

LAÍS DA SILVA MORAIS

**Produtos alimentícios vegetais e extrato padronizado e validado
com potencial larvicida em *Aedes aegypti***

BRASÍLIA, 2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LAÍS DA SILVA MORAIS

**Produtos alimentícios vegetais e extrato padronizado e validado
com potencial larvicida em *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília

Orientadora: Profa. Dra. Laila Salmen Espindola

Co-Orientadora: Profa. Dra. Lorena Carneiro Albernaz

LAÍS DA SILVA MORAIS

**Produtos alimentícios vegetais e extrato padronizado e validado
com potencial larvicida em *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Laila Salmen Espindola – Presidente

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Walter Soares Leal

University of California – Davis, Estados Unidos

Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dra. Patrícia Cardoso Cortelo

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos Orixás e aos espíritos de luz por sempre me guardarem.

Aos meus pais, Adriana e Ivan, pelo apoio incondicional, em todo e qualquer momento.

Ao meu irmão, por ser exemplo de força, dedicação e resiliência.

A minha família espiritual, pela presença marcante em minha vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Laila Salmen Espindola, pelo reconhecimento ao meu trabalho, pela dedicação à ciência e ensinamentos.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Lorena Carneiro Albernaz, por sempre estar ao meu lado desde o meu primeiro contato com a ciência.

Ao Prof. Dr. João Paulo Barreto de Sousa, que esteve comigo a cada segundo da execução do trabalho, muito obrigada pelos ensinamentos científicos e para a vida, te levarei comigo sempre.

A Renata Garcia Dusi, por sempre me apoiar e estar disposta a discutir ciência e a vida.

Ao Prof. Dr. Daniel Pecoraro Demarque, pelo apoio e cuidado.

Aos meus amigos, Bia, Eduardo e Renata, obrigada por estarem sempre comigo.

A Nayara, minha irmã de outras vidas, e Roberta, com quem sempre posso contar.

A Sophia e a Paula, minhas amigas companheiras que a farmacognosia uniu.

Aos demais colegas do Laboratório de Farmacognosia/UnB, pelo apoio no dia-a-dia.

Ao Ministério da Saúde pelo financiamento por meio do Projeto ArboControl.

A Universidade de Brasília por me possibilitar crescimento diário.

Dedico esse trabalho ao Prof. Dr. João Paulo Barreto de Sousa, quem tornou possível a execução desse trabalho, por todo os ensinamentos que me passou, por estar sempre disposto a me ajudar, pelo amor com que faz ciência.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é responsável pela transmissão de dengue, Zika, chikungunya, febre amarela urbana e outras arboviroses, causando significativo impacto na saúde pública e na economia mundial. O controle vetorial é recomendado pela Organização Mundial da Saúde como a medida mais eficiente para a redução dos casos. As matrizes alimentícias são uma alternativa promissora, pois o amplo consumo humano reduz possíveis toxicidades, além de estarem disponíveis no mercado. Esse trabalho tem por objetivo testar diferentes extratos produzidos a partir de matrizes alimentícias em larvas e pupas de *Aedes aegypti*, otimizar a produção do extrato etanólico dos frutos de *Piper nigrum* (pimenta do reino) e validar uma metodologia analítica para a quantificação de piperina, seu componente majoritário. Foram produzidos 70 extratos brutos, que foram testados quanto a atividade larvicida e pupicida em *Aedes aegypti*. Desses, 19 foram considerados ativos, sendo *P. nigrum* a matriz escolhida para continuação do trabalho. Para isso foi utilizado planejamento tipo Box-Behnken para as extrações com equipamento de extração acelerada por solvente. Para a validação foi utilizado cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo, e foram executadas as figuras de mérito, seletividade, linearidade, limites operacionais de detecção e quantificação, estudo prévio de estabilidade, precisão, recuperação e exatidão, efeito matriz e robustez. O método foi considerado seletivo, separando o pico majoritário e mais 12 picos minoritários ao longo de um perfil cromatográfico com o tempo de análise em 21 minutos. A linearidade aos níveis de teor e de impurezas apresentaram dados estatísticos aceitáveis com faixas lineares de 11,5 a 263,6 µg/mL para teor e 1,5 a 48,5 µg/mL para impurezas. Os limites operacionais de detecção e quantificação do padrão de piperina foram de 0,54 e 1,54 µg/mL. Em 72 h, durante o estudo de estabilidade, observaram-se quedas dos teores de piperina isolada (18,94%) e de piperina no extrato (5,97%). O desvio padrão relativo máximo foi de 6,06% considerando todos os picos em estudo no parâmetro de precisão. A exatidão do método foi dada pelo estudo de recuperação o qual oscilou entre 88,09 a 107,36%. O efeito matriz apresentou o paralelismo entre as curvas de forma adequada e para a robustez o fluxo da fase móvel do método cromatográfico nunca deverá ser alterado. Foi determinado CL₅₀ do extrato etanólico padronizado dos frutos de *P. nigrum* (1,1 µg/mL) e do padrão de piperina (19,0 µg/mL) em larvas L3 de *Ae. aegypti*. Além disso foi determinado atividade residual de 9 dias para o extrato a 4 µg/mL e para piperina a 60 µg/mL realizando quantificação simultânea de piperina para ambas as amostras. Sendo assim, o extrato etanólico de *P. nigrum* apresentou-se como alternativa para controle de *Ae. aegypti* com atividade laboratorial comprovada e metodologia validada, que pode ser utilizada em futuros produtos inseticidas.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, *Piper nigrum* L., pimenta-do-reino, padronização e validação, Extração acelerada por solvente (ASE)

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is responsible for the transmission of dengue, Zika, chikungunya, urban yellow fever and other arboviruses, causing a significant impact on public health and the world economy. Vector control is the most efficient measure recommended by the World Health Organization to reduce cases. Food matrices are a promising option due to widespread human consumption reducing possible toxicity, not to mention their market availability. This work aimed to test crude extracts produced with food matrices, optimize the production of an ethanol extract from *Piper nigrum* L. (black pepper) fruit and validate an analytical methodology for piperine quantification, its major component. Of the 70 extracts produced and tested against larvae and pupae, 19 were considered active against at least one of the immature forms, with *P. nigrum* chosen to continue the research. A Box-Behnken design plan was used for extractions performed by an accelerated solvent extractor (ASE) system. Validation employed high-performance liquid chromatography with a diode array detector, while the figures of merit, selectivity, linearity, operational limits of detection and quantification, preliminary study of stability, precision, recovery and accuracy, matrix effect and robustness were documented. The method was considered selective, separating the major and 12 minor peaks along a chromatographic profile with an analysis time of 21 minutes. Linearity at the levels of content and impurities presented acceptable statistical data, with linear ranges from 11.5 to 263.6 µg/mL for content and 1.5 to 48.5 µg/mL for impurities. The operational limits for detection and quantification of the piperine standard were 0.54 and 1.54 µg/mL. After 72 h, during the stability study, there were decreases in the isolated piperine (18.94%) and in the extract (5.97%) contents. The maximum relative standard deviation was 6.06% considering all peaks under study in the precision parameter. The method accuracy was provided by the recovery study which ranged from 88.09 to 107.36%. The matrix effect presented the parallelism between the curves in an adequate manner, and for robustness, the mobile phase flow of the chromatographic method should not be altered. The LC₅₀ values of the standardized *P. nigrum* fruit ethanol extract (1.1 µg/mL) and the piperine standard (19.0 µg/mL) were determined against L3 *Ae. aegypti* larvae. Furthermore, 9-day residual activity was determined for the extract (at 4 µg/mL) and piperine (at 60 µg/mL), performing simultaneous piperine quantification in both samples. Thus, the *P. nigrum* ethanol extract presented itself as an alternative to control *Ae. aegypti* with proven laboratory activity and validated methodology, which can be used in future insecticide products.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Piper nigrum* L., black pepper, standardization and validation, accelerated solvent extraction (ASE)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formas imaturas e mosquito durante o ciclo de vida do *Aedes aegypti*. **A)** Ovos; **B)** Larvas em seus quatro estágios; **C)** Pupas: macho, visão lateral e fêmea em sequência; e **D)** Mosquito adulto. 14
- Figura 2.** Distribuição de casos de Covid-19 e dengue em 2020 e 2021 por semana epidemiológica, nos seguintes países: Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Traduzido da Organização Pan-Americana de Saúde (20). 17
- Figura 3. A)** Espécie de *Piper nigrum* crescendo ao longo de árvore. **B)** Destaque de suas folhas e frutos/pimentas vermelha e verde. Fonte: https://jb.utad.pt/especie/Piper_nigrum - com adaptação autoral..... 22
- Figura 4.** As diferentes pimentas de *Piper nigrum* com destaque para suas cores. Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Black_pepper#/media/File:4_color_mix_of_peppercorns.jpg, com adaptação autoral..... 23
- Figura 5.** Estruturas químicas de alcamidas previamente obtidas de *P. nigrum*. 24
- Figura 6.** Percentual de mortalidade de larvas L3 de *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição à diferentes extratos para triagem de solventes, testados a 1,9 µg/mL. **EtOH** = etanol; **H2O** = água destilada. *= diferença estatística, quando comparado com a extração a 100% EtOH a 50 °C no teste de Dunnet. 45
- Figura 7 .** Gráficos de Pareto e valor do teste t de student. Valores de efeitos superiores a linha tracejada aponta influência do fator. **A)** Gráfico de Pareto para o percentual de mortalidade a 1,9 µg/mL. **B)** Gráfico de Pareto para o percentual de rendimento..... 48
- Figura 8 .** Gráficos de contorno para as respostas: **A)** % de rendimento e **B)** % de mortalidade, fixando a quantidade de amostra em 3 g. 49

Figura 9. Cristais de piperina isolados da amostra de trabalho de <i>P. nigrum</i>	51
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H da piperina (CDCl ₃ , 600 MHz) e sua estrutura química elucidada.....	52
Figura 11. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD em 266 nm. A) Perfil cromatográfico do padrão de piperina isolado de <i>P. nigrum</i> e sua estrutura química. B) Perfil do extrato etanólico de <i>P. nigrum</i> . C) Ampliação de B.....	56
Figura 12. Pureza espectral do padrão piperina com teor de 97,18%. A) Corte lateral do pico. B) Fatiamento em cinco posições e C) Espectros de cada posição.	57
Figura 13. Espectros de UV dos picos separados durante o estudo de seletividade.	57
Figura 14. Curva analítica da piperina ao nível de teor.	62
Figura 15. Curva analítica da piperina ao nível de impurezas.....	62
Figura 16. Plotagem de resíduos da regressão linear ao nível de teor. A) Resíduos em relação ao Y previsto da curva. B) Resíduo padronizado em %.....	67
Figura 17. Plotagem de resíduos da regressão linear ao nível de impureza. A) Resíduos em relação ao Y previsto da curva. B) Resíduo padronizado em %.	67
Figura 18. Perfil cromatográfico do padrão de piperina a 0,81 µg/mL com tempo de retenção em 6,9 minutos.....	68
Figura 19. Estabilidade considerando o teor absoluto do padrão de piperina ao longo de 72 h.	72
Figura 20. Estabilidade considerando o teor relativo dos 13 picos estudados presentes no extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i>	73
Figura 21. Regressões lineares para determinação de efeito matriz. PP = Padrão de piperina em etanol; PP+E = Padrão de piperina em extrato etanólico de trabalho;	

PP+E-Br= Padrão de piperina em extrato etanólico de trabalho com a área de piperina natural do extrato subtraída.	77
Figura 22. Gráfico de robustez para o método relacionando ensaios e % DPR dos efeitos determinados. DPR= desvio padrão relativo. A) gráfico de robustez para o tempo de retenção; B) gráfico de robustez para a área de pico.	79
Figura 23. A) Padrão de piperina em água a 60 µg/mL. B) Padrão de piperina em água com matriz esgotada a 60 µg/mL.	84
Figura 24. Gráficos de atividade residual e quantificação simultânea de piperina. A= Atividade residual de extrato etanólico de <i>P. nigrum</i> a 4 µg/mL. B= Atividade residual de padrão de piperina a 60 µg/mL.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras alimentícias adquiridas no comércio do Distrito Federal.	28
Tabela 2. Gradiente de eluição da fase móvel analítica.....	32
Tabela 3. Fatores utilizados para realização de planejamento fatorial para determinação da robustez.....	36
Tabela 4. Rendimento dos extratos avaliados e mortalidade de larvas e pupas na concentração de 250 µg/mL com leitura após 24 h.	40
Tabela 5. Experimentos realizados de acordo com o planejamento Box - Behnkhen, variáveis estudadas e respostas rendimento e o percentual de mortalidade de larvas L3 de <i>Ae. aegypti</i>	46
Tabela 6. Dados na avaliação da adequabilidade do sistema, razão entre P1 e P2 adequada com erro menor que 3%.	53
Tabela 7. Variáveis cromatográficas de cada pico em estudo ($n = 6$).	58
Tabela 8. Níveis de concentrações da curva analítica para teor em triplicata e variáveis cromatográficas estudadas.	60
Tabela 9. Níveis de concentrações para a curva analítica para impureza em triplicata e variáveis cromatográficas estudadas.	61
Tabela 10. Análise de variância dos dados da regressão em nível de teor (ANOVA).	63
Tabela 11. Análise de variância dos dados da regressão ao nível de impureza (ANOVA).....	64
Tabela 12. Resultados de resíduos da regressão em nível de teor.....	65
Tabela 13. Resultados de resíduos da regressão em nível de impureza.....	66
Tabela 14. Parâmetros estudados na estabilidade do padrão de piperina ($n = 3$)....	69

Tabela 15. Parâmetros avaliados na estabilidade do extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> (n = 3).....	70
Tabela 16. Dados de repetibilidade do extrato etanólico de <i>P. nigrum</i> (n=6).....	74
Tabela 17. Dados de precisão intermediária do extrato etanólico de <i>P. nigrum</i> (n=6).	75
Tabela 18. Parâmetros para determinação da exatidão do método	76
Tabela 19. Dados de efeito da matriz normalizada.	78
Tabela 20. Lotes de <i>P. nigrum</i> , avaliados na aplicabilidade	80
Tabela 21. Atividade biológica de <i>P. nigrum</i> e piperina em larvas L3 de <i>Aedes aegypti</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS = Organização Mundial da Saúde

BTI = *Bacillus thuringiensis israelensis*

MIV = manejo integrado de vetores

CLAE-DAD = cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo

ASE = Accelerated solvent extraction (extração acelerada por solvente)

PVDF = *Polyvinylidene Fluoride* [poli(fluoreto de vinilideno)]

PTFE = Politetrafluoretileno

UV = ultravioleta

TR = tempo de retenção

LOD = limite operacional de detecção

LOQ = limite operacional de quantificação

T₀ = tempo inicial

DPR = desvio padrão relativo

DMSO = dimetilsulfóxido

CL₅₀ = concentração letal de 50% dos indivíduos

CL₉₀ = concentração letal de 90% dos indivíduos

EtOH = etanol

H₂O = água

IC95% = intervalo de confiança de 95%

PP = padrão de piperina

F α = fator alfa de separação

AP = altura de pico

LBP = largura da base de pico

GL = graus de liberdade

SQ = soma dos quadrados

MQ = média dos quadrados

ANOVA= análise de variância

SUMÁRIO

1. Referencial teórico.....	12
1.1. Justificativa	12
1.2 O <i>Aedes aegypti</i> e seu ciclo de vida	13
1.2.1 O impacto do vetor <i>Aedes aegypti</i>	14
1.3 Produtos naturais alimentícios como inseticidas	18
1.4 Padronização e validação de métodos analíticos	19
1.5 A planta <i>Piper nigrum</i> L.....	21
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. Materiais e métodos.....	27
3.1 Amostras e extrações iniciais	27
3.2 Extração padronizada a partir da amostra de trabalho.....	30
3.3 Preparo analítico da amostra de trabalho	31
3.4 Equipamento e sistema analítico.....	31
3.5 Parâmetros de validação	32
3.6 Aplicabilidade do método na análise de diferentes lotes de <i>Piper nigrum</i> L.....	36
3.7 Ensaio biológico em <i>Aedes aegypti</i> L.....	36
3.7.1 Manutenção de colônia de <i>Ae. aegypti</i>	36

3.7.2 Testes de triagens larvicida e pupicida	37
3.7.3 Determinação das concentrações letais CL ₅₀ e CL ₉₀ do extrato etanólico de <i>P. nigrum</i> e piperina.....	38
3.7.4 Determinação dos teores de piperina no extrato etanólico de <i>P. nigrum</i> e do padrão de piperina utilizando o método validado no ensaio residual em larvas de <i>Ae. aegypti</i>	38
4. Resultados e discussão	39
4.1 Triagem de amostras alimentícias em larvas e pupas de <i>Aedes aegypti</i>	39
4.2 Otimização da extração de <i>P. nigrum</i> por ASE - extração acelerada por solvente	44
4.3 Elucidação estrutural, desenvolvimento e validação do método analítico	50
4.3.1 Adequabilidade do sistema.....	52
4.3.2 Seletividade	54
4.3.3 Linearidade.....	59
4.3.4 Limites operacionais de detecção e quantificação (LOD e LOQ)	67
4.3.5 Estudo de estabilidade dos compostos para o método	68
4.3.6 Precisão.....	74
4.3.7 Exatidão.....	75
4.3.8 Efeito matriz.....	76
4.3.9 Robustez.....	78
4.4 Aplicabilidade do método na análise de lotes comerciais	80
4.5 Avaliação da atividade biológica do extrato padronizado de <i>P. nigrum</i>	81

4.6 Uso do método validado no sistema biológico de larvas de <i>Aedes aegypti</i> : quantificação de piperina simultânea à atividade larvicida residual	83
5. Conclusão.....	89
6. Referências bibliográfica.....	90

1. Referencial teórico

1.1. Justificativa

O mosquito *Aedes aegypti* se adaptou facilmente às regiões tropicais e subtropicais onde as condições climáticas permitem seu desenvolvimento adequado. A disseminação ocorre em grandes centros e regiões metropolitanas, onde há disponibilidade para reprodução e propagação ao redor da grande circulação de pessoas. Esse vetor é responsável por transmitir arboviroses mundialmente importantes, como dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana, para as quais não existem tratamentos específicos, e em que somente para febre amarela existe sistema vacinal reconhecidamente efetivo (1).

Mais da metade da população mundial vive em áreas de risco para contágio destas arboviroses, e estima-se que o impacto econômico causado chega a escala de milhões de dólares. Este relato mostra a importância de agregar conhecimento e buscar estratégias de controle de um dos vetores mais relevantes do mundo. Porém, alguns dos inseticidas utilizados no controle apresentam falhas, como o desenvolvimento de resistência por parte dos insetos, além de toxicidade ambiental (2,3).

Os produtos naturais têm sido descritos como uma alternativa para substituir os inseticidas convencionais, com relatos adequados e de qualidade de distintas espécies de plantas. Contudo, em muitos casos há limitações, como a disponibilidade de matéria-prima para o uso em larga escala, além da escassez de padronização e validação vinculadas às amostras com potencial para uso no controle de *Ae. aegypti*. Estudos relataram a atividade de produtos alimentícios, como chás, frutas, verduras e especiarias, que são amplamente comercializados ao redor do mundo. Dentre essas espécies, a *Piper nigrum* L. - pimenta-do-reino, teve sua atividade relatada e se mostrou como um produto em potencial (4,5).

Sendo assim, este trabalho buscou diferentes amostras consumidas por diversas populações ao redor do mundo e que apresentassem alguma atividade em *Ae.*

aegypti. Após triagem prévia, *P. nigrum* se destacou considerando os três critérios adotados: (i) a ampla disponibilidade comercial, (ii) o consumo em rotina por seres humanos e (iii) a potente atividade larvicida contra o vetor em estudo. Embora, observaram-se alguns trabalhos na literatura demonstrando o controle de qualidade de *P. nigrum*, pouquíssimos estudos relacionaram a padronização, método cromatográfico completamente validado com atividade larvicida e residual contra o *Ae. aegypti*. Por isso, o trabalho aqui relatado busca atingir esse contexto analítico escasso na literatura, com o objetivo de gerar alta qualidade do extrato etanólico de *P. nigrum* para o controle de *Ae. aegypti*.

1.2 O *Aedes aegypti* e seu ciclo de vida

O mosquito *Aedes aegypti* pertence a ordem Díptera e a família Culicidae (6). Este vetor é holometábolo, ou seja, possui ciclo de vida completo constituído por 4 estágios: ovo; larva; pupa e adulto. Os ovos (Figura 1A), ao serem postos, são inicialmente claros e translúcidos, rapidamente se tornam escuros, sendo resistentes a dessecação e podem eclodirem ao longo de até 8 meses, a depender das condições naturais que estiverem sujeitos. Os ovos são colocados pelas fêmeas nas paredes horizontais de criadouros contendo água, ao submergirem eclodem, dando origem as larvas (7–9). O estágio larval tem duração de 5 a 10 dias, é um estágio aquático onde as larvas se desenvolvem e se alimentam de matéria orgânica contida nos criadouros. Conforme seu desenvolvimento, as larvas são classificadas em quatro estágios denominados L1, L2, L3 e L4 (Figura 1B). Sua estrutura é dividida em cabeça, tórax e abdome, possui cerdas pelo corpo que auxiliam o nado e têm função sensorial (6). No ambiente aquático, após o período de desenvolvimento larval, posterior ao estágio L4, as larvas se transformam em pupas (Figura 1C), permanecendo nesse estágio por 2 a 3 dias. As pupas apresentam cefalotórax e abdome, sendo possível diferenciar machos de fêmeas com auxílio de lupas, nesse estágio não há alimentação. Ao fim do estágio pupal, os indivíduos se transformam em mosquito adulto (Figura 1D). Esses mosquitos têm longevidade de aproximadamente 30 dias. Os adultos machos se

alimentam de soluções açucaradas. As fêmeas possuem hábitos hematófagos, já que a ingestão de sangue é necessária para maturação de seus ovos (1).

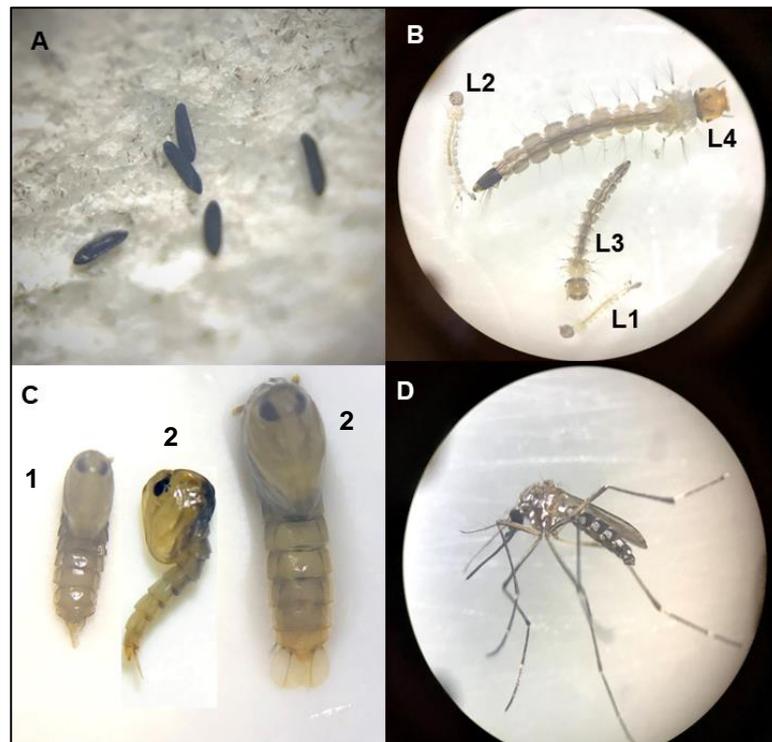


Figura 1. Formas imaturas e mosquito durante o ciclo de vida do *Aedes aegypti*. **A)** Ovos; **B)** Larvas em seus quatro estágios; **C)** Pupas: macho¹, e fêmea²; e **D)** Mosquito adulto.

1.2.1 O impacto do vetor *Aedes aegypti*

As arboviroses são doenças virais transmitidas por artrópodes. Estas doenças são amplamente propagadas devido a adaptação do vírus ao vetor, as características climáticas, a disponibilidade de criadouros e as interações do hospedeiro invertebrado com as espécies vertebradas (10). Dentre os vetores competentes para a transmissão de vírus, o *Ae. aegypti* se destaca por ser capaz de transmitir as arboviroses de maior impacto global (11). O *Aedes albopictus* também é um vetor importante para a transmissão dessas doenças, porém como possui comportamento menos

antropofílico, faz com que o *Ae. aegypti* seja superior no que diz respeito ao poder de propagação das arboviroses (12).

