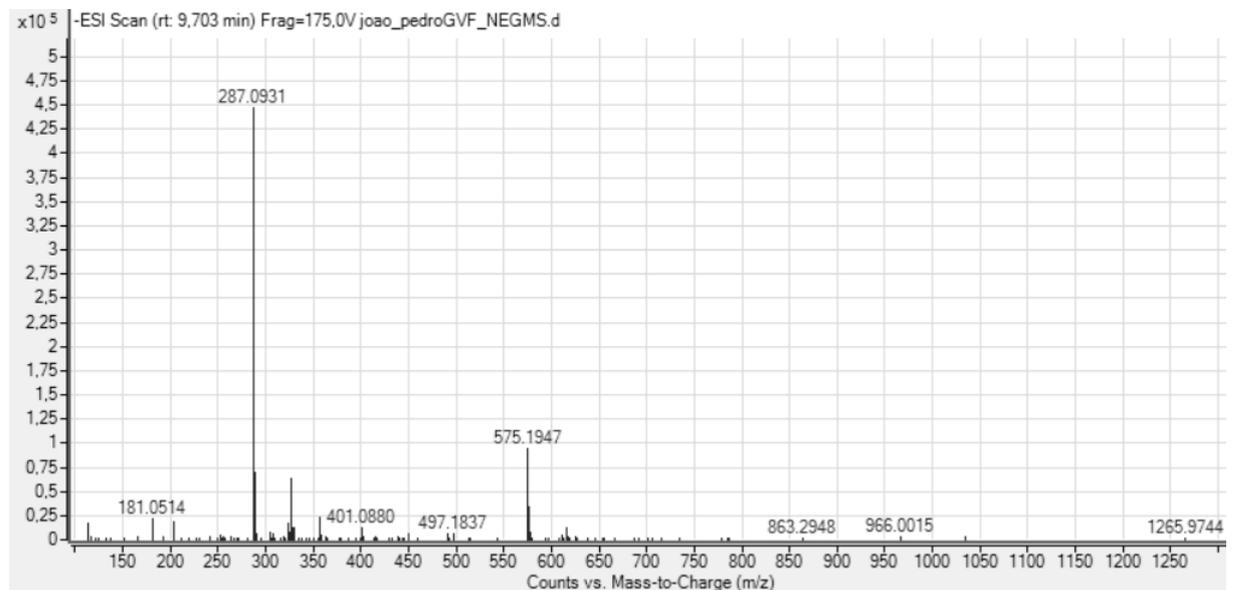


Imagem A27: (-)-IES-EM do pico de m/z 271,1023 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

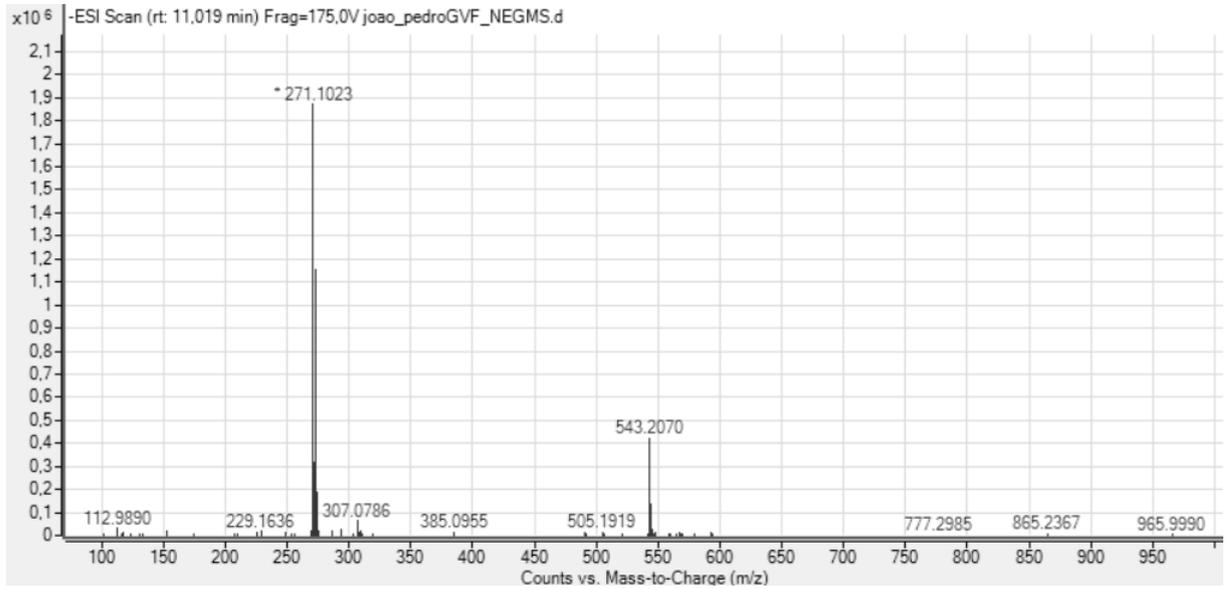


Imagem A28: (-)-IES-EM do pico de m/z 305,1404 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

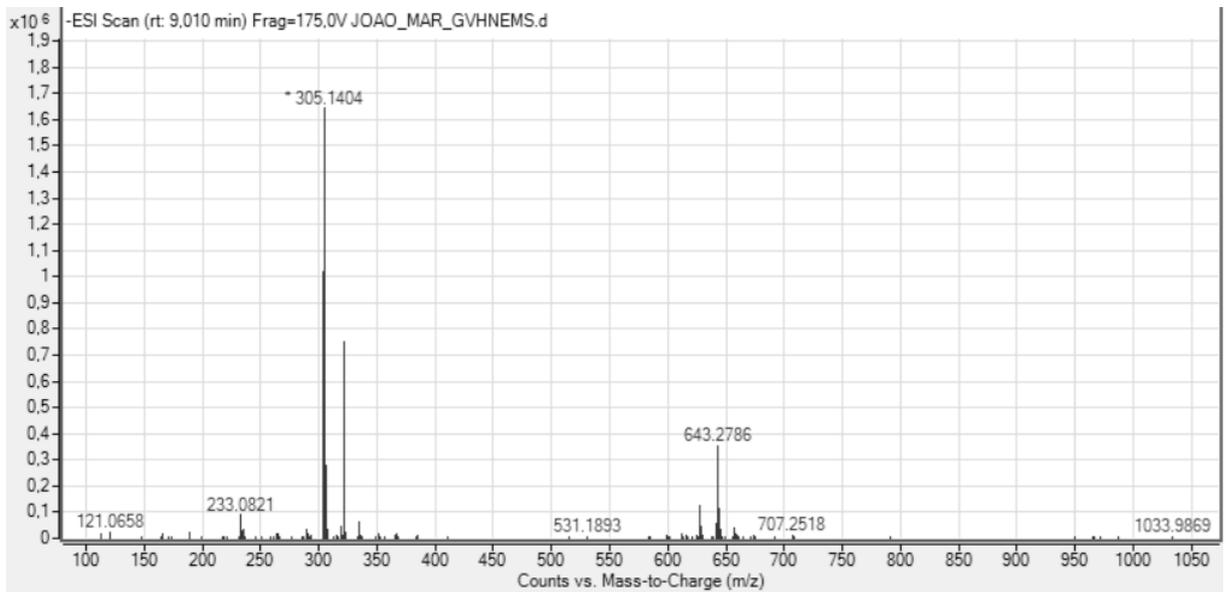


Imagem A29: (-)-IES-EM do pico de m/z 319,1555 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

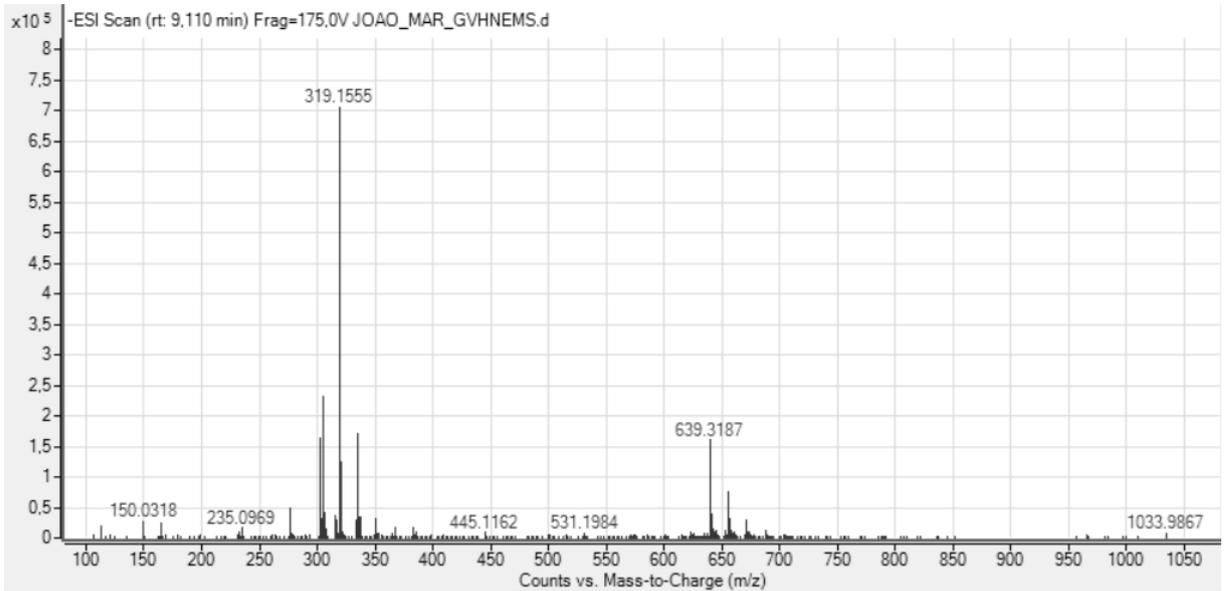


Imagem A30: (-)-IES-EM do pico de m/z 271,0980 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

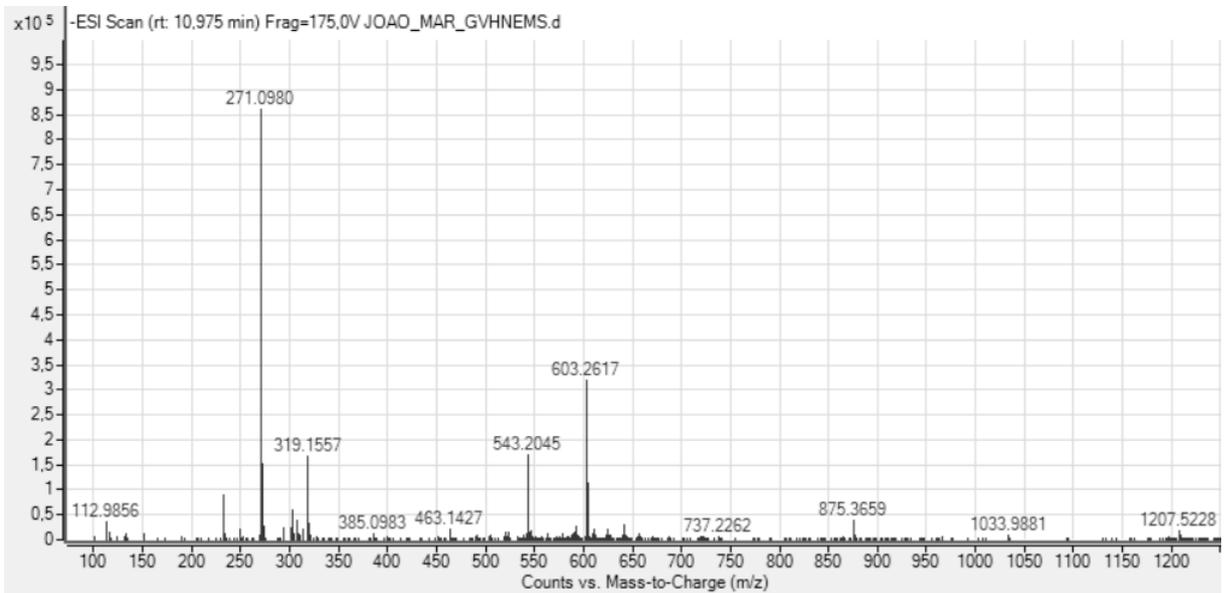


Imagem A31: (-)-IES-EM do pico de m/z 295,2285 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

