



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO DE *Piper sp.* POR EXTRAÇÃO ACELERADA  
POR SOLVENTE (ASE) EM LARVAS DE *Aedes aegypti***

**Estudante:** Carolina de Melo de Aguiar - 17/0007782

**Orientadora:** Prof. Dra. Lorena Carneiro Albernaz

**Coorientadora:** Laís da Silva Morais

BRASÍLIA

2021

CAROLINA DE MELO DE AGUIAR

17/0007782

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO DE *Piper sp.* POR EXTRAÇÃO ACELERADA  
POR SOLVENTE (ASE) EM LARVAS DE *Aedes aegypti***

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial de obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

**Orientadora:** Prof. Dra. Lorena C. Albernaz

**Coorientadora:** Laís da Silva Morais

BRASÍLIA

2021

Dedico aos meus pais, Lilian e José, e à minha irmã,

Sônia.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina de Melo de Aguiar

### **AVALIAÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO DE *Piper sp.* POR EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE (ASE) EM LARVAS DE *Aedes aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como  
requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.

---

Profª Drª Lorena Carneiro Albernaz (Presidente)

Universidade de Brasília

---

Dr Daniel Percoraro Demarque

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter me dado forças durante toda a graduação.

À minha família, por tudo que fizeram para me ajudar nessa reta final, sem vocês eu não teria chegado aqui.

Aos meus amigos e colegas, pelo apoio e carinho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lorena Carneiro Albernaz, que desde o início da graduação contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

À minha coorientadora Laís da Silva Morais, por ter me ajudado em todo o trabalho prontamente, pelos ensinamentos, desabafos, paciência e parceria, você sempre será uma inspiração de pessoa e pesquisadora.

À Gabi, por ter sido minha gêmea da graduação inteira até agora, por toda a ajuda e apoio no desenvolvimento do trabalho, por me fazer sempre acreditar mais em mim mesma, sem você nem metade disso teria dado certo.

À Ana, por todo o apoio e parceria principalmente nessa reta final de curso, por me divertir, me escutar e me ajudar a evoluir, você foi essencial, deixou tudo mais leve.

À Sophia, por ter me ensinado e ajudado tanto desde o início da minha vida acadêmica.

Ao Renato e equipe do insetário, pela ajuda nos testes e no trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Farmacognosia UnB, pelos ensinamentos e momentos vividos.

Muito obrigada.

## RESUMO

As arboviroses são doenças de grande impacto na saúde pública. Como não existe tratamento nem vacinas eficientes para as doenças, dengue, Zika e chikungunya, o controle do vetor *Aedes aegypti* é a melhor maneira de se evitá-las. Apesar disso, o uso de inseticidas convencionais vêm causando resistência por parte deste inseto. Uma opção então, é buscar na natureza compostos que tenham ação inseticida sobre este vetor. A *Piper sp.*, tem atividade larvicida já documentada e vem sendo estudada como inseticida. Este trabalho teve como objetivo otimizar a atividade larvicida do extrato de *Piper sp.* utilizando Extrator Acelerado por Solvente (ASE). A partir de um planejamento fatorial, buscou-se analisar a influência das variáveis temperatura, solvente e tempo de ciclos de extração nas respostas atividade biológica, rendimento e área de piperina no cromatograma obtido por análise por CLAE-DAD. O extrato de acetato de etila produzido a 50°C com 2 minutos de ciclos de extração foi o que apresentou melhor atividade larvicida, com  $CL_{50}$  de 1,089  $\mu\text{g/mL}$ . Observou-se que uma alta atividade biológica não está ligada diretamente à maior quantidade de piperina, e sim a uma junção desta, com quantidade dos compostos minoritários. Nosso trabalho observou que o solvente tem influência significativa nas 3 respostas analisadas dentro dos intervalos estudados. O solvente acetato de etila foi melhor para mortalidade e para a quantidade de piperina. No final, foram produzidos dois extratos por maceração a fim de analisar a possibilidade de escalonamento a partir da comparação dos cromatogramas com os extratos produzidos por ASE. Nossos resultados apontam que o extrato otimizado de frutos de *Piper sp.* é uma boa opção para controle do mosquito *Aedes aegypti*.

**Palavras-chave:** *Piper sp.*, ASE, *Aedes aegypti*, planejamento fatorial, quimiometria.

## ABSTRACT

Arboviruses are diseases with a big impact on public health. As there is no effective treatment or vaccines for the diseases dengue, Zika and chikungunya, controlling the *Aedes aegypti* vector is the best way to avoid them. Despite this, the use of conventional insecticides has caused resistance by this insect. One option, then, is to look for natural compounds that have an insecticidal action on this vector. *Piper sp.*, has already documented larvicidal activity and has been studied as an insecticide. This work aimed to optimize the larvicidal activity of *Piper sp.* extract using Solvent Accelerated Extractor (ASE). From a factorial design, we sought to analyze the influence of the variables temperature, solvent and time of extraction cycles on the biological activity, yield and piperine area in the chromatogram obtained by HPLC-DAD analysis. The ethyl acetate extract produced at 50 °C with 2 minutes of extraction cycles showed the best larvicidal activity, with a LC<sub>50</sub> of 1.089 µg/mL. It was observed that a high biological activity is not directly linked to the largest area of piperine, but to its junction with areas of minor compounds. Our work observed that the solvent affects the 3 responses analyzed within the ranges studied. Ethyl acetate was the best for mortality and for a piperine area. In the end, two extracts were obtained by maceration and in order to analyze the possibility of scaling from the comparison of the chromatograms with the extracts obtained by ASE. Our results show that the optimized extract of *Piper sp.* fruits is a good option for controlling the *Aedes aegypti* mosquito.

**Keywords:** *Piper sp.*, ASE, *Aedes aegypti*, factorial design, chemometrics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> <i>Piper sp.</i> utilizada para a produção dos extratos.....	25
<b>Figura 3.</b> Equipamento ASE.....	26
<b>Figura 4.</b> Rotaevaporador e extratos do ASE.....	26
<b>Figura 5.</b> Preparação do teste larvicida.....	28
<b>Figura 6.</b> Processo de maceração para a produção dos extratos.....	29
<b>Figura 7.</b> Equipamento de CLAE-DAD utilizado.....	30
<b>Figura 8.</b> Gráficos de pareto e otimização de resposta múltipla.....	32
<b>Figura 9.</b> Extrato bruto de <i>Piper sp.</i> após completa secagem do solvente.....	36
<b>Figura 10.</b> Gráfico Amostra x Mortalidade (%) em 24 horas na concentração de 2 ppm dos testes em placas com larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	39
<b>Figura 11.</b> Teste larvicida em copos com a amostra Arbo27A065G.....	41
<b>Figura 12.</b> Curva dose-resposta da amostra Arbo27A065G testada em larvas L3 de <i>Aedes aegypti</i> nas leituras de 24, 48 e 72 horas.....	42
<b>Figura 13.</b> Extratos etanólico e de acetato de etila feitos por maceração.....	44
<b>Figura 14 .</b> Cromatogramas obtidos em análise de CLAE-DAD.....	47



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Planejamento fatorial para extração de <i>Piper sp.</i> no ASE.....	24
<b>Tabela 2.</b> Variação do gradiente de solvente ao decorrer da corrida.....	30
<b>Tabela 3.</b> Rendimento e CL <sub>50</sub> dos extratos do ASE.....	31
<b>Tabela 4.</b> CL <sub>50</sub> , IC 95% e R <sup>2</sup> da amostra Arbo27A065G.....	41
<b>Tabela 5.</b> Número do pico, tempo de retenção, área do pico e razão (área do pico/ área do pico da piperina) dos 12 extratos de <i>Piper sp.</i> analisados.....	48
<b>Tabela 6.</b> Número do pico, tempo de retenção, área do pico e razão (área do pico/ área do pico da piperina) dos 2 extratos de <i>Piper sp.</i> escalonados analisados.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$  - microlitro

$\mu\text{g}$  – micrograma

$^{\circ}\text{C}$  - graus celsius

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE – Extração Acelerada por Solvente

$\text{CL}_{50}$  – Concentração letal 50 % dos indivíduos testados

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD- Detector de Arranjo de Diodos

DMSO – Dimetilsulfóxido

FDA – *Food and Drug Administration*

g – grama

h – hora

mg - miligrama

mL - mililitro

nm - nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

TR - Tempo de retenção

UnB – Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. ARBOVIROSES.....	12
1. 2. <i>Aedes aegypti</i> .....	14
1. 2. 1. RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS.....	17
1. 3. PRODUTOS NATURAIS: ESPECIARIAS.....	18
1. 3. 1. <i>Piper sp.</i> .....	19
1. 4. PLANEJAMENTO FATORIAL E EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE (ASE).....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3. 1. PLANEJAMENTO FATORIAL.....	24
3. 2. MATERIAL VEGETAL.....	25
3. 3. EXTRAÇÃO NO EXTRATOR ACELERADO POR SOLVENTE (ASE).....	25
3. 4. CRIAÇÃO DE COLÔNIAS DE <i>Aedes aegypti</i> EM LABORATÓRIO.....	27
3. 5. TESTE LARVICIDA - TRIAGEM.....	27
3. 6. TESTE LARVICIDA - EXTRATO OTIMIZADO.....	28
3. 7. ESCALONAMENTO DO EXTRATO.....	28
3. 8. ANÁLISE QUÍMICA.....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
4. 1. MONITORAMENTO DAS RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO.....	31
4. 2. DETERMINAÇÃO DO CL50 DO EXTRATO PADRONIZADO.....	39
4. 3. ESCALONAMENTO DO EXTRATO DE <i>Piper sp.</i> .....	42
4. 4. ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS PRODUZIDOS.....	45
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ARBOVIROSES

Arbovírus são vírus transmitidos de artrópodes para hospedeiros vertebrados, eles causam as doenças conhecidas como arboviroses. O gênero *Flavivirus* contém os arbovírus mais significativos atualmente. Cinco arbovírus epidêmicos surgiram/reemergiram nas décadas recentes, entre eles estão vírus da dengue (DENV), vírus Zika (ZIKV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da febre amarela (YFV), e vírus chikungunya (CHIKV). Destes vírus citados apenas o CHIKV não pertence ao gênero *Flavivirus*, ele pertence ao gênero *Alphavirus*. DENV, ZIKV e CHIKV ganham destaque perante os outros, pois geram as viroses globais mais significativas para saúde pública no mundo (HARAPAN et al., 2020).

A dengue é considerada emergência de saúde pública em vários países, inclusive é tida como preocupante devido à rápida dispersão no mundo (WHO, 2020). Epidemias de dengue acontecem em mais de 100 países tropicais e subtropicais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 30% da população mundial corre risco de ser contaminada pelo vírus da dengue (RAMYASOMA et al., 2020), cerca de 100-400 milhões de infecções acontecem a cada ano no mundo (WHO, 2020). As estimativas de infecções pelo vírus da dengue variam de 284 a 528 milhões, sendo 96 milhões desses casos sintomáticos. O custo global calculado para cada caso de hospitalização por dengue é de 84,73 dólares americanos, e o custo estimado anual em 2013 foi de 8,9 bilhões de dólares americanos (HARAPAN et al., 2020).

A transmissão do vírus da dengue para humanos ocorre por meio dos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Além da transmissão para humanos há a transmissão silvestre do DENV, que ocorre por meio dos vetores *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* e *Ae. taylori*. Geralmente esse tipo de transmissão ocorre entre primatas não humanos. Há relatos de

transmissões do vírus que não envolvem o vetor, como a transmissão vertical (da mãe para o feto), transfusão de sangue e transplante de medula por exemplo (HARAPAN et al., 2020).

A dengue pode ser causada por quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os quatro tipos são biologicamente parecidos e geneticamente relacionados (HALSTEAD, 2019), pois compartilham cerca de 65% de similaridade da sequência de aminoácidos (HARAPAN et al., 2020).

Os sintomas da dengue podem variar desde sintomas de gripe comum como febre, náuseas e dores no corpo, até sintomas graves como risco de vida e choques hemorrágicos. Não há tratamento específico para essa doença, o tratamento é sintomático. Não há nenhum medicamento aprovado pela ANVISA ou pelo FDA para o tratamento do vírus da dengue. As características ideais de um tratamento para a dengue seriam possuir atividade em todos os sorotipos, diminuir os sintomas de forma rápida e efetiva, ter toxicidade tolerada por humanos, ser tolerado por pessoas de grupos de risco (grávidas, crianças, pessoas com comorbidades), e ter poucas interações medicamentosas com outros fármacos. Porém existem muitos desafios para chegar nesse tratamento ideal, por exemplo: a dificuldade de encontrar um inibidor efetivo para os quatro sorotipos de dengue, assim como anticorpos para todos os sorotipos, os modelos animais não conseguem mimetizar a patogênese humana da dengue. Estes são apenas alguns dos entraves existentes na busca de uma terapia efetiva, específica e segura contra a dengue (HARAPAN et al., 2020).

Tendo em vista todas as dificuldades contra o tratamento da dengue, e a importância clínica desta doença, o controle do vetor *Aedes aegypti* se torna a principal forma de prevenção e controle da dengue atualmente (HARAPAN et al., 2020).