Mais de 50% da população global vive em áreas propícias para a transmissão de arboviroses, sendo a dengue considerada uma das dez ameaças à saúde mundial, com estimativa de 390 milhões de casos por ano (2,13). As pessoas infectadas com dengue podem ou não apresentar sintomas. Quando estão sintomáticas podem ter febre, dores de cabeça, nos olhos ou nas articulações. Existe ainda o quadro de dengue severa, caracterizado pelo extravasamento de plasma, provocando sangramento severo e podendo levar o paciente a óbito. Os sintomas incluem forte dor abdominal, vômitos persistentes e eventualmente com sangue, e fadiga (14). Os tratamentos disponíveis são apenas para tratar os sintomas. A Dengvaxia® é a primeira vacina licenciada em diferentes países para tentar prevenir a dengue. Apesar disso, a existência de 4 diferentes sorotipos do vírus faz com que esse imunizante possa aumentar o risco de dengue severa em pacientes que não foram expostos previamente (14). Estudos de fase 3 com outra vacina, TAK-003 (Takeda) mostraram sua eficiência quando aplicadas em crianças entre 4 e 16 anos, diferente da Dengvaxia® que só pode ser aplicada em crianças maiores de 9 anos (15).

O vírus Zika também apresenta grande preocupação mundial, por causar epidemias pelo mundo. Em 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) considerou essas ocasiões como uma emergência de saúde pública de relevância internacional. Este vírus pode ser transmitido pelo *Ae. aegypti*, por relação sexual ou por transmissão vertical, de mãe para filho durante a gravidez. Os sintomas mais comuns são similares aos da dengue, como dores de cabeça, nas articulações e febres. Além destes, o Zika vírus pode desencadear, a síndrome de Guillain-Barré e outras neuropatias, bem como estar associada a microcefalias em neonatais e outras máis formações durante a gravidez (16,17).

A chikungunya também é transmitida pelo *Ae. aegypti* e compartilha sintomas comuns aos da dengue e Zika, mas sua principal característica é a dor severa nas articulações que pode evoluir para um quadro crônico. Até a semana epidemiológica

16 de 2021, foram registrados 20.993 casos prováveis de chikungunya no Brasil (18,19).

O *Ae. aegypti* transmite a febre amarela urbana. Porém, o mesmo vírus é também transmitido por mosquitos do gênero *Haemagogus*, como *H. leucocelaenus* e *H. janthinomys*, causando a mesma doença, chamada de febre amarela silvestre. Essas espécies de *Haemagogus* foram responsáveis por surtos no Brasil entre 2016-2018. O principal sintoma da forma grave é o comprometimento do fígado que pode gerar icterícia, devido a não metabolização da bilirrubina que se acumula na corrente sanguínea. Para essa arbovirose, a vacinação é apontada pela OMS como a medida mais importante de prevenção (20,21).

Além do impacto direto na saúde dos indivíduos expostos às arboviroses, existem os custos econômicos para tratamento e prevenção dessas doenças. Para a febre amarela e dengue as estimativas de estudos realizados para cálculo dos custos com essas doenças entre 2000-2018, apontam que os valores mundiais totais variam de 2,1 a 57,3 bilhões de dólares (3).

Adicionalmente, em 2020, com a emergência da pandemia de Covid-19 os serviços de saúde de diferentes países onde as arboviroses são endêmicas têm enfrentado desafios que vão desde o atendimento de pacientes até os serviços de vigilância, contribuindo para um possível declínio no número de casos registrados destas doenças (19). Na Figura 2 é possível verificar a emergência do número de casos de Covid-19 e o declínio no número de casos de dengue simultaneamente por semana epidemiológica compreendendo os seguintes países: Argentina; Brasil; Chile; Paraguai; Uruguai (20).

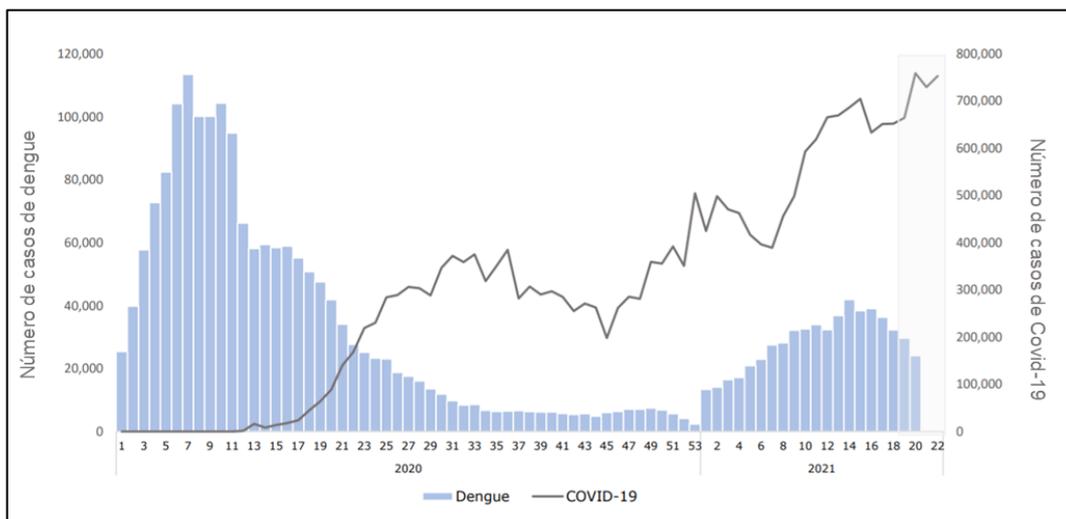


Figura 2. Distribuição de casos de Covid-19 e dengue em 2020 e 2021 por semana epidemiológica, nos seguintes países: Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Traduzido da Organização Pan-Americana de Saúde (20).

O controle vetorial é fortemente indicado como forma de reduzir o número de casos de transmissões destes vírus. O controle mecânico consiste na eliminação de criadouros para o vetor. O controle biológico inclui o uso de outros organismos parasitos, patógenos ou predadores, como a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI). O controle químico utiliza-se basicamente inseticidas sintéticos (23). Existe ainda o Manejo Integrado do Vetor (MIV), que inclui os serviços de vigilância ambiental, conscientização da população e o processo para utilização de controle químico e biológico (24).

Alguns desafios são enfrentados no controle vetorial, como a resistência adquirida pelos mosquitos e a toxicidade ao meio ambiente, provocada principalmente pelos inseticidas químicos. Quatro principais classes de inseticidas sintéticos são utilizadas: organoclorados; organofosforados; carbamatos; piretróides (25). Atualmente, no Brasil foram inseridos 2 inseticidas para o controle da fêmea adulta, Cielo-ULV® (imidacloprida + praletрина) e Fludora® fusion (clotianidina + deltametrina). Essas combinações foram introduzidas com o intuito de substituir o organofosforado Malathion, pelo qual os mosquitos já adquiriram resistência. Como larvicida, foi inserido o inseticida de origem natural Espinosade, composto pela mistura de espinosina A e D, que são metabólitos secundários da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* (26–28). Visando aprimorar o controle vetorial, uma das alternativas é buscar

contornar os problemas de resistência e toxicidade, por meio dos estudos com produtos naturais (29).

1.3 Produtos naturais alimentícios como inseticidas

Matrizes naturais desempenham um papel fundamental na descoberta e no desenvolvimento de produtos. Diferentes metabólitos secundários de plantas, originados de variadas rotas biossintéticas, destacam-se pela atividade inseticida com baixo impacto ambiental, sendo caracterizado como *eco-friendly*. Considerando a variedade e a complexidade das amostras naturais, a padronização e/ou métodos completamente validados que são exigidos para registros em agências reguladoras, ainda são considerados escassos (30,31).

No Brasil em 2021 a safra de alimentícios, incluindo grãos, frutas, legumes, especiarias, dentre outros pode bater recorde, com a produção de 264,9 milhões de toneladas (32). Este dado contribuiu para a escolha de buscar amostras naturais comestíveis com capacidade tóxica ao vetor *Ae. aegypti*, além de estarem presentes no cotidiano da população, oferece possibilidade de obtenção em grande escala e, provavelmente com custos acessíveis.

Uma revisão da atividade larvicida de plantas, incluindo frutas, chás e especiarias, evidenciou o potencial de produtos naturais para auxiliar no controle de vetores (33). Pavela et al. relacionaram a atividade larvicida de 429 espécies de plantas em vetores do gênero *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, sendo que 29 apresentaram valores de $CL_{50} < 10$ ppm (4), das quais algumas usualmente comercializadas. A atividade repelente e de toxicidade por contato dos óleos essenciais de folhas de louro (*Laurus nobilis*) e caule de canela (*Cinnamomum* ssp.) foram considerados eficientes para o controle dos insetos *Liposcelis bostrychophila* (piolho de farinha) e *Tribolium castaneum* (besouro castanho) que infestam produtos armazenados, particularmente grãos de alimentos (34). O extrato metanólico da casca do fruto de abacate (*Persea americana*) apresentou atividade larvicida em *Anopheles stephensi* (CL_{50} 6,65 ppm), *Ae. aegypti* (CL_{50} 7,12 ppm) e *Culex quinquefasciatus* (CL_{50} 10,78 ppm) (35). O óleo de alho demonstrou atividade repelente para uma espécie de flebotomíneo, vetor de

leishmaniose, sendo na concentração de 1 ppm, capaz de repelir 95% dos indivíduos testados (36). A combinação de extratos de diferentes polaridades de funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) e camomila (*Matricaria chamomilla* L.), plantas utilizadas para preparo de chás, apresentou atividade ovicida e larvicida em *Culex pipens* L. (37). Óleos essenciais de espécies de *Cinnamomum*, testados individualmente ou em misturas, inclusive com adição do constituinte principal - cinamaldeído, apresentaram atividade em fêmeas adultas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (38). Misturas de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. e *Eucalyptus globulus* Labill. demonstraram atividade em *Aedes* e na mosca doméstica (*Musca domestica*) (39). Alguns grãos comercializados, como a chia (*Salvia hispanica* L.) e o gergelim preto (*Nigella sativa* L.) apresentaram atividade inseticida em *Spodoptera exigua* Hübner (lagarta-do-cartucho) (150 µg por lagarta, 97% mortalidade) e em *Anopheles stephensi* Liston (CL₅₀ 88,1 ppm) (40,41).

Em adição, a otimização de extratos de matrizes alimentícias tem sido realizada por meio de nanopartículas. A produção de nanopartículas com o extrato aquoso de *Elettaria cardamomum* L. (cardamomo) permitiu aumentar a atividade em larvas de *Ae. aegypti* (CL₅₀ reduzido em mais de 3 vezes), e de *Culex tritaeniorhynchus* Giles, o transmissor da encefalite japonesa. Nanopartículas de *Citrus limon* (L.) Osbeck (limão siciliano) foi ativo em larvas de *Anopheles stephensi* (CL₅₀ 26,32 mg/L) e *Ae. aegypti* (CL₅₀ 6,17 mg/L) (42,43).

1.4 Padronização e validação de métodos analíticos

A padronização está relacionada a atribuir medições, especificações ou desenvolver algum tipo de uniformização para produzir ou avaliar algum sistema, processo ou cadeia produtiva. Esta apresenta como finalidade principal a busca pela qualidade permitindo as correções de erros ou o alinhamento de variáveis inclusas nas fases de um dado procedimento. A padronização deve ser dividida em etapas, sendo os processos presentes em cada etapa variável de acordo com a área de trabalho e os objetivos definidos (44).

As agências reguladoras mundiais controlam e descrevem legalmente os parâmetros de um método completamente validado. De um modo geral, tais agências que figuram como principais no exterior são: ICH (*International Conference on Harmonization*), USP (*The United States Pharmacopeia*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e a FDA (*Food and Drug Administration*). No Brasil, ao âmbito de fármacos, fitoterápicos, agroquímicos e alguns processos, estão presentes: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Para estas agências, considerando pequenas variações, um método validado visa assegurar a credibilidade de medições, com evidências legais e documentadas que garantam a confiabilidade para sua execução. Em outras palavras, um procedimento completamente validado dever incluir as seguintes figuras de méritos: seletividade, linearidade e faixa dinâmica de trabalho, limite operacional de detecção – LOD, limite operacional de quantificação – LOQ, estudo de estabilidade do método, precisão, exatidão, efeito matriz, robustez e, em muitos casos o estudo de aplicabilidade. (45,46).

Na literatura, os métodos existentes, geralmente não determinam todas estas figuras de méritos a partir de produtos naturais relacionando com algum sistema biológico, e esta falta pode estar inserida em quatro grandes desafios: 1 – ter a quantidade suficiente de matéria-prima para produzir adequadamente a matriz de trabalho ao longo dos procedimentos; 2 – promover a elucidação estrutural completa de pelo menos um analito que confira a qualidade geral à matriz em estudo; 3 – caso o analito elucidado ou de interesse não esteja disponível comercialmente, o mesmo deve ser isolado em quantidade adequada para execução de todas as figuras de méritos com grau de pureza de pelo menos 96%; 4 – o método completamente validado deve ser capaz de atuar no mínimo em duas frentes, por exemplo, de modo a garantir a qualidade do analito na respectiva matéria-prima e no sistema biológico que a matriz e analito foram submetidos. Trabalhar estes quatro contextos concomitantemente para atingir os objetivos propostos não é trivial, o que pode justificar as diferentes metodologias relatadas na literatura, porém poucas de forma

completas ao âmbito de produtos naturais e menos ainda relacionando aos sistemas biológicos.

O óleo da espécie vegetal *Azadirachta indica* A. Juss., conhecido como "neem" é o único inseticida natural aprovado no Brasil, União Europeia e Estados Unidos para controle de *Ae. aegypti* (47,48). Substâncias descobertas de fontes naturais e, posteriormente sintetizadas ou isoladas também são utilizadas no controle de vetores, dentre elas as piretrinas e o espinosade (49,50). Estudos descrevem métodos analíticos para produtos naturais com atividade inseticida: Kasaj et al. desenvolveu e validou um método para quantificação de piretrinas em amostras comerciais de extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de arranjo de diodo (51). Para o neem (*A. indica*), métodos foram estudados para a quantificação do seu componente ativo principal, a azadiractina, que atua contra diferentes insetos. As técnicas envolveram diferentes equipamentos, incluindo as cromatografias líquida e gasosa com diferentes detectores como espectrometria de massas ou UV- visível (52). Um estudo utilizando extrato etanólico de *P. nigrum* determinou piperina em água, mas em frasco distinto dos que continham larvas de *Ae. aegypti* ao longo de teste residual (53). O extrato hexânico das folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi. (Anacardiaceae), conhecida como pimenta-rosa apresentou o bilobol como seu componente principal que teve sua atividade descrita em larvas de *Ae. aegypti* e em embriões de peixe zebra. Neste estudo foi realizada quantificação do referido analito, bem como o estudo de degradação do bilobol na água dos embriões (54).

Somente amostras ou produtos com alguma padronização e/ou método analítico validado poderão ser aceitos ou registrados por alguma das agências reguladoras anteriormente mencionadas. Isto se deve à grande qualidade em todos os sentidos das análises qualitativas e quantitativas que são agregadas a qualquer analito, matriz, produto ou matéria-prima que estejam padronizadas e validadas.

1.5 A planta *Piper nigrum* L.

Piper nigrum L. pertence à família Piperaceae (Figura 3). Esta planta está comercialmente disponível sendo mundialmente conhecida como pimenta-do-reino,

pimenta redonda, pimenta preta, pimenta branca, pimenta verde ou pimenta vermelha (Figura 4), a depender do seu estado de colheita, período de maturação ou processo de secagem e conservação com qual foram tratadas. Há relatos de confusão da pimenta vermelha de *P. nigrum* com a pimenta rosa de *Schinus molle* ou *S. terebinthifolius* (55).



Figura 3. A) Espécie de *Piper nigrum* crescendo ao longo de árvore. **B)** Destaque de suas folhas e frutos/pimentas vermelha e verde. Fonte: https://jb.utad.pt/especie/Piper_nigrum - com adaptação autoral.



Figura 4. As diferentes pimentas de *Piper nigrum* com destaque para suas cores. Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Black_pepper#/media/File:4_color_mix_of_peppercorns.jpg, com adaptação autoral.

As espécies de *P. nigrum* são consideradas trepadeiras lenhosas perenes que crescem em torno de 4 a 6 m de altura sob árvores de suporte ou com o uso de postes e treliças. Estas plantas se espalham, sendo capazes de enraizarem rapidamente quando os caules tocam o solo. As suas folhas são alternadas, inteiras. As suas flores medindo de 4 a 8 cm de comprimento são pontas pendulares. Estas pontas são alongadas variando-se conforme o amadurecimento de seus frutos. *P. nigrum* é originária da Índia, se adaptando adequadamente a climas quentes e úmidos (55). O Brasil é o quarto maior produtor mundial de pimenta-do-reino. Em 2020 a produção chegou a mais de 114 mil toneladas e os estados que mais produziram tal especiaria foram o Espírito Santo e o Pará (56,57).

A fitoquímica a partir de *P. nigrum* está amplamente reportada na literatura envolvendo diferentes classes químicas como as lignanas, neolignanas, flavonoides,

terpenos, alcaloides, ácidos fenólicos, amidas e esteroides. As piperamidas são compostos característicos da espécie, responsáveis pelo sabor picante e também pela maioria das atividades biológicas já descritas. E a diferença na composição química é crucial para identificação da espécie e origem de *P. nigrum*, pois esta permite fazer uma correlação com a procedência da planta (56,58). O óleo essencial presente nos frutos é rico em terpenos que conferem aroma e sabor único a especiaria (59). A piperina e seus análogos (Figura 5) também são convencionalmente chamadas de alcanidas e estão presentes na grande maioria das espécies de Piperaceae. A pimenta-do-reino é a espécie que apresenta maior quantidade de piperina, variando de 2 a 9% de seu teor. Estudos relataram a segurança do uso desta pimenta tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo* (59).

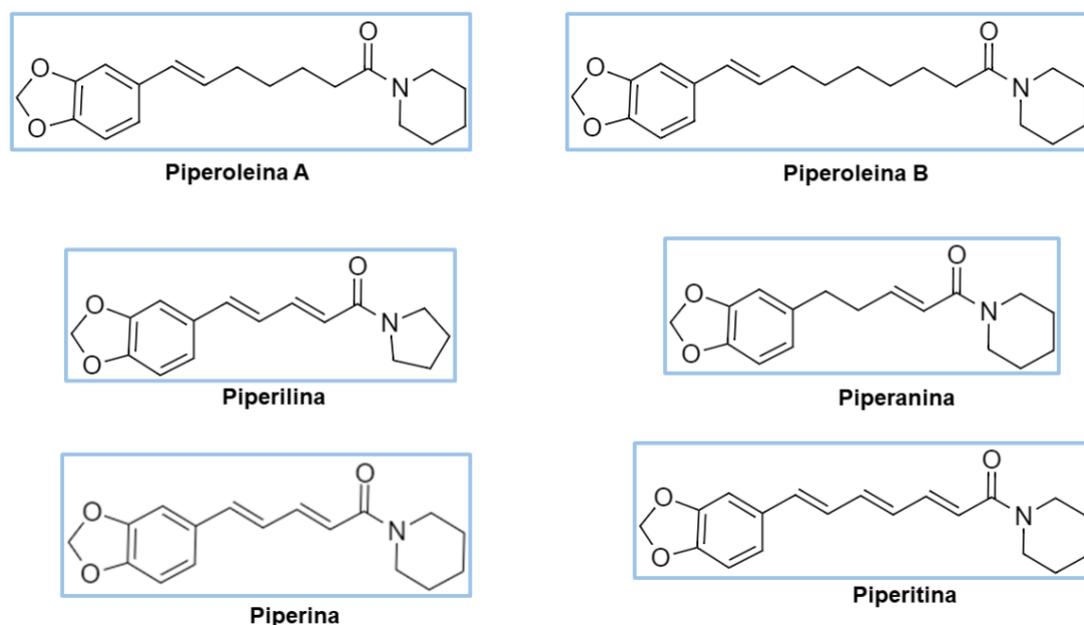


Figura 5. Estruturas químicas de alcanidas previamente obtidas de *P. nigrum*.

Estudos relataram as mais distintas atividades farmacológicas de *P. nigrum*, incluindo anticancerígena, antialérgica, hipoglicemiante, antioxidante e antimicrobiana (56). Assim como, a atividade inseticida em vetores de doenças e em insetos que são pragas agrícolas. O extrato etanólico dos frutos de pimenta-do-reino e suas frações apresentaram CL_{50} que variaram de 1 a 7 ppm em larvas de *Ae. aegypti*. Em estudo

de revisão, o extrato etanólico dos frutos de *P. nigrum* apresentou valor de CL₅₀ (0,98 ppm) larvicida em *Ae. aegypti* mais potente que seu componente majoritário, a piperina (CL₅₀ 5,10 ppm) (5). Na composição deste extrato há outras alcaloides capazes de potencializar tal atividade. Nanopartículas produzidas com o óleo essencial do fruto de *P. nigrum* apresentaram atividade em pragas de grãos estocados (60,61). Park et al. relataram atividade do extrato e frações hexânica e clorofórmio dos frutos de *P. nigrum* em larvas L3 de *Ae. aegypti* (100 ppm, 100% mortalidade). Este estudo bio guiado obteve 5 componentes: piperina (CL₅₀ 5,1 ppm), pelitorina (CL₅₀ 0,92 ppm), guineensina (CL₅₀ 0,89 ppm), piperidina (CL₅₀ 0,1 ppm) e retrofractamida A (CL₅₀ 0,039) ppm (62).

Considerando o levantamento bibliográfico, fica evidente o potencial da pimenta-do-reino, referindo-se à sua fitoquímica, suas atividades biológicas, bem como algumas metodologias analíticas para seu controle de qualidade. A *P. nigrum* se adequa aos critérios propostos no trabalho, já que é um produto alimentício, consumido ao redor do mundo, apresenta atividade inseticida, e está disponível no mercado em larga escala, além de dispor de bom custo-benefício. Nesse contexto, o presente trabalho, descreverá a completa padronização e validação para tal matéria-prima, monitorando o principal marcador químico da espécie, a piperina, em 2 situações: (i) utilizando o extrato etanólico e diferentes lotes vendidos no mercado e (ii) monitorando tal extrato e a piperina no ensaio larvicida residual em *Ae. aegypti*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Padronizar a obtenção do extrato etanólico de pimenta preta, *P. nigrum*. Validar um método cromatográfico completo para o extrato e piperina, capaz de monitorar a qualidade de amostras comerciais e de teste larvicida em *Ae. aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento e padronização de extrações de amostras alimentícias;
- Avaliação das atividades larvicida e pupicida dos extratos produzidos;
- Desenvolver e validar método cromatográfico para extrato padronizado abrangendo todas as figuras de méritos pertinentes;
- Determinar CL₅₀ e CL₉₀ de extrato padronizado e validado
- Determinar atividade larvicida residual a partir do marcador químico e do extrato de trabalho;
- Monitorar concomitantemente os teores do extrato de *P. nigrum* e de piperina durante a execução do ensaio residual.

3. Materiais e métodos

3.1 Amostras e extrações iniciais

Inicialmente, as 70 amostras listadas na tabela 1 foram adquiridas em mercados locais do Distrito Federal. As amostras frescas ou secas variaram a depender dos custos, disponibilidades e das quantidades necessárias para extrações preliminares. O preparo destas amostras foi iniciado com a redução de partícula com auxílio de processador ou tesouras com posterior tamisação através de peneira/tamis com malha medindo 1,4 mm (12 mesh). Após estes procedimentos, considerando a relação massa/volume pesou-se cerca de 50 g de cada amostra, transferindo-as para a cela de extração com capacidade de 100 mL do equipamento Dionex™ ASE™ 150 *Accelerated Solvent Extractor* (ASE-150). Todas as extrações foram feitas pelo extrator acelerado por solvente ASE-150, utilizando solvente extrator constituído pela mistura de hexano:acetato de etila:diclorometano:etanol na proporção de 4:4:1:1 v/v. Os parâmetros iniciais designados ao ASE-150 foram: temperatura de extração em 70 °C, com tempo de extração de 5 minutos por ciclo, com a execução de 3 ciclos estáticos e lavagem de 60% do volume da cela, além de 150 segundos de tempo de purga. As extrações resultantes destes processos foram concentradas usando-se evaporador rotativo Buchi-150, transferidas para frascos de vidro de 20 mL pesados, que foram mantidos em capela química sob exaustão até peso constante. Posteriormente, os rendimentos de cada extrato seco foram determinados considerando a massa inicial de material extraído e a massa de extrato bruto. Uma alíquota de cada um destes extratos foi reservada para serem submetidas aos ensaios larvicida e pupicida em *Ae. aegypti*.