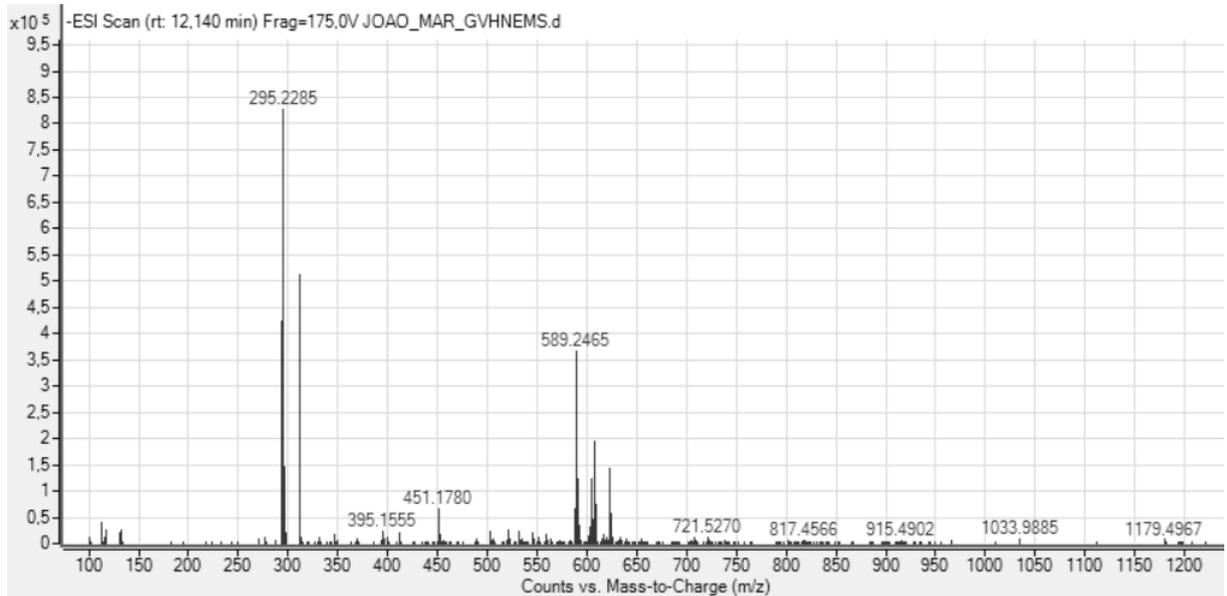


Imagem A32: (-)-IES-EM do pico de m/z 279,2341 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

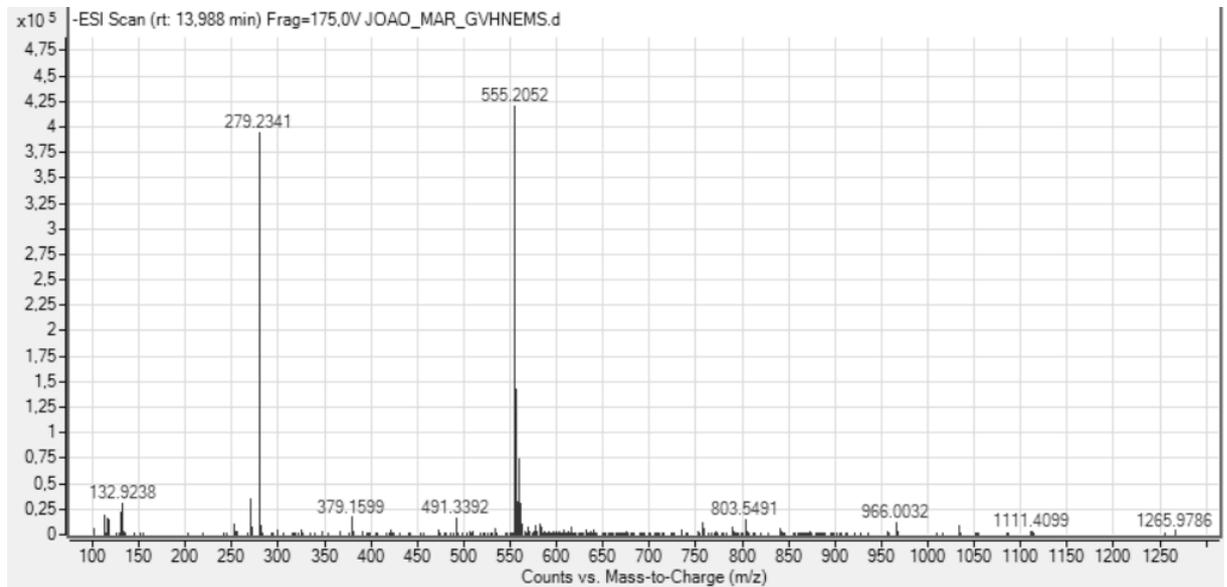


Imagem A33: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 305,1394 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

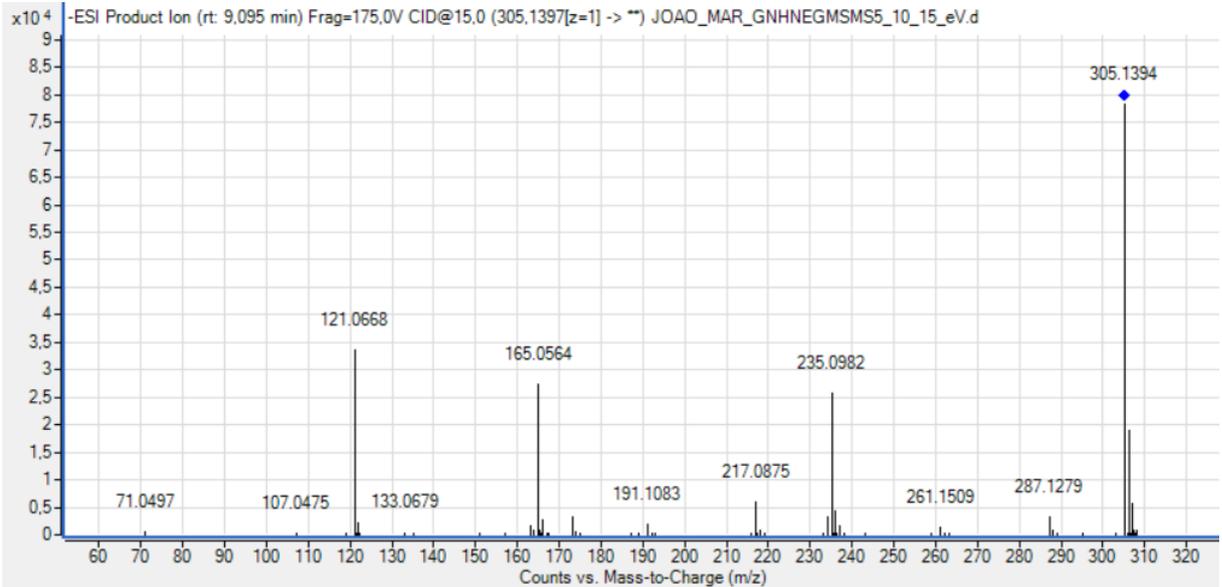


Imagem A34: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 319,1554 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

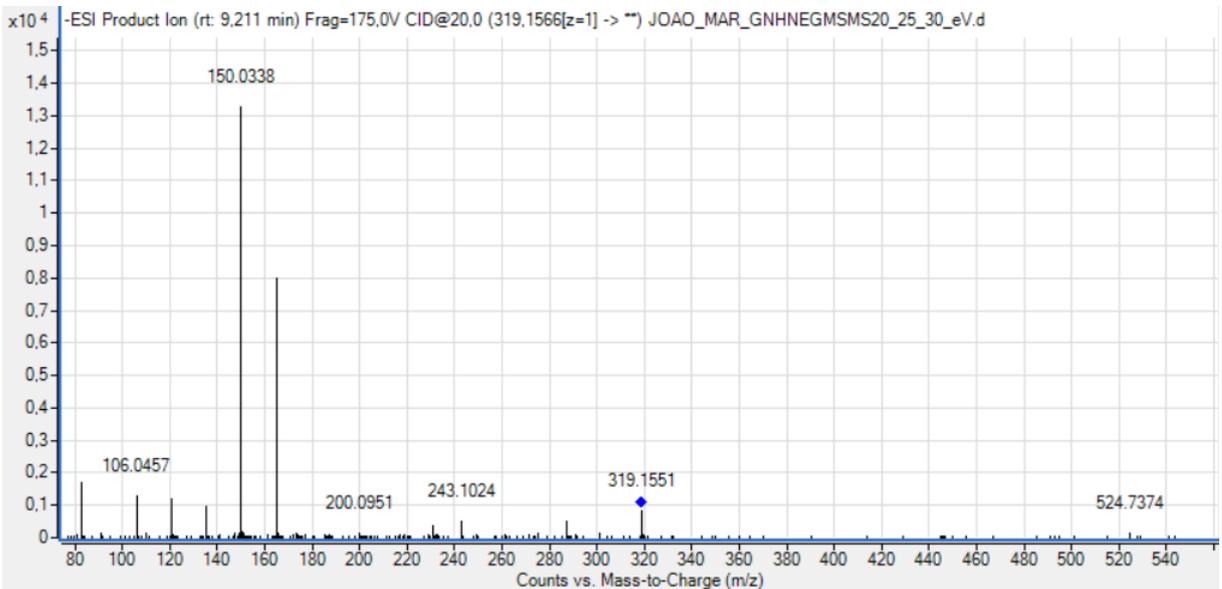


Imagem A35: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 303,1608 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