A Dengvaxia® (CYD-TDV) é a única vacina licenciada contra a dengue atualmente (WHO, 2020). Ela é uma quimera dos genes estruturais dos quatro tipos de DENV junto com a vacina da febre amarela de genoma não estrutural. É indicada para pessoas com

idade de 9 a 45 anos e com base nos estudos realizados até o momento, a OMS recomenda a vacina contra a dengue apenas para quem já apresentou uma infecção prévia conhecida de dengue e para populações com 80% de soroprevalência de DENV (HALSTEAD, 2019; WHO, 2020) .

O efeito benéfico é maior em crianças mais velhas do que mais novas e em indivíduos soropositivos do que em soronegativos, o que levou à restrição de idade e soro status da vacina. Além disso, para os que nunca tiveram dengue, a vacina mostrou acarretar um risco maior de dengue grave e hospitalização após a vacinação (THOMAS; YOON, 2019).

Já que a vacina é restrita para um certo grupo, e não existe tratamento específico para a dengue, a prevenção e controle dessa doença ficam dependentes de medidas e estratégias eficazes de controle de vetores (WHO, 2020), para isso, larvicidas, adulticidas e repelentes provenientes de fontes naturais têm sido foco de muitas pesquisas (ALI et al., 2020).

## 1. 2. *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ganha destaque porque é um dos principais vetores de arboviroses (CAMPOS et al., 2020), transmitindo assim, doenças como dengue, chikungunya, Zika e febre amarela urbana. A transmissão desses vírus é aumentada pois o *Ae. aegypti* é essencialmente um mosquito urbano, presente em grande quantidade nas cidades e povoados, apesar de já ter sido encontrado em zonas rurais, provavelmente vindos de zonas urbanas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001; CARVALHO et al., 2020).

O risco de ser infectado pelos arbovírus está diretamente relacionado pela presença ou ausência do *Ae. aegypti* nos locais frequentados ao longo do dia (HALSTEAD, 2019).

Como já citado anteriormente, a principal forma de controle da dengue e das demais arboviroses atualmente é controlar o vetor. Esse controle pode ser feito de diversas maneiras, com eliminação de criadouros naturais ou artificiais desse vetor, porém na prática essas intervenções não geram um alto impacto na redução de população larval. Outras formas de controle são o controle químico com inseticidas e larvicidas, e o controle biológico (HARAPAN et al., 2020).

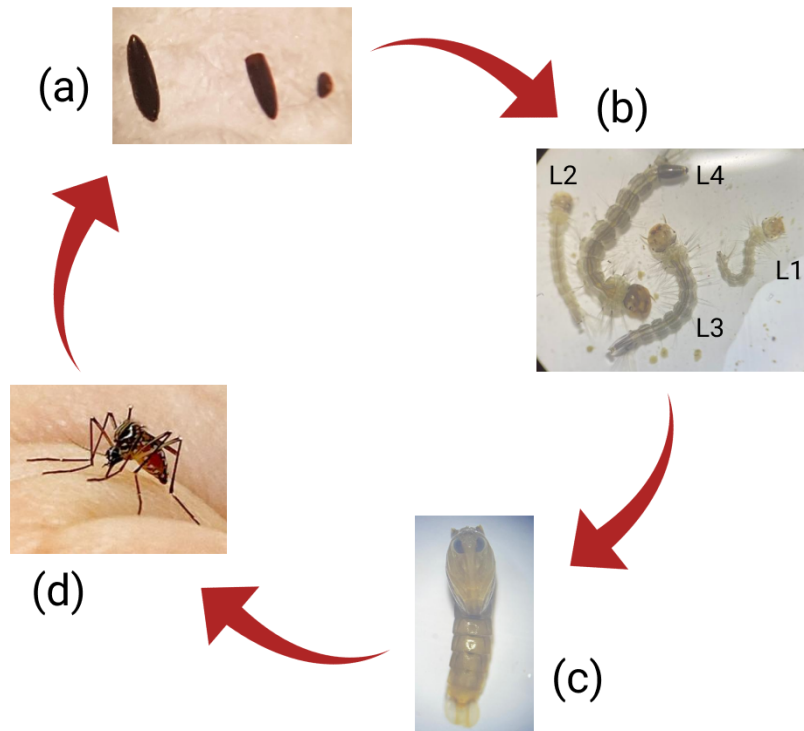
Uma estratégia que está sendo usada como controle biológico é a infecção de *Aedes aegypti* com *Wolbachia*, uma bactéria presente em 60% dos insetos. Já que esta bactéria não está presente no *Ae. aegypti*, a ideia é infectá-lo, visto que ela impede o desenvolvimento dos vírus da DENV, CHIKV e ZIKV dentro do mosquito, não existe nesse caso modificação genética. Mais de 14 países já utilizam essa estratégia de liberação de vetores infectados com *Wolbachia* (GARCIA et al., 2020).

Um larvicida biológico recentemente anunciado no Brasil é o espinosade, adquirido pelo Ministério da Saúde em maio de 2021. Este produto é composto por espinosina A e espinosina D, que são metabólitos advindos da fermentação biológica da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, um microrganismo naturalmente encontrado no solo. Essa nova tecnologia garante mais segurança aos trabalhadores que entram em contato com o produto, por apresentar baixo impacto à saúde humana e também baixo impacto ambiental (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Mesmo com o aparecimento de resistência do *Ae. aegypti* aos inseticidas, o uso destes produtos ainda é a principal estratégia de controle deste vetor (HARAPAN et al., 2020).

Em 2019 foi aprovada pelo Ministério da Saúde a utilização de um novo adulticida espacial chamado Cielo-ULV, composto de praletrina, um derivado piretróide, e imidacloprida, um neonicotinóide. Seu uso foi indicado para o controle de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* em situações de emergência, quando não for suficiente o controle preventivo.

Apesar de ser mais uma opção, este inseticida tem eficiência limitada considerando que o vetor vive muitas vezes em ambiente intradomiciliar e na pulverização apenas os mosquitos que estiverem em voo serão atingidos (SEI, MS. Nota Técnica, 2021)



**Figura 1:** Ciclo de vida do *Aedes aegypti*: (a) ovos (b) larvas (L1, L2, L3, L4) (c) pupa (d) mosquito.

O ciclo de vida do *Aedes aegypti* engloba uma metamorfose completa e tem 4 fases: ovo, larva (quatro estágios), pupa e adulto (Figura 1). Os ovos são depositados pelas fêmeas próximos à superfície da água, inicialmente sendo brancos e rapidamente se tornando pretos. O embrião se desenvolve em 48 horas, a partir daí os ovos podem sobreviver por longos períodos de seca, isso se torna um obstáculo quando o objetivo é erradicar estes ovos. A fase de larva engloba a alimentação destas, principalmente de material orgânico, e então elas passam pelos quatro estágios evolutivos: L1, L2, L3 e L4. Depois disso as larvas L4 evoluem para pupas, que não se alimentam, e duram de 2 a 3 dias. Por fim, as pupas evoluem para mosquitos, que é a fase reprodutiva do animal. As fêmeas em geral se alimentam de sangue, e fazem uma postura de ovos a cada repasse sanguíneo. Quando o mosquito está infectado com o vírus da dengue pode ocorrer



transmissão deste vírus para os ovos, então nascerão indivíduos já infectados e já passíveis de transmitir a doença (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

### 1. 2. 1. RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS

O uso contínuo e sistemático de um mesmo produto por muito tempo pode selecionar indivíduos resistentes, atrapalhando no controle do vetor (CARVALHO et al., 2020). Muitos estudos já evidenciaram e citaram a resistência de várias populações do *Aedes aegypti* ao temefós, DDT, malation, permetrina (MARCOMBE et al., 2019), e DEET (N,N-Dietil-3-metilbenzamida) (CAMPOS et al., 2020).

Estudos de resistência a inseticidas também são conduzidos no Brasil, e já detectaram resistência ao malation nos mosquitos de campo de todas as regiões brasileiras, já no caso do piriproxifeno apenas a região Nordeste apresentou indícios de resistência. E mesmo os piretróides não sendo mais utilizados desde 2012 pelo Programa Nacional das Doenças Transmitidas pelo *Aedes* ainda foram detectados a permanência de marcadores de resistência a essa classe de inseticidas em testes genéticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Algumas estratégias estão sendo usadas para tentar driblar o impasse da resistência, como vetores geneticamente modificados, vetores estéreis, para transgênese e a utilização de fontes alternativas para a produção de inseticidas, (HARAPAN et al., 2020) como por exemplo produtos naturais.

Toda essa situação de resistência dos mosquitos tem incentivado a busca por alternativas biodegradáveis que possam diminuir ou prevenir o desenvolvimento de resistência e toxicidade ambiental. Vários estudos já vêm indicando que substâncias químicas derivadas de plantas são boas alternativas aos inseticidas sintéticos convencionais (CUSTÓDIO et al., 2016).

Alguns mecanismos de resistência já foram desenvolvidos pelo *Aedes aegypti*, dentre eles, a enzima superóxido dismutase (SOD) tem um importante papel em promover resistência para os derivados de oxigênio prejudiciais. O nível desta enzima aumenta conforme a maturação das larvas (L1-L4), e níveis elevados podem aumentar a resistência aos piretróides. O mecanismo de resistência pela carboxilesterase (aumento desta enzima) é um dos principais quando se trata de resistência de insetos a organofosforados (LIJA-ESCALINE et al., 2015).

### 1. 3. PRODUTOS NATURAIS: ESPECIARIAS

Tendo em vista esses problemas no controle do *Ae. aegypti*, os produtos derivados de plantas são consideradas uma boa alternativa, pois produzem metabólitos secundários, que podem possuir atividade inseticida e repelente (CHELLAPPANDIAN et al., 2018; DE SOUSA et al., 2020).

O uso de especiarias é bastante difundido pelo mundo sendo usados atualmente óleos essenciais e oleoresinas também como aditivos alimentares, produtos farmacêuticos e inseticidas (LIJA-ESCALINE et al., 2015).

As plantas do gênero *Piper* são popularmente conhecidas como pimentas, e são amplamente distribuídas por regiões pantropicais, ou seja, todas as regiões tropicais e subtropicais. São consideradas plantas aromáticas por possuírem células com óleos em suas estruturas, são ricas em óleos essenciais. Além do uso das pimentas na culinária, seu uso medicinal vem sendo elucidado (SALEHI et al., 2019).

Várias espécies desse gênero vêm sendo usadas como especiarias e também na medicina tradicional, assegurando uma importância econômica e medicinal (GULZAR et al., 2013).

### 1. 3. 1. *Piper sp.*

O gênero *Piper* tem cerca de 2000 espécies de plantas. *Piper sp.* (Piperaceae) já foi investigada fitoquimicamente e foram identificados várias classes de compostos, como alcalóides, flavonas, flavanonas, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, chalconas, pironas, terpenos, esteróides e piperolídeos (GULZAR et al., 2013). O gênero *Piper* tem uma ampla gama de metabólitos secundários, destacando alcalóides e aminas. É uma notável fonte de metabólitos secundários com atividade inseticida (LIJA-ESCALINE et al., 2015).

*Piper sp.* é originalmente nativa da Índia. É uma das especiarias mais utilizadas no mundo inteiro. É usada em medicamentos como conservante, e em perfumes. Na culinária é usada como tempero em molhos, carnes, etc. Um de seus metabólitos secundários mais conhecido e estudado é o alcaloide piperina (SALEHI et al., 2019). A *Piper sp.* é considerada a “rainha das especiarias”. A família Piperaceae ocupa uma importante posição no comércio internacional. Essa família contém vários fotoquímicos ativos com usos na medicina e agricultura. Cerca de 63 substâncias já foram identificadas do óleo da folha de *Piper sp.*, muitas delas com atividade inseticida documentada, como as amidas piperina, piperida, guineensina, pelitorina, pipgulzarine e pipzorine (LIJA-ESCALINE et al., 2015).

As pimentas verdes e brancas são produzidas a partir dos frutos de *Piper sp.*. Estes frutos na forma seca se apresentam como bagas pretas pequenas enrugadas com 5 mm de diâmetro. A produção da *Piper sp.* geralmente é feita cozinhando os frutos verdes da planta em água quente (SALEHI et al., 2019).

*Piper sp.* tem preferência por lugares úmidos e quentes para seu crescimento e desenvolvimento. Os Gates Ocidentais são uma cordilheira localizada no oeste da península indiana, acredita-se que este foi o primeiro local a cultivar *Piper sp.*, a muitos séculos atrás. E esse local é até hoje considerado o principal lugar de cultivo desta espécie.

A partir daí seu cultivo foi difundido para o resto do mundo. O óleo essencial de *Piper sp.* é rico em sesquiterpenos, com destaque para o beta-cariofileno (SALEHI et al., 2019).

Das plantas com atividade larvicida descrita na literatura, o gênero *Piper* ganha destaque principalmente devido à substância piperina, e seus derivados, presente nas espécies deste gênero. Diversas pesquisas já demonstraram que a espécie *Piper sp.* tem atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* (CUSTÓDIO et al., 2016).