Tabela 1. Amostras alimentícias adquiridas no comércio do Distrito Federal.

Nº amostra	Nome popular	Nome científico	Parte da Planta
1	Amora Branca	<i>Morus alba</i>	Partes aéreas
2	Canela de Velho	<i>Miconia albicans</i>	Partes aéreas
3	Mulungu	<i>Erythrina verna</i>	Madeira Caule
4	Goji Berry	<i>Lycium barbarum</i>	Fruto
5	Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Folha
6	Moringa	<i>Moringa oleifera</i>	Folha
7	Espinheira Santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Partes aéreas
8	Capim Limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Folha
9	Camomila	<i>Matricaria chamomilla</i>	Flor
10	Chapéu de Couro	<i>Echinodorus grandiflorus</i>	Partes aéreas
11	Coco	<i>Cocos nucifera</i>	Fruto
12	Melissa	<i>Lippia alba</i>	Folha
13	Chia	<i>Salvia hispanica</i>	Semente
14	Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i>	Folha
15	Carqueja	<i>Baccharis trimera</i>	Folha e caule
16	Calêndula	<i>Calendula officinalis</i>	Flor
17	Carqueja	<i>Baccharis triptera</i>	Folha e caule
18	Cavalinha	<i>Equisetum arvense</i>	Hastes estéreis
19	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Semente em pó
20	Abóbora	<i>Cucurbita</i> sp.	Semente
21	Gergilim preto	<i>Nigella sativa</i>	Semente
22	Gergilim Branco	<i>Sesamum indicum</i>	Semente
23	linhaça dourada	<i>Linum usitatissimum</i>	Semente
24	Amaranto	<i>Amaranthus caudatus</i>	Semente
25	Quinoa	<i>Chenopodium quinoa</i>	Semente

26	Girassol	<i>Helianthus annuus</i>	Semente s/ casca
27	Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	Semente
28	Cardamomo	<i>Elettaria cardamomum</i>	Semente em pó
29	Limão Siciliano	<i>Citrus lemon</i>	Casca do fruto
30	Pimenta malagueta	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
31	Pimenta chocolate	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
32	Pitaya	<i>Hylocerus monacanthus</i>	Fruto casca
33	Avocado	<i>Persea americana</i>	Polpa
34	Abacate	<i>Persea americana</i>	Polpa
35	Romã	<i>Punica granatum</i>	Fruto casca
36	Pimenta scorpion amarela	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
37	Abacate	<i>Persea americana</i>	Semente
38	Batata Yacon	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	Tubérculo
39	Pimenta scorpion vermelha	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
40	Pinha	<i>Annona squamosa</i>	Fruto polpa
41	Blueberry seca	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Fruto
42	Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i>	Fruto
43	Pinha	<i>Annona squamosa</i>	Fruto casca
44	Maxixe	<i>Cucumis anguria</i>	Fruto
45	Romã	<i>Punica granatum</i>	Fruto semente e arilo
46	Pitaya	<i>Hylocerus monacanthus</i>	Fruto polpa
47	Cebola	<i>Allium cepa</i>	Bulbo
48	Cebola roxa	<i>Allium cepa</i>	Bulbo
49	Gengibre	<i>Zingiber officinalis</i>	Rizoma
50	Limão Siciliano	<i>Citrus lemon</i>	Polpa
51	Abacate	<i>Persea americana</i>	Casca do fruto
52	Avocado	<i>Persea americana</i>	Semente

53	Avocado	<i>Persea americana</i>	Casca do fruto
54	Olho de Boi	<i>Dioclea violacea</i>	Semente
55	Uxi amarelo	<i>Endopleura uchi</i>	Caule
56	Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i>	Semente
57	Bluberry fresca	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Fruto
58	Vagem	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fruto
59	Ervilha	<i>Pisum sativum</i>	Fruto
60	Cranberry	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Fruto
61	Uva Passa Branca	<i>Vitis vinifera</i>	Fruto
62	Pimenta Cumari	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
63	Pimenta Bode	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
64	Pimenta dedo de moça	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
65	Pimenta de cheiro	<i>Capsicum sp.</i>	Fruto
66	Sassafrás	<i>Sassafras albidum</i>	Caule
67	Mostarda	<i>Brassica alba</i>	Semente
68	Carapiá	<i>Dorstenia brasiliense</i>	Raiz
69	Pimenta de macaco	<i>Piper aduncun</i>	Flor
70	Pimenta-do-reino preta	<i>Piper nigrum</i>	Fruto

3. 2 Extração padronizada a partir da amostra de trabalho

Após os estudos iniciais a pimenta-do-reino preta (nº 70 listada na tabela 1) foi selecionada para o prosseguimento dos trabalhos. Uma nova aquisição de 1 kg dos frutos *in natura* de *P. nigrum* foi necessária (fabricante “Rei dos condimentos”, lote número 9073). Toda alíquota de 1 kg de frutos foi pulverizada utilizando moinho de facas laboratorial resultando em pó com partículas menores que 1,4 mm. Toda esta matéria-prima *in natura* com partícula reduzida foi estabelecida como a amostra de trabalho.

Um planejamento fatorial do tipo *Box-Behnken* foi realizado utilizando o extrator acelerado por solvente ASE-150. Para isso, foram utilizados três fatores contínuos: quantidade de amostra (1 - 5 g), temperatura de extração (50 – 130 °C) e tempo de ciclo estático (2 - 4 minutos). O solvente etanol e 2 ciclos estáticos no extrator foram parâmetros fixos. O rendimento (%) de extrato seco e a mortalidade das larvas (%) na concentração de 1,9 µg/mL foram as respostas monitoradas. Um total de 15 experimentos foram realizados em duplicata e todas as análises foram estudadas com o uso do *software* Minitab® 18.

Os dados resultantes deste planejamento fatorial permitiram definir a extração padronizada a partir da amostra de trabalho. Para essa extração, 1 g de frutos de pimenta-do-reino preta pulverizada foi transferida para cela extratora com capacidade de 100 mL, a qual foi posteriormente acoplada ao extrator de solventes acelerado Dionex™ ASE™ 150. Os parâmetros do equipamento extrator foram temperatura de extração em 50 °C, com tempo de ciclo estático em 4 minutos/ciclo, com a execução de 2 ciclos e com a lavagem de 60% do volume da cela durante 150 segundos de tempo de purga.

3.3 Preparo analítico da amostra de trabalho

Ao final de cada extração padronizada a partir da amostra de trabalho foram obtidos cerca de 175 mL de extrato etanólico. Alíquotas de 1 mL de cada extração foram filtradas através de filtro analítico medindo 13 mm de diâmetro com membrana de nylon de 0,22 µm de porosidade. Todas as amostras foram filtradas diretamente para frasco apropriado de injetor automático e já analisadas subsequentemente, pelo equipamento e condições descritas na seção 3.4. O padrão de piperina, em uso de rotina, foi preparado na concentração de ~150 µg/mL com o uso de balão volumétrico, utilizando-se etanol com os mesmos sistemas de filtragem e análise.

3.4 Equipamento e sistema analítico

Todas as análises da amostra de trabalho e respectivo padrão foram conduzidas por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE. O cromatógrafo da

marca Waters apresentava detector UV-DAD modelo 2998, sistema binário de solventes com bombas mod. 1525 e auto injetor mod. 2707. Depois do preparo analítico de cada amostra, 10 µL foram injetados no sistema cromatográfico. A separação dos compostos foi atingida com o uso de fase estacionária reversa C₁₈ em uma coluna cromatográfica Kinetex (5 µm, Biphenyl, 100 Å 150 x 4,6 mm) e fase móvel composta por acetonitrila:água, ambas contendo 0,2% de ácido fórmico. A eluição dos compostos foi realizada sob gradiente como apresentado na tabela 2, sob vazão de 1 mL/min, com tempo total de análise de 21 minutos. Todos os perfis cromatográficos foram adquiridos com comprimento de ondas em 266 nm.

Tabela 2. Gradiente de eluição da fase móvel analítica

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

3.5 Parâmetros de validação

Para o desenvolvimento desses parâmetros, seguiu-se especialmente a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N^o 166 de 2017 – ANVISA. Para alguns

casos artigos científicos também foram consultados (63). A grande maioria das variáveis estudadas ao longo destes parâmetros foram dadas pelo cálculo de desvio padrão relativo, conforme equação a seguir:

$$\text{DPR (\%)} = (\text{S/X}).100$$

Em que, **DPR %**: corresponde ao desvio padrão relativo, **S**: é a estimativa do desvio padrão e **X**: é a média das medidas em replicatas.

A adequabilidade do sistema foi elaborada pela avaliação individual de duas soluções de padrão de piperina em concentrações semelhantes com ~150 µg/mL, cada. Estas soluções foram nomeadas como P1 e P2. Nas análises de rotina para verificar a qualidade do sistema obtinham-se seis análises de P1 e duas análises de P2. Posteriormente, avaliavam-se a conformidade dos picos pelo estudo comparativo com relação ao tempo de retenção, área do pico, bem como calculava-se a razão de P1 função de P2.

A seletividade foi dada pelo estudo comparativo entre os perfis cromatográficos do padrão com àqueles obtidos para a amostra em estudo, além da avaliação das respostas: tempo de retenção, fator de separação α , largura de base do pico e altura do pico. Além disso, a pureza espectral do padrão, e a comparação dos espectros de UV entre padrão e amostra foram monitorados ao longo das análises.

A linearidade foi avaliada por meio da elaboração de curvas analíticas do padrão. Estas curvas foram obtidas a partir de diluições seriadas de soluções-mãe, com concentrações expressas em µg/mL. Durante os estudos foi necessário obter uma curva ao nível de teor e outra ao nível de impureza, ambas em triplicata. As análises estatísticas dos dados foram obtidas pelo método de regressão linear e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, em que, **y**: corresponde à resposta medida (área do pico), **x**: concentração (µg/mL), **a**: corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta e **b**: corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas. O coeficiente de correlação de Pearson, *r* e R-quadrado também foram calculados. Tal modelo de

regressão incluiu a obtenção de Y – previsto e gráficos de resíduos que permitiram determinar a faixa linear dinâmica.

Os limites operacionais de detecção – LOD e de quantificação - LOQ foram determinados por procedimentos semelhantes ao processo de linearidade. Para isso, foram elaboradas curvas analíticas com o componente de interesse respeitando a faixa dinâmica de trabalho próxima ao limite de detecção. Após a elaboração destas curvas, foi obtida a regressão linear, determinando, a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a média do coeficiente angular. Em seguida, estes dados foram aplicados às seguintes equações: **LOD = 3,3.(s/S)** e **LOQ = 10.(s/S)**, obtendo-se os limites operacionais de detecção e quantificação, respectivamente. Nestas equações, **s** é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e **S** é a média do coeficiente angular.

No estudo de estabilidade do método, tanto o padrão obtido no preparo analítico como a amostra de trabalho extraída pelo extrator ASE-150, foram submetidas às variações de temperatura e luz ao longo de 3 dias. Ambas as amostras foram mantidas sob luz e temperatura ambiente por 9 h/dia e reservadas ao escuro dentro de geladeira por 15 h/noite. A cada 24 h tais amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos e seus teores relativos foram determinados.

O parâmetro de precisão foi avaliado de duas formas: pela repetibilidade e pela precisão intermediária. As repostas obtidas foram: área do pico, tempo de retenção e fator cauda. A repetibilidade foi avaliada conforme ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de no mínimo seis amostras. Essas medições foram realizadas sob as mesmas condições cromatográficas e procedimentos de extração, único local e equipamento, realizando repetições no mesmo dia. A precisão intermediária seguiu os mesmos parâmetros da repetibilidade, porém esta foi realizada em dias consecutivos e por dois analistas.

A exatidão do método foi calculada por meio do ensaio de recuperação. Na fase inicial, construiu-se uma matriz a partir da mesma amostra de trabalho livre de seus compostos. Para tanto, cerca de 100 g de *P. nigrum* pulverizada foi submetida à extração exaustiva com auxílio de aparelho de Soxhlet, utilizando-se etanol:acetona 9:1 v/v por 16 h (64). Ao final deste procedimento o material vegetal esgotado foi seco

em temperatura ambiente e analisado pela metodologia analítica descrita, confirmando a exclusão eficiente de seus componentes. Para a recuperação, pesaram-se 15 alíquotas de 1 g cada da amostra esgotada em suportes “barcas” de papel alumínio. Estas amostras foram separadas em três níveis de concentração com cinco ensaios individuais. Ao nível de concentração nomeada baixa foi adicionado 1 mL do padrão de piperina a 10 mg/mL em cada pesagem. Aos níveis médio e alto adicionaram-se tal padrão a 20 e 40 mg/mL, respectivamente. Estas amostras enriquecidas com padrão foram secas em temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente, para evitar perda de amostra, as barcas de alumínio contendo a matriz enriquecida foram transferidas diretamente para cela de extração do extrator ASE-150, realizando, 15 extrações separadamente. Ao final de cada extração o volume médio de extrato etanólico a partir destas amostras enriquecidas foi de 175 mL, correspondendo às concentrações teóricas de piperina em níveis baixa, média e alta de 57,14, 114,28 e 228,57 µg/mL, respectivamente. Depois de todas as extrações amostrais, todas as amostras resultantes foram preparadas analiticamente e analisadas por cromatografia em fase líquida (seção 4.3 e 4.4 respectivamente).

O parâmetro efeito matriz foi obtido por meio de curvas analíticas. Foi elaborada uma curva com o padrão de piperina nas concentrações seriadas de 163; 81; 41; 20 e 10 µg/mL. Em seguida, a partir do extrato seco de *P. nigrum* obteve-se as diluições etanólicas com 143; 138; 125; 99 e 48 µg/mL. Essas concentrações foram analisadas separadamente em triplicata. E em seguida, foram misturadas proporcionalmente ponto a ponto, resultando, assim, na análise do extrato enriquecido com o padrão. O efeito matriz normalizada – EMN foi calculado pela análise dos coeficientes angulares envolvendo as respectivas curvas analíticas.

A robustez do método também foi elaborada pela alternativa de planejamento fatorial completo 2⁴. Para tanto foram considerados quatro diferentes fatores em dois níveis de variações, positivo +1 e negativo -1, listados na tabela 3. Ao longo destes estudos, incluindo 16 experimentos em duplicata, as respostas monitoradas foram o tempo de retenção e a área de pico. Os efeitos observados nestas respostas foram determinados e convertidos em valores de desvio padrão relativo pela equação: DPR = (Efeito/Média das medições) x 100.

Tabela 3. Fatores utilizados para realização de planejamento fatorial para determinação da robustez.

Nível	Fatores			
	T (min.)	Filtro	λ_{nm}	Fluxo (mL/min)
-1	3	PVDF	256 nm	0,9
+1	5	PTFE	276 nm	1,1
Método nominal	4	Nylon	266 nm	1,0

T= tempo de ciclo estático no extrator ASE-150; **Filtro**= tipo de membrana usada no preparo analítico da amostra; λ_{nm} = comprimento de onda utilizado ao detector UV-DAD. **Fluxo**= fluxo da fase móvel utilizada na análise por CLAE.

3.6 Aplicabilidade do método na análise de diferentes lotes de *Piper nigrum* L.

A aplicabilidade do método foi realizada pela quantificação absoluta de piperina em diferentes amostras disponíveis no mercado. Para tanto foram adquiridos cinco lotes de pimenta preta (Lotes N° RPPNP-31102020; RCPNP-OO8R; TCPNP-14921; CFPNP-70926; CTFGNP-30102020) e cinco lotes de pimenta branca (Lotes N°CDQPNB-341; RPPNB-30102020; TCPNB-14921; CTFGNB-31102020; BMPNB-32102020). Estas amostras passaram por todos os procedimentos já descritos, incluindo a redução de partículas, as pesagens, as extrações padronizadas e o preparo analítico de amostras. Posteriormente, tais amostras foram submetidas às análises cromatográficas utilizando todos os conceitos da metodologia em estudo. Ao final de cada análise as respostas área de pico, tempo de retenção, bem como a determinação do teor de piperina *p/p* nos respectivos extratos foram obtidas.

3.7 Ensaios biológicos em *Aedes aegypti* L.

3.7.1 Manutenção de colônia de *Ae. aegypti*

Os testes biológicos utilizando-se formas imaturas de *Ae. aegypti* foram realizados com cepa Rockfeller mantidas no Insetário ArboControl - Laboratório Prof. José Elias de Paula - Anexo do Laboratório de Farmacognosia - UnB. A manutenção seguiu as orientações da Organização Mundial da Saúde. A temperatura (25 a 28 °C)

e umidade relativa do ar (60 – 80%) foram controladas, sob fotoperíodo de 12 horas por dia. A eclosão dos ovos foi realizada em câmara sob pressão reduzida. Após as eclosões, as larvas colocadas em bandejas plásticas (com dimensões de 50 x 35 x 8 cm) foram alimentadas com ração de peixe. As pupas fêmeas e machos foram separadas visualmente para montagem das gaiolas na proporção de 1:3, para machos e fêmeas, respectivamente. Os adultos foram alimentados com solução açucarada a 10% e sangue de equino para as fêmeas fornecido pelo Hospital Veterinário da UnB, para a maturação dos ovos (65).

3.7.2 Testes de triagens larvicida e pupicida

Para testes larvicida utilizaram-se placas de 12 poços contendo 10 larvas L3 por poço em 3 mL de água. Em cada poço foram aplicados 50 µL das amostras previamente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO), considerando a obtenção das concentrações finais desejadas. Na fase inicial, as amostras foram testadas a 250 µg/mL. Nestes ensaios, as amostras que apresentaram 100% de mortalidade de larvas foram, posteriormente, avaliadas à 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. As amostras foram consideradas ativas quando a taxa de mortalidade foi maior ou igual a 80% nas respectivas concentrações. O percentual de mortalidade das larvas foi avaliado após 24 h do tratamento e todos os testes foram realizados em triplicata. Como controle positivo foi utilizado o temefós e para o negativo DMSO.

Para os ensaios pupicidas usaram-se 10 pupas sob estas mesmas condições e metodologia, porém em tais ensaios as amostras foram avaliadas na concentração de 250 µg/mL com a leitura dos resultados realizada em 24 e 48 horas. O desenvolvimento das pupas foi observado até que o controle virasse mosquito, para verificar se as amostras foram capazes de inibir o desenvolvimento do inseto.

3.7.3 Determinação das concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ do extrato etanólico de *P. nigrum* e piperina

Para determinação de CL₅₀ e CL₉₀ do extrato etanólico de *P. nigrum* e do padrão de piperina foram utilizadas 25 larvas L3 em copos plásticos transparentes contendo 120 mL de água com coluna de água variando de 5 a 10 cm, conforme normas descritas pela OMS. O extrato etanólico foi avaliado nas concentrações de 2,5; 1,5; 1,1; 0,9; e 0,5 µg/mL. Para a piperina utilizou-se as concentrações 50; 25; 15; 10 e 5 µg/mL. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata e, em três testes independentes. A mortalidade das larvas foi avaliada em 24, 48 e 72 h. DMSO (1%) e temefós (6,25; 3,13; 1,76; 0,58 e 0,39 µg/mL) foram utilizados para garantir a correta execução do ensaio como controle negativo e positivo, respectivamente. Para os cálculos das concentrações letais foi empregado o modelo de regressão não linear de 4 parâmetros no *software GraphPadPrism 9*.

3.7.4 Determinação dos teores de piperina no extrato etanólico de *P. nigrum* e do padrão de piperina utilizando o método validado no ensaio residual em larvas de *Ae. aegypti*

No ensaio com o extrato etanólico, a partir do extrato seco preparou-se 1 L de solução na concentração de 4 µg/mL em água com 0,5% de etanol com o auxílio de balão volumétrico. Em seguida, 800 mL desta solução foi dividida em quatro copos descartáveis contendo 25 larvas L3, cada, totalizando um volume final de 200 mL em cada copo. Após esse procedimento foram retirados 5 mL desta solução de cada copo e transferidos para único frasco de vidro com tampa. O volume total de 20 mL foi congelado e seco em liofilizador. O conteúdo seco resultante foi solubilizado com 1 mL de etanol, submetido ao preparo analítico e analisado pelo método validado. Esta primeira amostragem foi nomeada como T₀. Em continuidade ao ensaio de atividade larvicida residual da amostra, o peso do conjunto experimental de cada um dos 4 copos contendo a solução em estudo mais larvas foi registrado. Ao passar 24 horas de ensaio, caso existisse larvas vivas, as mesmas foram retiradas com bastante cautela. Adicionavam-se outras 25 larvas novas, e o volume de água foi restabelecido

com base na diferença de pesagem devido a evaporação natural de água do sistema. Todos estes procedimentos amostrais foram realizados dia-a-dia ao longo de 9 dias, finalizando o ensaio residual com a determinação simultânea de piperina no extrato na presença de larvas de *Ae. aegypti*.

Para o procedimento contendo o padrão de piperina, inicialmente, foram preparados 2 L de solução aquosa com 0,5% de etanol adicionando-se a mesma matriz esgotada, obtida por soxhlet usada no estudo de recuperação na concentração de 500 µg/mL (item 3.5). Esta solução contendo a matriz esgotada foi necessária para eliminar a precipitação de piperina em solução abundantemente aquosa. Depois deste procedimento, usando esta solução, preparou-se 1 L com o padrão de piperina na concentração de 60 µg/mL. Similarmente ao extrato, 800 mL desta solução foi dividida em quatro copos contendo cada um deles 25 larvas L3, resultando em volume final de 200 mL. Posteriormente, 1 mL da solução de cada copo foram transferidos para fracos com tampa separadamente, nos quais já continham 1 mL de etanol em cada. Resultaram-se, portanto, quatro amostras individuais com o volume final de 2 mL. Estas quatro amostras foram homogeneizadas por 2 minutos em ultrassom. Este sistema analítico em quadruplicata foi denominado T₀. Tais amostras passaram pelo preparo analítico e método validado. Em seguida, o conjunto experimental de cada um dos 4 copos foi pesado, atuando semelhantemente ao extrato. Ao passar 24 h as larvas eventualmente vivas foram cuidadosamente retiradas e 25 novas larvas foram adicionadas. O volume de água foi reabastecido pelos valores de pesagens iniciais e finais, repetindo-se todos os procedimentos por 9 dias consecutivos. Desta forma foi possível quantificar o padrão de piperina concomitantemente ao mesmo ambiente de larvas de *Ae. aegypti*.

4. Resultados e discussão

4.1 Triagem de amostras alimentícias em larvas e pupas de *Aedes aegypti*

Os extratos das amostras alimentícias foram obtidos de acordo com o método geral de extração descrito na seção 3.1. As 70 amostras listadas na tabela 4 foram

testadas em larvas e pupas de *Ae. aegypti*, além da determinação de rendimento para cada extrato em questão.

Tabela 4. Rendimento dos extratos avaliados e mortalidade de larvas e pupas na concentração de 250 µg/mL com leitura após 24 h.