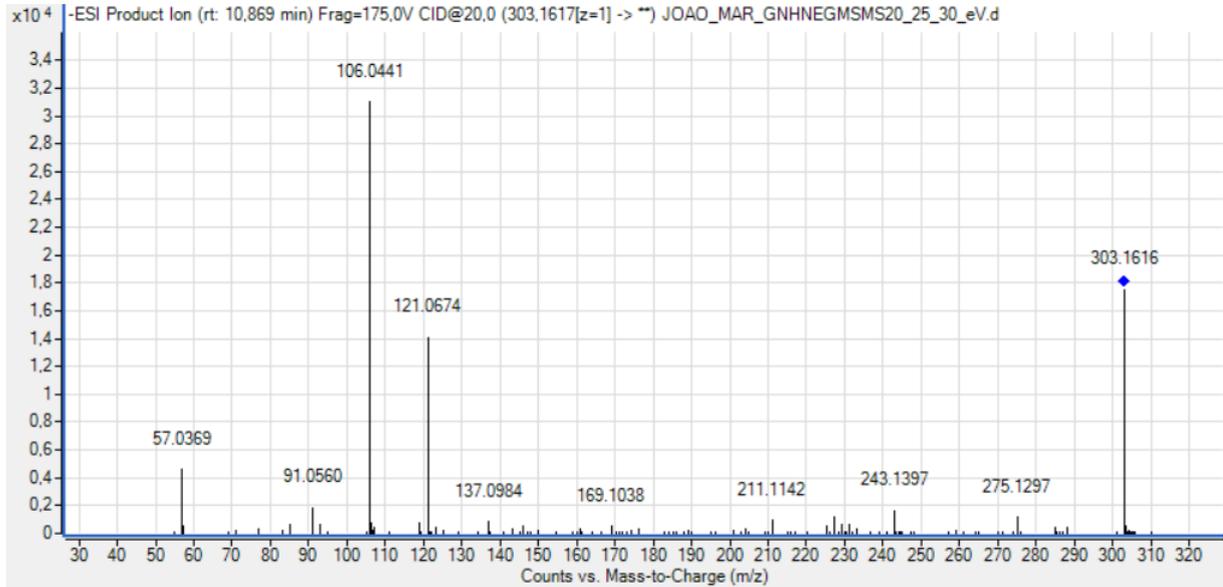


Imagem A36: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 271,0993 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

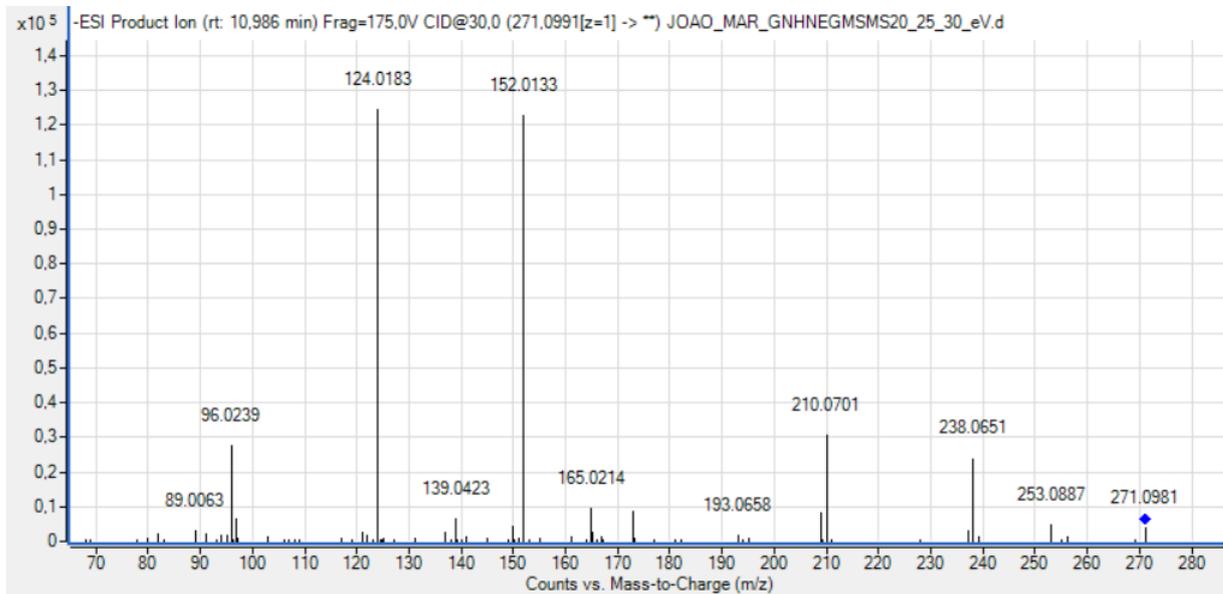


Imagem A37: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 277,2175 do extrato hexânico dos galhos de *Piper fuliginum*

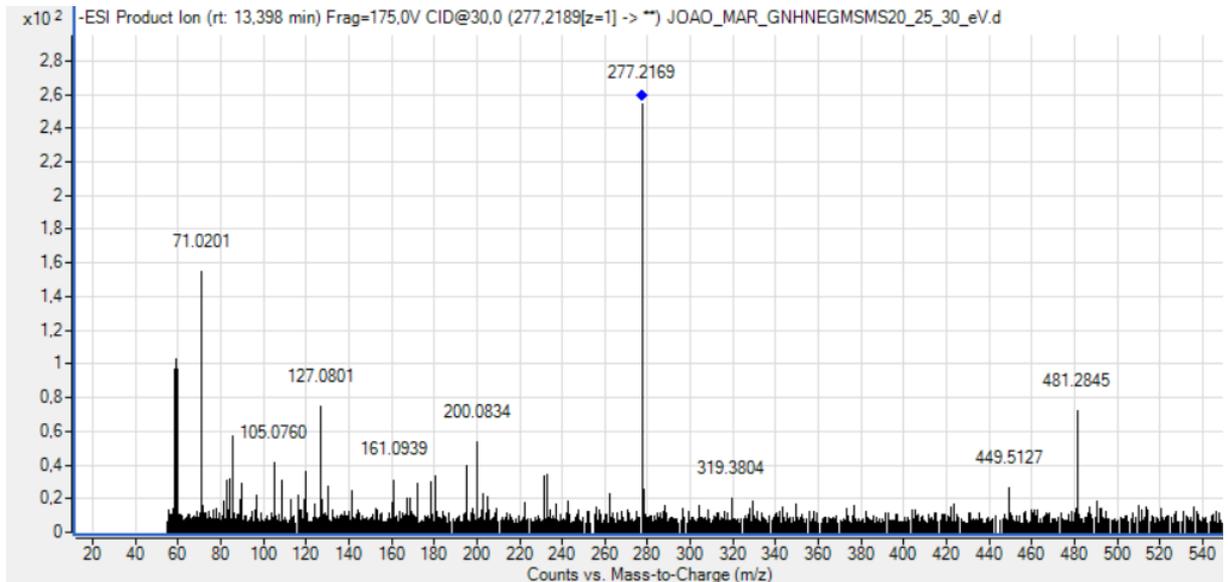


Imagem A38: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 431,1000 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

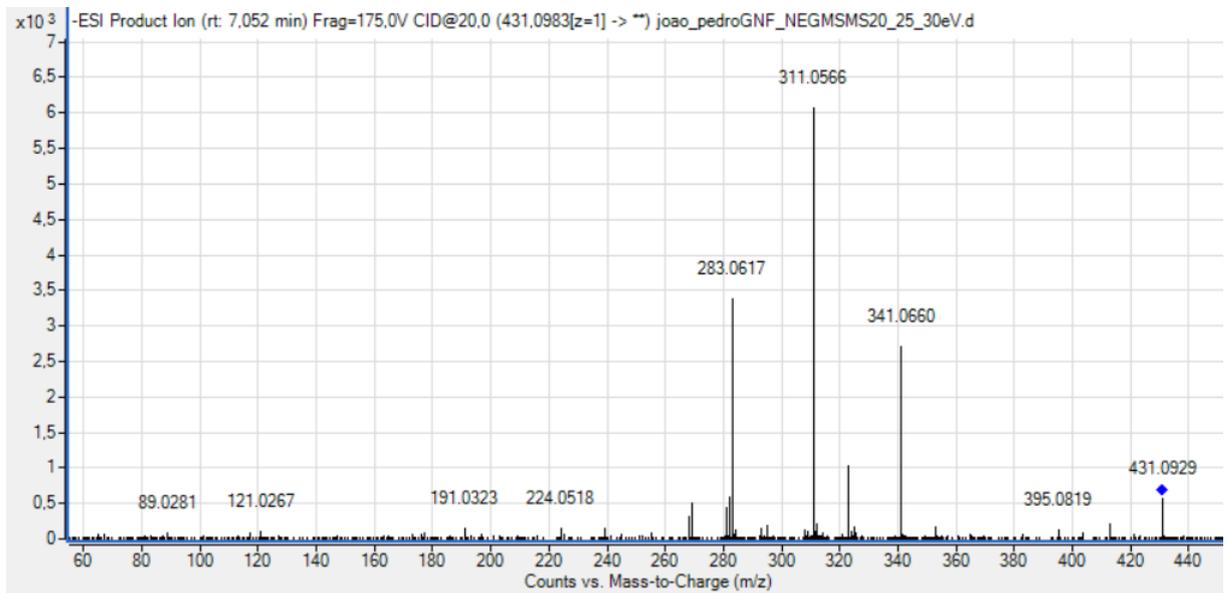


Imagem A39: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 233,0823 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

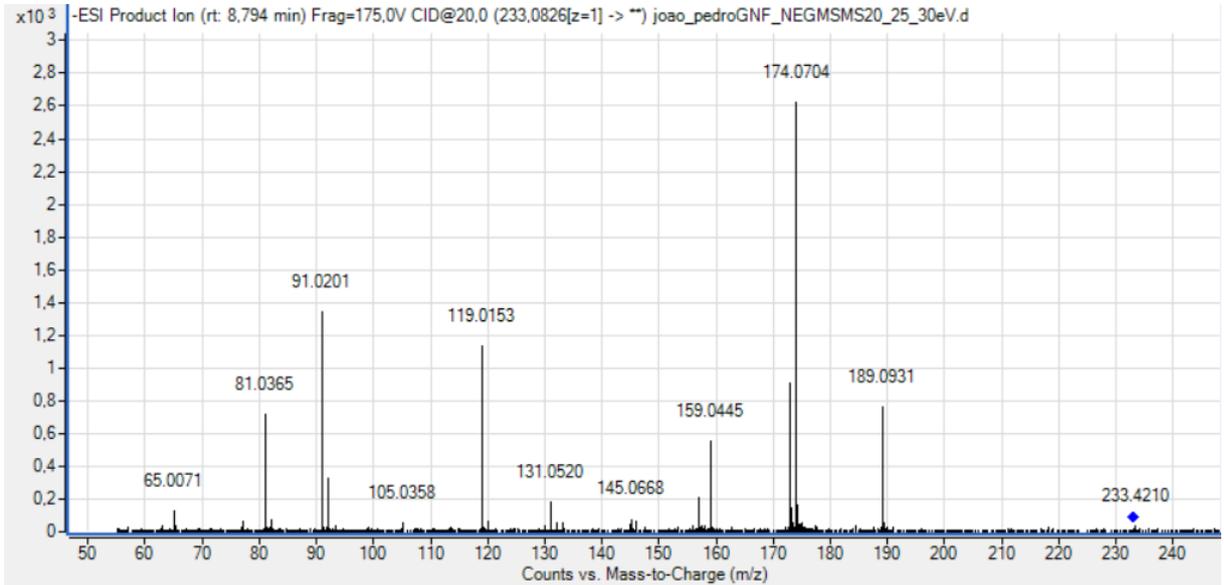


Imagem A40: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 205,0869 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