A piperina, principal componente dos frutos, é um alcalóide amplamente estudado como sendo o maior responsável pela ação terapêutica da *Piper sp.*. Essa substância é antioxidante, analgésico, antidepressivo, imunomodulador, hepatoprotetor, antipirético, antitumoral, antiinflamatório, antimutagênico, antifúngico, larvicida, inseticida, dentre outros. E algumas ações que a piperina realiza são inibição de enzimas metabólicas, aumento da biodisponibilidade oral de alguns medicamentos e nutrientes, aumentando os efeitos destes, estímulo de enzimas pancreáticas e intestinais (SALEHI et al., 2019).

Diferentes formas de extração de plantas, incluindo *Piper sp.*, podem alterar sua atividade, incluindo os efeitos larvicidas, que não diferem apenas de uma espécie de planta para outra, mas também quanto ao método de extração e as condições a ele associadas (LIJA-ESCALINE et al., 2015).

#### 1. 4. PLANEJAMENTO FATORIAL E EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE (ASE)

Quando algum experimento é feito, o problema de influências de variáveis sobre outras variáveis surge. Um sistema funciona a partir de fatores (variáveis de entrada), que em geral são controláveis, gerando uma resposta (variáveis de saída), que são ou não afetadas pelos fatores manipulados. O objetivo do experimento é descobrir como isso tudo funciona, pois assim é possível entender mais sobre a natureza do estudo e

consequentemente conseguir operar o sistema nas melhores condições (ROY EDWARD BRUNS; IEDA SPACINO SCARMINIO, 2001).

A otimização de resposta múltipla é um método para avaliar as variáveis de resposta de um planejamento, encontrando valores ótimos dos fatores monitorados que satisfaçam simultaneamente as respostas observadas. Para isso é usada a função de desejabilidade, que possibilita encontrar as condições que forneçam a resposta mais desejada, que seria uma combinação de múltiplas respostas (GOMES, 2014).

O monitoramento das respostas a diferentes fatores permite avaliar mudanças no perfil químico e na atividade biológica das amostras, por exemplo, de um extrato bruto vegetal. A otimização do extrato vegetal deve levar em consideração as substâncias biologicamente ativas da amostra (DEMARQUE et al., 2015).

Quando se trata de pesquisa com produtos naturais, ainda há muitos outros obstáculos envolvidos, como a identificação da(s) substância(s) ativa(s) e reprodutibilidade baixa das extrações convencionais (DEMARQUE et al., 2015). A identificação e quantificação de metabólitos por técnicas analíticas dependem de como foi a extração. Uma extração eficiente é influenciada pelo tipo de solvente utilizado, quantidade de solvente utilizado (razão solvente/material a ser extraído), temperatura, tempo e método de extração. Os métodos de extração convencionais consomem muito tempo e solvente durante a extração, e alguns não são muito eficazes quando se busca a extração de substâncias de interesse (UPADHYA et al., 2014). Com isso, surge uma alternativa que ajuda a resolver estes impasses: o uso da extração acelerada por solvente (ASE) aliada a planejamento fatorial. Com uma extração rápida e eficiente, uso reduzido de solvente, além da possibilidade de controle de temperaturas, o ASE, aliado ao planejamento fatorial, pode fornecer informações sobre como cada matéria prima utilizada, responde a cada um dos fatores que podem influenciar na resposta monitorada (DEMARQUE et al., 2015).

A utilização desta técnica torna as extrações reprodutíveis e estáveis, o que para um extrato vegetal seria um grande ganho. Experimentos fatoriais podem otimizar ainda mais a prática de extração por ASE, a partir da otimização das variáveis e monitoração de respostas biológicas, pode-se obter resultados melhores para um determinado objetivo estipulado anteriormente (DEMARQUE et al., 2015).

O Extrator Acelerado por Solvente (ASE) é um equipamento utilizado para extrair substâncias orgânicas buscando otimizar a quantidade de solvente e o tempo de extração. A extração com esta técnica é acelerada devido a alta pressão e temperatura exercidas pelo equipamento (UPADHYA et al., 2014). O ASE utiliza uma atmosfera de nitrogênio inerte, o que permite fazer extrações a temperaturas mais altas e ainda assim se manter estável, isso porque as temperaturas utilizadas no ASE podem muitas vezes exceder o ponto de ebulição do solvente, porém com a pressão do equipamento os solventes se mantêm estáveis na forma líquida durante a extração (GOMES, 2014). Este equipamento já foi utilizado em várias pesquisas com a finalidade de otimizar extratos, como por exemplo o extrato da planta *Achyrocline alata* que possui atividade bacteriostática documentada (DEMARQUE et al., 2015), e flavonoides presentes nas folhas de diferentes espécies de *Passiflora* (GOMES, 2014). Atualmente, esse processo que economiza tempo do operador e solvente chama atenção de muitos pesquisadores.

## 2. OBJETIVOS

Otimizar extração de *Piper sp. L.* por ASE para atividade em larvas L3 de *Aedes aegypti*.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar extrações de *Piper sp.* de acordo com planejamento fatorial;
- Avaliar os extratos em larvas L3 de *Aedes aegypti*;
- Realizar análise estatística das variáveis de acordo com o planejamento;
- Determinar atividade do extrato bruto de *Piper sp.* otimizado em larvas L3 de *Aedes aegypti*;
- Realizar análise química e quimiométrica dos extratos vegetais produzidos;
- Escalonar o extrato escolhido para realizar análise química.

### 3. MÉTODOS

#### 3. 1. PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento fatorial realizado foi 2<sup>3</sup>, sendo um planejamento completo com 4 pontos centrais, com fator categórico de tempo de ciclo estático. Neste planejamento foram estudados 3 fatores: **temperatura, gradiente de solvente e tempo de ciclo**. E a partir disso, 3 respostas foram analisadas: **rendimento, atividade biológica (mortalidade a 2 ppm em 24 horas) e área de piperina no cromatograma obtido por CLAE-DAD**.

As temperaturas escolhidas foram 50 °C e 130 °C, sendo o ponto central 90 °C. Os solventes escolhidos foram 100% hexano, 100% acetato de etila, sendo o ponto central 50:50 hexano:acetato de etila. Os tempos de ciclo escolhidos foram 2 e 4 minutos, que foram considerados fator categórico. O planejamento fatorial foi feito no programa Minitab 18 (Tabela 1).

**Tabela 1:** Planejamento fatorial para extração de *Piper sp.* no ASE em Minitab.

Nome da amostra	Solvente hexano (%)	Temperatura (°C)	Tempo ciclo (min)
Arbo27A065A	100	50	4
Arbo27A065B	0	50	4
Arbo27A065C	100	50	2
Arbo27A065D	50	90	2
Arbo27A065E	0	130	4
Arbo27A065F	50	90	4
Arbo27A065G	0	50	2
Arbo27A065H	100	130	4
Arbo27A065I	50	90	4
Arbo27A065J	50	90	2
Arbo27A065K	0	130	2
Arbo27A065L	100	130	2

- A coluna nomeada de solvente hexano apresenta a porcentagem de hexano utilizada em cada extração. A coluna temperatura indica com qual temperatura a extração foi feita



naquele experimento. O tempo de ciclo indica quantos minutos cada ciclo de extração durou.

### 3. 2. MATERIAL VEGETAL

Frutos secos de *Piper sp. L.* foram adquiridos no comércio local e passaram por moagem em moinho de facas (Figura 2).

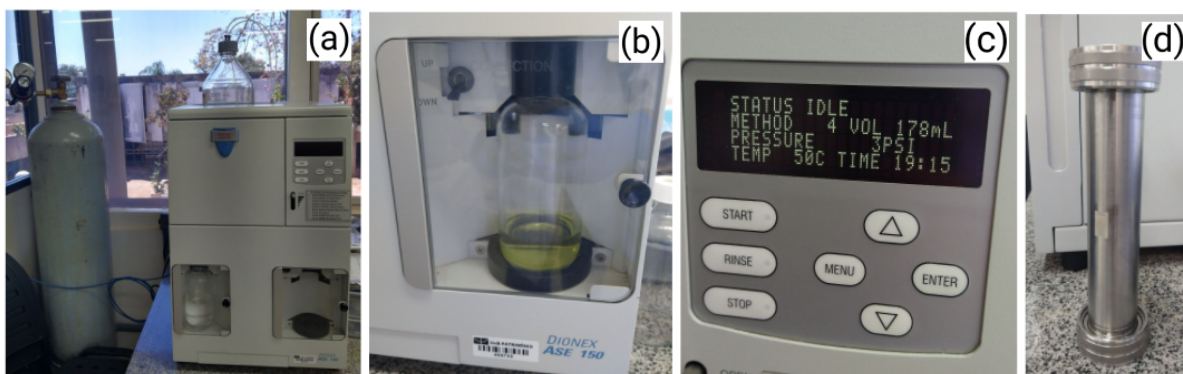


**Figura 2:** *Piper sp.* utilizada para a produção dos extratos.

### 3. 3. EXTRAÇÃO NO EXTRATOR ACELERADO POR SOLVENTE (ASE)

O modelo do Extrator Acelerado por Solvente (ASE) utilizado foi o Dionex™ ASE™ 150 Accelerated Solvent Extractor (Thermo Scientific) (Figura 3a)

Foi pesado aproximadamente 1 grama de *Piper sp.* triturado para cada extração (Tabela 3). A amostra era colocada na cela (Figura 3d), então o ASE era configurado (Figura 3c) com as condições apresentadas na Tabela 1 para cada amostra.

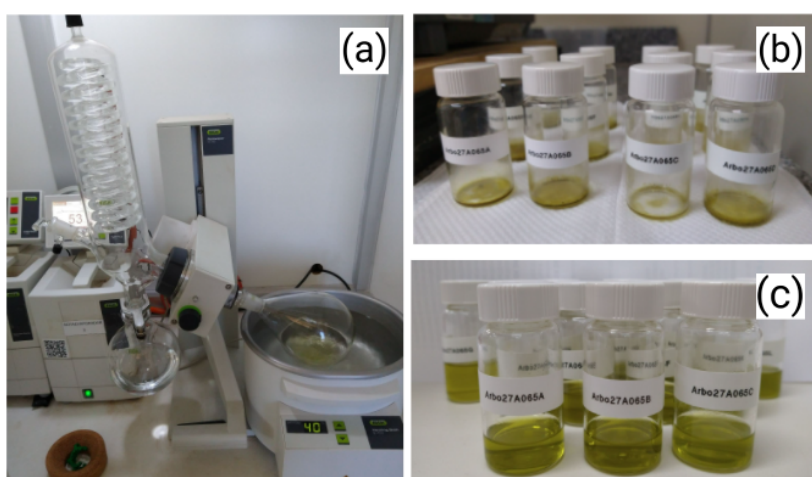


**Figura 3:** Equipamento ASE. (a) ASE junto ao tubo de nitrogênio; (b) garrafa com extrato depositado depois dos ciclos de extração; (c) painel de configuração de variáveis e condições para a extração; (d) cela: recipiente do equipamento onde o material seco a ser extraído era colocado.

A solução extrativa foi levada ao rotaevaporador para evaporação do solvente (Figura 4a). A secagem foi continuada em capela química até a eliminação completa do solvente.

O rendimento (%) foi calculado seguindo a equação abaixo:

$$\text{Rendimento}(\%) = (\text{peso extrato seco (g)} - \text{peso frasco (g)}) \div \text{peso da pimenta(g)} \times 100$$



**Figura 4:** (a) rotaevaporador utilizado para evaporação do solvente dos extratos; (b) os 12 extratos secos; (c) os 12 extratos feitos no ASE com seus respectivos códigos.

### 3. 4. CRIAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Aedes aegypti* EM LABORATÓRIO

O Laboratório de Farmacognosia/UnB tem seu próprio insetário, onde são criados mosquitos, larvas e pupas de *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) para testes biológicos. A criação é feita de acordo com o protocolo POP0009 do Lab. de Farmacognosia/UnB, que foi baseado no guia da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO,2005). A temperatura e umidade de criação são  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $60 \pm 10\%$ , respectivamente. Os organismos vivem no ciclo de luz 12 horas claro: 12 horas escuro. Os mosquitos são alimentados com solução açucarada de 10 %, sendo que as fêmeas além disso também se alimentam de sangue de cavalo para maturação dos ovos. Já as larvas são alimentadas com ração de peixe enriquecida com 60% de proteína.

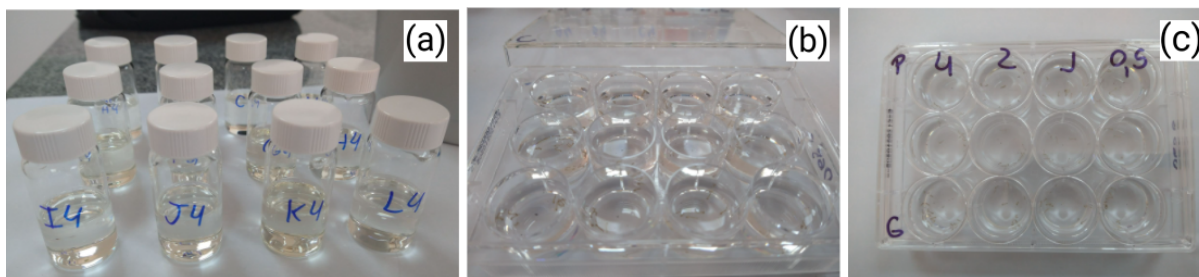
### 3. 5. TESTE LARVICIDA - TRIAGEM

A triagem dos 12 extratos vegetais de *Piper sp.* obtidas foram realizadas conforme o POP0006 do Lab. de Farmacognosia/UnB (Figura 5a). Foram realizados ensaios em placas de 12 poços contendo 3 mL de água e 10 larvas do terceiro estágio (L3) (Figura 5b). Foi feita uma diluição seriada para que as concentrações finais em cada poço fossem de 4, 2, 1 e 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , cada concentração foi testada em triplicata (Figura 5c). Foi utilizado como controle negativo DMSO < 2 %; e como controle positivo temephos.