Nº amostra	Nome popular	Mortalidade larvas (%)	Mortalidade pupas (%)	Rendimento (%)
1	Amora Branca	1	5	3,2
2	Canela de Velho	1	50	2,1
3	Mulungu	33	95	0,3
4	Goji Berry	100	36	1,7
5	Alecrim	1	1	12,6
6	Moringa	26	1	7,9
7	Espinheira Santa	1	1	2,1
8	Capim Limão	20	1	2,7
9	Camomila	100	26	4,4
10	Chapéu de Couro	100	70	2,6
11	Coco	1	1	62,6
12	Melissa	2,5	25	3,3
13	Chia	50	5	1,8
14	Alcachofra	1	5	4,7
15	Carqueja	1	1	7,1
16	Calêndula	1	23	9,0
17	Carqueja	1	6	7,8
18	Cavalinha	10	30	2,1
19	Cacau (pó)	6	100	7,6
20	Abóbora	1	1	32,7
21	Gergilim preto	1	1	45,1
22	Gergilim Branco	1	1	3,6
23	linhaça dourada	1	1	25,4
24	Amaranto	36	1	2,1

25	Quinoa	6	1	1,7
26	Girassol	6	3	41,0
27	Cacau (semente)	1	1	22,7
28	Cardamomo	100	56	3,6
29	Limão Siciliano (Casca fruto)	56	6	0,3
30	Pimenta malagueta	100	100	0,4
31	Pimenta chocolate	23	12	1,9
32	Pitaya (Casca fruto)	100	1	0,05
33	Avocado (Polpa)	1	36	0,5
34	Abacate (Polpa)	100	100	0,2
35	Romã	1	1	0,7
36	Pimenta scorpion amarela	100	94	0,3
37	Abacate (Semente)	6	1	2,7
38	Batata Yacon	1	100	0,3
39	Pimenta scorpion vermelha	7	46	0,07
40	Pinha (Polpa)	26	1	0,2
41	Blueberry seca	100	33	0,7
42	Jurubeba	1	1	0,3
43	Pinha (Casca do fruto)	1	1	0,2
44	Maxixe	1	6	0,4
45	Romã	1	1	3,2
46	Pitaya (Polpa)	1	1	2,0
47	Cebola	1	1	1,0
48	Cebola roxa	1	1	1,3
49	Gengibre	1	1	0,5
50	Limão Siciliano (Polpa)	1	1	1,8
51	Abacate (Casca do fruto)	100	12	0,5
52	Avocado (Semente)	100	6	1,9
53	Avocado (Casca do fruto)	12	6	0,6

54	Olho de Boi	I	100	0,3
55	Uxi amarelo	I	6	0,9
56	Tamarindo	I	66	0,7
57	Bluberry fresca	I	I	2,1
58	Vagem	I	I	0,5
59	Ervilha	I	I	0,9
60	Cranberry	I	10	1,0
61	Uva Passa Branca	100	6	0,5
62	Pimenta Cumari	100	23	0,3
63	Pimenta Bode	I	3	0,8
64	Pimenta dedo de moça	I	6	1,6
65	Pimenta de cheiro	10	6	0,9
66	Sassafrás	100	10	0,2
67	Mostarda	I	43	0,6
68	Carapiá	67	3	0,6
69	Pimenta de macaco	47	I	3,0
70	Pimenta-do-reino preta	100	I	6,0

I = inativa

A partir destas 70 amostras, 15 extratos (Tabela 4 - Nº 4, 9, 10, 28, 30, 32, 34, 36, 41, 51, 52, 61, 62, 66, 70) apresentaram atividade larvicida, causando mortalidade de 100% das larvas após 24 h de exposição. As amostras 13, 29, 68 e 69 apresentaram mortalidade moderada variando entre 47 e 67%. Quanto à atividade pupicida, os extratos de pimenta scorpion amarela (Tabela 4, Nº 36); e mulungu (Tabela 4, Nº 3), apresentaram mortalidade de 94 e 95% em 24 h. Outras cinco amostras 19, 30, 34, 38 e 54 eliminaram 100% das pupas nesse mesmo tempo de ensaio. As amostras 2, 39, 56 e 67 foram moderadamente pupicidas com mortalidade oscilando entre 43 e 66%. As amostras 10 e 28 foram capazes de matar 100% de larvas e no mínimo de 55% de pupas. Os extratos das amostras 30, 34 e 36 foram ativos em larvas e pupas mostrando mortalidade acima de 90%

Todos os extratos que atingiram alguma atividade superior a 90% foram submetidos ao teste dose resposta. Ao reduzir a concentração na faixa de 30 µg/mL o extrato N° 70 de *P. nigrum* foi o único capaz de matar todas as larvas em após 24 horas de exposição. Nenhuma das amostras que apresentaram atividade pupicida atingiu mortalidade de 100% nesse período e nessa faixa de concentração.

Na literatura, há relatos de atividade de algumas das espécies descritas nesse estudo. O extrato aquoso de cardamomo apresentou CL₉₀ de 88,46 µg/mL em larvas de *Ae. aegypti* (43). O óleo essencial de camomila foi ativo conforme sua origem com CL₅₀ de 2,9 a 60,5 µg/mL (66). Os extratos de diferentes partes de *Persea americana* demonstraram atividade em larvas com CL₅₀ variando de 9,82 a 21,32 µg/mL (67). *P. nigrum* demonstrou atividade em larvas com CL₅₀ de 1,84 µg/mL considerando o extrato etanólico dos frutos e CL₅₀ de 32,23 µg/mL a partir do óleo essencial das folhas (68,69).

As larvas de *Ae. aegypti* se alimentam e são capazes de filtrar o ambiente aquático retendo, por exemplo, as amostras sob análise (70). As pupas não se alimentam e não filtram tal ambiente. Certamente, estes são alguns motivos para que algumas amostras funcionem como larvicida, mas não como pupicida. Por outro lado, a composição química das amostras também influencia, já que existem amostras que são ativas nas duas formas imaturas testadas.

Logo após todo este estudo de triagem de amostras comestíveis, quatro amostras foram consideradas de primeira escolha para estudos futuros. Incluem pimenta malagueta (Tabela 4, N° 30); cumari (Tabela 4, N° 62); pimenta scorpion amarela (Tabela 4, N° 36) e pimenta-do-reino preta (Tabela 4, N° 70). No presente trabalho optou-se em prosseguir com a pimenta-do-reino preta (amostra N° 70) devido a sua elevada atividade larvicida, por ser amplamente consumida no mundo, apresentar custo-benefício acessível e estar comercialmente disponível em larga escala.

4.2 Otimização da extração de *P. nigrum* por ASE - extração acelerada por solvente

A extração acelerada por solvente – ASE, de um modo geral, pode ser considerada um avanço quando comparada à extração por Soxhlet. Guardadas as proporções e objetivos, esta técnica de extração poderia substituir o uso de ultrassom e outras técnicas agitadoras extrativas. A extração acelerada por solvente permite a extração viável de compostos orgânicos a partir de amostras sólidas e semissólidas. O princípio desta técnica envolve o uso de solventes pressurizados, temperaturas programáveis, tempo e número de ciclos estáticos. As amostras são acondicionadas dentro de uma cela de extração, comumente de aço inox, o sistema de solvente escolhido preenche esta cela sob uma dada pressão e temperatura sendo o período e número de vezes em que o solvente está em contato com a amostra denominado de ciclo estático. Por meio desta metodologia obtém-se a solução extrativa automaticamente filtrada com menos uso de solventes, flexibilidade do tamanho amostral e com extrações eficientes dos compostos de interesse (71). Por estes motivos unindo a rapidez e a repetibilidade das extrações, o ASE foi selecionado para a padronização da amostra de trabalho.

O estudo inicial, utilizando ASE com amostra de *P. nigrum*, envolveu a definição do solvente extrator. Nesta fase foi realizada a triagem com diferentes solventes. Optou-se em trabalhar com etanol, acetato de etila e água sob distintas temperaturas e proporções conforme mostrado na figura 6. Estes solventes foram selecionados, especialmente por serem considerados *verdes*, provenientes de fontes renováveis e com baixa toxicidade (72). A resposta monitorada nestes ensaios foi o percentual de mortalidade de larvas de *Ae. aegypti*, com todos os extratos na concentração de 1,9 µg/mL. Nessa concentração, a amostra extraída com 100% de etanol a 50 °C demonstrou maior percentual de mortalidade (Figura 6), sendo, portanto, o etanol definido como solvente extrator.

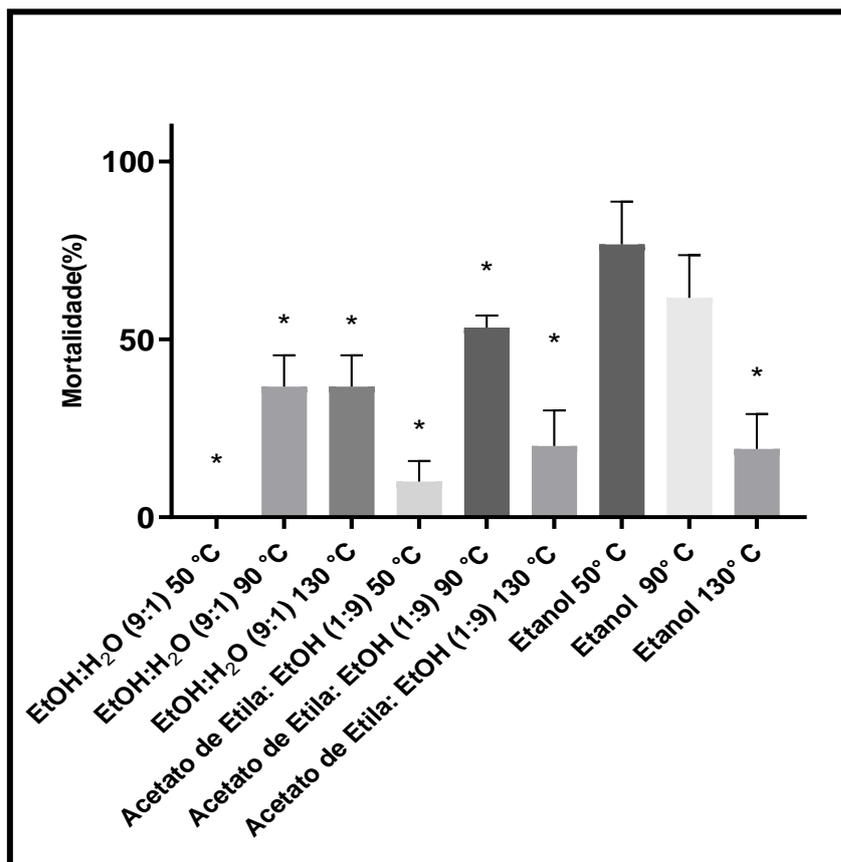


Figura 6. Percentual de mortalidade de larvas L3 de *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição à diferentes extratos para triagem de solventes, testados a 1,9 µg/mL. **EtOH** = etanol; **H₂O** = água destilada. * = diferença estatística, quando comparado com a extração a 100% EtOH a 50 °C no teste de *Dunnet*.

Como etanol foi definido como solvente extrator para todos os ensaios por extração acelerada por solvente, ainda há a possibilidade de trabalhar as seguintes variáveis: temperatura, quantidade amostral para a extração, tempo de ciclo e número de ciclos. Para otimização de tempo, a variável número de ciclos foi fixada em dois ciclos estáticos para todos os experimentos. Assim, a quantidade de amostra, o tempo de ciclo e a temperatura foram as variáveis escolhidas para a elaboração do planejamento fatorial do tipo *Box – Benhken*, monitorando duas respostas: a atividade larvicida do extrato na concentração de 1,9 µg/mL e os respectivos rendimentos para cada extração. A tabela 5 apresenta as variáveis estudadas e os resultados envolvendo as duas respostas monitoradas.

Tabela 5. Experimentos realizados de acordo com o planejamento *Box - Behnkhen*, variáveis estudadas e respostas rendimento e o percentual de mortalidade de larvas L3 de *Ae. aegypti*.

Experimento	T (min.)	Temp (°C)	QA (g)	Mort (%)	Rend (%)
A	2	130	3	30,8	9,1
B	3	130	1	61,7	9,7
C	4	50	3	84,2	6,5
D	4	90	1	74,2	7,1
E	4	90	5	78,3	7,9
F	4	50	3	86,7	6,8
G	2	50	3	80,8	4,9
H	3	130	1	78,3	9,5
I	3	130	5	23,3	10,1
J	3	90	3	60,8	8,9
K	2	90	5	53,3	11,0
L	3	90	3	88,3	7,4
M	3	90	3	75,0	7,0
N	2	90	5	86,7	6,9
O	3	50	1	92,5	6,4
P	2	90	1	71,7	7,7
Q	2	50	3	90,0	6,1
R	3	90	3	76,7	7,0
S	3	50	5	80,8	6,2
T	4	90	1	70,0	6,8
U	2	90	1	52,5	7,1
V	4	130	3	68,3	8,3
W	2	130	3	60,0	9,1
X	4	90	5	65,0	10,8
Y	4	130	3	19,2	13,0

Z	3	50	5	82,5	6,6
AA	3	130	5	67,5	8,5
AB	3	90	3	61,7	7,1
AC	3	90	3	43,3	10,0
AD	4	50	1	94,2	5,9

T= tempo de ciclo estático; **Temp**= temperatura de extração; **QA**= quantidade de amostra; **Mort**= mortalidade de larvas L3 a 1,9 µg/mL; **Rend**= rendimento.

Após a obtenção das respostas percentual de mortalidade e percentual de rendimento (Tabela 5), as mesmas foram submetidas ao teste de influência das variáveis. Para tanto, foram elaborados gráficos de Pareto, nos quais relacionaram-se fatores em função dos efeitos padronizados das variáveis estudadas para o percentual de mortalidade (Figura 7A) e para o rendimento (Figura 7B). Por meio destes gráficos foi possível observar que o fator B = temperatura, ultrapassou o valor limite dos efeitos padronizados representado pela linha vermelha tracejada (Figura 7). Portanto, a temperatura foi capaz de influenciar as duas respostas estudadas. Sabendo-se deste resultado e visando conhecer como a temperatura influenciaria cada uma delas, dois gráficos de contorno para cada resposta foram gerados. Para obter estes gráficos demonstrados na figura 8 foi necessário fixar uma das variáveis, sendo assim os gráficos foram plotados com a quantidade de amostra fixa em 3 g. Assim obteve-se a relação temperatura e tempo de ciclo estático. Pela avaliação desta relação incluindo as duas respostas em estudo foi possível definir que a medida em que a temperatura se eleva, aumenta o percentual de rendimento, porém a mortalidade diminui. Portanto, a temperatura influenciou as duas respostas de forma inversa.

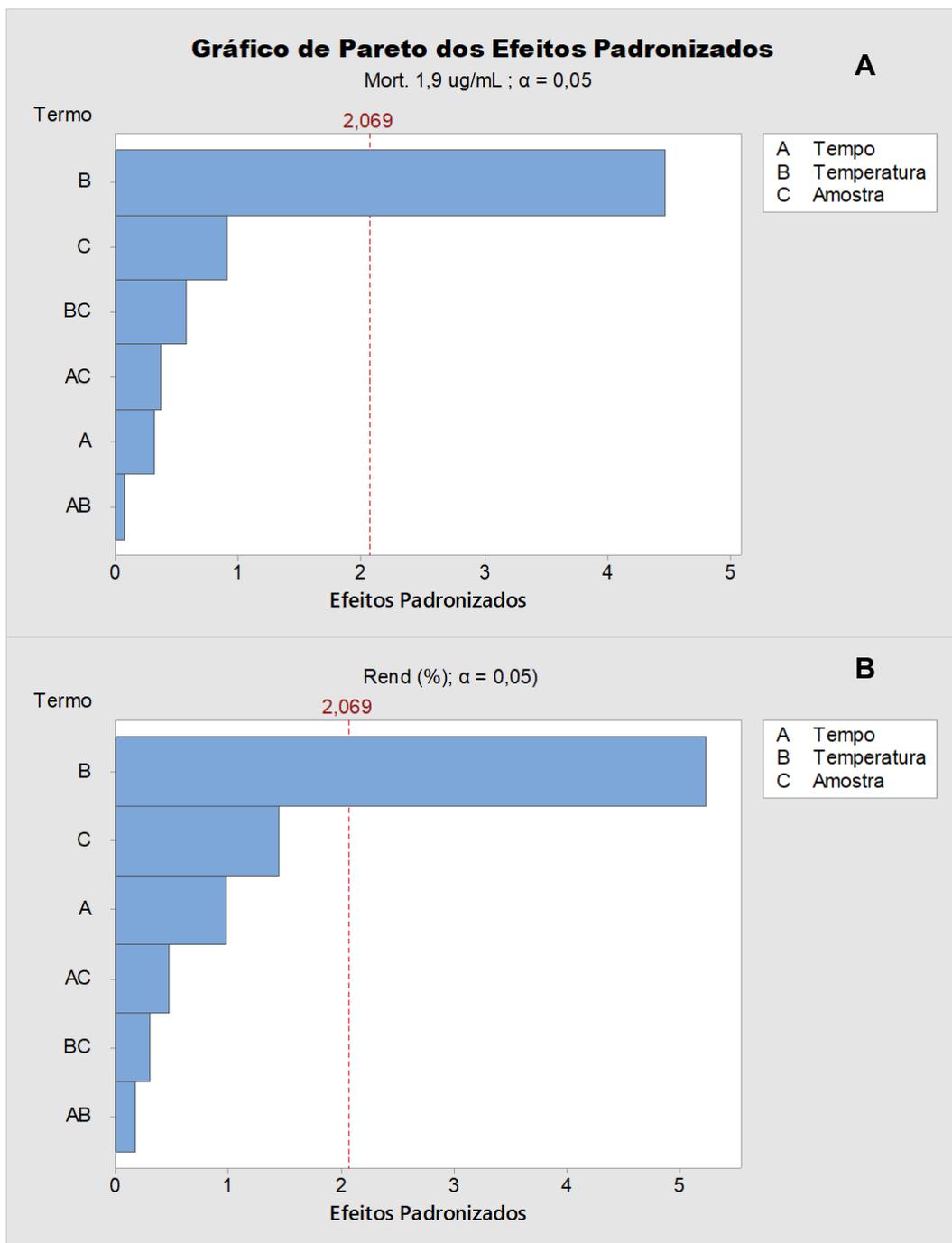


Figura 7 . Gráficos de Pareto e valor do teste *t de student*. Valores de efeitos superiores a linha tracejada aponta influência do fator. **A)** Gráfico de Pareto para o percentual de mortalidade a 1,9 $\mu\text{g/mL}$. **B)** Gráfico de Pareto para o percentual de rendimento.

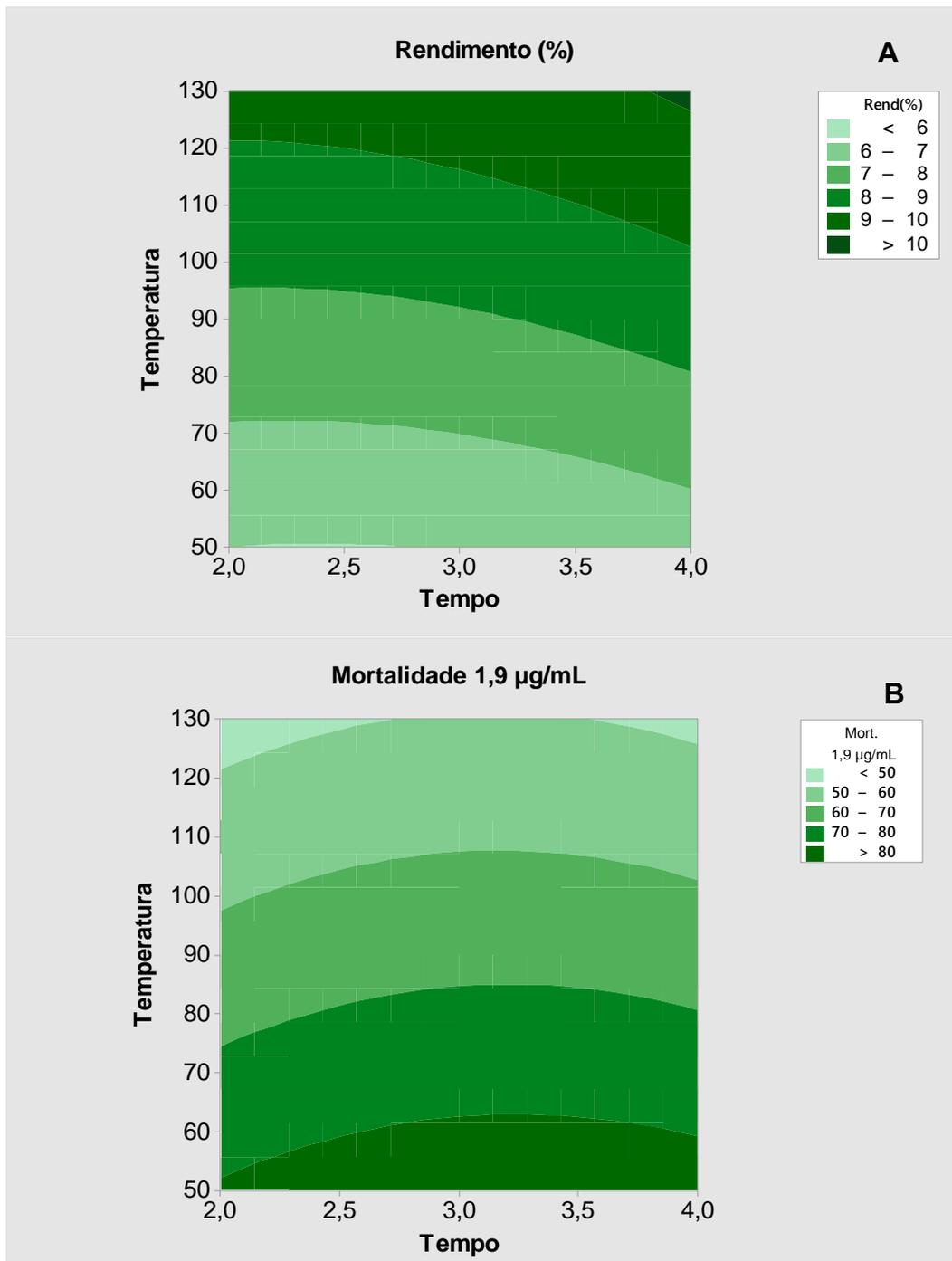


Figura 8. Gráficos de contorno para as respostas: **A)** % de rendimento e **B)** % de mortalidade, fixando a quantidade de amostra em 3 g.

O cenário ideal no contexto destas extrações seria obter elevado rendimento de extrato, bem como alta atividade larvicida. Contudo, os estudos ao redor do planejamento fatorial demonstraram uma relação inversa para estas duas respostas. Assim, na avaliação dos dados, optou-se em escolher a metodologia experimental de extração AD definida pelo planejamento e listada na tabela 5. Nesta metodologia o tempo de ciclo estático ficou com 4 minutos, a temperatura em 50 °C, a quantidade de amostra em 1 g com a mortalidade de 94,2% e o rendimento de 5,9%. Como pode ser observado na tabela 5 este valor de rendimento não foi o mais elevado. Contudo, a escolha priorizou a alta atividade e com rendimento aceitável para a continuidade do trabalho visando o desenvolvimento analítico.

Em um estudo anterior (73) foi realizada extração de *P. nigrum* por maceração tradicional, utilizando 145 g de amostra para 1 L de etanol (93%). O material foi macerado em três ciclos com renovação de solvente a cada 72 horas, obtendo rendimento de 6,4%, próximo aos rendimentos das extrações a 50 °C realizadas neste trabalho. Cada um dos experimentos com as características otimizadas para as nossas condições, despende cerca de 20 minutos e, em média 175 mL de solvente, uma redução de mais de 600 vezes no tempo e 15 vezes no volume de solvente quando comparado com o relato (73) da literatura.

4.3 Elucidação estrutural, desenvolvimento e validação do método analítico

Os estudos da literatura relatam informações sobre a composição química do extrato etanólico de *P. nigrum* apontando a piperina como a alcaloide majoritária, podendo existir outras amidas similares (Figura 5), além da possível detecção de compostos fenólicos convencionais (73). O padrão de piperina está disponível comercialmente pela empresa Merck® e foi adquirido para ser usado ao longo do processo analítico e ensaios biológicos. Contudo, foi realizado um estudo fitoquímico rápido com o extrato de *P. nigrum* obtida no comércio com o intuito de comprovar a presença desses constituintes nessa amostra. Para isso, uma alíquota de 60 g do extrato seco de trabalho foi fracionada por métodos cromatográficos

convencionalmente realizados no Laboratório de Farmacognosia - UnB (74). A partir deste fracionamento foram obtidos 5 g dos cristais de piperina (Figura 9).

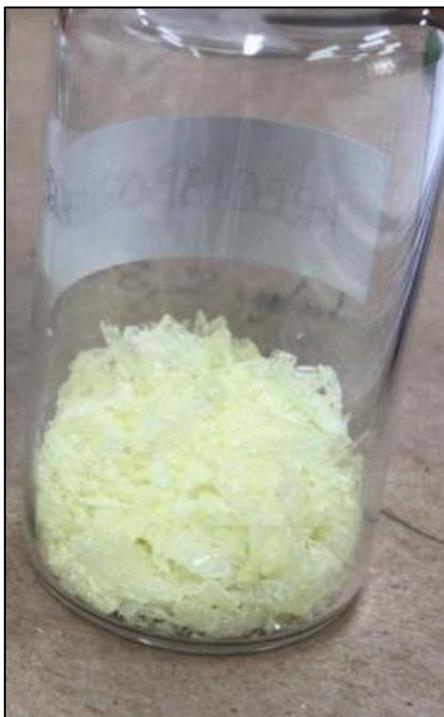


Figura 9. Cristais de piperina isolados da amostra de trabalho de *P. nigrum*

A elucidação estrutural desta alcaloide foi realizada especialmente pelos experimentos de ressonância magnética nuclear – RMN. A figura 10 apresenta o espectro de RMN de ^1H da piperina. Neste espectro, existe um singleto intenso com deslocamento químico em torno de δ 6,0 ppm o qual pode ser atribuído à presença de hidrogênios de CH_2 do grupo metilenodióxido. Há diferentes sinais entre δ 6,4 a 7,4 ppm direcionando para a detecção de hidrogênios aromáticos e das ligações duplas conjugadas. Há um sinal em $\delta \sim 3,5$ ppm que caracteriza os grupos CH_2 ligados ao nitrogênio da função amida. Há também outros hidrogênios de CH_2 entre δ 1,5 e 1,6 ppm que podem compor ao ciclo nitrogenado. Estes dados de RMN estão condizentes com a literatura (75).