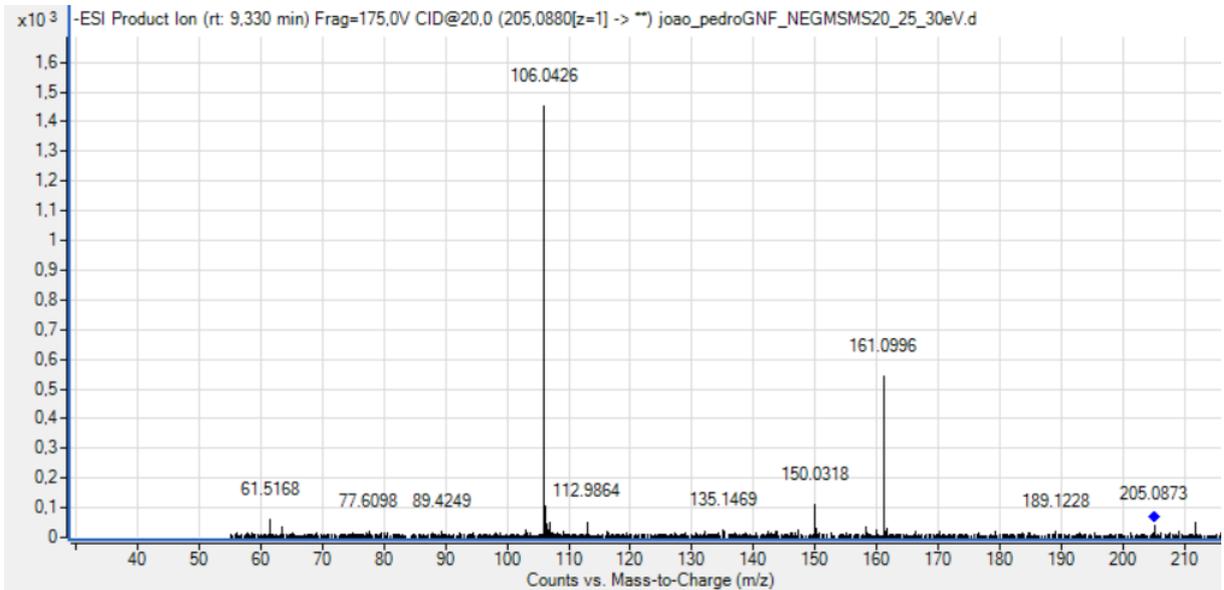


Imagem A41: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 287,0927 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

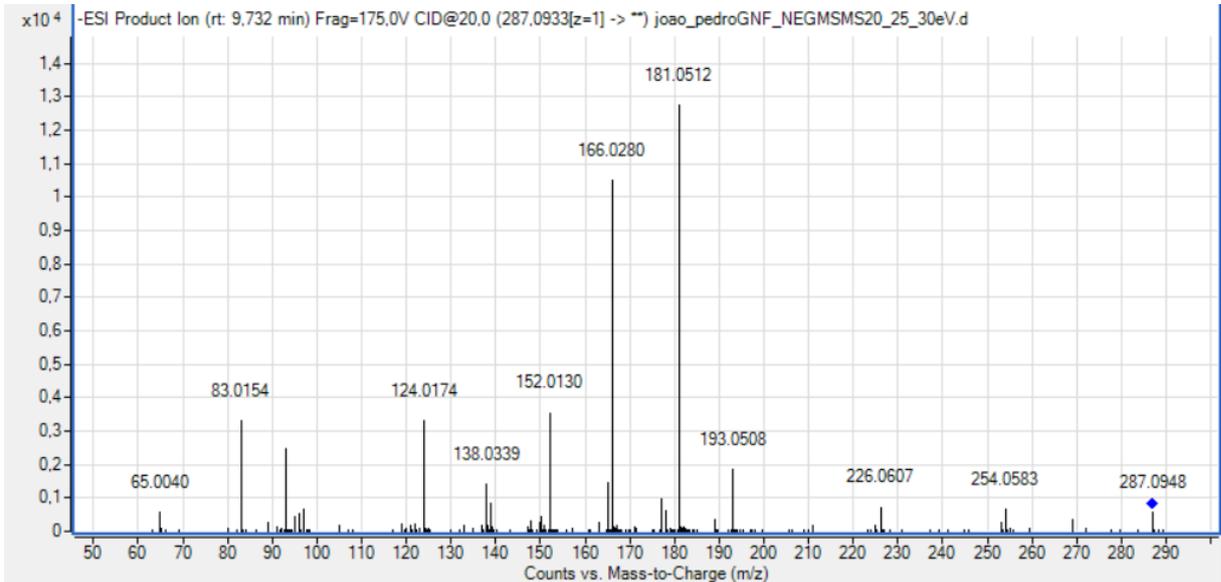


Imagem A42: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 257,0826 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

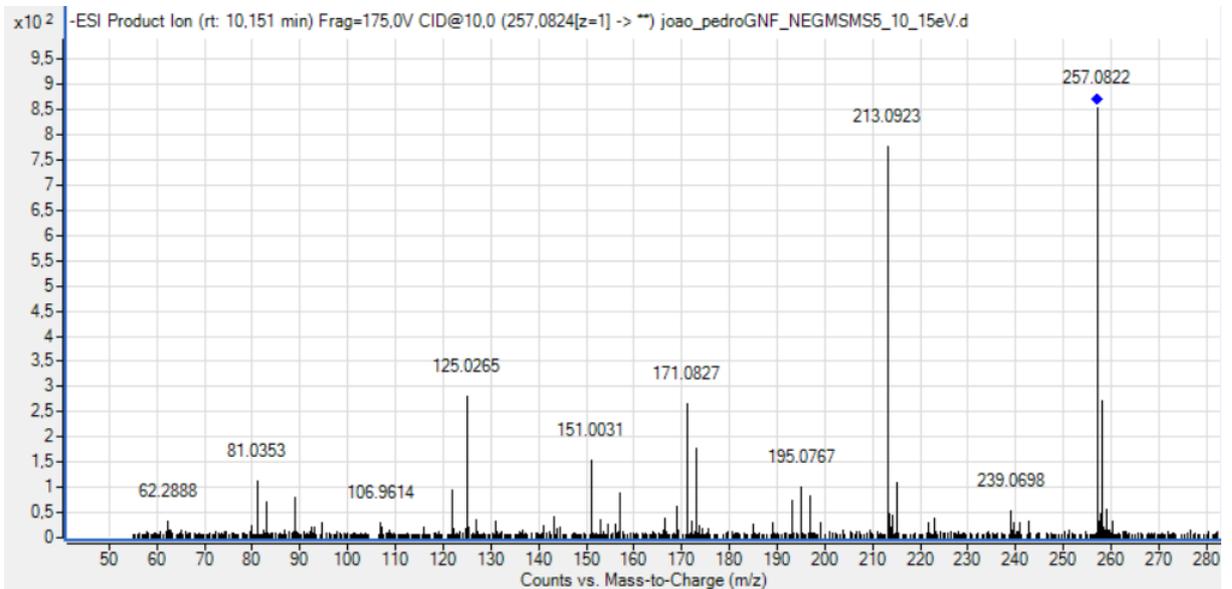


Imagem A43: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 271,0982 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

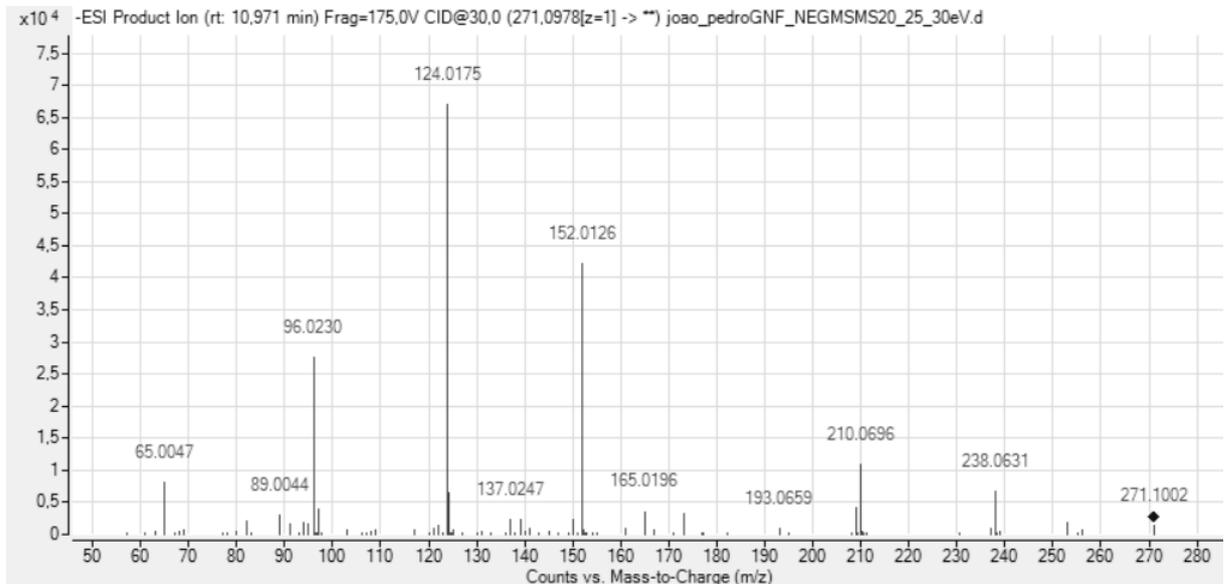


Imagem A44: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 315,1248 do extrato etanólico dos galhos de *Piper fuliginum*

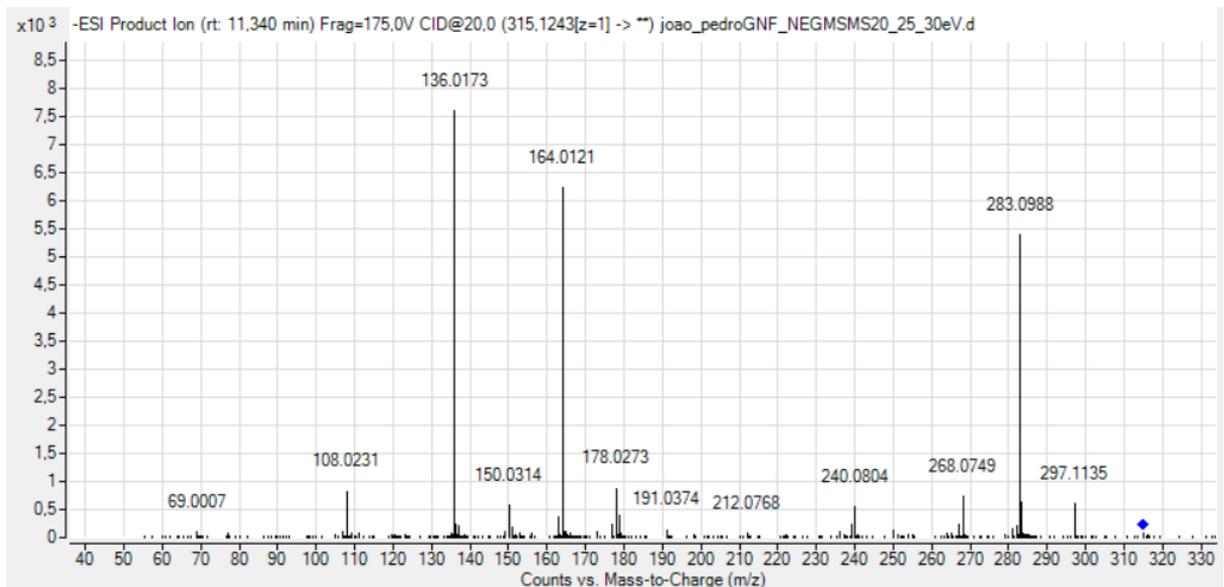


Imagem A45: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 305,1404 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