A mortalidade das larvas foi verificada em 24, 48 e 72 horas após o início do ensaio. Para a avaliação da mortalidade das larvas foi usada a fórmula abaixo:

$$\text{Mortalidade} = (\text{larvas mortas} \times 100) \div \text{total de larvas}$$

O  $\text{CL}_{50}$  foi calculado utilizando o programa GraphPad Prism 9.0.



**Figura 5:** Preparação do teste larvicida. (a) 12 extratos diluídos prontos para a testagem; (b) placa de 12 poços; (c) teste já montado.

### 3. 6. TESTE LARVICIDA - EXTRATO OTIMIZADO

O teste larvicida foi realizado conforme o POP0011 do Laboratório de Farmacognosia/UnB que foi escrito de acordo com os critérios adotados pela OMS (WHO, 2005). O extrato escolhido foi avaliado em copos de 200 mL com 25 larvas L3 cada e em concentrações diferentes para determinação do  $CL_{50}$  e obtenção de uma curva de dose resposta. O experimento foi repetido três vezes com lotes diferentes de larvas. Foi feita uma diluição seriada para que as concentrações finais em cada copo fossem de 4, 2, 1.5, 1, 0.5 e 0.1  $\mu\text{g/mL}$ , cada concentração foi testada em quadruplicata. Foram utilizados como controle negativo DMSO < 2 %; e como controle positivo temefós.

A mortalidade das larvas foi verificada em 24, 48 e 72 horas após início do experimento. Para a avaliação da mortalidade das larvas foi usada a fórmula abaixo:

$$\text{Mortalidade} = (\text{larvas mortas} \times 100) \div \text{total de larvas}$$

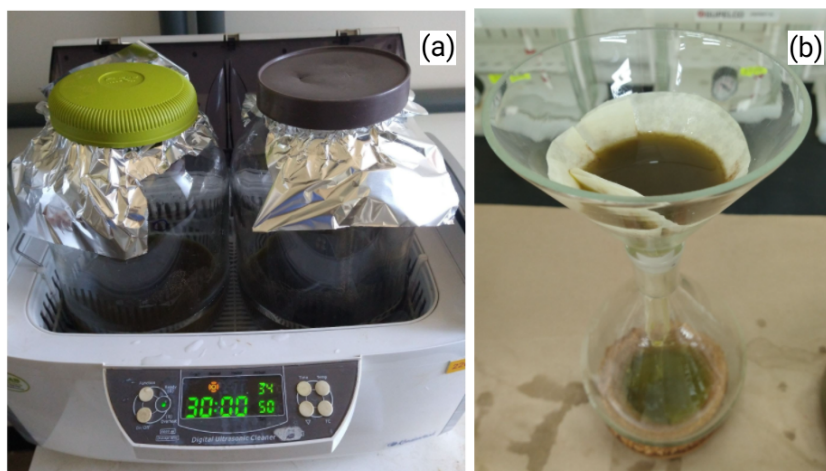
O  $CL_{50}$  foi calculado utilizando o programa GraphPad Prism 9.0.

### 3. 7. ESCALONAMENTO DO EXTRATO

Foi realizado escalonamento do extrato de *Piper sp.* por maceração. Para isso foram utilizados ~150 g de droga vegetal para 600mL de solvente. Foram feitas extrações com

etanol, e acetato de etila.. Ambos foram produzidos a 50 °C e 1 hora no ultrassom (Figura 6a). Depois da maceração as soluções extrativas foram filtradas (Figura 6b), os solventes evaporados no equipamento rotaevaporador e o rendimento foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento}(\%) = (\text{peso extrato seco (g)} - \text{peso frasco (g)}) \div \text{peso da pimenta(g)} \times 100$$



**Figura 6:** Processo de maceração para a produção dos extratos. (a) extratos no ultrassom; (b) filtração do extrato.

Depois de prontos, foi feita a análise química por CLAE-DAD destes dois extratos para comparar o perfil químico deles com o perfil químico dos extratos produzidos no ASE.

### 3. 8. ANÁLISE QUÍMICA

Todos os 12 extratos produzidos no ASE foram analisados por CLAE-DAD (Figura 7), assim como os extratos produzidos por maceração. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em etanol. As amostras foram filtradas em membrana de Nylon, diâmetro do filtro 13 mm, diâmetro do poro 0,22 µm.

O detector utilizado foi o PDA Waters 2998 Photodiode Array Detector, a bomba utilizada foi a Waters 1525 Binary HPLC Pump. Foi empregada a coluna analítica de fase reversa Kinetex® 5 µm bifenil 100 Å, (150 x 4.6 mm) Core-Shell Technology, Phenomenex®.



**Figura 7:** Equipamento de CLAE-DAD utilizado.

Foi realizada uma corrida de 21 minutos, com fluxo de 1 mL/min, injeção de 10µL de amostra, gradiente de solvente A (água com 0,2% de ácido fórmico) e B (acetonitrila com 0,2% de ácido fórmico) seguindo a Tabela 2. Os cromatogramas foram analisados a 266 nm.

**Tabela 2:** Variação do gradiente de solvente ao decorrer do tempo da corrida, onde % A é porcentagem do solvente A (água com 0,2% de ácido fórmico) e % B é a porcentagem do solvente B (acetonitrila com 0,2% de ácido fórmico).

Tempo (min)	% A	% B
0	60	40
1	55	45
9	20	80
13	15	85
16	15	85
17	0	100
18	60	40
21	60	40

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4. 1. MONITORAMENTO DAS RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO

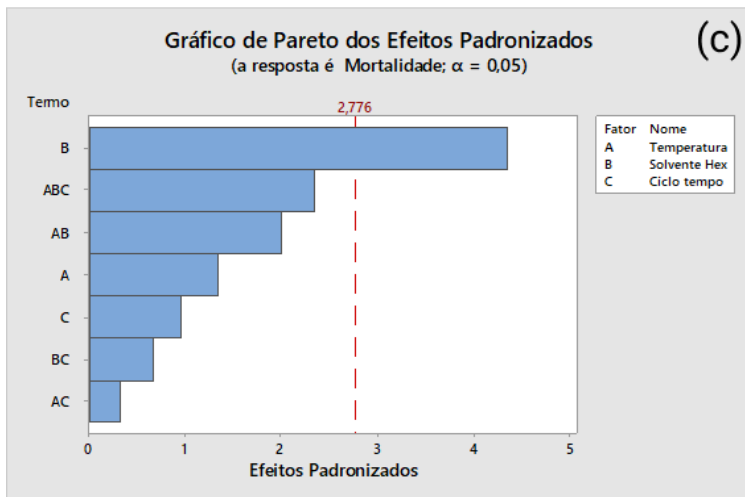
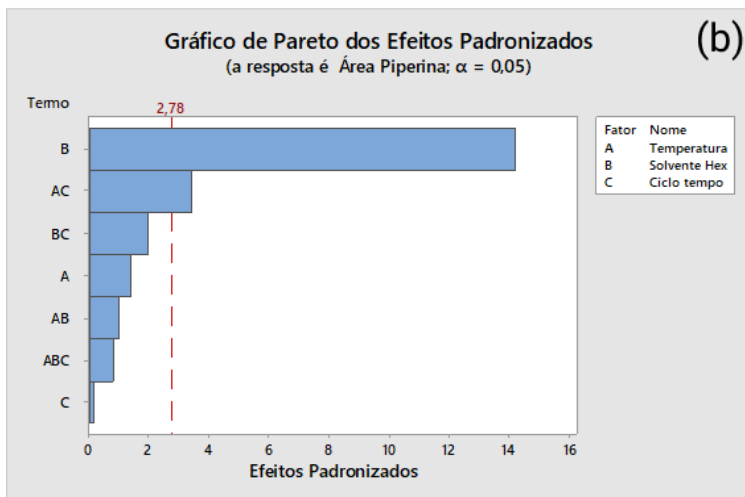
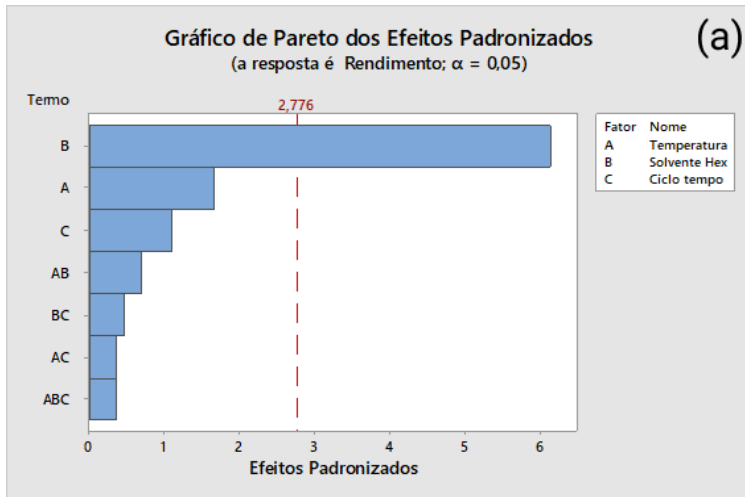
O planejamento fatorial é vantajoso porque permite a obtenção de um conhecimento prévio do comportamento das variáveis. No caso do presente estudo as variáveis analisadas foram temperatura, tipo de solvente e tempo de ciclo estático, já as respostas observadas foram atividade biológica (mortalidade a 2 ppm em 24 horas), rendimento do extrato e área da piperina.

Foram produzidos 12 extratos brutos do fruto de Piper sp. de acordo com o planejamento realizado no software Minitab (Tabela 1). As primeiras respostas avaliadas foram rendimento e atividade biológica (Tabela 3).

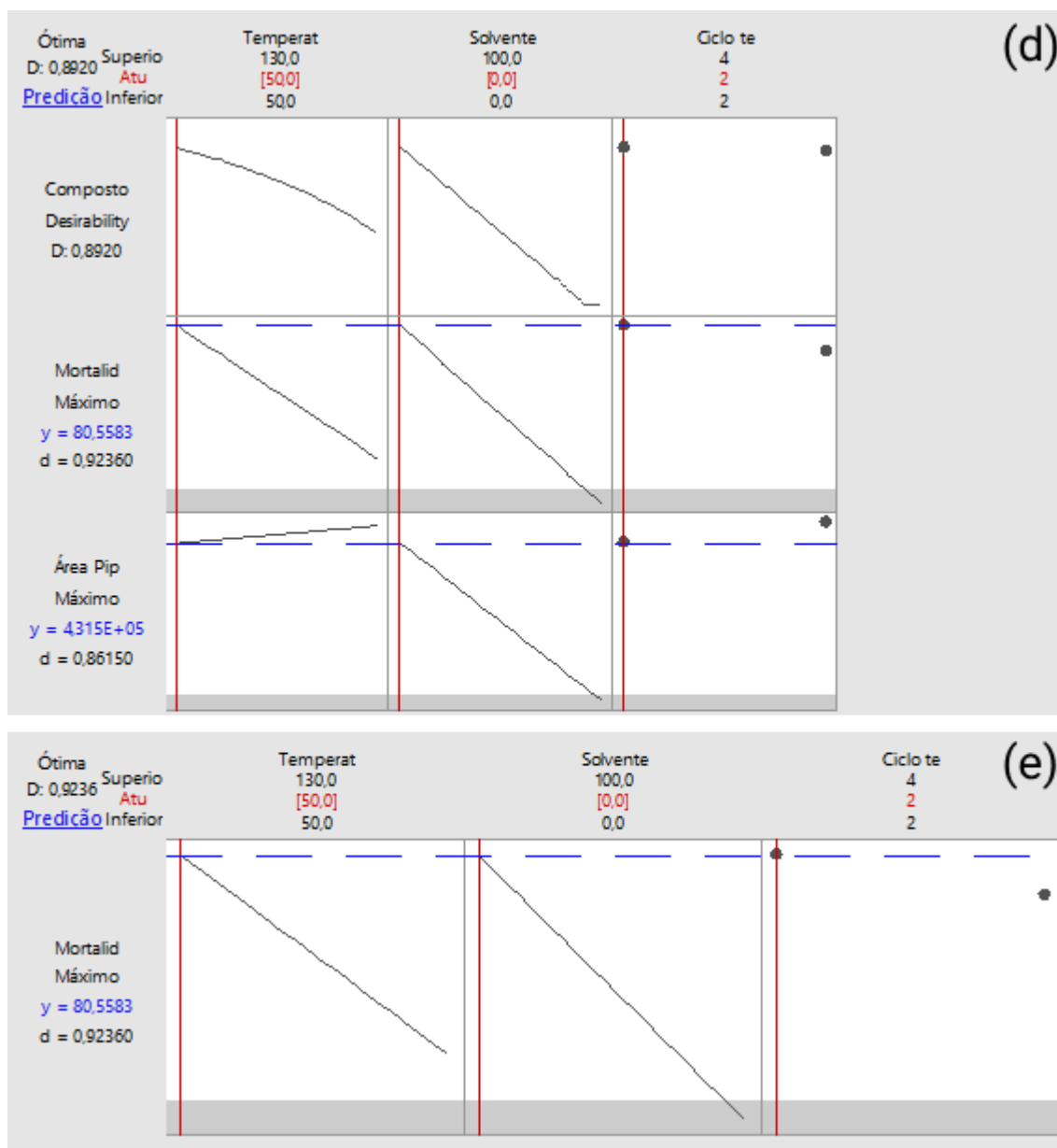
**Tabela 3:** Rendimento (%) após a produção dos extratos e CL<sub>50</sub> dos extratos do ASE testados em larvas L3 de *Aedes aegypti* em placas.