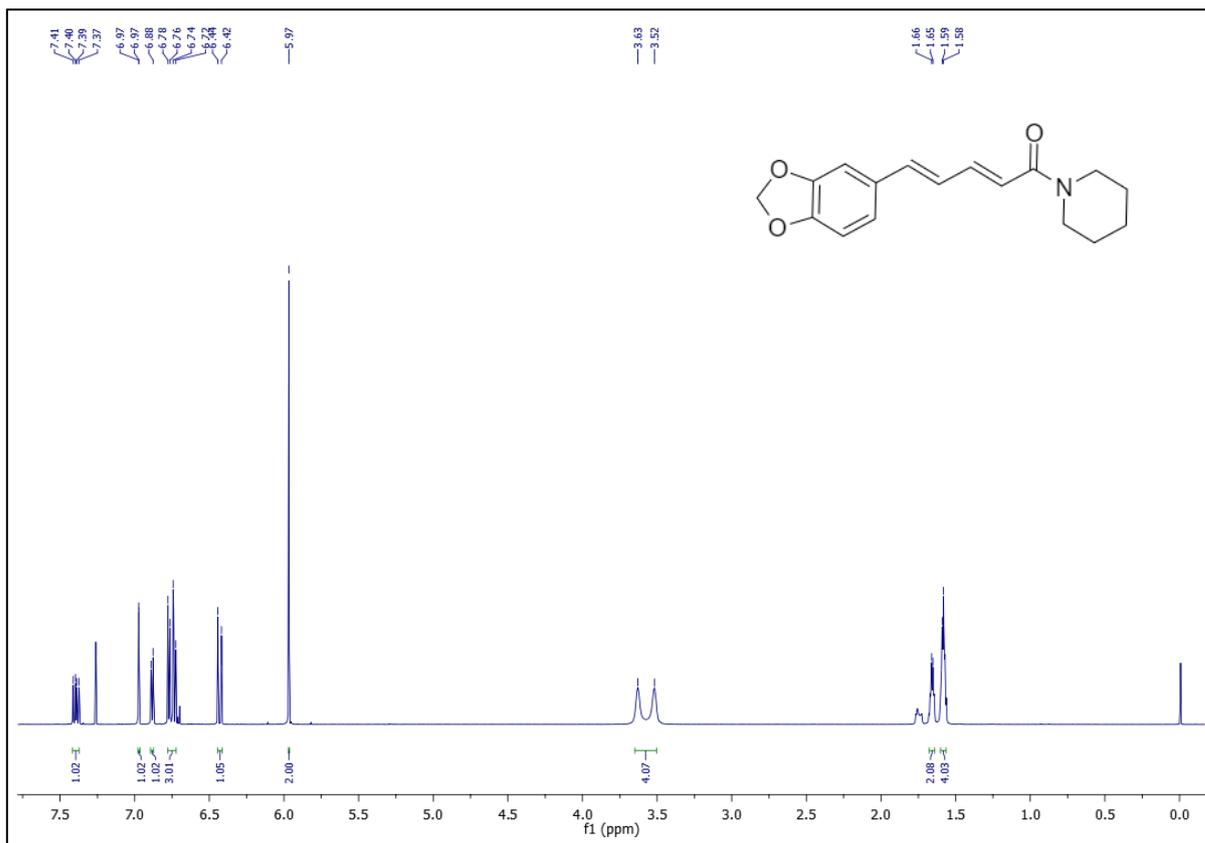


Figura 10. Espectro de RMN de ¹H da piperina (CDCl₃, 600 MHz) e sua estrutura química elucidada.

Por meio das metodologias de separações foi possível isolar e purificar a piperina em grande quantidade, corroborando com os dados da literatura em que a mesma é tratada como o componente majoritário. Algumas tentativas de obter outros compostos estão em andamento. Porém, esses componentes são bastante minoritários existindo a possibilidade de obter alíquotas somente para o processo de identificação. Por outro lado, a piperina pode ser considerada um marcador químico na espécie de *P. nigrum*, uma vez que tal alcaloide pode ser encontrada em alguma quantidade em todas as variações dos frutos da espécie (76).

4.3.1 Adequabilidade do sistema

Na adequabilidade do sistema estão envolvidas análises sistemáticas do padrão antes de iniciar, por exemplo, o estudo de alguma figura de mérito. Estas

análises visam demonstrar as qualidades dos sistemas de cromatografia e de pesagem. Em resumo essas análises devem ser capazes de indicar se naquele dia e momento o sistema analítico está apto a fornecer as respostas esperadas. Assim, as soluções do padrão de piperina nomeadas como P1 e P2 na concentração definida de trabalho ~150 µg/mL foram avaliadas pelas respostas tempo de retenção, área do pico e fator cauda. A tabela 6, mostra estes dados em que o desvio padrão relativo para tais respostas normalmente ficou abaixo de 2% e a razão entre P1 e P2 oscilou entre de 90 a 102%.

Tabela 6. Dados na avaliação da adequabilidade do sistema, razão entre P1 e P2 adequada com erro menor que 3%.

P1				P2				Razão %
Análise	TR (min)	Área	FC	Análise	TR (min)	Área	FC	
1	6,85	163340	10,69	1	6,86	163804	10,66	98,74
2	6,85	160543	10,55	2	6,85	163722	10,59	
3	6,85	160456	10,50	–	–	–	–	
4	6,86	162050	10,49	–	–	–	–	
5	6,86	160388	10,49	–	–	–	–	
6	6,85	162740	10,53	–	–	–	–	
Média	6,85	161586	10,54	Média	6,86	163763	10,62	
Desvio	0,01	1298	0,08	Desvio	0,01	58	0,05	
DPR (%)	0,08	0,80	0,73	DPR (%)	0,10	0,035	0,49	
Massa (mg)	15,03			Massa (mg)	15,04			
Teor	0,9718			Teor	0,9718			
Diluição	100			Diluição	100			
[C] (µg/mL)	146			[C] (µg/mL)	146			

TR= tempo de retenção; FC= fator cauda; P1 e P2= padrão de piperina; DPR= desvio padrão relativo

4.3.2 Seletividade

A figura de mérito seletividade diz respeito à capacidade em determinar confiavelmente o padrão de interesse na presença de outros compostos que estão presentes na amostra (77–79). Durante estes estudos considerando o uso de amostra do extrato de trabalho e do padrão de piperina, foi observado a separação eficiente dos possíveis compostos detectados. Diferentes sistemas de solventes incluindo proporções de metanol, água e acetonitrila foram avaliados. O uso de modificadores de fase como os ácidos trifluoroacético, fórmico e acético foram incluídos aos testes visando atingir alta resolução de cada pico de interesse. O sistema de separação foi avaliado trabalhando-se de forma isocrática e por meio de gradientes lineares. Neste contexto, foram testados 47 formatos de gradientes. O comprimento de onda ao detector UV-DAD foi selecionado de forma a apresentar uma varredura do maior número possível de picos. Distintas fases estacionárias, incluindo as fases reversas Kinetex EVO, Onyx monolítica, Luna 2^aG, Synergi-Fusion-RP, Kinetex Biphenyl com diferentes tamanhos de partículas e dimensões foram ensaiadas. Três filtros analíticos contendo membranas de nylon, PTFE e PVDF passaram por testes. Ao longo destes estudos foram testadas diferentes diluições do padrão de piperina e do extrato etanólico obtido por extração acelerada por solvente. Alíquotas de 10 e 20 µL foram injetadas no sistema de cromatografia em fase líquida. A separação de treze picos, sendo a piperina majoritária e outros doze compostos minoritários foi atingida como descrita nas seções metodológicas do presente trabalho com tempo de análise em 21 minutos. Os perfis cromatográficos do padrão e do extrato etanólico podem ser verificados na figura 11. O padrão de piperina isolado de *P. nigrum*, também foi submetido a estudo de pureza espectral em que há o fatiamento do pico em cinco posições distintas (Figura 12). Em cada posição obtém-se um espectro de UV. A comparação entre estes espectros e seus percentuais de área correspondentes indicaram não existir impurezas co-eluindo, denotando, portanto, uma pureza espectral do pico com teor de 97,18%. Adicionalmente, os espectros de UV dos treze picos separados foram apresentados na figura 13. Estes espectros podem enunciar a presença de ácidos fenólicos e aromáticos, possivelmente outras amidas encontradas

no gênero *Piper* (80). Assim, optou-se em avaliar a qualidade destes treze picos pelas variáveis cromatográficas tempo de retenção, fator de separação α , altura do pico e largura de base do pico. A tabela 7 apresenta estes resultados com desvio padrão relativo não ultrapassando 5%.

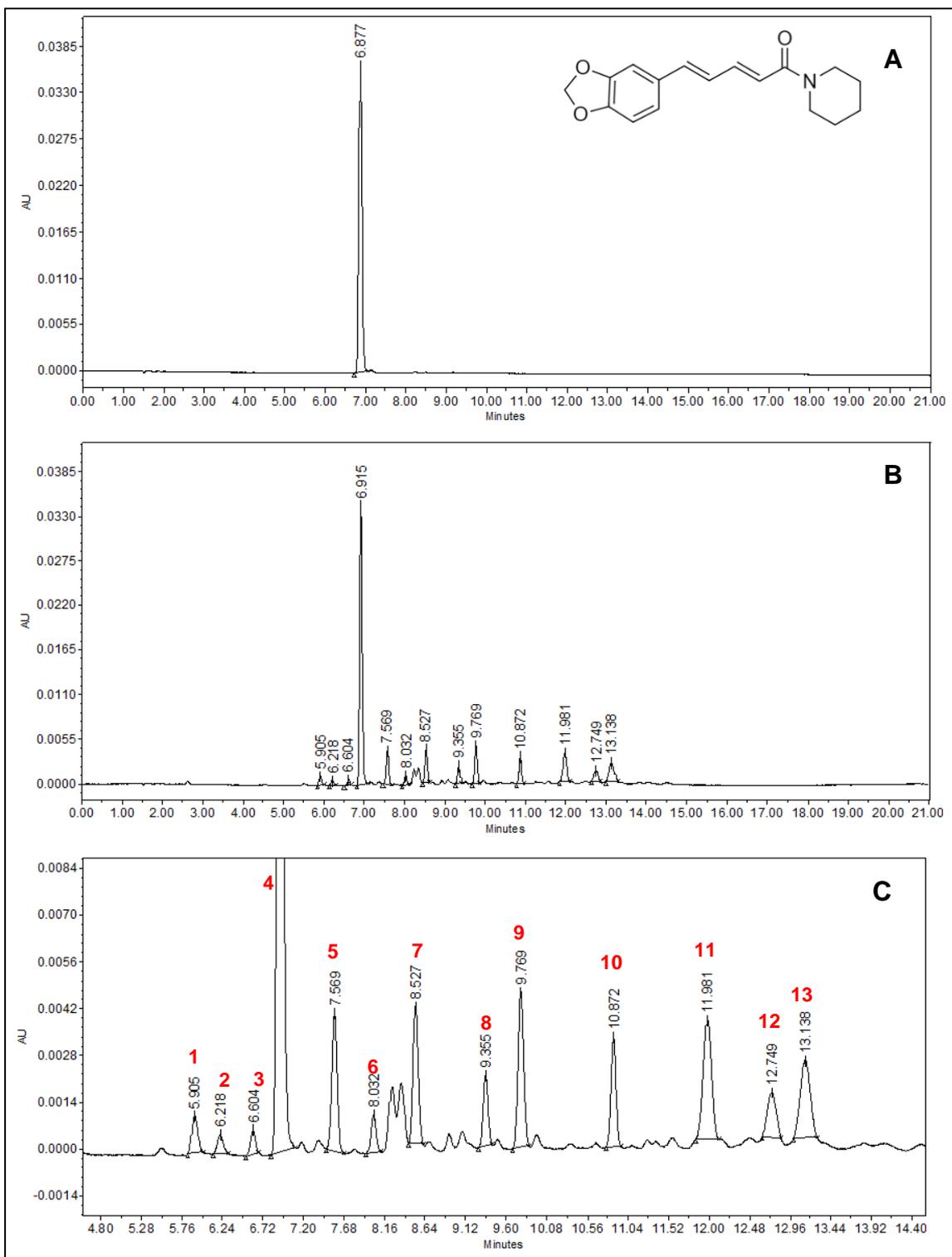


Figura 11. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD em 266 nm. **A)** Perfil cromatográfico do padrão de piperina isolado de *P. nigrum* e sua estrutura química. **B)** Perfil do extrato etanólico de *P. nigrum*. **C)** Ampliação de B.

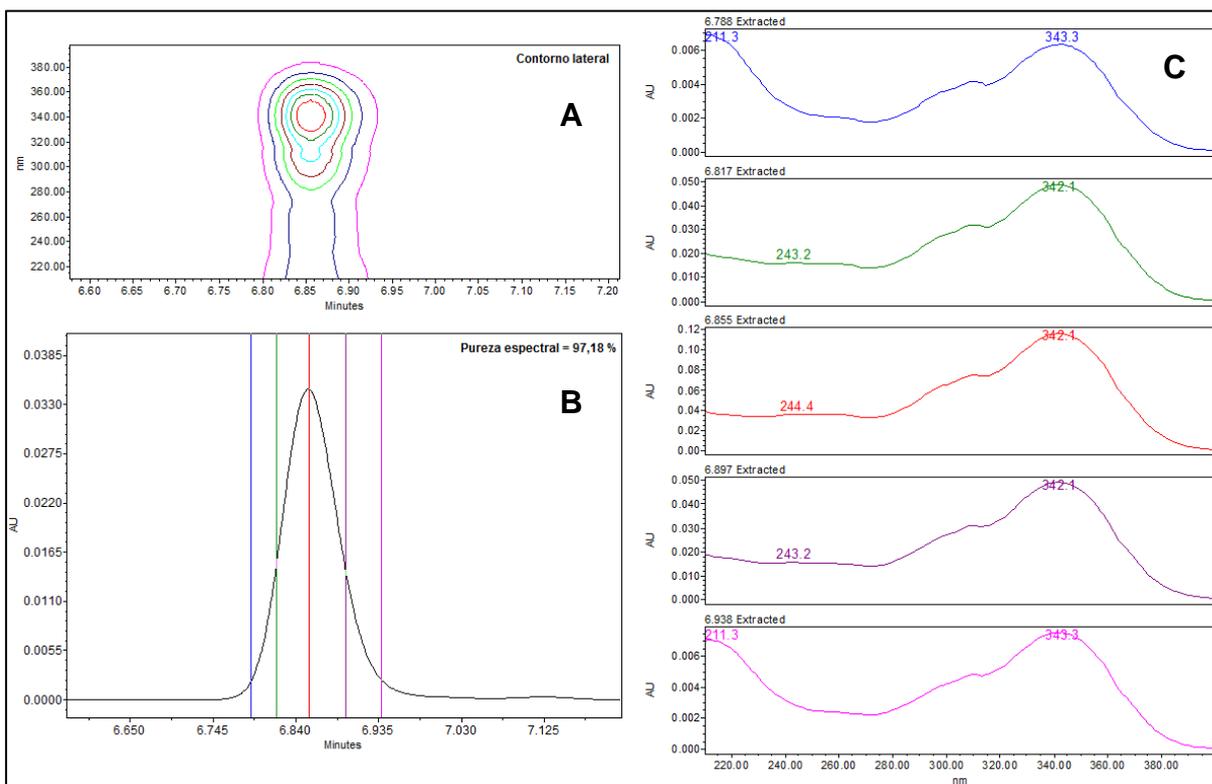


Figura 12. Pureza espectral do padrão piperina com teor de 97,18%. **A)** Contorno lateral do pico. **B)** Fatiamento em cinco posições e **C)** Espectros de cada posição.

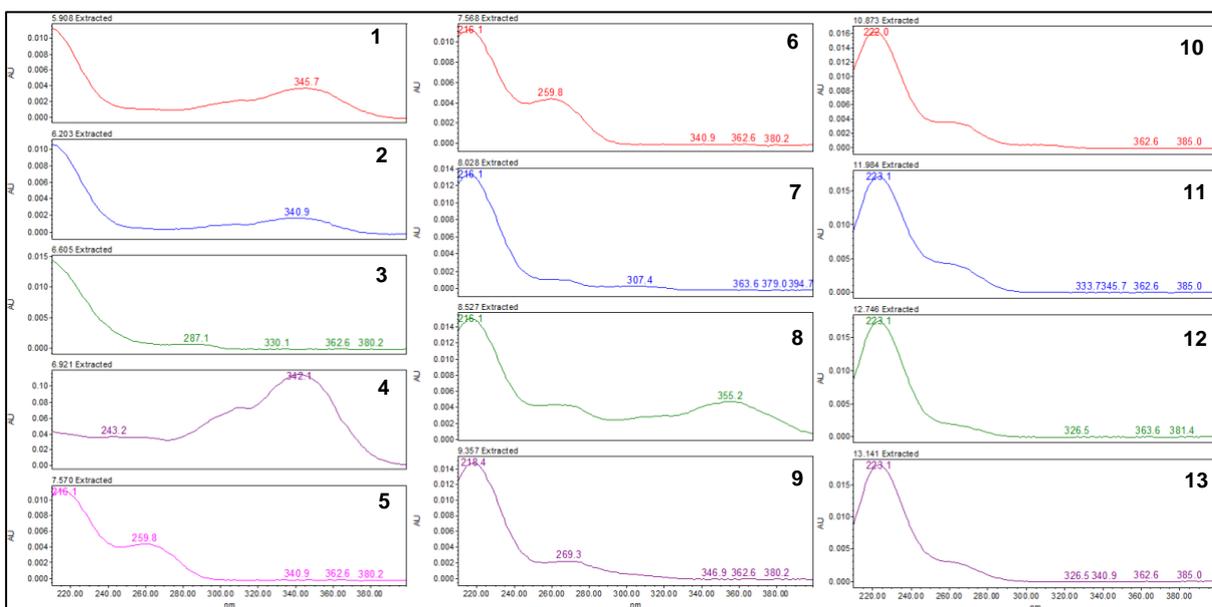


Figura 13. Espectros de UV dos picos separados durante o estudo de seletividade.

Tabela 7. Variáveis cromatográficas de cada pico em estudo ($n = 6$).

N°	TR (min) ± DP	DPR (%)	Fα ± DP	DPR (%)	AP ± DP	DPR (%)	LBP ± DP	DPR (%)
PP	6,87 ± 0,005	0,07	1,04 ± 0,001	0,07	33280 ± 216	0,65	14,2 ± 0,17	1,22
1	5,91 ± 0,015	0,25	1,05 ± 0,0008	0,08	1173 ± 36	3,06	10,4 ± 0,40	3,88
2	6,22 ± 0,014	0,23	1,06 ± 0,0008	0,08	600 ± 18	2,93	10,6 ± 0,41	3,92
3	6,61 ± 0,015	0,22	1,05 ± 0,0003	0,03	773 ± 30	3,82	9,3 ± 0,29	3,10
4	6,93 ± 0,015	0,22	1,09 ± 0,0003	0,03	35781 ± 847	2,37	14,3 ± 0,20	1,42
5	7,58 ± 0,015	0,20	1,06 ± 0,0002	0,02	4408 ± 131	2,96	13,0 ± 0,48	3,71
6	8,04 ± 0,016	0,19	1,06 ± 0,0003	0,03	1200 ± 35	2,95	11,1 ± 0,48	4,35
7	8,53 ± 0,016	0,18	1,10 ± 0,0004	0,03	4051 ± 193	4,76	10,5 ± 0,41	3,86
8	9,36 ± 0,016	0,16	1,04 ± 0,0002	0,02	2229 ± 76	3,43	9,4 ± 0,25	2,68
9	9,78 ± 0,016	0,17	1,11 ± 0,0004	0,03	4902 ± 169	3,45	10,9 ± 0,39	3,60
10	10,88 ± 0,015	0,14	1,10 ± 0,0002	0,02	3471 ± 98	2,83	10,7 ± 0,50	4,72
11	11,99 ± 0,017	0,14	1,06 ± 0,0006	0,06	3822 ± 129	3,37	16,5 ± 0,50	3,04
12	12,75 ± 0,019	0,15	1,03 ± 0,0004	0,04	1467 ± 54	3,66	13,9 ± 0,35	2,48
13	13,15 ± 0,019	0,14	1,10 ± 0,0010	0,09	2514 ± 101	4,01	17,3 ± 0,70	4,04

N°= Numeração dos picos; **PP=** Padrão de piperina **TR=** tempo de retenção em minutos; **F α =** Fator de separação; **AP=** Altura do pico; **LBP=** Largura de base do pico em segundos; **DP=** Desvio padrão; **DPR=** Desvio padrão relativo (%).

4.3.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de um método em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do padrão em estudo na amostra, dentro de uma faixa linear dinâmica (77–79). A linearidade desenvolvida no trabalho incluiu a elaboração de duas curvas analíticas com o padrão de piperina, ambas contendo seis níveis de concentração. Uma curva denominada ao nível de teor foi feita para garantir a quantificação do padrão no extrato etanólico e outra curva chamada ao nível de impureza foi realizada para quantificar adequadamente o padrão durante a realização dos ensaios biológicos. Tais curvas foram adquiridas nas seguintes faixas de concentrações: de 11,5 a 263,6 µg/mL ao nível de teor e de 1,5 a 48,5 µg/mL ao nível de impureza. Para ambas as curvas e para cada nível de concentração em triplicata as variáveis tempo de retenção, área e altura de pico foram monitoradas (Tabelas 8 e 9). Os resultados indicaram DPR de área variando de 0,31 a 5,57% e de 0,76 a 2,45% para os níveis teor e impureza, respectivamente. O coeficiente de correlação de Pearson r^2 foi superior a 0,999 para as duas curvas analíticas como pode ser observado pelas figuras 14 e 15.

Tabela 8. Níveis de concentrações da curva analítica para teor em triplicata e variáveis cromatográficas estudadas.

Nível	Curvas	TR (min)	Área	AP
1 (263,6 µg/mL)	Curva 1	6,88	283617	61605
	Curva 2	6,87	278136	60985
	Curva 3	6,89	283183	61454
	Média	6,88	281645	61348
	DP	0,010	3047	323
	DPR (%)	0,14	1,08	0,53
2 (184,5 µg/mL)	Curva 1	6,89	192047	42429
	Curva 2	6,89	192184	42570
	Curva 3	6,89	193128	42705
	Média	6,89	192453	42568
	DP	0,003	589	138
	DPR (%)	0,04	0,31	0,32
3 (92,3 µg/mL)	Curva 1	6,91	98766	21108
	Curva 2	6,90	95855	20861
	Curva 3	6,90	96544	20976
	Média	6,90	97055	20982
	DP	0,002	1521	124
	DPR (%)	0,03	1,57	0,59
4 (46,1 µg/mL)	Curva 1	6,91	48503	10441
	Curva 2	6,90	48012	10387
	Curva 3	6,90	47422	10318
	Média	6,90	47979	10382
	DP	0,003	541	62
	DPR (%)	0,05	1,13	0,59
5 (23,1 µg/mL)	Curva 1	6,90	23590	5122
	Curva 2	6,91	23395	5097
	Curva 3	6,92	21304	4699
	Média	6,91	22763	4973
	DP	0,004	1267	237
	DPR (%)	0,06	5,57	4,77
6 (11,5 µg/mL)	Curva 1	6,90	10242	2266
	Curva 2	6,91	10339	2274
	Curva 3	6,91	10281	2234
	Média	6,91	10287	2258
	DP	0,002	49	21
	DPR (%)	0,03	0,47	0,94

TR= tempo de retenção em minutos; **AP=** Altura do pico; **DP=** Desvio padrão; **DPR=** Desvio padrão relativo (%).

Tabela 9. Níveis de concentrações para a curva analítica para impureza em triplicata e variáveis cromatográficas estudadas.