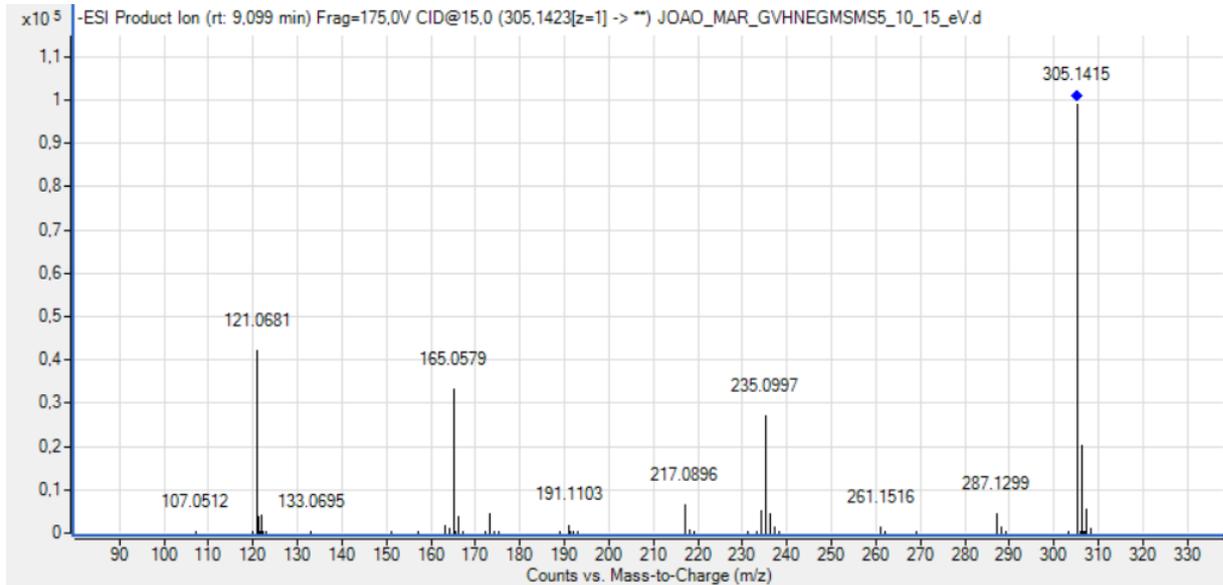


Imagem A46: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 319,1555 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

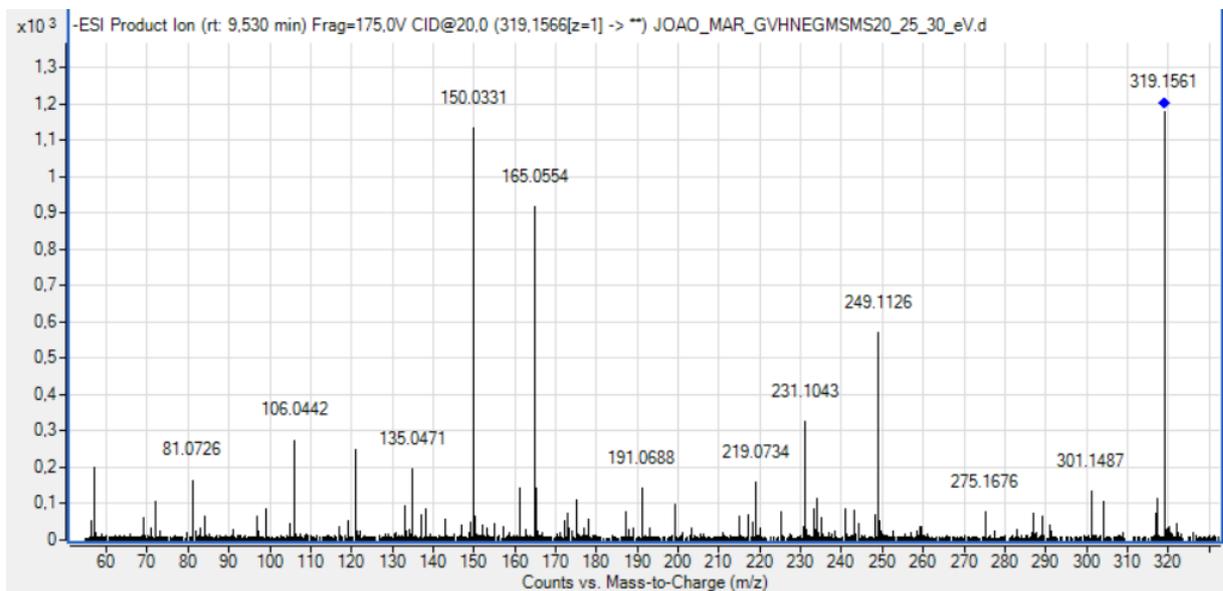


Imagem A47: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 271,0980 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

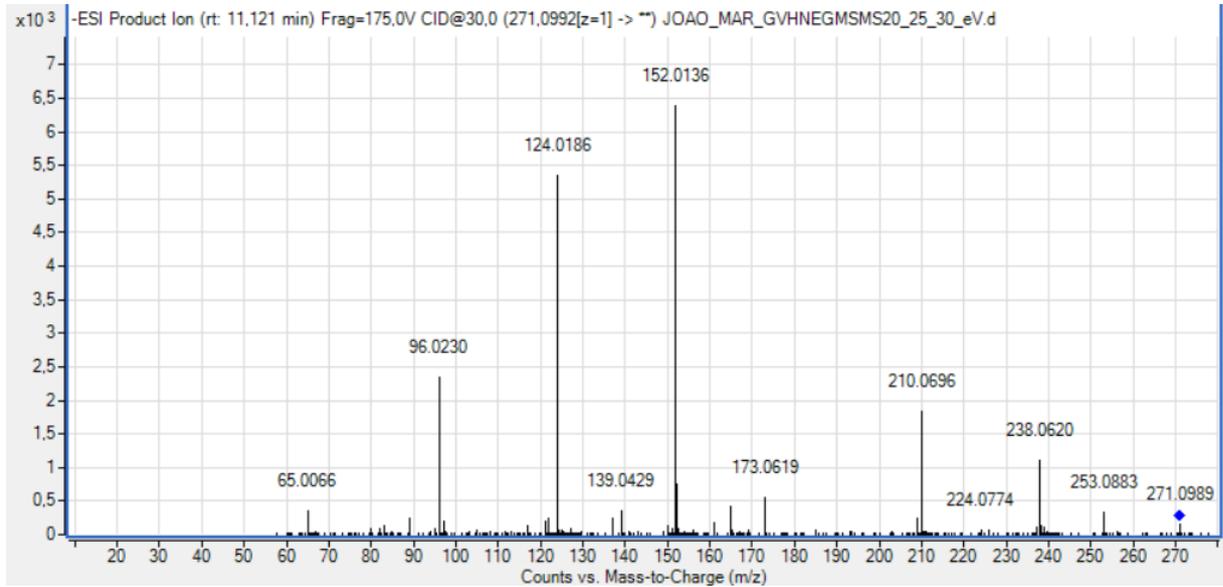


Imagem A48: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 295,2285 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

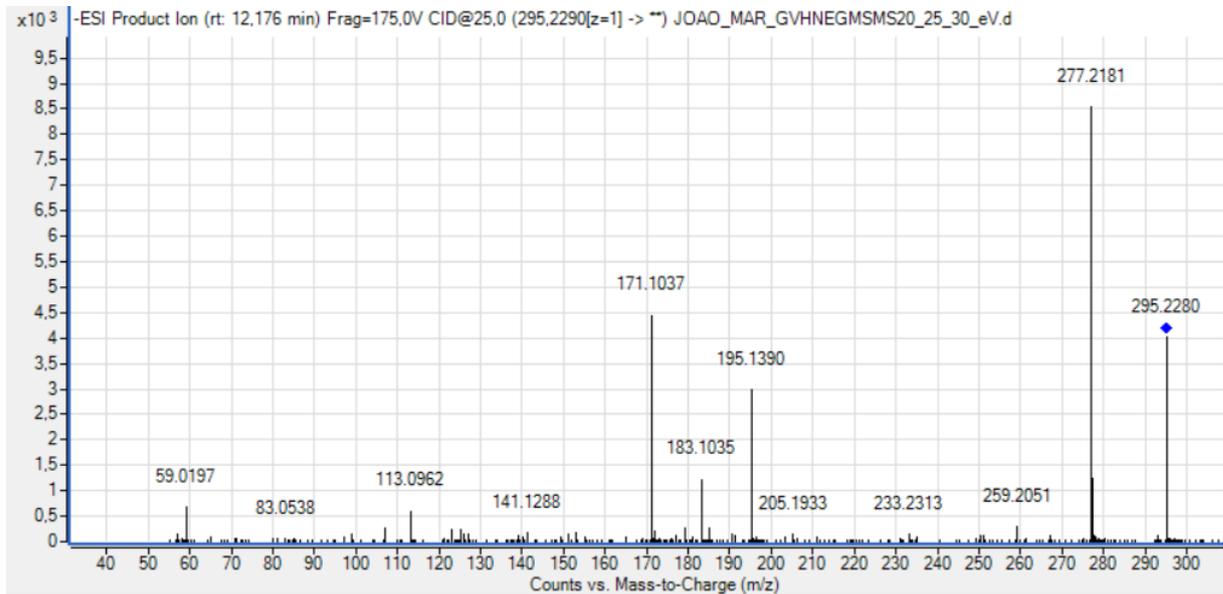


Imagem A49: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 279,2341 do extrato hexânico dos galhos de *Piper macedoi*

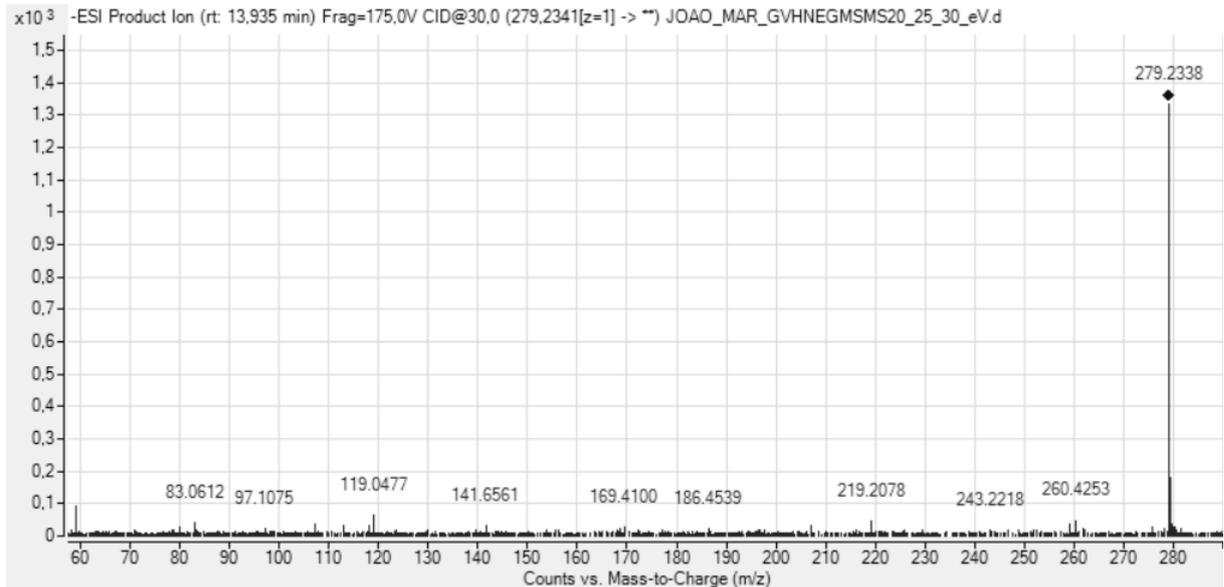


Imagem A50: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 607,1689 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