Amostra	Solvente hexano (%)	Temperatura (°C)	Tempo ciclo (min)	Rendimento (%)	24h	48h	72h
					CL <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub>
Arbo27A065A	100	50	4	8,66	2,202	2,378	2,02
Arbo27A065B	0	50	4	6,85	1,617	1,340	1,08
Arbo27A065C	100	50	2	8,05	2,605	2,113	2,09
Arbo27A065D	50	90	2	8,31	2,357	2,109	2,08
Arbo27A065E	0	130	4	6,92	1,695	1,414	1,37
Arbo27A065F	50	90	4	8,37	2,604	2,097	2,000
Arbo27A065G	0	50	2	6,30	1,414	1,377	1,41
Arbo27A065H	100	130	4	9,43	2,448	2,180	5,79
Arbo27A065I	50	90	4	8,04	2,130	2,185	3,14
Arbo27A065J	50	90	2	8,17	3,497	2,378	5,33
Arbo27A065K	0	130	2	6,86	2,194	2,551	7,55
Arbo27A065L	100	130	2	9,82	2,119	2,031	2,03
Temefós	-	-	-	-	0,0006	0,0006	0,0005

- Solvente hexano: porcentagem de hexano utilizada na extração de cada extrato.  
 Temperatura: temperatura usada em cada extração. Tempo de ciclo: quantos minutos durou cada ciclo estático. CL<sub>50</sub>: Concentração Letal média (ppm), em 24, 48 e 72 horas.







**Figura 8:** Gráficos de pareto dos efeitos padronizados com a resposta rendimento (a); área de piperina (b); mortalidade (c). Linha vermelha: linha de significância de acordo com o teste t a 95% de confiança. Gráfico de otimização de resposta múltipla: (d) otimização da mortalidade + área de piperina; (e) otimização apenas da mortalidade.

Os extratos Arbo27A065L e Arbo27A065H apresentaram os melhores rendimentos da extração feita pelo ASE, 9,82% e 9,43%, respectivamente (Tabela 3). Os dois foram

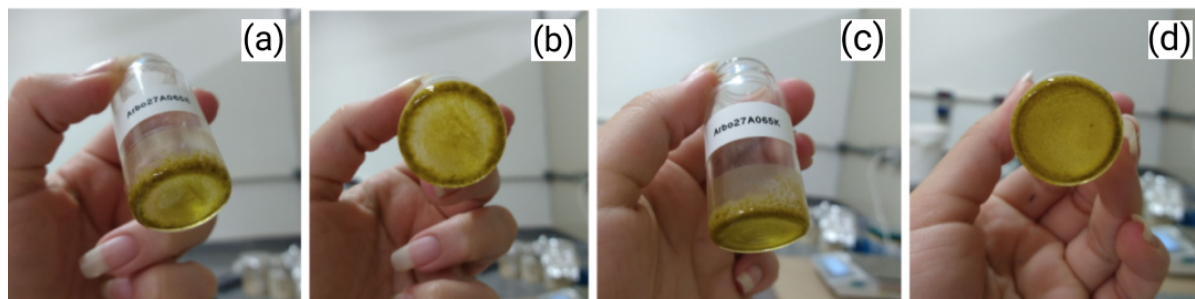
produzidos com hexano 100%, temperatura de 130°C, a diferença foi no tempo do ciclo, sendo que o primeiro foi em 2 minutos e o segundo em 4 minutos. O solvente e temperatura desta maneira chamam atenção em um primeiro momento porque sinalizam que pode haver uma correlação com maior rendimento quando utilizados nessa configuração: hexano 100% e temperatura de 130 °C. Porém com o resultado do planejamento fatorial (Figura 8a) percebe-se que a temperatura na verdade não exerce influência significativa no rendimento.

Após análise do experimento no Minitab foi possível observar fatores significativos para as respostas monitoradas, assim como obter a otimização de respostas múltiplas. Para o rendimento o único fator significativo é o solvente, enquanto que os outros fatores isolados ou combinados não mostraram interferência nessa resposta (Figura 8a), isso aliado aos dados dos rendimentos obtidos (Tabela 3), compila para afirmação de que o extrato com hexano é o que tem o maior rendimento. Portanto para a resposta rendimento, o melhor solvente é o hexano 100%, e os outros dois fatores (temperatura e tempo de ciclo) não influenciam.

Quando nós observamos a combinação solvente x temperatura, os extratos Arbo27A065A e Arbo27A065C, ambos hexano 100%, apresentaram rendimentos de 8,66% e 8,05% respectivamente, com a temperatura de 50 °C. Isso está de acordo com o resultado obtido do planejamento fatorial, visto que não houve uma diferença grande entre o rendimento dos extratos produzidos a 50 °C e 130°C já que a temperatura não foi um fator de influência significativa para o rendimento. Na literatura, a temperatura de 70 °C foi ligeiramente melhor para o rendimento do que as outras temperaturas testadas (40 °C e 50 °C) (AHMAD; AHMAD; SHEHZAD, 2019).

Os extratos brutos, Arbo27A065E (Figura 9a e 9b) e Arbo27A065K (Figura 9c e 9d) que foram extraídos a 130 °C com acetato de etila 100% tiveram rendimentos de 6,92% e 6,86%, respectivamente. Foi notado que o rendimento diminuiu quando comparado com o rendimento dos extratos brutos produzidos na mesma temperatura com hexano 100%, isso

porque o hexano 100% de mostrou solvente que mais otimiza o rendimento, enquanto que o acetato de etila 100% é o solvente que menos otimiza essa resposta.



**Figura 9:** Extrato bruto de *Piper sp.* após completa secagem do solvente; (a) e (b) Arbo27A065E; (c) e (d) Arbo27A065K.

Os rendimentos mais baixos foram 6,85% do extrato Arbo27A065B e 6,30% do Arbo27A065G, ambos foram produzidos com acetato de etila 100% e a 50 °C. Todos os extratos feitos com acetato de etila não apresentaram bom rendimento quando comparados com os outros solventes (Tabela 3).

O extrato de frutos de *Piper sp.* de diclorometano a 70 °C produzidos por Ahmad e colaboradores (2019), teve o rendimento de 11,3% uma amostra de *Piper sp.* vinda do Vietnã. Eles utilizaram 20 g de pimenta para a produção do extrato no ASE (AHMAD; AHMAD; SHEHZAD, 2019). O rendimento de 11,2% foi maior do que o melhor rendimento encontrado neste estudo com o solvente de mais próxima polaridade com o diclorometano, que é o acetato de etila (Arbo27A065E 6,92%). Enquanto isso, os extratos metanólicos feitos por Ahmad e colaboradores (2019) apresentaram rendimentos mais altos. Metanol é mais polar do que acetato de etila e diclorometano.

Foi documentado um rendimento de 4,65% para um extrato hexânico de frutos de *Piper sp.* feito a 50 °C (AHMAD; AHMAD; SHEHZAD, 2019), nossos resultados para extratos hexânicos a 50 °C foram de 8,66% e 8,05% (Arbo27A065A e Arbo27A065C,

respectivamente). Nota-se a diferença de quase o dobro do rendimento, isso pode ser consequência da massa de pimenta utilizada por Ahmad (20 g), proporção droga vegetal:solvente (1g:2,5mL para o extrato de Ahmad, e 1g:200mL para os extratos do nosso estudo) ou ainda o tipo de ASE usado.

Para a obtenção de extratos um fator que influencia diretamente na qualidade, rendimento e composição é o tipo de extração feito e a técnica utilizada. Técnicas como o ASE melhoram a eficiência de extração e a seletividade, além da fácil automação (ANDRADE, 2015).

Para a área de piperina o solvente foi consideravelmente significativo, e a temperatura junto com o tempo de ciclo também foram significantes para esta resposta (Figura 8b).

Para a área de piperina as melhores condições foram solvente acetato de etila 100%, 4 minutos de ciclo estático e 130 °C (Figura 8d), que é o extrato Arbo27A065E. Há relatos na literatura da influência do solvente não só no rendimento como também na composição do extrato (ANDRADE, 2015).

O teste larvicida em placas de 12 poços foi realizado com o objetivo de monitorar a mortalidade para a análise no planejamento fatorial e triar os 12 extratos produzidos para escolher o que apresentou melhor atividade, e então prosseguir para os ensaios em copos segundo protocolo da OMS.

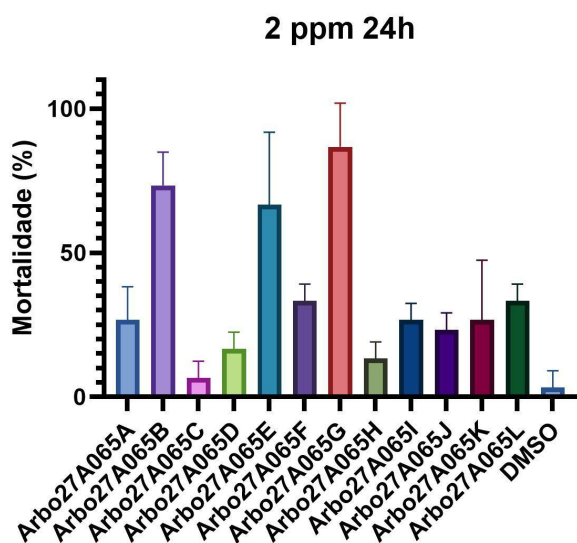
Todos os extratos foram considerados ativos na concentração de 4 ppm em larvas L3 de *Ae. aegypti* pois apresentaram mortalidade maior que 80% em 24, 48 ou 72 horas. Mesmo todos sendo considerados ativos, alguns se destacaram mais por apresentarem melhor atividade em menos tempo (com mortalidade alta em 24 h) ou melhor atividade a uma concentração mais baixa. Com isso, a resposta monitorada pelo planejamento fatorial foi a mortalidade a 2 ppm em 24 horas. Para essa resposta a única variável significativa foi o solvente (Figura 8c), portanto temperatura nem tempo de ciclo influenciam na mortalidade.

Com esses dados pode-se afirmar que o solvente é um fator significativo em todas as respostas analisadas, ou seja, ele interfere no rendimento, na mortalidade e na área de piperina.

O extrato Arbo27A065G apresentou menor  $CL_{50}$  em 24 horas (1,414 ppm), seguidos do Arbo27A065B (1,617 ppm) e Arbo27A065E (1,695 ppm) (Tabela 3). O extrato que apresentou o maior  $CL_{50}$  em 24 horas (3,497 ppm) foi o Arbo27A065J (Tabela 3), que foi feito a 90 °C com acetato:hexano 50:50 e 2 minutos de ciclo estático.

Ao tentar otimizar apenas a mortalidade (Figura 8e), observa-se que o D (Composto Desirability) fica mais próximo de 1 (0,92360), e quanto mais perto de 1, mais a resposta está sendo otimizada. Com isso, tem-se que os melhores fatores para a mortalidade máxima do extrato de *Piper sp.* são: 50 °C, acetato de etila 100% e 2 minutos de ciclo estático. Essas condições são justamente as que o extrato Arbo27A065G foi produzido, por isso ele foi escolhido para o teste larvicida em copos e escalonamento.

O gráfico da figura 10 apresenta um comparativo entre as mortalidades (%) das amostras avaliadas a 2 ppm em 24 horas. Nele fica claro que os extratos com as melhores atividades foram Arbo27A065B (73,33%), Arbo27A065E (66,67%) e Arbo27A065G (86,67%). Os rendimentos destes extratos foram parecidos entre si. Todos eles são de acetato de etila 100%, destacando esse solvente como boa opção para atividade larvicida dentre os solventes testados, como mostra o resultado de otimização da mortalidade (Figura 8e). O extrato Arbo27A065E foi extraído a 130 °C e 4 minutos cada ciclo de extração. Arbo27A065B e Arbo27A065G foram extraídos a 50 °C com 4 e 2 minutos de ciclo respectivamente. O solvente mostra ser um fator de influência para a atividade, pois os outros extratos, com temperatura e tempo de extração diferenciados não alteram a mortalidade, já os diferentes solventes sim para a atividade larvicida a 2 ppm em 24 horas, confirmando os resultados do planejamento.