Nível	Curvas	TR (min)	Área	AP
1 (48,5 µg/mL)	Curva 1	6,90	54167	11949
	Curva 2	6,95	52974	11785
	Curva 3	6,92	53541	11773
	Média	6,92	53561	11836
	Desvio	0,027	597	98
	DPR (%)	0,39	1,11	0,83
2 (24,3 µg/mL)	Curva 1	6,91	26719	5925
	Curva 2	6,90	27134	5939
	Curva 3	6,90	27018	5899
	Média	6,90	26957	5921
	Desvio	0,006	214	20
	DPR (%)	0,09	0,79	0,34
3 (12,1 µg/mL)	Curva 1	6,90	12917	2852
	Curva 2	6,91	12994	2833
	Curva 3	6,91	13114	2828
	Média	6,91	13008	2838
	Desvio	0,003	99	13
	DPR (%)	0,04	0,76	0,45
4 (6,1 µg/mL)	Curva 1	6,91	6330	1394
	Curva 2	6,91	6431	1377
	Curva 3	6,91	6479	1391
	Média	6,91	6413	1387
	Desvio	0,003	76	9
	DPR (%)	0,04	1,19	0,65
5 (3,0 µg/mL)	Curva 1	6,92	2697	595
	Curva 2	6,92	2648	593
	Curva 3	6,91	2649	620
	Média	6,92	2665	603
	Desvio	0,002	28	15
	DPR (%)	0,03	1,05	2,5
6 (1,5 µg/mL)	Curva 1	6,90	1439	330
	Curva 2	6,91	1372	310
	Curva 3	6,92	1393	317
	Média	6,91	1401	319
	Desvio	0,008	34	10
	DPR (%)	0,11	2,45	3,18

TR= tempo de retenção; **AP=** Altura do pico; **DP=** Desvio padrão; **DPR=** Desvio padrão relativo (%).

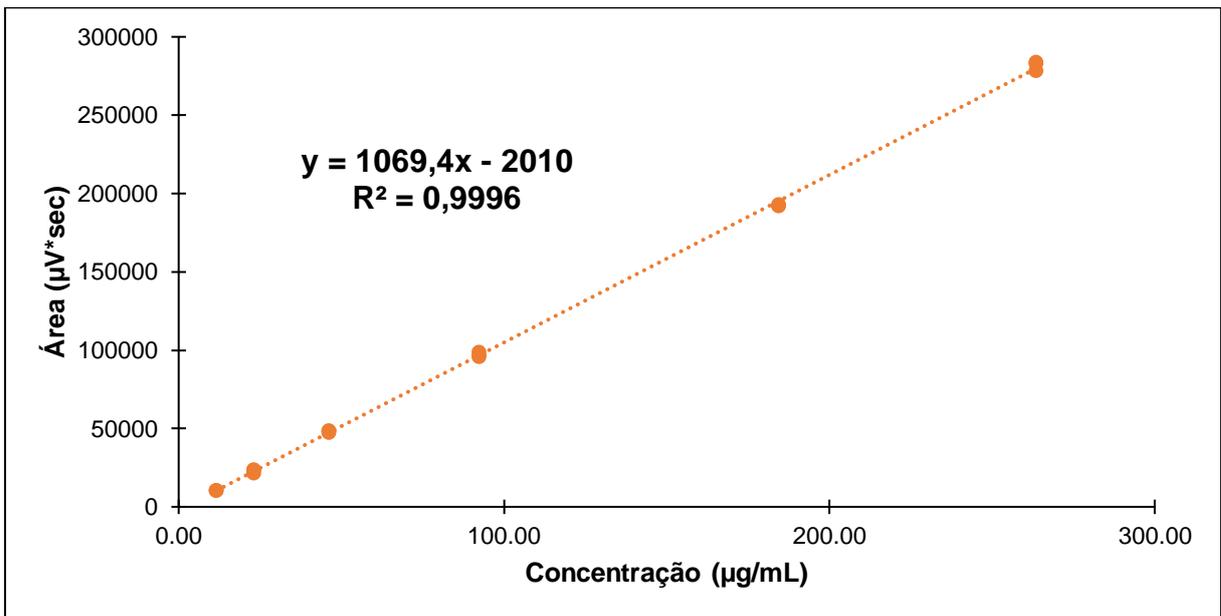


Figura 14. Curva analítica da piperina ao nível de teor.

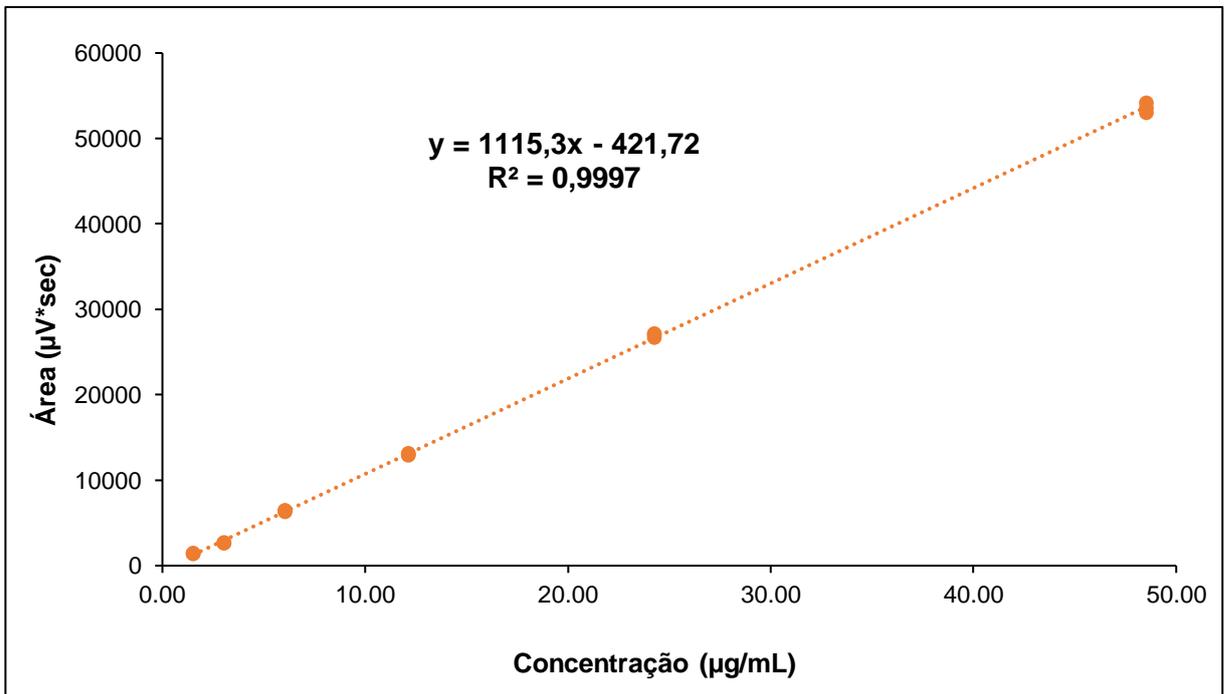


Figura 15. Curva analítica da piperina ao nível de impurezas.

A análise de variância dos dados foi realizada para as duas curvas (Tabelas 10 e 11). Por meio do teste de ANOVA verificou-se a relação teste F calculado > F tabelado demonstrando a diferença entre os valores das variâncias do resíduo em relação àqueles da regressão, contribuindo aos coeficientes de Pearson, confirmando à adequabilidade das curvas em estudo. Os coeficientes das equações foram estudados estatisticamente realizando o teste *t* obtendo valor de $p < 0,05$ mostrando significância da média entre os erros de tais coeficientes para as duas curvas.

Tabela 10. Análise de variância dos dados da regressão em nível de teor (ANOVA).

ANOVA						
	GL	SQ	MQ	F	F _s	F _t
Regressão	1	1,73E+11	1,73E+11	43761	6,25392E-29	4,49
Resíduo	16	6,34E+07	3,96E+06			
Total	17	1,73E+11				
	Coeficientes	Erro padrão	Stat <i>t</i>	valor- <i>P</i>	95% Inf.	95% Sup.
Interseção	-2010,01	707,26	-2,84	0,0118	-3509,34	-510,68
Variável X	1069,45	5,11	209,19	6,2539E-29	1058,61	1080,29

GL= grau de liberdade; **SQ=** soma dos quadrados; **MQ=** média dos quadrados; **F=** coeficiente do Teste de *Fisher* para verificação das diferenças entre as variâncias da regressão e dos resíduos; **F_s=** valor-*P* do teste F; **F_t=** F tabelado; **Stat *t*=** Estatística do teste *t de Student* de significância para cada um dos coeficientes; **95 % Inf=** Limite inferior do intervalo de confiança 95%; **95% Sup=** Limite superior do intervalo de confiança 95%.

Tabela 11. Análise de variância dos dados da regressão ao nível de impureza (ANOVA)

ANOVA						
	GL	SQ	MQ	F	F _s	F _t
Regressão	1	6035233961	6035233961	61886,5	3,91E-30	4,49
Resíduo	16	1560335,9	97521			
Total	17	6036794297				
	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% Inf.	95% Sup.
Interseção	-421,72	102,53	-4,11	0,001	-639,07	-204,37
Variável X	1115,28	4,48	248,77	3,90E-30	1105,78	1124,78

GL= graus de liberdade; **SQ** = soma dos quadrados; **MQ** = média dos quadrados; **F** = coeficiente do Teste de *Fisher* para verificação das diferenças entre as variâncias da regressão e dos resíduos; **F_s** = valor-P do teste F; **F_t** = F tabelado; **Stat t** = Estatística do teste t de Student de significância para cada um dos coeficientes; **95% Inf** = Limite inferior do intervalo de confiança 95%; **95% Sup** = Limite superior do intervalo de confiança 95%.

Logo após os estudos de significância das regressões foi construído um modelo envolvendo *Y* experimental e *Y* previsto visando determinar o quanto as medidas experimentais divergiram das medições teóricas utilizando-se os cálculos de resíduos, resíduos padronizados, recuperação residual e recuperação pontual para cada curva analítica. Estes dados para ambas as curvas estão apresentados nas tabelas 12 e 13. Na avaliação destes resultados, a recuperação residual oscilou de 96,04 a 106,35% para o nível de teor com erro de recuperação pontual da curva variando em menos de 6%. Para a curva ao nível de impureza, os pontos de mais baixa concentração a 1,5 e 3 µg/mL apresentaram variações médias entre as medições de 10% tanto para recuperação residual como para o erro da recuperação pontual. Para todas as outras concentrações ao nível de impureza tais variações médias ficaram abaixo de 5%. Este estudo avalia as possíveis divergências entre os dados reais e o modelo teórico ponto a ponto obtido pela regressão. Portanto, na avaliação geral dos dados de cada curva, os mesmos se divergiram com valores aceitáveis para o propósito analítico do presente trabalho.

Tabela 12. Resultados de resíduos da regressão em nível de teor.

OBS.	Conc. (µg/mL)	Y experimental	Y previsto	Res.	Res. P.	Rec. residual %	Rec. curva %
1	263,6	283617	279897	3720	1,93	98,69	101,32
2	263,6	278136	279897	-1761	-0,91	100,63	99,38
3	263,6	283183	279897	3286	1,70	98,84	101,17
4	184,5	192047	195325	-3278	-1,70	101,71	98,34
5	184,5	192184	195325	-3141	-1,63	101,63	98,41
6	184,5	193128	195325	-2197	-1,14	101,14	98,89
7	92,3	98766	96657	2109	1,09	97,86	102,14
8	92,3	95855	96657	-802	-0,42	100,84	99,19
9	92,3	96544	96657	-113	-0,06	100,12	99,89
10	46,1	48503	47324	1179	0,61	97,57	102,40
11	46,1	48012	47324	688	0,36	98,57	101,40
12	46,1	47422	47324	98	0,05	99,79	100,20
13	23,1	23590	22657	933	0,48	96,04	103,79
14	23,1	23395	22657	738	0,38	96,84	103,00
15	23,1	21304	22657	-1353	-0,70	106,35	94,52
16	11,5	10242	10323	-81	-0,04	100,79	99,34
17	11,5	10339	10323	16	0,01	99,85	100,13
18	11,5	10281	10323	-42	-0,02	100,41	99,66

OBS= número da observação; **Conc=** concentração; **Res=** resíduo; **Res. P=** resíduo padronizado; **Rec. Residual=** recuperação da regressão com relação ao dado experimental do eixo Y; **Rec. Curva=** recuperação pontual da regressão determinando a qualidade do eixo X.

Tabela 13. Resultados de resíduos da regressão em nível de impureza.

OBS.	Conc. (µg/mL)	Y experimental	Y previsto	Res.	Res. P.	Rec. residual %	Rec. curva %
1	48,5	54167	53692	475	1,57	99,12	100,88
2	48,5	52974	53692	-718	-2,37	101,35	98,67
3	48,5	53541	53692	-151	-0,5	100,28	99,72
4	24,3	26719	26635	84	0,28	99,69	100,31
5	24,3	27134	26635	499	1,65	98,16	101,84
6	24,3	27018	26635	383	1,26	98,58	101,41
7	12,1	12917	13107	-190	-0,63	101,47	98,6
8	12,1	12994	13107	-113	-0,37	100,87	99,17
9	12,1	13114	13107	7	0,02	99,94	100,05
10	6,1	6330	6342	-12	-0,04	100,2	99,81
11	6,1	6431	6342	89	0,29	98,62	101,31
12	6,1	6479	6342	137	0,45	97,89	102,02
13	3	2697	2960	-263	-0,87	109,77	92,21
14	3	2648	2960	-312	-1,03	111,8	90,76
15	3	2649	2960	-311	-1,03	111,75	90,79
16	1,5	1439	1269	170	0,56	88,21	110,03
17	1,5	1372	1269	103	0,34	92,52	106,07
18	1,5	1393	1269	124	0,41	91,12	107,31

OBS= número da observação; **Conc=** concentração; **Res=** resíduo; **Res. P=** resíduo padronizado; **Rec. Residual=** recuperação da regressão com relação ao dado experimental do eixo Y; **Rec. Curva=** recuperação pontual da regressão determinando a qualidade do eixo X.

Visando confirmar que as possíveis divergências entre os valores resultantes envolvendo Y experimental e Y previsto foram aceitáveis optaram-se nas plotagens dos gráficos de resíduos das regressões lineares para ambas as curvas. As figuras 16 e 17 apresentam tais gráficos demonstrando os resíduos em relação Y previsto e o percentual para os resíduos padronizados. Por meio destas figuras pode ser observado que os resíduos padronizados apresentaram valores de variações de no máximo $\pm 2,5\%$ e não foi encontrado padrão de distribuição de resíduos. Portanto, todos os conjuntos de resultados descritos para a linearidade demonstraram que as

duas curvas analíticas de trabalho obedecem às faixas lineares dinâmicas adequadas com precisão e exatidão para cada concentração que incluem à estas respectivas faixas.

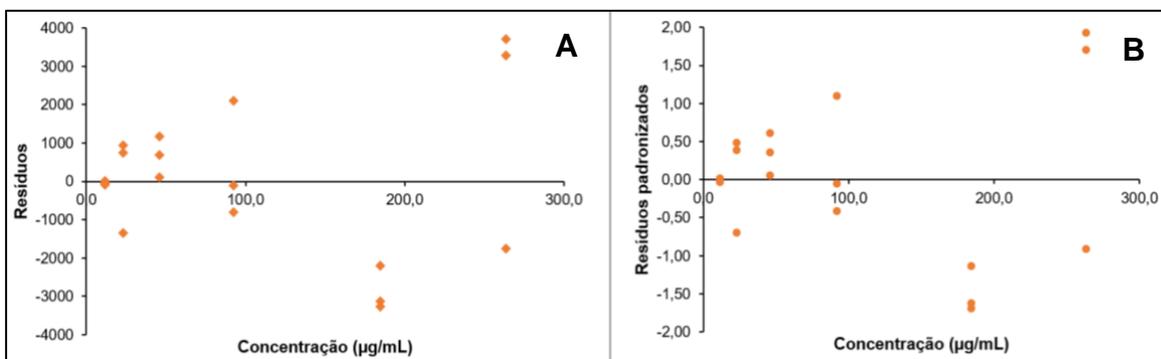


Figura 16. Plotagem de resíduos da regressão linear ao nível de teor. **A)** Resíduos em relação ao Y previsto da curva. **B)** Resíduo padronizado em %.

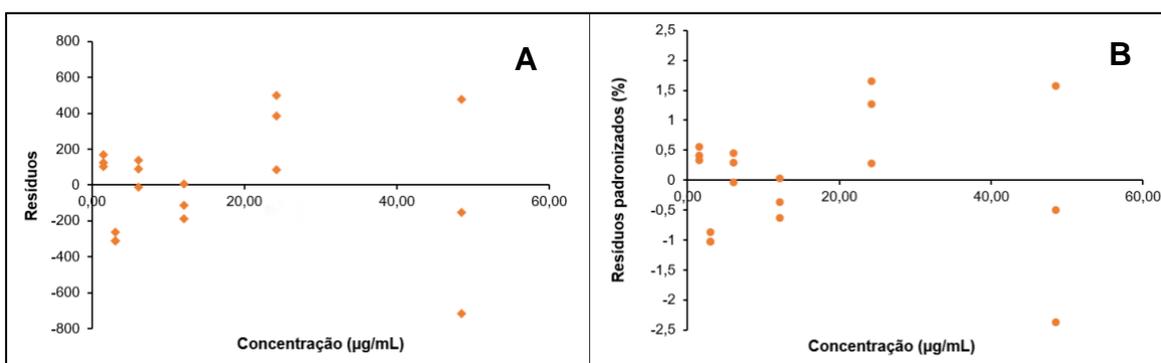


Figura 17. Plotagem de resíduos da regressão linear ao nível de impureza. **A)** Resíduos em relação ao Y previsto da curva. **B)** Resíduo padronizado em %.

4.3.4 Limites operacionais de detecção e quantificação (LOD e LOQ)

O limite operacional de detecção diz respeito à menor quantidade de substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite operacional de quantificação representa a menor concentração do padrão de interesse que pode ser quantificada com precisão e exatidão (77–79). Conforme descrito na metodologia tais limites foram obtidos por curvas analíticas similarmente ao estudo de linearidade. Os valores de LOD e LOQ para o padrão de piperina foram

de 0,54 $\mu\text{g/mL}$ 1,54 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, com desvio padrão relativo de 4,4% ao nível da quantificação. Visando confirmar estes valores experimentalmente, na figura 18 foi apresentado um exemplo de perfil cromatográfico do padrão de piperina na concentração de 0,81 $\mu\text{g/mL}$ com o tempo de retenção em 6,9 minutos. Na literatura há variações na detecção de piperina dependendo da metodologia utilizada podendo variar de 0,27 a 4,35 $\mu\text{g/mL}$. (79,80).

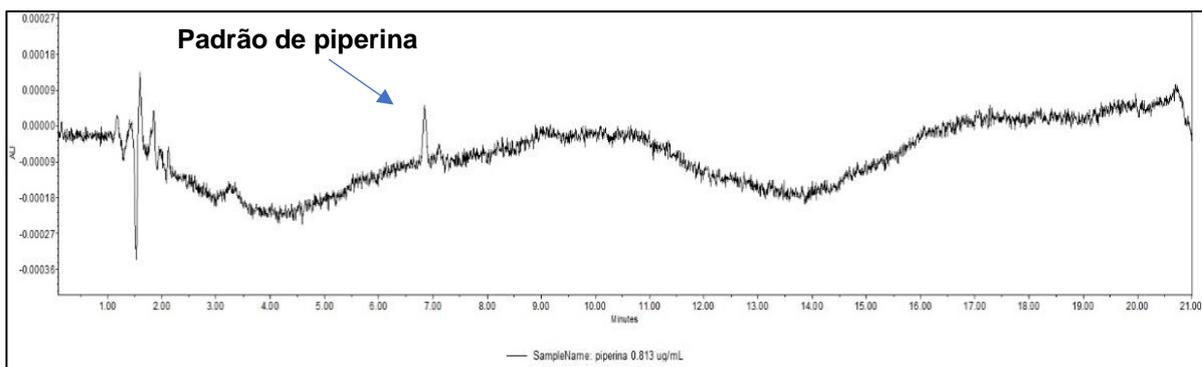


Figura 18. Perfil cromatográfico do padrão de piperina a 0,81 $\mu\text{g/mL}$ com tempo de retenção em 6,9 minutos.

4.3.5 Estudo de estabilidade dos compostos para o método

O estudo de estabilidade do presente trabalho visa avaliar o comportamento dos compostos na amostra de trabalho, bem como o comportamento do padrão de piperina em distintas condições dentro do laboratório conforme explicado na seção experimental, expondo as amostras a diferentes condições do ambiente (77–79). Uma mesma amostra de piperina e do extrato foram preparadas separadamente e foram analisadas ao longo de 72 horas. As variáveis tempo de retenção e área de pico foram monitoradas para os treze compostos detectados no extrato e para o padrão de piperina. As tabelas 14 e 15 mostram que os desvios padrões relativos para estas variáveis foi de no máximo 4,93% envolvendo todos os compostos. O teor absoluto do padrão de piperina em etanol diminuiu de 97,18% no tempo = 0 para 78,24% em $t = 72$ h (Figura 19). O teor de piperina no extrato também apresentou queda com 95,60% em $t = 24$ h reduzindo para 89,63% em $t = 72$ h (Figura 20). A piperina em etanol durante 72 h mostrou um decréscimo de seu teor de 18,94% (Figura 19), enquanto a

piperina presente no extrato apresentou tal diferença em 5,97% no mesmo período de tempo (Figura 20). Comparando-se a queda entre o tempo = 0 do padrão com o t = 72 h de piperina no extrato o valor foi de 7,55%. Sendo assim, a piperina no extrato é mais estável em relação padrão isolado. Os outros doze compostos detectados no extrato apresentaram teores em média de 98% ao longo de 72 h, não existindo variações significativas entre eles (Figura 20).

Tabela 14. Parâmetros estudados na estabilidade do padrão de piperina ($n = 3$).

	TR ± DP	DPR (%)	Área ± DP	DPR (%)
t = 0	6,88 ± 0,004	0,06	168182 ± 546	0,33
t = 24 h	6,87 ± 0,001	0,02	158914 ± 1707	1,07
t = 48 h	6,86 ± 0,004	0,05	147883 ± 1356	0,92
t = 72 h	6,87 ± 0,002	0,03	135387 ± 382	0,28

TR= tempo de retenção; **DP=** Desvio padrão; **DPR=** Desvio padrão relativo.

Tabela 15. Parâmetros avaliados na estabilidade do extrato etanólico de *Piper nigrum* ($n = 3$).

N°	Tempo (h)	TR \pm DP	DPR (%)	ÁREA \pm DP	DPR (%)
1	0	5,85 \pm 0,003	0,05	4896 \pm 99	2,03
	24	5,85 \pm 0,006	0,11	4767 \pm 129	2,7
	48	5,86 \pm 0,005	0,08	4903 \pm 113	2,31
	72	5,85 \pm 0,003	0,06	5043 \pm 159	3,16
2	0	6,16 \pm 0,005	0,09	2813 \pm 113	4,02
	24	6,16 \pm 0,008	0,12	2769 \pm 94	3,4
	48	6,17 \pm 0,003	0,05	2724 \pm 109	4,01
	72	6,16 \pm 0,003	0,05	2800 \pm 105	3,76
3	0	6,55 \pm 0,003	0,05	3074 \pm 60	1,95
	24	6,55 \pm 0,009	0,14	3025 \pm 85	2,8
	48	6,56 \pm 0,002	0,03	3053 \pm 150	4,93
	72	6,55 \pm 0,002	0,04	3117 \pm 100	3,21
4	0	6,86 \pm 0,003	0,05	168859 \pm 1219	0,72
	24	6,86 \pm 0,005	0,07	161430 \pm 1687	1,04
	48	6,88 \pm 0,003	0,05	160535 \pm 886	0,55
	72	6,87 \pm 0,003	0,04	151349 \pm 1178	0,78
5	0	7,52 \pm 0,002	0,03	18467 \pm 109	0,59
	24	7,52 \pm 0,002	0,08	17747 \pm 217	1,22
	48	7,52 \pm 0,003	0,03	18747 \pm 241	1,29
	72	7,52 \pm 0,003	0,03	18664 \pm 198	1,06
6	0	7,99 \pm 0,003	0,04	4564 \pm 31	0,68
	24	7,98 \pm 0,005	0,06	4406 \pm 87	1,97
	48	7,99 \pm 0,002	0,03	4648 \pm 49	1,05
	72	7,98 \pm 0,002	0,03	4545 \pm 98	2,15
7	0	8,48 \pm 0,003	0,03	20184 \pm 413	2,04
	24	8,48 \pm 0,005	0,06	19588 \pm 289	1,48
	48	8,48 \pm 0,005	0,06	20171 \pm 190	0,94
	72	8,47 \pm 0,003	0,03	19861 \pm 311	1,57
8	0	9,31 \pm 0,004	0,04	8418 \pm 183	2,18
	24	9,31 \pm 0,004	0,05	8097 \pm 219	2,7
	48	9,31 \pm 0,006	0,07	8481 \pm 88	1,04

	72	9,30 ± 0,003	0,03	8407 ± 228	2,71
9	0	9,72 ± 0,004	0,04	21940 ± 278	1,27
	24	9,72 ± 0,004	0,04	21139 ± 262	1,24
	48	9,72 ± 0,006	0,06	21754 ± 149	0,68
	72	9,72 ± 0,003	0,03	21748 ± 759	3,49
10	0	10,83 ± 0,002	0,02	13730 ± 180	1,31
	24	10,82 ± 0,006	0,06	13327 ± 184	1,38
	48	10,83 ± 0,006	0,05	13934 ± 48	0,35
	72	10,82 ± 0,001	0,01	13955 ± 221	1,58
11	0	11,93 ± 0,001	0,01	22916 ± 420	1,83
	24	11,92 ± 0,006	0,05	22129 ± 405	1,83
	48	11,93 ± 0,007	0,06	23453 ± 355	1,52
	72	11,92 ± 0,002	0,02	23319 ± 361	1,55
12	0	12,69 ± 0,006	0,05	10213 ± 421	4,12
	24	12,68 ± 0,006	0,05	9647 ± 214	2,22
	48	12,69 ± 0,007	0,05	10403 ± 142	1,37
	72	12,68 ± 0,003	0,02	10591 ± 522	4,93
13	0	13,08 ± 0,007	0,06	19214 ± 329	1,71
	24	13,07 ± 0,003	0,02	18449 ± 431	2,34
	48	13,09 ± 0,008	0,06	19722 ± 332	1,69
	72	13,07 ± 0,005	0,04	19379 ± 340	1,75

N°= numeração dos picos; **TR**= tempo de retenção em minutos; **DP**= Desvio padrão; **DPR**= Desvio padrão relativo.