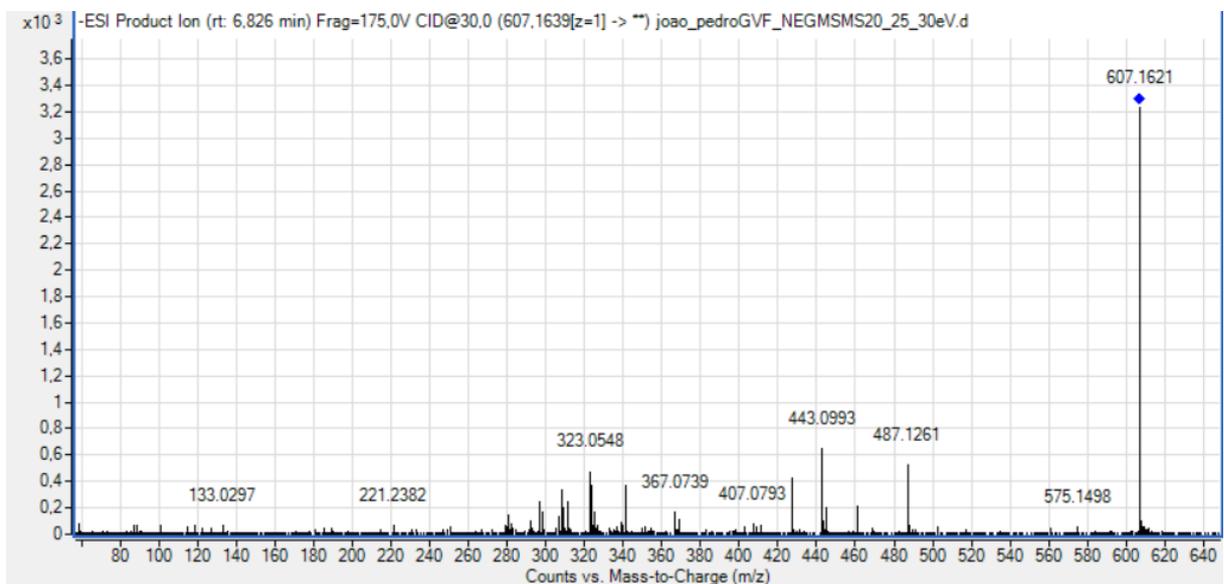


Imagem A51: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 431,0997 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

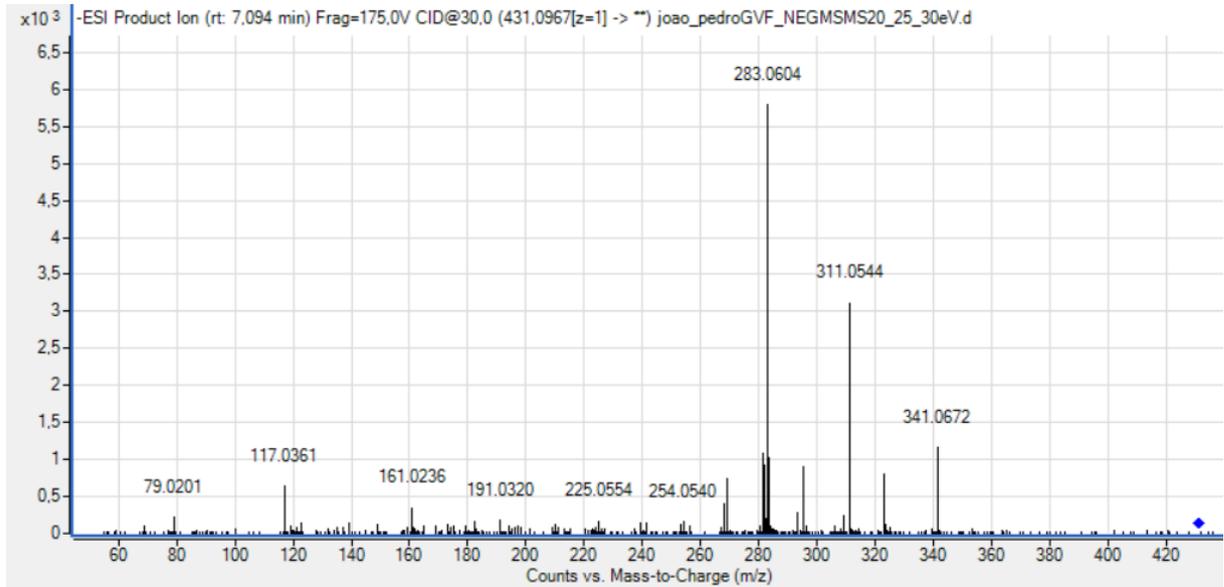


Imagem A52: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 205,0874 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

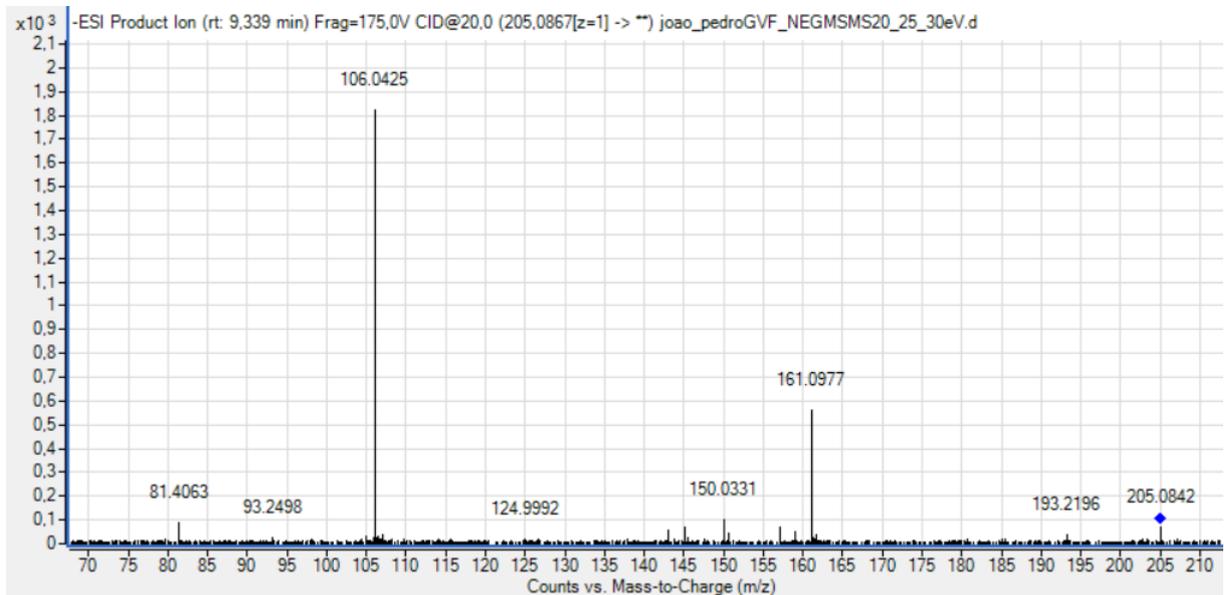


Imagem A53: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 287,0931 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

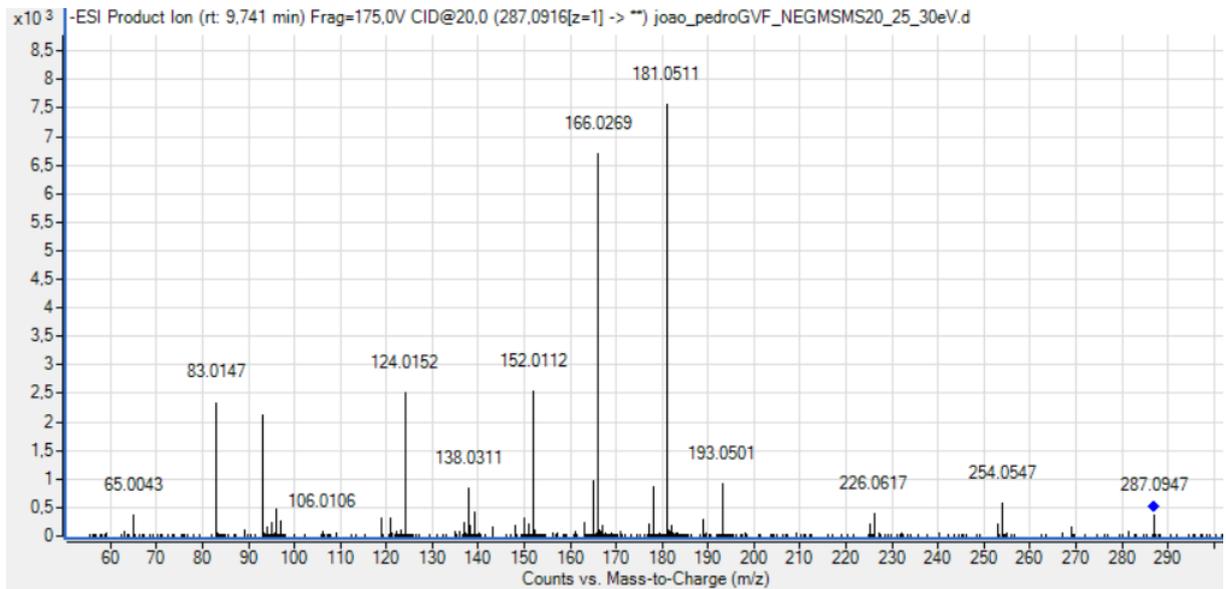


Imagem A54: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 271,0986 do extrato etanólico dos galhos de *Piper macedoi*

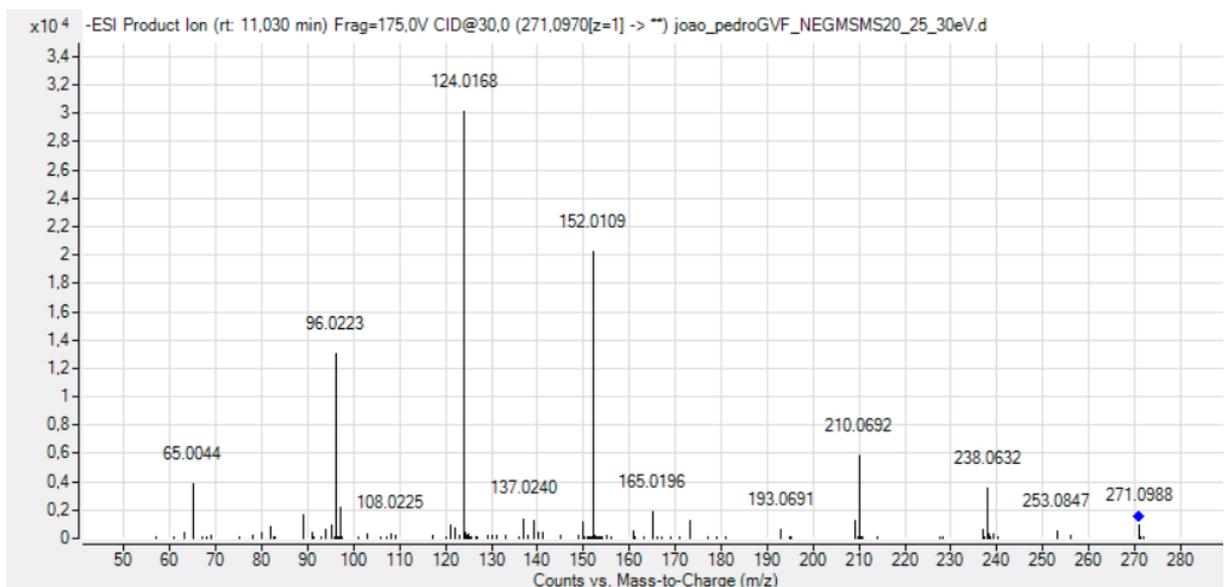


Imagem A55: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 305,1397 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