**Figura 10:** Gráfico Amostra x Mortalidade (%) em 24 horas na concentração de 2 ppm dos testes em placas com larvas de *Aedes aegypti*.

Na produção de um extrato as substâncias são extraídas com base na polaridade do solvente. A hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade de uma substância determina sua solubilidade no solvente estabelecido, a polaridade do solvente afeta diretamente a eficácia da extração (ANDRADE, 2015). Provavelmente então, as substâncias mais ativas tenham mais afinidade pelo solvente acetato de etila, por isso os extratos com esse solvente apresentaram melhor atividade larvicida.

Na Figura 8 (d) e (e), observa-se a otimização de resposta múltipla, quanto mais próximo o D ótimo (Composto Desirability) estiver de 1, mais determinada resposta está sendo otimizada. Tanto para a temperatura quanto para o tempo de ciclo, tem-se que a relação da área de piperina com a mortalidade é alterada. Já para o solvente, como o 100% acetato de etila foi melhor para mortalidade e para a área de piperina, a curva continua igual quando as respostas são analisadas juntas, isso é vantajoso porque consegue-se otimizar a área de piperina e não interferir na mortalidade, podendo aumentar as duas respostas juntas. Já no caso da temperatura, como ela influencia na área de piperina mas não na

mortalidade, pode ser o fato de ter mais piperina isoladamente não ajude a aumentar a mortalidade (Figura 8d).

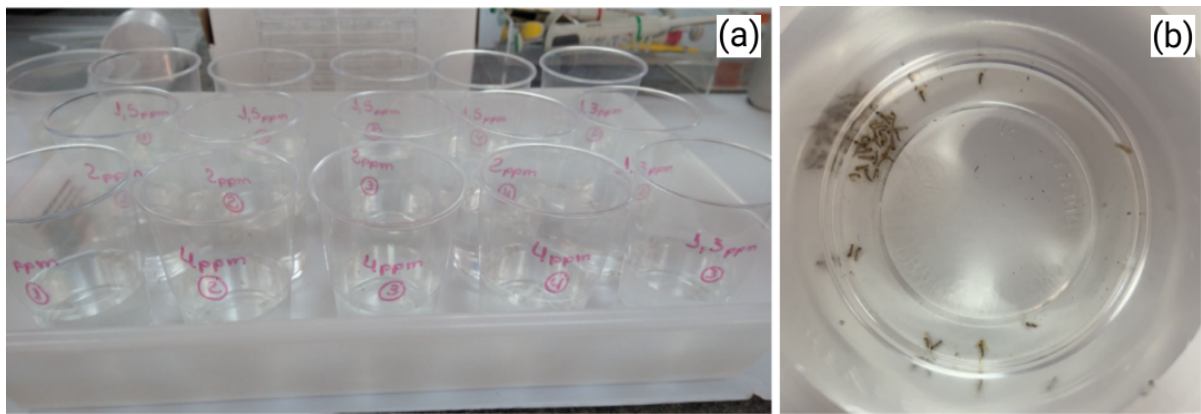
Com os dados obtidos, otimizar as respostas atividade biológica e rendimento ao mesmo tempo não é possível. Isso porque o solvente hexano é o que mais otimiza o rendimento, enquanto que o solvente acetato de etila otimiza a atividade biológica, e o solvente é a variável que influencia significativamente estas respostas. Uma opção para tentar otimizar ambas as respostas seria testar outros solventes como etanol.

O cálculo de efeito foi feito para todas as áreas dos 13 picos do cromatograma de cada extrato, tendo como resultado a influência do solvente para todas as áreas e o solvente que maximiza todas as áreas é o acetato de etila. Ao se analisar a otimização de resposta múltipla da área de cada pico com a mortalidade, observou-se que os picos 5, 6, 7, 9 e 11 apresentaram o maior composto de Desirability (0,9610), podendo ser indício de que esses esses picos tenham grande influência na atividade dos extratos.

#### 4. 2. DETERMINAÇÃO DO CL<sub>50</sub> DO EXTRATO PADRONIZADO

O ensaio foi realizado com o extrato selecionado na triagem inicial, o Arbo27A065G, nas concentrações de 4, 2, 1,5, 1,3, 1, e 0,5 ppm. Em um primeiro momento observou-se que na menor concentração (0,5 ppm) a mortalidade foi maior que 5%, então optou-se por repetir o ensaio diminuindo as concentrações. Então foram realizados ensaios nas concentrações de 4, 2, 1,5, 1, 0,5 e 0,1 ppm (Figura 11a). Em 24 horas foi registrado 100% de mortalidade das larvas de todos os copos da concentração de 4 ppm (Figura 11b).

A importância de sempre se fazer o experimento em três lotes diferentes de larvas L3 de *Ae. aegypti* é para garantir que mesmo com as variabilidades existentes entre os indivíduos a amostra continua com atividade.



**Figura 11:** Teste larvicida em copos com a amostra Arbo27A065G. (a) Os copos foram deixados em sala com temperatura e umidade controladas; (b) Larvas mortas em 24 horas na concentração de 4 ppm.

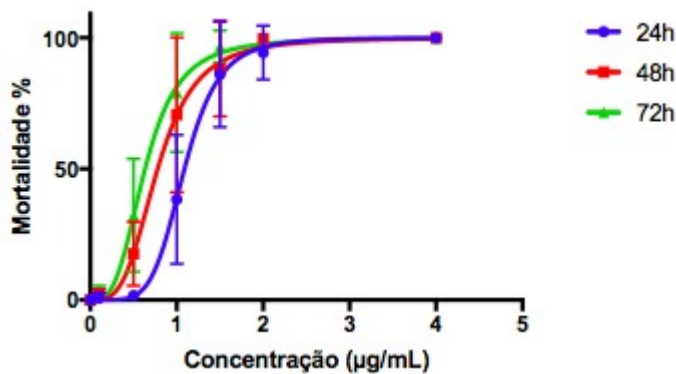
Na figura 12 a curva de dose-resposta mostra que a mortalidade aumentou de 24 para 72h, o que demonstra que os metabólitos continuaram a ter atividade nas larvas. Seria interessante fazer um ensaio de residualidade para avaliar até quando essa mortalidade continuaria. No extrato etanólico de frutos de *Piper sp.* (testado a 25 ppm) feito por Custódio et al. (2016) observou-se atividade larvicida residual nos primeiros 10 dias obtendo 100% de mortalidade, depois disso a atividade foi diminuindo até o dia 31, quando se tornou ineficaz contra as larvas de *Ae. aegypti* (CUSTÓDIO et al., 2016).

**Tabela 4:** CL<sub>50</sub>, IC 95% e R<sup>2</sup> da amostra Arbo27A065G e do controle positivo temefós testados em larvas L3 de *Aedes aegypti* em copos. Dados das três leituras feitas em 24, 48 e 72 horas.

Amostra	24h			48h			72h		
	CL <sub>50</sub>	95% IC	R <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub>	95% IC	R <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub>	95% IC	R <sup>2</sup>
Arbo27A065G	1,089	1,037 a 1,143	0,9265	0,7797	0,7141 a 0,8487	0,9087	0,6338	0,5852 a 0,6857	0,9288
Temefós	0,0082	0,0076 a 0,0089	0,9761	0,0063	0,0059 a 0,0067	0,9831	0,0053	0,0049 a 0,0057	0,9793



- CL<sub>50</sub>: Concentração Letal média; 95% IC: Intervalo de Confiança a 95%; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.



**Figura 12:** Curva dose-resposta da amostra Arbo27A065G testada em larvas L3 de *Aedes aegypti* nas leituras de 24, 48 e 72 horas.

O CL<sub>50</sub> do extrato Arbo27A065G em 24 horas é de 1,089 µg/mL (Tabela 4). Na literatura, extratos etanólicos de frutos de *Piper sp.* feitos por maceração apresentaram CL<sub>50</sub> de 5,3 em 24 horas, e tinha piperina na concentração de 580 mg/g (CUSTÓDIO et al., 2016). As diferenças de valores do CL<sub>50</sub> citado e o encontrado no nosso estudo podem ser devido às diferenças nos métodos de extração, ou no solvente, visto que o extrato analisado aqui foi feito por ASE, a 50 °C e com acetato de etila.

A *Piper sp.* já tem atividade larvicida documentada na literatura contra *Ae. aegypti* e em *Anopheles stephensi* (LIJA-ESCALINE et al., 2015).

Lija-Escaline e colaboradores (2015) mostraram que o efeito na mortalidade das larvas com o extrato metanólico das folhas da *Piper sp.* feito por extração no Soxhlet é dose-dependente (CL<sub>50</sub> foi de 32,23 ppm em 24 horas), e a atividade larvicida seria devido a presença do timol no extrato metanólico. O extrato a 10 ppm afetou morfologicamente várias organelas das larvas, mostrando mudanças histológicas significativas e incompatíveis com a vida. (LIJA-ESCALINE et al., 2015).

Em vários extratos de frutos de *Piper sp.* (de água, metanol e etanol) foi observado a grande presença de metabólitos secundários, incluindo terpenoides, esteroides, flavonoides, taninos, antraquinonas, alcalóides e glicosídeos. Nas oleoresinas de etanol e acetato de etila a maior substância encontrada foi a piperina (63,9 e 39%, respectivamente), seguida de muitas outras substâncias porém em quantidade menor (TAKOOREE et al., 2019).

No extrato etanólico de frutos de *Piper sp.* foram identificadas as seguintes substâncias: pipiliasina (CL<sub>50</sub> de 28 ppm), pipzubedina (CL<sub>50</sub> de 22 ppm), obtidas da fração solúvel em hexano e pipiacubina (CL<sub>50</sub> de 31 ppm), pelitorina (CL<sub>50</sub> de 20 ppm), piperina (CL<sub>50</sub> de 25 ppm) e piperina (CL<sub>50</sub> de 10 ppm), obtidas da fração insolúvel em hexano. Todas essas substâncias foram testadas por Gulzar (2013) em larvas L4 de *Ae. aegypti* e avaliadas em 24 horas. A piperina apresentou o menor CL<sub>50</sub> (10 ppm). O CL<sub>50</sub> do extrato etanólico foi 35 ppm, da fração solúvel em hexano 29,5 ppm e da fração insolúvel em hexano 20 ppm (GULZAR et al., 2013). No extrato etanólico dos frutos de *Piper sp.*, piperina se mostrou ser o principal composto ativo (TAKOOREE et al., 2019).

Já no extrato metanólico de frutos de *Piper sp.*, foram identificadas as seguintes substâncias e seus respectivos CL<sub>50</sub> em 48 horas: pelitorina (0,92 ppm), guineensine (0,89 ppm), piperina (0,10 ppm) e retrofractamida A (0,039 ppm). E o CL<sub>50</sub> da piperina foi de 5,10 ppm em 48 horas (PARK et al., 2002).

#### 4. 3. ESCALONAMENTO DO EXTRATO DE *Piper sp.*

O escalonamento do extrato foi feito com o intuito de analisar se através do método tradicional de extração (maceração) as características químicas daquele extrato continuariam as mesmas comparando com o extrato bruto produzido por ASE.

A extração com ultrassom apresenta algumas vantagens, como a simplicidade do equipamento, baixo custo. E algumas desvantagens como a inviabilidade de renovação do

solvente ao longo do processo, limitando a extração ao saturar o solvente usado, além da necessidade de filtração depois da extração, aumentando o tempo do experimento e risco de perda de matéria ou contaminação (ANDRADE, 2015).

Em pesquisas feitas anteriormente no Laboratório de Farmacognosia/UnB foi observado que o extrato etanólico de *Piper sp.* tinha alta atividade larvicida ( $CL_{50}$  de 1,1 ppm em 24 horas), portanto seria interessante observar se o escalonamento deste extrato seria possível, assim como para o extrato de acetato de etila Arbo27A065G, que apresentou melhor atividade larvicida neste estudo.



**Figura 13:** Extratos feitos por maceração. (a) extratos etanólico e de acetato de etila respectivamente; (b) os dois extratos depois de filtrados.

Os extratos produzidos por maceração, etanólico e acetato de etila (Figura 13) tiveram rendimento de 5,15% e 4,91%, respectivamente. O rendimento do extrato de acetato de etila feito por ASE foi 6,30%, indicando que a extração por ASE otimiza o rendimento.

Um extrato metanólico de frutos de *Piper sp.* apresentou 11% de rendimento. Ele foi feito com 3,6 kg de pimenta e 20 litros de metanol (proporção 1g:5,5mL) por duas vezes com 2 dias de maceração (PARK et al., 2002). Essa diferença no rendimento pode ser devido à quantidade de pimenta utilizada para a extração (neste estudo utilizou-se a

proporção 1g:4mL), como também às condições da maceração como tempo e quantidade de solvente.

Em um estudo feito por Andrade e colaboradores (2015), os compostos identificados na análise de CG-MS do extrato de frutos de *Piper sp.* (acetato de etila 100%) feito por maceração com ultrassom foram a piperina e o gama-sitosterol (ANDRADE, 2015).