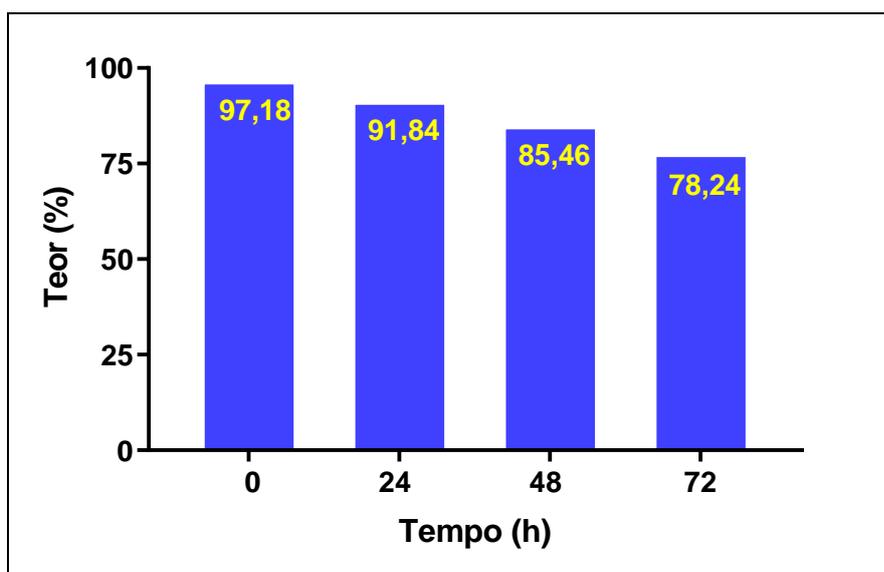


Figura 19. Estabilidade considerando o teor absoluto do padrão de piperina ao longo de 72 h.

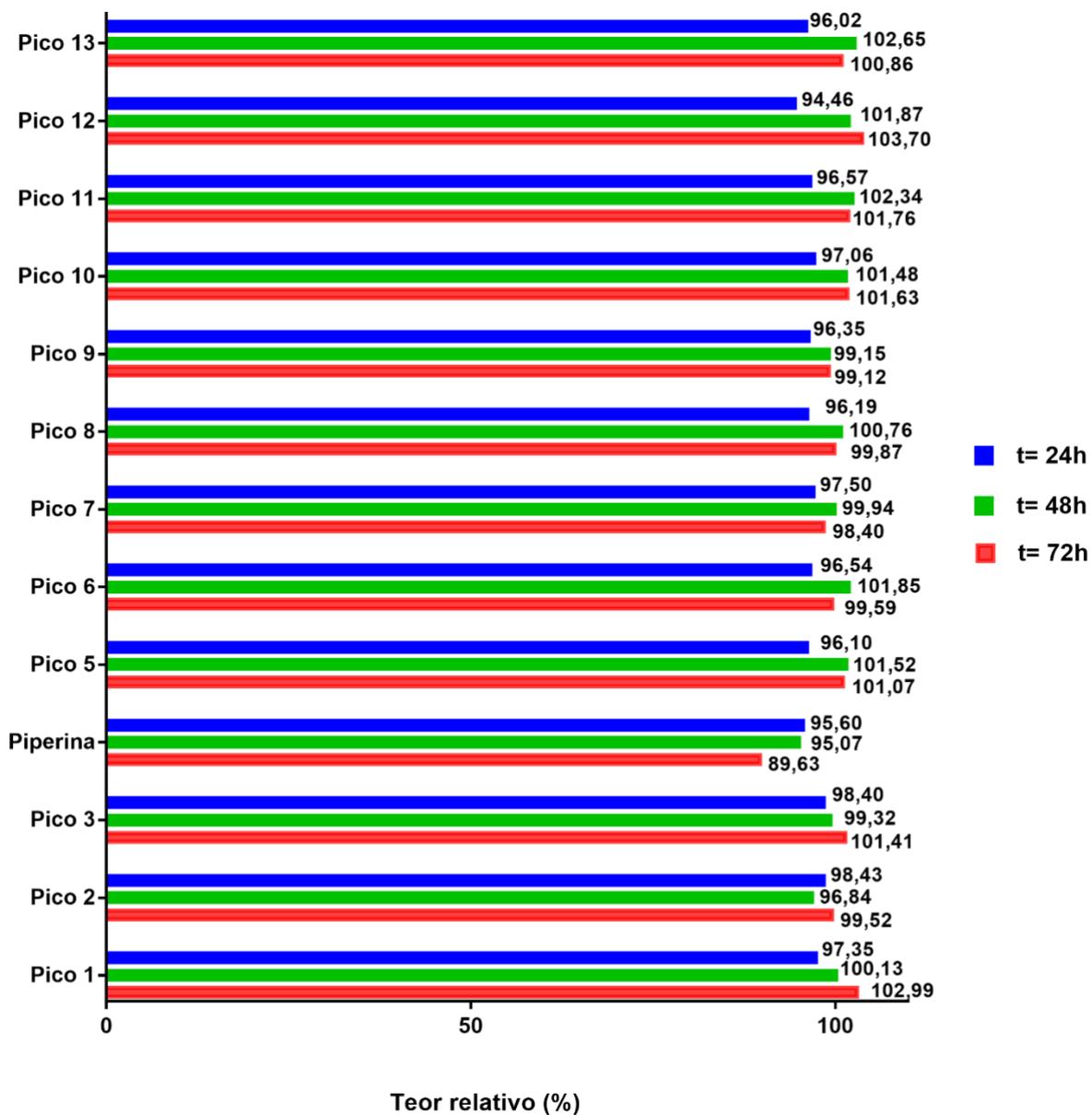


Figura 20. Estabilidade considerando o teor relativo dos 13 picos estudados presentes no extrato etanólico de *Piper nigrum*.

4.3.6 Precisão

A precisão pode ser considerada a habilidade em avaliar a proximidade dos resultados entre análises independentes de uma mesma amostra sob condições definidas (77–79). A tabela 16 apresenta os dados de repetibilidade e a tabela 17 mostra os resultados de precisão intermediária. O tempo de retenção, a área de pico e o fator cauda foram as variáveis estudadas. Levando em conta todos os compostos em estudo presentes no extrato etanólico de trabalho os DPR calculados ficaram com valores abaixo de 6,1% tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária, denotando, portanto, um método com precisão aceitável.

Tabela 16. Dados de repetibilidade do extrato etanólico de *P. nigrum* (n=6)

N°	TR ± DP	DPR (%)	ÁREA ± DP	DPR (%)	FC ± DP	DPR (%)
1	5,90 ± 0,004	0,07	5430 ± 199	3,67	0,12 ± 0,0028	2,39
2	6,21 ± 0,004	0,06	3167 ± 89	2,82	0,07 ± 0,0016	2,31
3	6,60 ± 0,005	0,08	3402 ± 95	2,79	0,11 ± 0,0028	2,64
4	6,91 ± 0,005	0,07	169034 ± 4279	2,53	5,75 ± 0,1401	2,43
5	7,55 ± 0,006	0,08	20417 ± 803	3,93	0,93 ± 0,0340	3,66
6	8,02 ± 0,005	0,06	4979 ± 137	2,76	0,30 ± 0,0063	2,11
7	8,51 ± 0,004	0,05	18700 ± 838	4,48	1,24 ± 0,0677	5,47
8	9,34 ± 0,004	0,04	9326 ± 347	3,72	0,88 ± 0,0266	3,01
9	9,75 ± 0,004	0,04	24481 ± 895	3,65	2,28 ± 0,0881	3,65
10	10,85 ± 0,004	0,03	15553 ± 680	4,37	2,21 ± 0,0881	3,99
11	11,95 ± 0,003	0,03	26559 ± 1067	4,02	3,27 ± 0,1481	4,52
12	12,69 ± 0,005	0,04	12062 ± 194	1,61	1,55 ± 0,0359	2,31
13	13,08 ± 0,003	0,02	22277 ± 945	4,24	2,86 ± 0,1174	4,10

N°= Numeração dos picos; **TR**= tempo de retenção em minutos; **FC**= Fator cauda; **DP**= Desvio padrão; **DPR**= Desvio padrão relativo.

Tabela 17. Dados de precisão intermediária do extrato etanólico de *P. nigrum* (n=6).

N°	TR ± DP	DPR (%)	ÁREA ± DP	DPR (%)	FC ± DP	DPR (%)
1	5,90 ± 0,005	0,08	5357 ± 248	4,64	0,11 ± 0,005	4,16
2	6,21 ± 0,005	0,09	3121 ± 136	4,34	0,07 ± 0,004	5,70
3	6,59 ± 0,005	0,08	3336 ± 164	4,92	0,10 ± 0,004	3,85
4	6,91 ± 0,005	0,07	1690554 ± 6782	4,27	5,46 ± 0,217	4,02
5	7,56 ± 0,005	0,07	18912 ± 937	4,98	0,88 ± 0,044	5,04
6	8,03 ± 0,005	0,07	4786 ± 219	4,61	0,29 ± 0,013	4,59
7	8,52 ± 0,005	0,06	19562 ± 882	4,52	1,30 ± 0,078	6,06
8	9,34 ± 0,005	0,05	8861 ± 426	4,85	0,85 ± 0,043	5,13
9	9,76 ± 0,005	0,05	22858 ± 1112	4,86	2,16 ± 0,116	5,39
10	10,85 ± 0,005	0,05	14425 ± 696	4,85	2,09 ± 0,117	5,61
11	11,95 ± 0,004	0,03	25800 ± 760	2,93	3,14 ± 0,185	5,95
12	12,70 ± 0,006	0,05	11904 ± 298	2,51	1,50 ± 0,072	4,87
13	13,09 ± 0,005	0,04	22148 ± 779	3,51	2,77 ± 0,164	5,97

N°= Numeração dos picos; **TR=** tempo de retenção em minutos; **FC=** Fator cauda; **DP=** Desvio padrão; **DPR=** Desvio padrão relativo.

4.3.7 Exatidão

A exatidão demonstra o grau de concordância entre os valores teóricos e experimentais a partir de um conjunto de medições (77–79). A exatidão do presente trabalho foi calculada levando em conta o ensaio de recuperação já descrito. A partir deste ensaio foram obtidos os valores de erro absoluto, erro relativo e percentuais de recuperação utilizando a matriz esgotada enriquecida com padrão de piperina em três níveis de concentração. Na tabela 18 é possível verificar os resultados de recuperação para nível alto de 92,73% com DPR de 5,10%, nível médio de 88,88% com DPR de 4,76% e nível baixo de 83,36% com DPR de 5,70%. A média dos erros relativos para estes três níveis foram 7,27; 11,12 e 16,64%, respectivamente. Este ensaio envolveu realizar 15 extrações individuais por ASE a partir de matriz seca e enriquecida com o padrão de trabalho. Posteriormente, cada uma das amostras foi filtrada através de filtro analítico para, então, serem analisadas pelo método desenvolvido. Portanto, considerando os processos de extrações e filtrações, o erro máximo de cerca de 17%

em concentrações baixas está aceitável para considerar a exatidão no presente trabalho.

Tabela 18. Parâmetros para determinação da exatidão do método

N	CT (µg/mL)	CE (µg/mL)	E absoluto (µg/mL)	E (%)	Rec (%)	RecM (%) ± DP	DPR (%)
Alta		221,1	7,47	3,27	96,73		
		202,35	26,22	11,47	88,53		
	228,57	203,37	25,2	11,03	88,97	92,73 ± 4,73	5,1
		204,41	24,16	10,57	89,43		
		228,59	-0,02	-0,01	100,01		
Média		98,8	15,48	13,55	86,45		
		98,65	15,63	13,68	86,32		
	114,28	95,78	18,5	16,19	83,81	88,88 ± 4,23	4,76
		108,11	6,17	5,4	94,6		
		106,51	7,77	6,8	93,2		
Baixa		45,81	11,33	19,83	80,17		
		44,66	12,48	21,84	78,16		
	57,14	52,59	4,55	7,96	92,04	83,36 ± 4,75	5,7
		47,29	9,85	17,24	82,76		
		47,8	9,34	16,35	83,65		

N= níveis; **CT=** concentração teórica; **CE=** concentração experimental; **E=** erro; **Rec=** recuperação; **M=** média; **DP=** desvio padrão; **DPR=** desvio padrão relativo.

4.3.8 Efeito matriz

O efeito matriz refere-se à dados experimentais capazes de mensurar o quanto os componentes naturalmente presentes em uma matriz podem interferir na quantificação do analito de interesse (77–79). Estes dados experimentais incluem a comparação de coeficiente angulares de curvas analíticas elaboradas com a matriz *in natura* e com a mesma, enriquecida com o padrão de trabalho. Na figura 21 pode ser observado três curvas analíticas. Uma delas realizada a partir do padrão de piperina em etanol. A outra inclui a mistura proporcional das concentrações como mencionadas

na metodologia, usando o padrão adicionado do extrato etanólico de *P. nigrum*. Na análise destas duas primeiras curvas experimentais observa-se o paralelismo das retas indicando ausência de interferências. Como já era esperado, a curva que demonstra a mistura de padrão e matriz está numa faixa de concentração maior, uma vez que já existia piperina no extrato naturalmente. Para deixar este paralelismo mais evidente, uma terceira curva foi plotada subtraindo a área do pico de piperina natural presente no extrato. Desta forma simula-se a piperina que foi adicionada na matriz livre de piperina, mas contendo todo o restante da matriz. Por meio desta simulação o paralelismo entre as curvas fica nítido demonstrando ausência de efeito matriz.

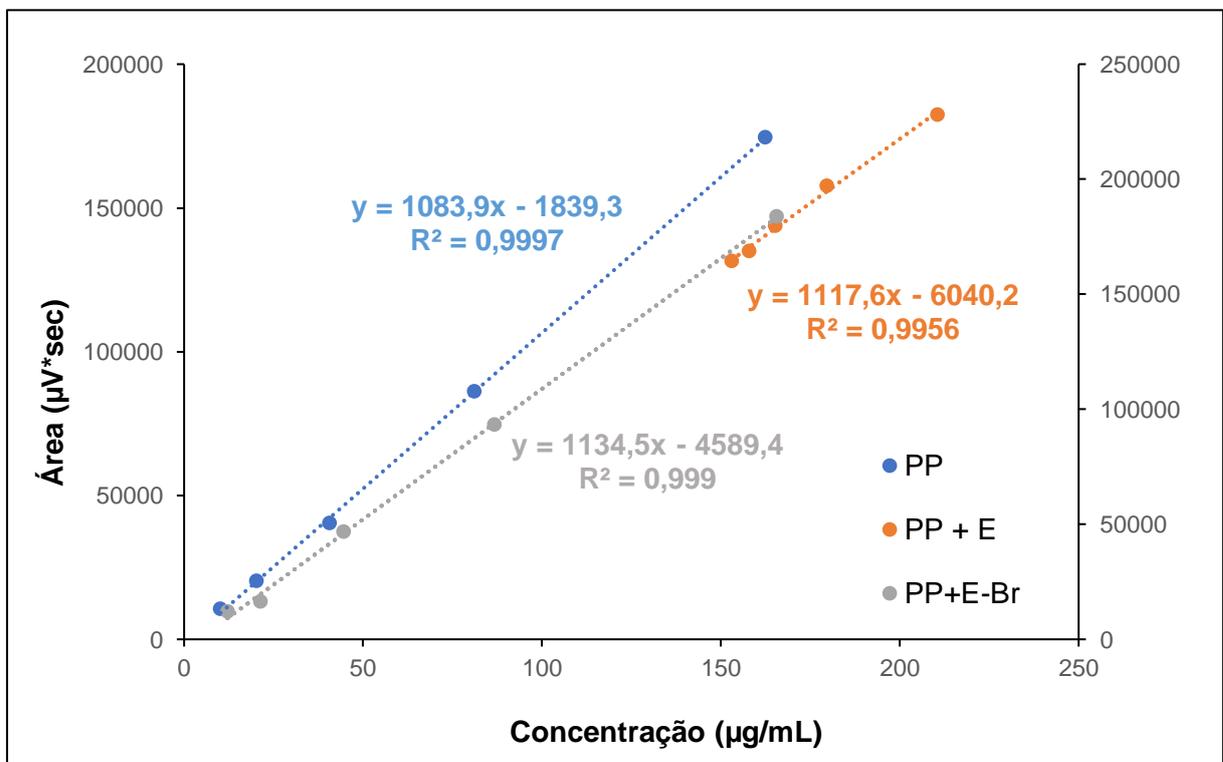


Figura 21. Regressões lineares para determinação de efeito matriz. **PP**= Padrão de piperina em etanol; **PP+E**= Padrão de piperina em extrato etanólico de trabalho; **PP+E-Br**= Padrão de piperina em extrato etanólico de trabalho com a área de piperina natural do extrato subtraída.

Adicionalmente aos dados de paralelismo, o efeito da matriz normalizada - EMN foi calculado como mostra a tabela 19. O EMN foi obtido pela razão entre o coeficiente angular da curva do padrão de piperina em relação aos coeficientes angulares da matriz natural enriquecida apresentando EMN = 0,97 e erro relativo de 3,02% e da matriz natural subtraída mostrando EMN de 0,96 e erro relativo de 4,46%. Quanto mais próximo de 1 o EMN estiver, mais similares serão as retas e, portanto, a ausência de efeito matriz que causaria interferências na quantificação fica confirmada.

Tabela 19. Dados de efeito da matriz normalizada.

Curva	Equações	r^2	FLT ($\mu\text{g/mL}$)	P	Dados de efeito matriz			
					M \pm DP CA	DPR CA %	EMN	E%
PP	$y = 1083,9x - 1839,3$	0,9997	10,15 - 162,15	5				
PP+E	$y = 1117,6x - 6040,2$	0,9956	153,02 - 210,56	5	1100,75 \pm 24	2,16	0,97	\pm 3,02
PP+E-Br	$y = 1134,5x - 4589,4$	0,9990	12,12 - 165,70	5	1109,2 \pm 36	3,23	0,96	\pm 4,46

PP= Padrão de piperina em etanol; **PP+E=** Padrão de piperina em extrato etanólico de trabalho; **PP+E-Br=** Padrão de piperina em extrato etanólico de trabalho com a área de piperina natural do extrato subtraída. **FLT=** Faixa linear de trabalho; **NP=** Número de pontos; **M=** Média; **DP=** Desvio padrão; **CA=** Coeficiente angular; **DPR=** Desvio padrão relativo; **EMN=** Efeito da matriz normalizada.

4.3.9 Robustez

A análise de robustez mede a habilidade de um método frente à pequenas variações. Um método é considerado robusto quando o mesmo não é afetado por pequenas modificações deliberadas em seus parâmetros (77–79). Neste estudo o tempo de ciclo estático está relacionado ao extrator ASE-150, as diferentes membranas dos filtros estão inclusas ao preparo analítico da amostra e as variações de comprimento de onda e fluxo da fase móvel pertencem ao sistema cromatográfico. Estes quatro parâmetros, foram modificados deliberadamente seguindo um planejamento fatorial e podem representar um todo desde às extrações, amostragens

e análises. Nestes ensaios foi monitorada a piperina presente na amostra de trabalho. Isto significa que o extrato etanólico de *P. nigrum* foi submetido à estas variações propositais o que aumenta o nível de complexidade geral. Os efeitos das respostas tempo de retenção e área de pico foram obtidos e convertidos em seus respectivos valores de DPR. A figura 22 mostra as diferentes combinações advindas do planejamento em função dos valores de DPR dos efeitos determinados. Neste estudo foi determinado os valores de desvio padrão relativo aceitáveis em no máximo de 10%. Assim a única variável que atingiu valores superiores ao aceitável foi o fluxo da fase móvel (Figura 22). Analiticamente, o fluxo de fase em qualquer sistema cromatográfico pode alterar parâmetros envolvidos na equação mestra da resolução, a qual comanda a qualidade do formato dos picos envolvidos. Esta equação faz relações envolvendo o fator de separação α , a constante de distribuição K entre os compostos nas fases envolvidas, além dos parâmetros de eficiência, dados pelo número de pratos teóricos (83). Nem sempre pequenas modificações de fluxo gerariam efeitos significativos. No ensaio proposto as modificações de fluxo da fase móvel geraram efeitos com valores acima de 10%. Por outro lado, dada a magnitude deste ensaio somente uma das variáveis foi sensível. Portanto, este método foi considerado robusto e poderá ser executado em qualquer estabelecimento pertinente, resultando em dados bastante semelhantes com os quais estão sendo demonstrados no presente trabalho desde que, não haja alteração no fluxo da fase móvel analítica.

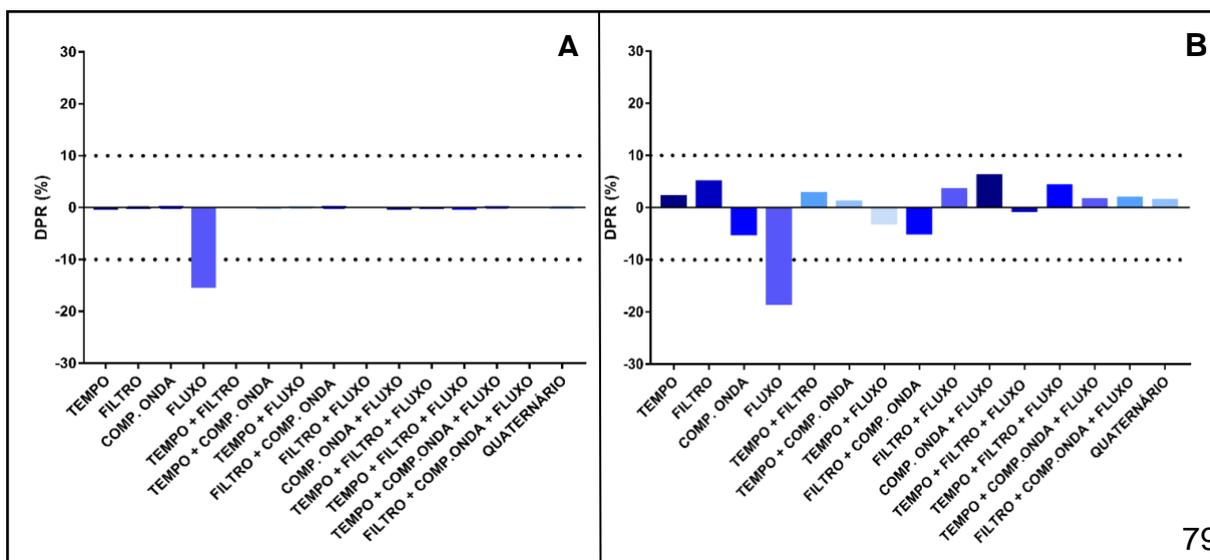


Figura 22. Gráfico de robustez para o método relacionando ensaios e % DPR dos efeitos determinados. **DPR=** desvio padrão relativo. **A)** gráfico de robustez para o tempo de retenção; **B)** gráfico de robustez para a área de pico.