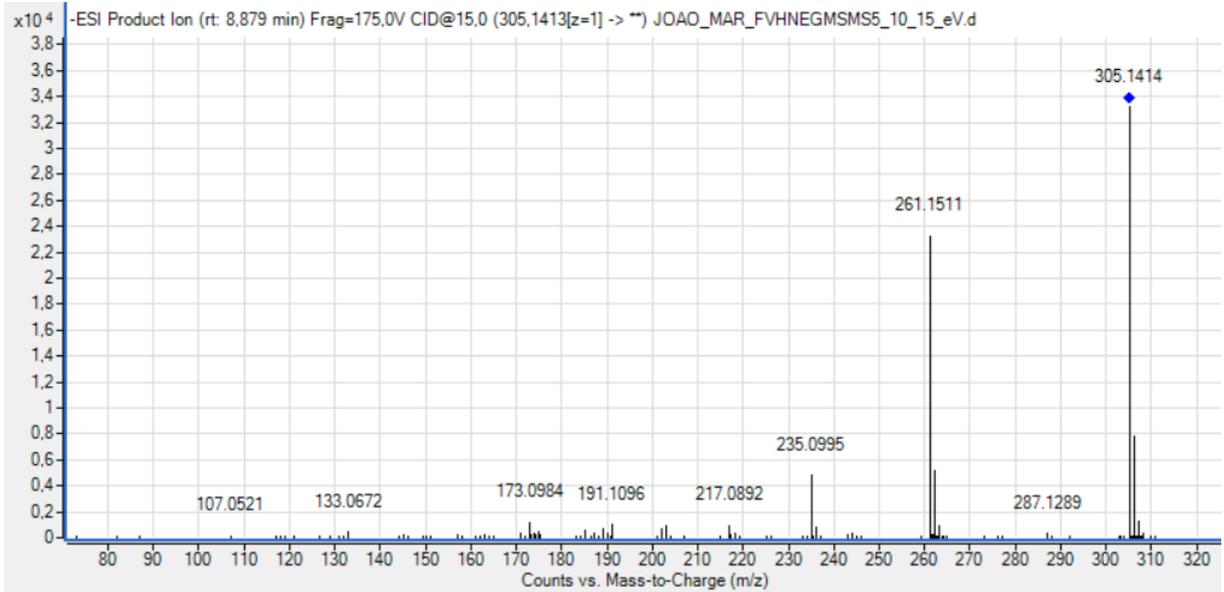


Imagem A56: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 319,1557 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

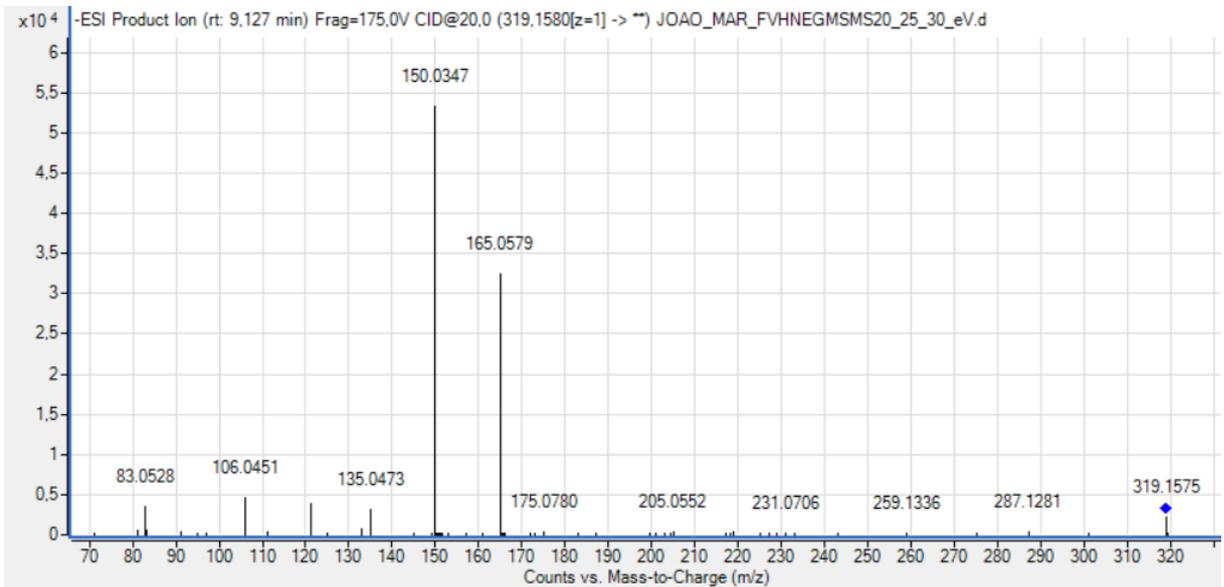


Imagem A57: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 303,1613 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

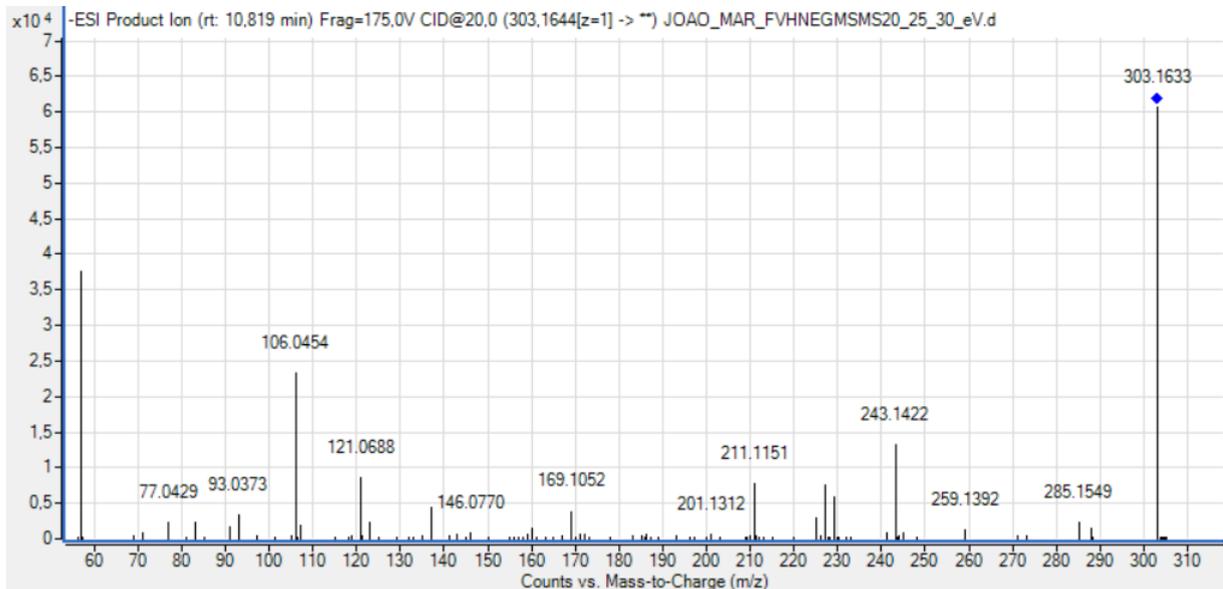


Imagem A58: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 271,0983 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

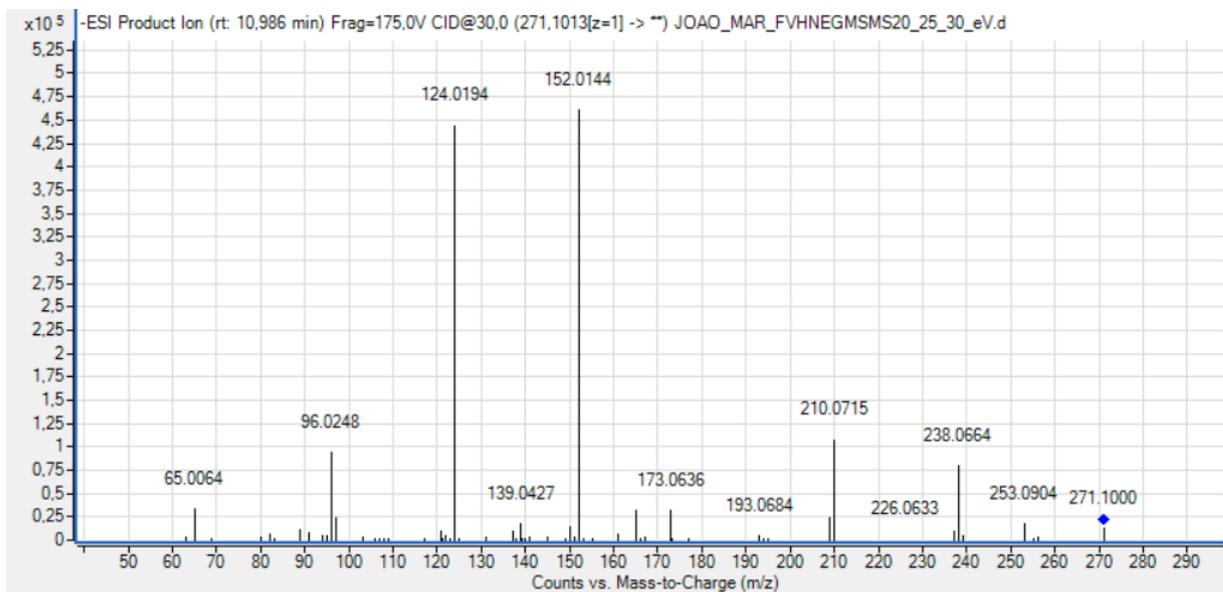


Imagem A59: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 287,1659 do extrato hexânico dos frutos de *Piper macedoi*