Santiago e colaboradores (2015) identificaram no extrato etanólico dos frutos de *Piper sp.* (CL<sub>50</sub> 7,1246 ppm) a fração mais ativa (CL<sub>50</sub> 1.7101 ppm) que continha o ácido oleico, que tem atividade contra *Culex quinquefasciatus* e *Aedes stephensi*. Eles mostraram que a configuração cis desse composto apresenta maior atividade. O problema a ser solucionado seria a solubilidade, uma vez que essa substância é lipofílica e as larvas vivem em água (SANTIAGO; ALVERO; VILLASEÑOR, 2015), então a solução estaria em alguma tecnologia na produção de uma formulação.

Um estudo feito por Andrade (2015) mostrou que o rendimento do extrato de frutos de *Piper sp.* feito por maceração no ultrassom foi de 5,6% para o extrato de acetato de etila 100% e 5,3% para o extrato etanólico, já utilizando o Soxhlet como equipamento de extração, o rendimento aumenta: 6,5% e 10,3%, respectivamente. Esse aumento de rendimento pela extração com Soxhlet se deve a maior temperatura no processo, ao reciclo do solvente e interação entre solvente e matéria vegetal, aumentando esta interação aumenta-se a solubilização de compostos e conseqüentemente o rendimento. A extração com Soxhlet apresenta algumas vantagens como a recirculação do solvente, aumentando a eficiência da extração, tendo maior reprodutibilidade que a maceração (ANDRADE, 2015).

Apesar do sucesso obtido no escalonamento por maceração por ultrassom, técnicas de extração como essa podem por ventura degradar substâncias que sejam sensíveis a temperatura (ANDRADE, 2015), por isso a importância da análise química do extrato. Com a análise por CLAE-DAD será possível comparar os extratos do ASE para comparação do perfil cromatográfico.

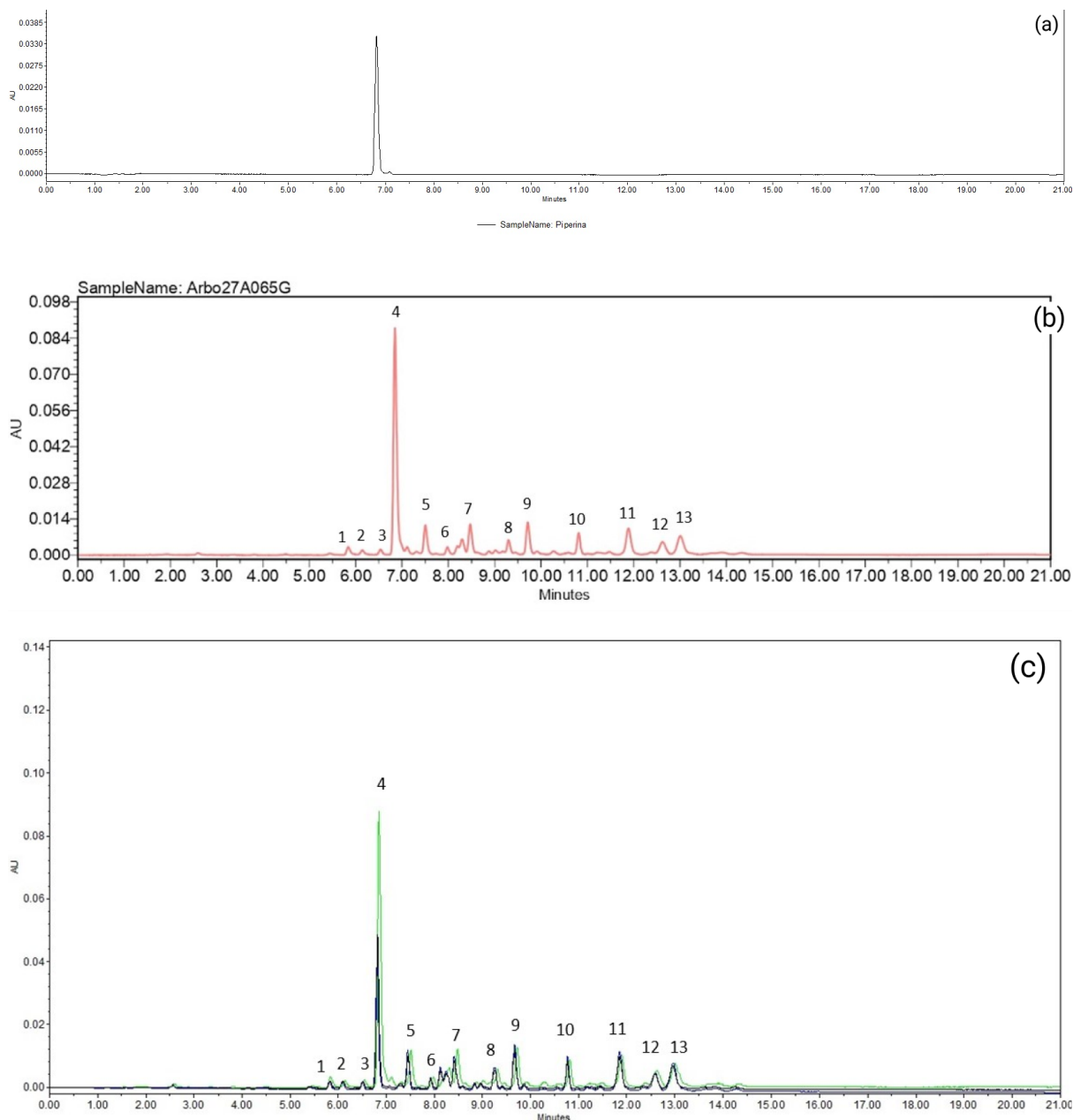
#### 4. 4. ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS PRODUZIDOS

Foi realizada a análise química dos extratos produzidos no ASE e por maceração neste trabalho com o objetivo de analisar e comparar o perfil químico de cada um deles. A importância de se realizar esta análise é avaliar as possíveis diferenças que a mudança dos fatores escolhidos resultou nos extratos, além de comparar as duas técnicas de extração utilizadas (ASE x maceração).

A maioria dos estudos analíticos de piperina da literatura usam o CLAE-DAD para a análise, por ser uma técnica sensível, simples, com boa resolução e com tempo de análise curto. Geralmente é utilizada a coluna de C-18 para a separação de piperina, e as fases acetonitrila-água ou metanol-água (QUIJIA; CHORILLI, 2020).

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Farmacognosia/UnB, encontraram 13 picos relevantes na análise do extrato etanólico de frutos de *Piper sp.*. A Figura 14 traz os cromatogramas dos extratos, e a Tabela 6 apresenta o tempo de retenção, área do pico e a razão de cada área de pico em relação a área de pico da piperina em cada extrato.

O cromatograma da piperina isolada (Figura 14a) foi obtido de análises prévias no Laboratório de Farmacognosia/Unb, e foi usado para comparação e identificação do pico nos cromatogramas dos extratos.



**Figura 14:** Cromatogramas obtidos em análise de CLAE-DAD, com comprimento de onda de 266 nm. (a) cromatograma da piperina isolada; (b) cromatograma do extrato Arbo27A065G produzido no ASE; (c) cromatograma sobreposto de três extratos: verde (Arbo27A065G: acetato de etila 100%, 50 °C, 2 min de ciclo), preto (Arbo27A066A: etanol 100%, 50 °C, 1 hora no ultrassom) e azul (Arbo27A066B: acetato de etila 100%, 50 °C, 1 hora no ultrassom).

Os extratos etanólico (Arbo27A066A) e de acetato de etila (Arbo27A066B) que foram escalonados por maceração apresentaram os 13 picos no cromatograma bem parecidos com o extrato do ASE (Arbo27A065G). Pode-se observar isso na Figura 14, onde há a sobreposição dos cromatogramas citados. Isto nos leva a crer que o escalonamento foi bem-sucedido, e que então seria possível aumentar a produção de um determinado extrato pelo método de maceração em ultrassom. A maior diferença entre eles, a princípio, seria a maior extração de piperina, pelo método ASE, quando comparado com a extração por maceração. Isso pode ser justificado quando se observa um maior pico de piperina do Arbo27A065G no cromatograma (439498) (Tabela 5), enquanto os extratos de maceração não extraíram tanto essa substância (extrato etanólico 180278; extrato de acetato 212076) (Tabela 6).

Comparando os extratos de acetato, observa-se que o do ASE extraiu não só mais piperina como também mais compostos minoritários, visto que apresentou maior área em todos os picos comparando com o extrato de maceração (Tabela 6). Já no caso do extrato etanólico, apesar de não ter extraído tanta piperina quanto o Arbo27A065G, conseguiu extrair mais de todos os compostos minoritários.

**Tabela 5:** Número do pico, tempo de retenção, área do pico e razão (área do pico/ área do pico da piperina) dos 12 extratos de *Piper sp.* analisados.

Amostra	Arbo27A065A												
Nº do pico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TR	5.850	6.154	6.541	6.853	7.493	7.964	8.451	9.285	9.700	10.793	11.875	12.609	12.994
Área	11305	6718	5628	292045	37375	8410	34744	14244	41840	26188	52096	26123	41169
Razão piperina	0,04	0,02	0,02	1	0,13	0,03	0,12	0,05	0,14	0,09	0,18	0,09	0,14
Amostra	Arbo27A065B												
Nº do pico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

TR	5.863	6.164	6.563	6.873	7.529	8.004	8.491	9.320	9.733	10.830	11.908	12.642	13.025
Área	16236	8466	9288	462154	52441	1237 8	49799	21767	61391	39780	78485	39882	63560
Razão piperina	0,04	0,02	0,02	1	0,11	0,03	0,11	0,05	0,13	0,09	0,17	0,09	0,14
Amostra	Arbo27A065C												
Nº do pico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TR	5.862	6.164	6.558	6.871	7.517	7.987	8.472	9.303	9.713	10.810	11.887	12.627	13.012
Área	9850	6252	6180	240954	36936	7995	32369	13815	40330	25604	54525	26581	42573
Razão piperina	0,04	0,03	0,03	1	0,15	0,03	0,13	0,06	0,17	0,11	0,23	0,11	0,18
Amostra	Arbo27A065D												
Nº do pico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TR	5.854	6.158	6.551	6.862	7.512	7.984	8.468	9.298	9.708	10.805	11.881	12.624	13.010
Área	12752	8187	8053	336987	42099	9661	39977	16470	48365	30839	62805	30446	42187
Razão piperina	0,04	0,02	0,02	1	0,12	0,03	0,12	0,05	0,14	0,09	0,19	0,09	0,13
Amostra	Arbo27A065E												
Nº do pico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TR	5.849	6.155	6.545	6.857	7.511	7.982	8.469	9.296	9.709	10.811	11.889	12.630	13.011
Área	15075	8511	7643	381543	39405	1019 7	38846	16599	45750	28004	54543	27312	44656
Razão piperina	0,04	0,02	0,02	1	0,1	0,03	0,1	0,04	0,12	0,07	0,14	0,07	0,12
Amostra	Arbo27A065F												
Nº do pico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TR	5.844	6.152	6.538	6.854	7.508	7.981	8.472	9.300	9.714	10.815	11.891	12.625	13.005
Área	12425	6585	7252	333517	40039	9574	38065	15608	45472	28286	59053	28788	46384
Razão piperina	0,04	0,02	0,02	1	0,12	0,03	0,11	0,05	0,14	0,08	0,18	0,09	0,14
Amostra	Arbo27A065G												
Nº do pico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TR	5.838	6.142	6.536	6.847	7.505	7.978	8.471	9.299	9.714	10.812	11.888	12.626	13.008



<b>Área</b>	16509	8389	9039	439498	54675	1278 6	51948	21222	61785	38555	77822	36808	61012
<b>Razão piperina</b>	0,04	0,02	0,02	1	0,12	0,03	0,12	0,05	0,14	0,09	0,18	0,08	0,14
<b>Amostra</b>	<b>Arbo27A065H</b>												
<b>Nº do pico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>TR</b>	5.846	6.150	6.542	6.859	7.511	7.982	8.470	9.300	9.713	10.810	11.883	12.617	13.003
<b>Área</b>	10067	5724	6028	255713	32547	7556	28507	12195	35204	21578	43029	22066	35497
<b>Razão piperina</b>	0,04	0,02	0,02	1	0,13	0,03	0,11	0,05	0,14	0,08	0,17	0,09	0,14
<b>Amostra</b>	<b>Arbo27A065I</b>												
<b>Nº do pico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>TR</b>	5.849	6.153	6.542	6.854	7.503	7.981	8.470	9.298	9.714	10.812	11.889	12.629	13.011
<b>Área</b>	12415	6197	6115	333682	31876	7687	30833	12932	36153	22591	43828	22650	34590
<b>Razão piperina</b>	0,04	0,02	0,02	1	0,1	0,02	0,09	0,04	0,11	0,07	0,13	0,07	0,1
<b>Amostra</b>	<b>Arbo27A065J</b>												
<b>Nº do pico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>TR</b>	5.841	6.146	6.537	6.852	7.506	7.982	8.472	9.304	9.720	10.816	11.888	12.618	13.010
<b>Área</b>	11857	6996	6701	320431	41472	9920	39319	16569	48002	30059	61798	28334	45127
<b>Razão piperina</b>	0,04	0,02	0,02	1	0,13	0,03	0,12	0,05	0,15	0,09	0,19	0,09	0,14
<b>Amostra</b>	<b>Arbo27A065K</b>												
<b>Nº do pico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>TR</b>	5.844	6.155	6.546	6.860	7.516	7.989	8.477	9.303	9.718	10.815	11.889	12.632	13.022
<b>Área</b>	18077	9455	8651	461519	45394	1166 9	45766	18990	51904	32623	65147	32553	53392
<b>Razão piperina</b>	0,04	0,02	0,02	1	0,1	0,03	0,1	0,04	0,11	0,07	0,14	0,07	0,12
<b>Amostra</b>	<b>Arbo27A065L</b>												
<b>Nº do pico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>TR</b>	5.851	6.156	6.547	6.859	7.509	7.986	8.473	9.302	9.713	10.813	11.890	12.635	13.015
<b>Área</b>	10477	5821	5470	268632	33191	7518	29471	12496	35798	22084	45868	23885	37047

<b>Razão piperina</b>	0,04	0,02	0,02	1	0,12	0,03	0,11	0,05	0,13	0,08	0,17	0,09	0,14
-----------------------	------	------	------	---	------	------	------	------	------	------	------	------	------

- TR: tempo de retenção. Área: área de cada pico do cromatograma. Razão piperina: área de cada pico dividida pela área da piperina.