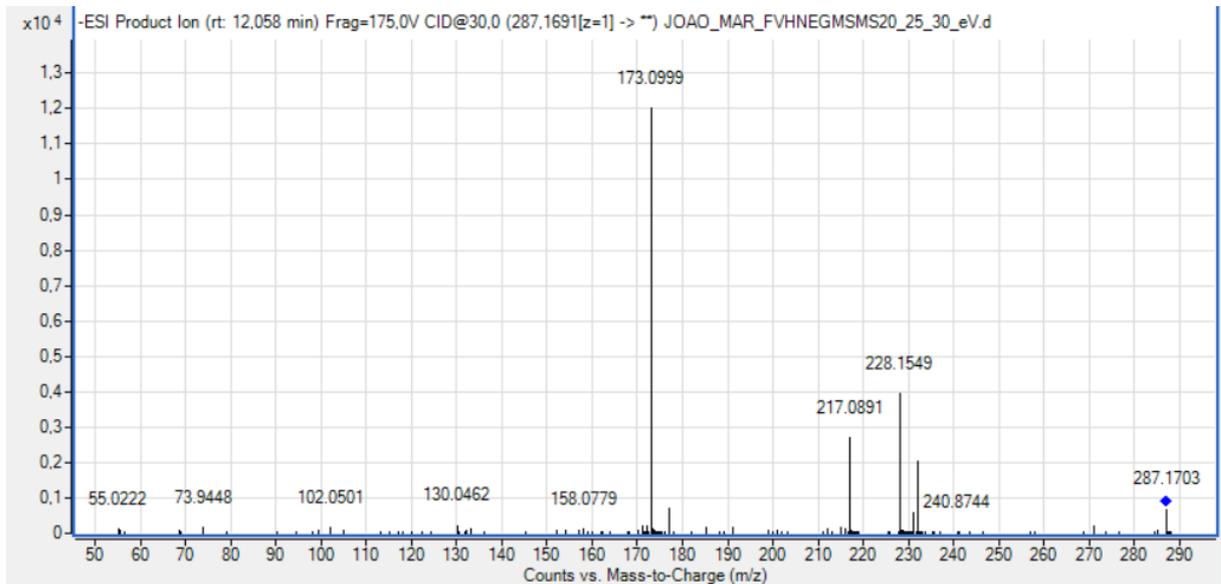


Imagem A60: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 233,0818 do extrato etanólicos dos frutos de *Piper macedoi*

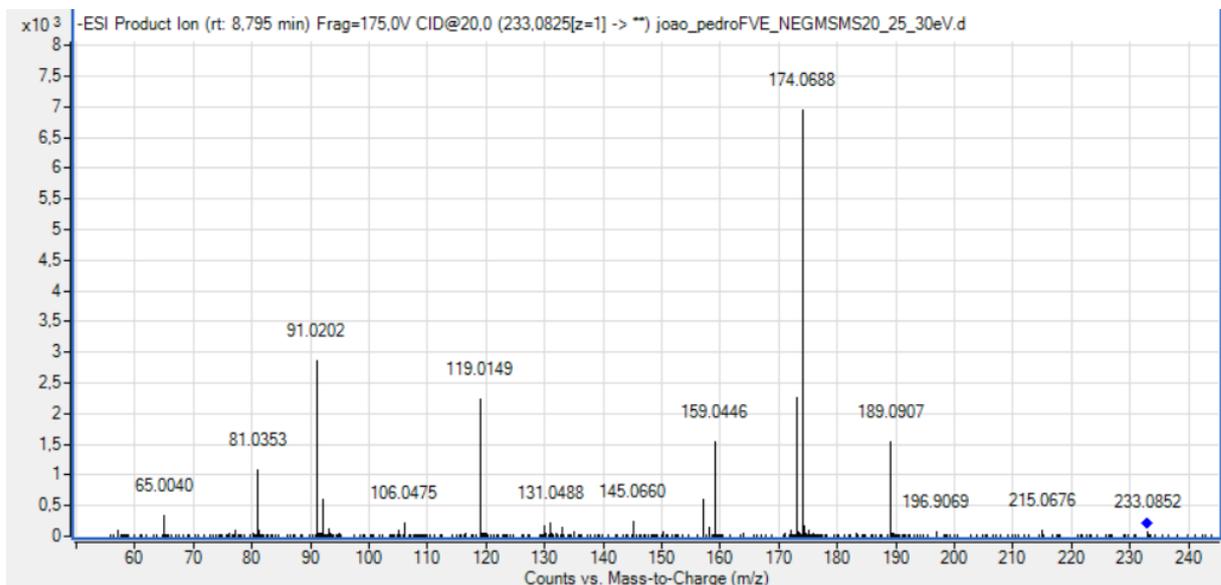


Imagem A61: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 205,0875 do extrato etanólicos dos frutos de *Piper macedoi*

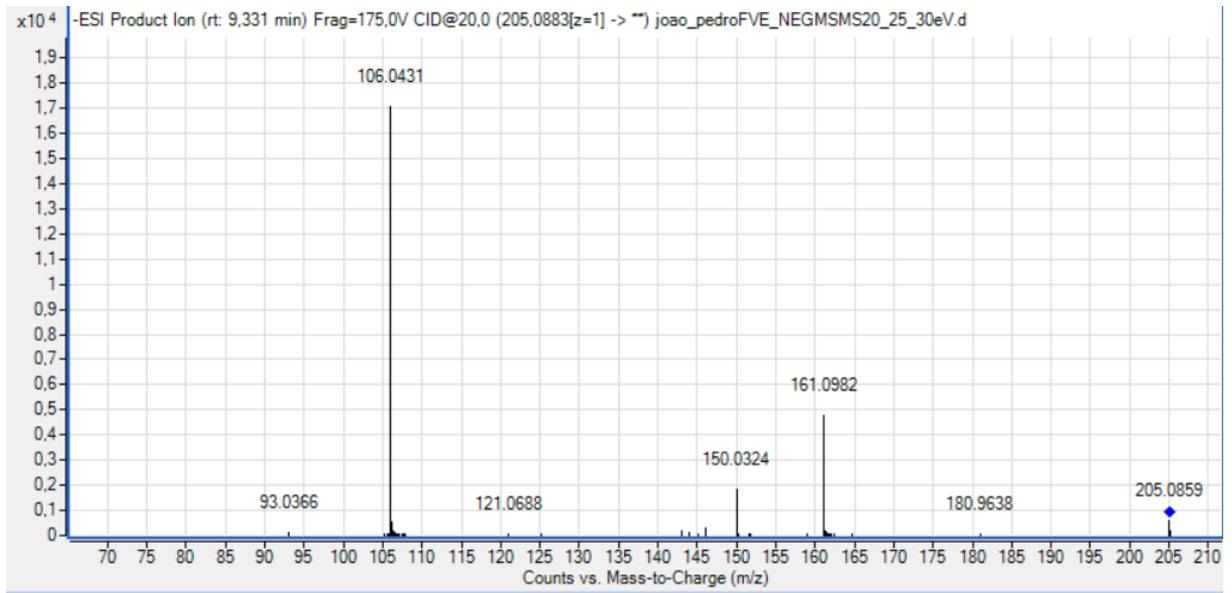


Imagem A62: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 287,0938 do extrato etanólicos dos frutos de *Piper macedoi*

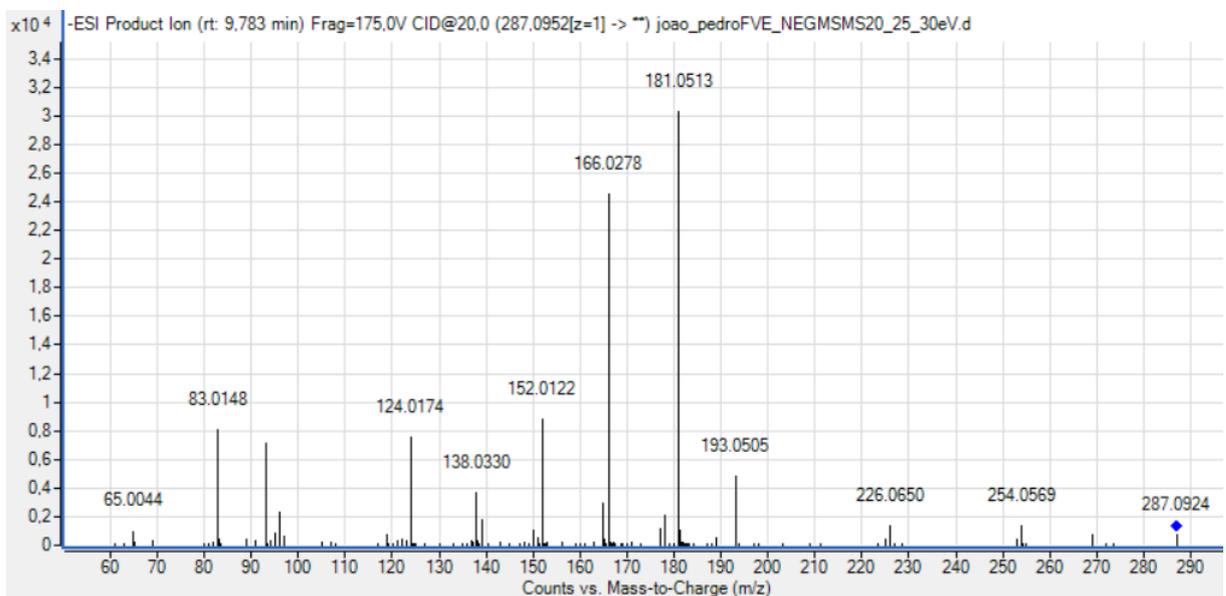


Imagem A63: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 255,0668 do extrato etanólicos dos frutos de *Piper macedoi*

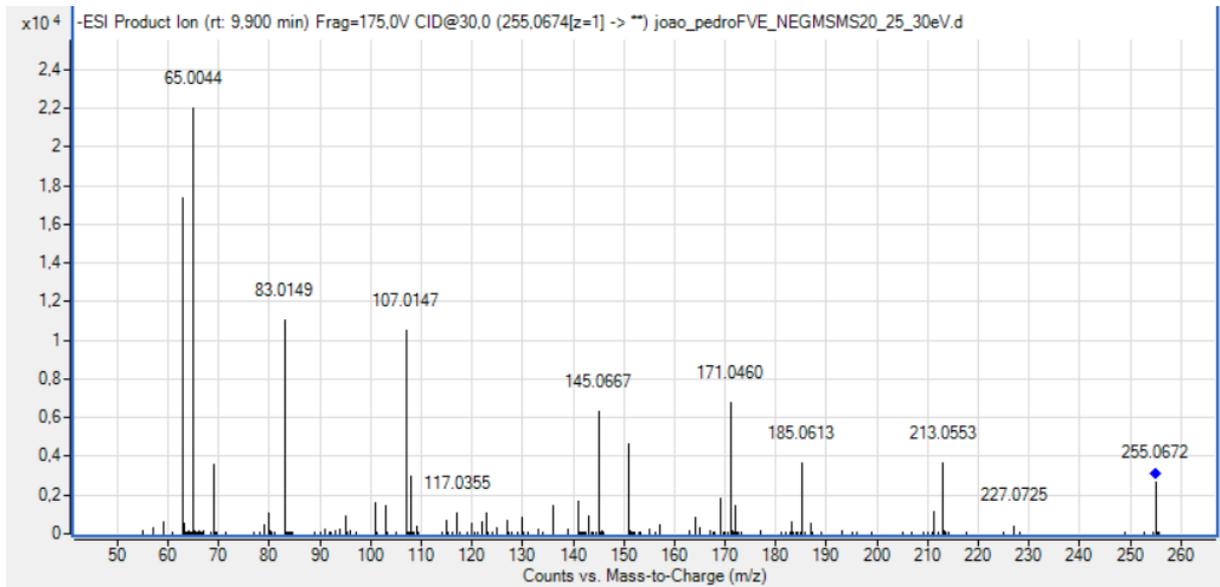


Imagem A64: (-)-IES-EM/EM do pico de m/z 257,0827 do extrato etanólicos dos frutos de *Piper macedoi*