**Tabela 6:** Número do pico, tempo de retenção, área do pico e razão (área do pico/ área do pico da piperina) dos 2 extratos de *Piper sp.* escalonados analisados.

<b>Amostra</b>	<b>Arbo27A066A</b>												
<b>Nº do pico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>TR</b>	5.813	6.093	6.500	6.804	7.438	7.921	8.401	9.247	9.665	10.766	11.852	12.588	12.968
<b>Área</b>	9779	11292	9748	180278	51428	12889	45418	27076	68092	45375	89416	39993	69889
<b>Razão piperina</b>	0,05	0,06	0,05	1	0,28	0,07	0,25	0,15	0,38	0,25	0,50	0,22	0,39
<b>Amostra</b>	<b>Arbo27A066B</b>												
<b>Nº do pico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>TR</b>	5.827	6.108	6.512	6.815	7.447	7.925	8.403	9.248	9.664	10.763	11.850	12.578	12.961
<b>Área</b>	9229	9351	7374	212076	39385	10190	34688	19116	55674	35616	70747	31766	53733
<b>Razão piperina</b>	0,04	0,04	0,03	1	0,19	0,05	0,16	0,09	0,26	0,17	0,33	0,15	0,25

- TR: tempo de retenção. Área: área de cada pico do cromatograma. Razão piperina: área de cada pico dividida pela área da piperina.

A área de cada pico é associada à concentração daquela substância na amostra. O pico número 4 (Tabela 5) é o pico da piperina, e comparando os valores da área deste pico em cada extrato analisado observa-se que as maiores concentrações de piperina estão nos extratos Arbo27A065B (CL<sub>50</sub> 1,617 ppm em 24 h), Arbo27A065G (CL<sub>50</sub> 1,414 ppm em 24 h), Arbo27A065K (CL<sub>50</sub> 2,194 ppm em 24 h), com os respectivos valores de área: 462154, 439498 e 461519.

O extrato Arbo27A065G foi o que apresentou melhor atividade larvicida, seguido do Arbo27A065B (CL<sub>50</sub> de 1,617 ppm em 24h) que tem a maior concentração associada de piperina, devido à maior área de pico apresentada. Por outro lado, o extrato Arbo27A065K

apresentou o  $CL_{50}$  de 2,194 ppm em 24h, tendo baixa atividade larvicida comparando com grande parte dos outros extratos, e mesmo assim a concentração de piperina é alta. Isso pode ser um indicativo que no caso do extrato de frutos de *Piper sp.* ocorra um efeito sinérgico na atividade larvicida em *Ae. aegypti*. Isso se a piperina juntamente com outros compostos minoritários influenciam na atividade, aumentando a atividade larvicida do extrato.

Ao se avaliar os compostos presentes em um extrato é importante lembrar que pode existir sinergismo entre componentes majoritários e minoritários da amostra quando se avalia algum tipo de atividade biológica (ANDRADE, 2015). Um bom prosseguimento seria descobrir qual ou quais são os minoritários que agem sinergicamente com a piperina e otimizar a extração destes para melhorar a atividade larvicida.

O extrato Arbo27A065B e Arbo27A065G tiveram atividade larvicida igual na concentração 4 ppm, matando 100% das larvas em 24 horas, porém a 2 ppm percebe-se que o Arbo27A065G teve melhor atividade (86,67% de mortalidade em 24 horas) (Figura 10). Essa diferença de atividade a 2 ppm provavelmente se deve a diferença dos picos 5, 6, 7 e 9, que foram maiores no Arbo27A065G.

Os outros picos não foram identificados por não ser o objetivo deste trabalho, porém na literatura há relatos de substâncias no extrato de frutos de *Piper sp.* como a pelitorina, guineensina, piperida e retrofractamida A (PARK et al., 2002).

O extrato Arbo27A065C foi o que apresentou menor área de pico de piperina (240954), associando-se à menor concentração de piperina. O  $CL_{50}$  deste extrato hexânico foi de 2,605 ppm em 24h, ele não apresentou boa atividade larvicida comparando com os outros. Este foi o extrato que teve os maiores valores da razão pico/piperina para todos os picos, provavelmente extraiu menos piperina e quantidade parecida de minoritários que os outros extratos. Ou seja, com menos piperina e minoritários com quantidade semelhante aos outros extratos (Arbo27A065C) o extrato não apresentou boa atividade ( $CL_{50}$  2,605 ppm

em 24 h), e com menos minoritários (Arbo27A065H e Arbo27A065I) a atividade também não é elevada ( $CL_{50}$  em 24 h de 2,448 e 2,130 ppm, respectivamente). Essa análise reforça a ideia de que talvez o que ajuda o extrato a ter uma alta atividade seja a combinação de alta extração de piperina e alta extração de compostos minoritários no extrato, como acontece no extrato Arbo27A065B ( $CL_{50}$  1,617 ppm em 24 h) e Arbo27A065G ( $CL_{50}$  1,414 ppm em 24 h). Talvez os extratos hexânicos apesar de melhor rendimento não têm alta atividade larvicida porque não conseguem extrair tanta piperina e os demais minoritários ativos.

## 5. CONCLUSÃO

O atual estudo buscou otimizar a atividade larvívica do extrato de *Piper sp.* por meio de planejamento fatorial aliado a um método de extração simples, aprimorado e rápido, o ASE. Dentre as variáveis analisadas, observou-se que o tipo de solvente influencia significativamente na atividade do extrato, no rendimento e na área de piperina. Para a atividade biológica o melhor solvente foi o acetato de etila puro, a melhor temperatura 50 °C com 2 minutos de ciclo estático. Utilizando essas variáveis o extrato bruto dos frutos de *Piper sp.* (Arbo27A065G) apresentou melhor atividade em larvas L3 de *Aedes aegypti*. O CL<sub>50</sub> deste extrato foi de 1,089 ppm em 24 horas. Para o rendimento o melhor solvente foi hexano 100%, independente da temperatura e do tempo de ciclo estático. Para a área de piperina as melhores condições foram solvente acetato de etila 100%, 4 minutos de ciclo estático e 130 °C.

Os extratos escalonados pelo método de maceração em ultrassom sugerem que é possível aumentar a produção dos extratos e manter um perfil químico similar aos extratos produzidos pelo ASE.

Os resultados supracitados irão ajudar a selecionar o melhor extrato para a continuidade dos estudos de residualidade e posteriormente para o desenvolvimento de uma formulação, otimizando ainda mais a atividade larvívica. Além disso, é importante o estudo dos componentes minoritários que juntamente com a piperina aumentam a atividade larvívica, e como otimizar a extração deles.

Futuramente seria interessante a realização de outros ensaios, como testes de irritação por contato; enriquecimento dos extratos com piperina para análise da atividade larvívica e testes larvívicos com os extratos escalonados, uma vez que o extrato dos frutos de *Piper sp.* apresenta um enorme potencial para se tornar um larvívico utilizado pela população para controle do mosquito *Aedes aegypti*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, R. et al. Solvent and temperature effects of accelerated solvent extraction (ASE) with Ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC-PDA) technique for determination of Piperine and its ICP-MS analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 136, p. 37–49, set. 2019.

ANDRADE, K. S. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC CENTRO TECNOLÓGICO – CTC PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, 2015.

ALI, A. et al. Insecticidal and Biting Deterrent Activities of Magnolia grandiflora Essential Oils and Selected Pure Compounds against *Aedes aegypti*. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1359, 17 mar. 2020.

CAMPOS, E. V. R. et al. Recent Developments in Nanotechnology for Detection and Control of *Aedes aegypti*-Borne Diseases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 102, 2020.

CARVALHO, B. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* populations to pyriproxyfen in the Federal District of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 7 fev. 2020.

CHELLAPPANDIAN, M. et al. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. **Environment International**, v. 113, p. 214–230, abr. 2018.

CUSTÓDIO, K. M. et al. A biodegradable device for the controlled release of *Piper nigrum* (Piperaceae) standardized extract to control *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 687–692, dez. 2016.

DEMARQUE, D. P. et al. Optimization and technological development strategies of an antimicrobial extract from *Achyrocline alata* assisted by statistical design. **PloS One**, v. 10, n. 2, p. e0118574, 2015.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, M. DA S. **Dengue - Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor**. 3ª ed.

GARCIA, G. A. et al. *Aedes aegypti* insecticide resistance underlies the success (and failure) of Wolbachia population replacement. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 63, 9 jan. 2020.

GOMES, S. V. F. Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *Passiflora*. 23 set. 2014.

GULZAR, T. et al. New constituents from the dried fruit of *Piper nigrum* Linn., and their larvicidal potential against the Dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 219–223, 21 fev. 2013.

HALSTEAD, S. Recent advances in understanding dengue. **F1000Research**, v. 8, p. F1000 Faculty Rev-1279, 31 jul. 2019.

HARAPAN, H. et al. Dengue: A Minireview. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. E829, 30 jul. 2020.

LIJA-ESCALINE, J. et al. Physiological and biochemical effects of botanical extract from *Piper nigrum* Linn (Piperaceae) against the dengue vector *Aedes aegypti* Liston (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 11, p. 4239–4249, nov. 2015.

MARCOMBE, S. et al. Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *Aedes aegypti* in Laos and implication for vector control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007852, dez. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **NOTA INFORMATIVA Nº 103/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS**.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE: SAÚDE PASSA A DISTRIBUIR LARVICIDA BIOLÓGICO PARA O CONTROLE DAS ARBOVIROSES**. 04 de Maio de 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/saude-passa-a-distribuir-larvicida-biologico-o-para-o-controle-das-arboviroses>>. Acesso em: 21 out. 2021.

PARK, I.-K. et al. Larvicidal Activity of Isobutylamides Identified in *Piper nigrum* Fruits against Three Mosquito Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1866–1870, 1 mar. 2002.

QUIJIA, C. R.; CHORILLI, M. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Piperine: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 62–77, 2 jan. 2020.

RAMYASOMA, H. P. B. K. D. et al. Multiple dengue virus serotypes resistant transgenic *Aedes aegypti* fitness evaluated under laboratory conditions. **RNA biology**, v. 17, n. 7, p. 918–929, jul. 2020.

ROY EDWARD BRUNS, B. DE B. N. R. E.; IEDA SPACINO SCARMINIO. **Como fazer experimentos**. 2. ed. [s.l.] Editora da Unicamp, 2001.

SALEHI, B. et al. Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 7, p. E1364, 7 abr. 2019.

SANTIAGO, V. S.; ALVERO, R. G.; VILLASEÑOR, I. M. *Aedes aegypti* larvicide from the ethanolic extract of *Piper nigrum* black peppercorns. **Natural Product Research**, v. 29, n. 5, p. 441–443, 2015.

**SEI\_MS - 0013726537 - Nota Técnica (1).pdf**. Disponível em: <[https://dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/dengue/SEI\\_MS%20-%200013726537%20-%20Nota%20T%C3%A9cnica%20\(1\).pdf](https://dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/dengue/SEI_MS%20-%200013726537%20-%20Nota%20T%C3%A9cnica%20(1).pdf)>. Acesso em: 20 out. 2021

SOUSA, F. et al. Dereplication and Isolation of Larvicidal Compounds From Annonaceae Species Against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, p. 1–4, 1 fev. 2020.

TAKOOREE, H. et al. A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. sup1, p. S210–S243, 27 jun. 2019.

THOMAS, S. J.; YOON, I.-K. A review of Dengvaxia®: development to deployment. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2295–2314, 2019.

UPADHYA, V. et al. Compound Specific Extraction of Camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* and Piperine from *Piper nigrum*. Using Accelerated Solvent Extractor. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, p. 932036, 2014.

WHO, World Health Organization, **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 20 out. 2021.

WHO, World Health Organization, **GUIDELINES FOR LABORATORY AND FIELD TESTING OF MOSQUITO LARVICIDES**, 2005.