4.4 Aplicabilidade do método na análise de lotes comerciais

Na aplicabilidade do método foram analisados diferentes lotes comerciais de *P. nigrum*. Nestas análises consideraram-se as variações de pimenta-do-reino branca e preta. A pimenta-do-reino preta é obtida a partir dos frutos verdes, que sofrem oxidação de polifenóis presentes nas cascas para chegarem a coloração preta. Já a pimenta branca é obtida pela remoção das cascas da pimenta preta (84). Os diferentes lotes de pimentas foram extraídos e analisados de acordo com os procedimentos padronizados e validados. O teor absoluto de piperina foi determinado em cada lote estudado (Tabela 20). O método desenvolvido no presente trabalho foi capaz de quantificar piperina em 10 diferentes amostras comerciais, incluindo as diferenças de variedades de cores para os frutos. Na literatura há relatos de quantificação de piperina em lotes de *P. nigrum* de diferentes países, mostrando que a detecção por CLAE-UV-DAD é adequada para o controle de qualidade desta matéria-prima (85).

Tabela 20. Lotes de *P. nigrum*, avaliados na aplicabilidade

Fornecedor	Lote	TR ± DP	DPR	ÁREA ± DP	DPR	Teor %
RP	PNP-31102020	6,914 ± 0,011	0,165	124125 ± 8004	6,45	2,0
RC	PNP-OO8R	6,912 ± 0,004	0,052	115555 ± 3777	3,27	2,0
TC	PNP-14921	6,909 ± 0,006	0,086	96426 ± 2696	2,8	1,6
CF	PNP-70926	6,902 ± 0,019	0,276	96046 ± 6863	7,15	1,6
CTFG	PNP-30102020	6,894 ± 0,001	0,021	115941 ± 3533	3,05	1,9
CDQ	PNB-341	6,899 ± 0,004	0,064	141792 ± 6411	4,52	2,3
RP	PNB-30102020	6,908 ± 0,003	0,04	99920 ± 1134	1,13	1,7
TC	PNB-14921	6,925 ± 0,022	0,325	127618 ± 2119	1,66	2,1
CTFG	PNB-31102020	6,932 ± 0,002	0,032	130894 ± 9520	7,27	2,2
BM	PNB-32102020	6,927 ± 0,005	0,072	152313 ± 6150	4,04	2,5

RP= Rei das Pimentas; RC= Rei dos condimentos; TC= Temperos e Cia; CF= Carrefour; CTFG= Casa de temperos Feira do Guará; CDQ= Casa de Doces e queijos; BM= Biomundo; PNP= *Piper nigrum* preta; PNB= *Piper nigrum* branca TR= tempo de retenção; DP= Desvio padrão; DPR= Desvio padrão relativo.

4.5 Avaliação da atividade biológica do extrato padronizado de *P. nigrum*

Após a realização de todos os procedimentos de padronização e validação com as amostras de trabalho, tanto o extrato etanólico de *P. nigrum* como o padrão de piperina foram avaliados novamente quanto as atividades larvicida e pupicida em *Ae. aegypti*. Assim como na fase de triagem, a piperina e o respectivo extrato continuaram sendo inativos para pupas. A atividade larvicida foi refeita para ambas as amostras seguindo o protocolo descrito pela OMS determinando a CL₅₀ e a CL₉₀ conforme apresentado na tabela 21.

Tabela 21. Atividade biológica de *P. nigrum* e piperina em larvas L3 de *Aedes aegypti*.

Amostra	Concentração (µg/mL)	CL ₅₀ 24h* ;48h**; 72h*** µg/mL (IC 95%)	CL ₉₀ 24h* ;48h**; 72h*** µg/mL (IC 95%)	R ² 24 h
Piperina	50; 25; 15; 10; 5	19,03 (17,6 - 20,7)* 11,3 (10,2 - 12,4)** 7,5 (6,2 - 8,8) ***	38,1 (31,8 -45,4)* 27,6 (22,1 - 34, 4)** 23,8 (17,2 - 33,3)***	0,87
Extrato etanólico <i>P. nigrum</i>	2,5; 1,5; 1,1; 0,9; 0,5	1,1 (1,1 - 1,2)* 0,9 (0,6 - 0,9)** 0,9 (0,8 - 1,0)***	1,8 (1,6 - 1,9)* 1,3 (1,2- 1,5)** 1,2 (1,0 - 1,4)***	0,92
Temefós	0,00625; 0,00313; 0,00156;0,0007 8;0,00039	0,0011 (0,0010 - 0,0012)* 0,0010 (0,0010 - 0,0011)** 0,0009 (0,0009 - 0,0010)***	0,00165 (0,00154 - 0,00175)* 0,00156 (0,00141 - 0,00170)** 0,00129 (0,0011 - 0,00146)***	0,98

CL₅₀= Concentração letal de 50% dos indivíduos; **CL₉₀**= Concentração letal de 90% dos indivíduos; **IC 95%**= Intervalo de confiança de 95%. Dados expressos pela média de 3 experimentos independentes realizados em 5 concentrações (25 larvas em cada) e em quadruplicata, totalizando 1500 larvas por amostra. Temefós foi utilizado como controle positivo.

Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ larvicidas determinados para piperina foram de 19,03 e 38,1 µg/mL após 24 h, respectivamente (Tabela 21). O padrão de piperina aqui relatado passou por todos os processos de elucidação estrutural, padronização e validação de forma a obter seu grau de pureza com teor de 97%. Estes valores de concentrações letais encontrados para a piperina foram mais potentes quando

comparados com outros compostos/extratos denominados na literatura como muito ativos em larvas ($CL_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$) (29). A piperina no extrato de *P. nigrum* desempenha papel importante, pois a partir dela são formados outros isômeros como a isopiperina, a chavicina e a isochavicina. Fragmentos de piperina podem fazer parte da formação de outras alcaloides similares durante a biossíntese no metabolismo vegetal (86,87). A piperina pode ser considerada um marcador químico em variedades de pimenta-do-reino. Por estar sempre presente nestas especiarias a piperina corrobora com outros compostos naturalmente presentes nesta especiaria, não somente no que diz respeito às características organolépticas, bem como nas diferentes atividades biológicas reportadas na literatura (88).

O presente estudo reafirma a importância da piperina ao conjunto piperina mais os outros compostos minoritários detectados pelo método validado fazendo com que o extrato etanólico de *P. nigrum* apresente CL_{50} e CL_{90} em 1,1 e 1,8 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h de exposição (Tabela 21). Conforme a literatura descreve, no extrato de etanólico de *P. nigrum* pode existir alcaloides minoritários com atividade larvicida bem mais potente que a piperina ou o próprio extrato. Assim, a interação da somatória destes compostos no extrato considerando a atividade larvicida, oferece bons indicativos de que misturas em concentrações conhecidas de alcaloides específicas poderiam render um produto totalmente inovador (89).

O mecanismo de ação da atividade destas amidas ainda não está claramente definido em *Ae. aegypti*, porém, alguns dados sugerem que a atuação ocorra no citocromo p450 do mosquito. Este teria a função de detoxificação de compostos, mostrando alterações nas células do tubo digestivo das larvas (90,91). A presença de grupamentos metilendioxí, as cadeias carbônicas com diferentes insaturações, além da função orgânica amida conferem o reconhecido potencial inseticida para estas amostras (30,90,92).

4.6 Uso do método validado no sistema biológico de larvas de *Aedes aegypti*: quantificação de piperina simultânea à atividade larvicida residual

Esta etapa do trabalho buscou quantificar o padrão de piperina e a piperina presente no extrato etanólico dos frutos de *P. nigrum* padronizado, por meio de dois ensaios individuais, em ambiente aquático contendo larvas L3 de *Ae. aegypti* ao longo de um estudo de residualidade. O intuito foi definir o que estaria acontecendo entre amostras e larvas simultaneamente por meio da quantificação absoluta do principal marcador químico da amostra.

Conhecendo-se sobre os parâmetros de CL_{50} descritos ao tópico anterior, nestes ensaios de residualidade as concentrações de partida foram de 60 $\mu\text{g/mL}$ para o padrão de piperina e de 4 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de *P. nigrum* padronizado. Depois de diferentes características estudadas para determinar estas concentrações de partida surgiu uma primeira questão a ser contornada.

O padrão de piperina foi totalmente solúvel em água até a faixa de 50 $\mu\text{g/mL}$. Acima desta concentração precipitava como mostra a figura 23A. Esta precipitação não ocorreu com o extrato, porém com o padrão tal característica inviabilizaria a sua quantificação. Para resolver esta questão preparou-se uma solução aquosa contendo 500 $\mu\text{g/mL}$ da matriz esgotada que foi utilizada no ensaio de recuperação (Figura 23B). Assim, este sistema aquoso com a matéria orgânica esgotada permitiu solubilizar de forma efetiva o padrão de piperina. Esta solução de matriz esgotada sem adição de padrão foi usada no controle, não apresentando nenhuma mortalidade sob as larvas em estudo.

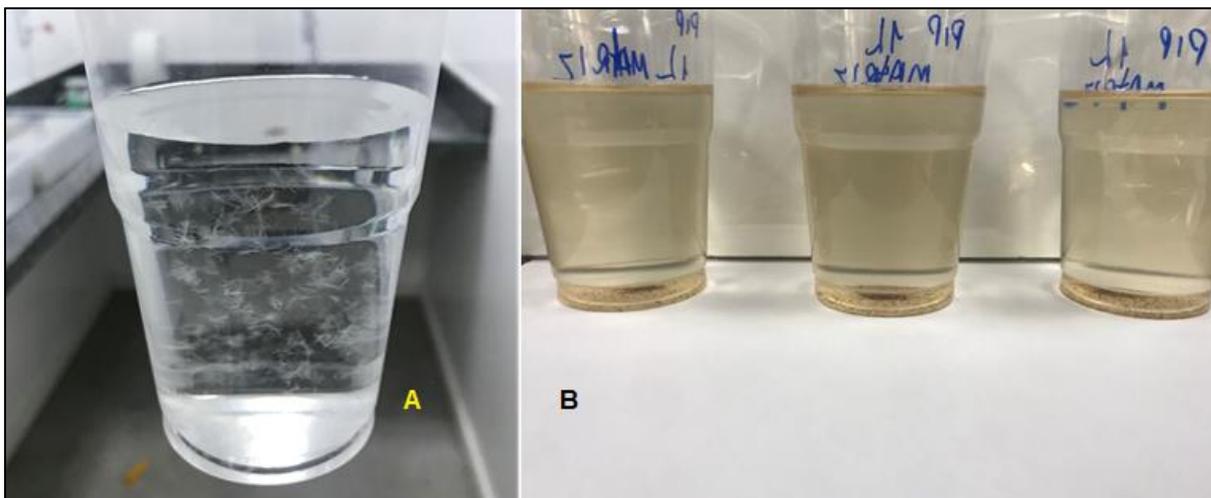


Figura 23. A) Padrão de piperina em água a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **B)** Padrão de piperina em água com matriz esgotada a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

O segundo ponto a ser resolvido foi determinar o erro analítico na quantificação de piperina em um sistema aquático e em baixas concentrações. Sendo assim, o erro analítico foi definido utilizando faixas próximas de concentrações ao ensaio de residualidade. Para tanto, um ensaio de recuperação similar ao descrito na metodologia foi elaborado considerando todo o sistema aquoso sem a presença de larvas. As concentrações teóricas do padrão de piperina foram **a)** 47,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **b)** 23,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e **c)** 4,58 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tais alíquotas foram transferidas para copos individuais contendo 200 mL de água. Em seguida, estas amostras foram homogeneizadas manualmente com auxílio de espátula, preparadas analiticamente e analisadas pelo método validado. Os erros analíticos para as concentrações **a**, **b** e **c** foram de 37; 41 e 54%, respectivamente. Normalmente, compostos orgânicos em matrizes aquosas resultam em erros relativamente elevados, principalmente quando se trata de concentrações de trabalho baixas. Contudo, o erro definido nesta metodologia não indica um ensaio de exatidão. Este erro foi de fundamental importância para estabelecer um fator de correção analítico de modo que a determinação absoluta ou alguma variação de piperina esteja relacionada diretamente à presença das larvas e não sofra a influência do sistema.

Uma vez que as principais questões foram resolvidas, o ensaio residual foi realizado como descrito na seção metodológica. A figura 24 apresenta os gráficos para cada ensaio realizado, nos quais podem ser observadas as correlações de quantificação do padrão de piperina e piperina no extrato em relação à mortalidade de larvas L3 do vetor *Ae. aegypti* em estudo ao longo de nove dias consecutivos.

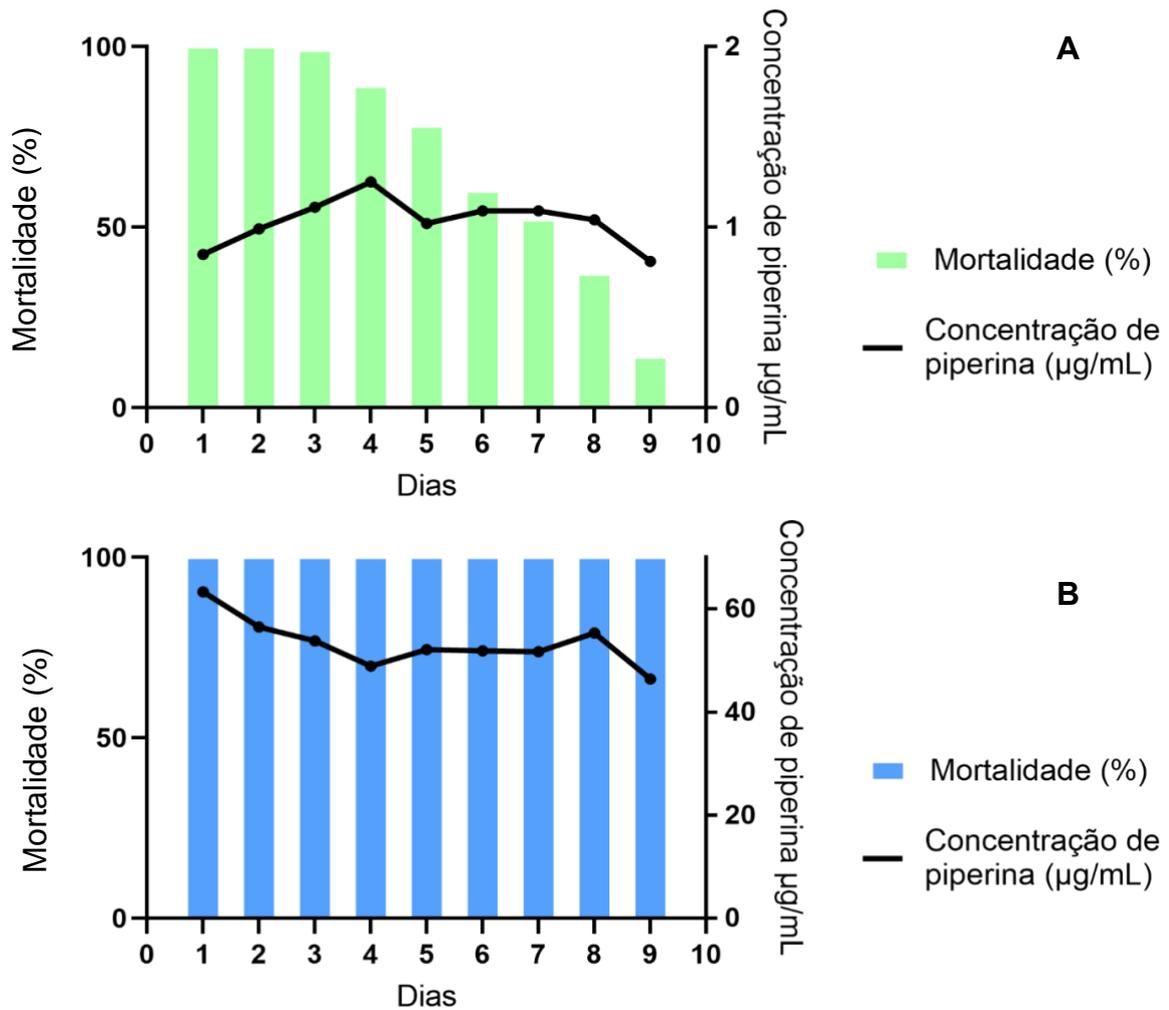


Figura 24. Gráficos de atividade residual e quantificação simultânea de piperina. **A=** Atividade residual de extrato etanólico de *P. nigrum* a 4 µg/mL. **B=** Atividade residual de padrão de piperina a 60 µg/mL.

Levando em conta o ambiente aquoso contendo extrato padronizado e 25 larvas (Figura 24A), nos primeiros três dias de ensaio foi possível observar 100% de mortalidade com a concentração de piperina variando 0,85 a 1,11 µg/mL. No quarto dia de ensaio a mortalidade das larvas foi de 89% com piperina no extrato em 1,25 µg/mL. No quinto dia observou-se 78% de mortalidade e 1,02 µg/mL de piperina. Na avaliação do sexto e sétimo dia tal mortalidade foi de 60% e 52% respectivamente a 1,09 µg/mL do marcador em questão. No oitavo dia a concentração de piperina foi de 1,04 µg/mL com mortalidade de 37% já no nono dia a piperina no extrato foi quantificada na concentração de 0,81 µg/mL e queda da mortalidade para 14%, finalizando o ensaio residual com o extrato padronizado. Durante esta quantificação simultânea observou-se que a concentração de piperina variou como esperado considerando a faixa de erro do método validado determinada no estudo de exatidão, a qual foi de no máximo 17%. A concentração média de piperina no extrato ao longo dos nove dias ensaiados foi de $1,03 \pm 0,13$ µg/mL com DPR de 12%, respeitando a exatidão do método. Conforme estes cálculos, a concentração de piperina no extrato não variou drasticamente, seu valor médio foi determinado mostrando uma certa regularidade na sua concentração durante o período de ensaio. No entanto, a mortalidade de larvas a partir do quarto dia de ensaio foi decrescente variando de 89 e chegando a 14% no último dia de experimento. Sendo assim, outros compostos minoritários em conjunto com a piperina que potencializam a elevada atividade larvicida do extrato padronizado tiveram queda de seus teores, justificando este comportamento de mortalidade.

O resultado apresentado na figura 24B envolvendo o padrão de piperina, de uma certa forma comprovou todas as observações discutidas para o extrato padronizado. Ou seja, a concentração do padrão variou dentro da exatidão do método com um valor médio de $53,4 \pm 4,6$ µg/mL com DPR de 8,7% sendo regular ao longo do ensaio residual. A mortalidade das larvas foi de 100% ao longo dos nove dias de ensaio, uma vez que a concentração de partida para este ensaio foi superior ao CL_{90} da piperina, já descrita ao tópico anterior. As alternativas em trabalhar com as concentrações de partida mais elevadas tanto para o padrão de piperina como para o

extrato foram lançadas para obter a exata certeza de mortalidade inicial e, ao longo do ensaio, caso tais concentrações variassem significativamente o método validado continuaria funcionando no quesito quantificação, bem como o percentual de mortalidade poderia se comportar diferentemente do que foi observado.

No geral, o presente trabalho visou estabelecer três estratégias específicas. A primeira, obtenção de amostras comerciais em larga escala. A segunda, o uso obrigatório de amostras consumidas por seres humanos no cotidiano. A terceira, determinar a existência de alguma atividade larvicida em *Ae. aegypti*, preferencialmente em baixa concentração. Estas três estratégias tiveram um contorno analítico detalhado no sentido de padronizar e validar as amostras referidas de trabalho. Uma triagem de diferentes matérias-primas amplamente disponíveis no comércio foi realizada levando em conta as atividades larvicida e pupicida. Os extratos dos frutos de *P. nigrum* demonstraram enorme potencial adequando o uso da espécie as três estratégias mencionadas. Diferentes dados descritos na literatura para a especiaria corroboraram para o conhecimento da matéria-prima, mas o presente estudo apresenta um conjunto de dados inovadores no que diz respeito às extrações padronizadas vinculadas à um método cromatográfico completamente validado, os quais puderam ser confrontados simultaneamente ao ensaio residual com larvas do vetor em estudo, conforme as descrições anteriores. Na literatura há somente um controle de qualidade determinando amostra de *P. nigrum* em relação a larvas de *Ae. aegypti*, porém os autores não descreveram as figuras de validação e nem parâmetros de padronizações, além das amostras que são quantificadas, serem retiradas de recipientes separados dos que estão contidas as larvas, não sendo expostas as mesmas condições (53). No presente trabalho todas as figuras de méritos foram desenvolvidas na íntegra com enorme rigor das agências reguladoras. Além disso, outro ponto desafiador foi interligar de alguma forma quatro módulos analíticos distintos para funcionarem sequencialmente atendendo as faixas aceitáveis de erro e de trabalho. São eles: extração acelerada por solventes, preparo analítico da amostra, sistema cromatográfico, e técnicas de quantificação em água e em solvente orgânico. Este alinhamento analítico sob o comando de todas as figuras de validação em

perfeita aceitabilidade de cálculos pode ser considerado novo na literatura. Portanto, todo o desenvolvimento e parâmetros respeitados aqui poderão servir como ponto de partida na continuidade em encontrar amostras tóxicas para o mosquito e que sejam amigáveis aos outros organismos vivos e ao meio ambiente.

5. Conclusão

O presente trabalho realizou triagem a partir de diferentes espécies alimentícias disponíveis no mercado em larvas e pupas de *Ae. aegypti*. O estudo também executou procedimentos envolvendo variáveis que influenciaram na atividade larvicida e no rendimento do extrato etanólico dos frutos de *P. nigrum* utilizando equipamento ASE, determinando, uma metodologia padronizada de extração.

Um método cromatográfico foi completamente validado, seguindo-se agências reguladoras nacionais e internacionais envolvendo os parâmetros: seletividade, linearidade, limite operacional de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), estabilidade, precisão, exatidão, efeito matriz e robustez.

Foram obedecidos os protocolos OMS, para determinação da atividade do extrato etanólico padronizado de *P. nigrum* em larvas de *Ae. aegypti* bem como do seu componente majoritário a piperina. A metodologia analítica validada foi aplicada a diferentes lotes de *P. nigrum* e foi possível quantificar o padrão de piperina durante teste de atividade larvicida residual em ambiente aquático na presença de larvas ao longo de nove dias.

Todos os resultados relatados aqui indicam que o extrato etanólico dos frutos de *P. nigrum* pode ser utilizado como alternativa no controle de *Ae. aegypti*. Este extrato foi produzido a partir de solvente reconhecidamente verde e apresentou CL₅₀ larvicida de 1,1 µg/mL e rendimento de 6%.

A alternativa sugerida dos dados resultantes, contorna problemas encontrados para a utilização de produtos naturais como alternativa no controle de vetores. Isto é, utilizando matéria-prima amplamente disponível no comércio com atividade larvicida comprovada em *Ae. aegypti*, que apresenta certo nível de segurança, sendo o extrato obtido a partir de pimenta-do-reino, consumida mundialmente na alimentação.

Este extrato com todos os requisitos analíticos determinados neste estudo demonstra alto potencial para o desenvolvimento de formulações, possibilitando

através da padronização e a validação realizadas, análise rigorosa e adequada, garantindo a qualidade e atividade larvicida adequada.

6. Referências bibliográfica

1. Marinho RA, Beserra EB, Bezerra-Gusmão MA, Porto V de S, Olinda RA, Santos CAC dos. Effects of temperature on the life cycle, expansion, and dispersion of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in three cities in Paraíba, Brazil. *J Vector Ecol.* 2016;41(1):1–10.
2. Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MUG, Wint GRW, Ray SE, et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol.* setembro de 2019;4(9):1508–15.
3. Thompson R, Martin Del Campo J, Constenla D. A review of the economic evidence of Aedes-borne arboviruses and Aedes-borne arboviral disease prevention and control strategies. *Expert Rev Vaccines.* 1º de fevereiro de 2020;19(2):143–62.
4. Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta Trop.* 1º de maio de 2019;193:236–71.
5. Active metabolites of the genus *Piper* against *Aedes aegypti*: natural alternative sources for dengue vector control [Internet]. [citado 9 de novembro de 2021]. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832015000100005
6. Consoli RAGB, Oliveira RL de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil [Internet]. Editora FIOCRUZ; 1994 [citado 12 de julho de 2021]. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/th>
7. Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol.* 1º de dezembro de 2015;83:43–52.
8. Farnesi LC, Vargas HCM, Valle D, Rezende GL. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 30 de outubro de 2017;11(10):e0006063.

9. Calma ML, Medina PMB. Acute and chronic exposure of the holometabolous life cycle of *Aedes aegypti* L. to emerging contaminants naproxen and propylparaben. *Environ Pollut*. 1º de novembro de 2020;266:115275.
10. Esser HJ, Mögling R, Cleton NB, van der Jeugd H, Sprong H, Stroo A, et al. Risk factors associated with sustained circulation of six zoonotic arboviruses: a systematic review for selection of surveillance sites in non-endemic areas. *Parasit Vectors*. 27 de maio de 2019;12(1):265.
11. Olson MF, Juarez JG, Kraemer MUG, Messina JP, Hamer GL. Global patterns of aegyptism without arbovirus. *PLoS Negl Trop Dis*. 5 de maio de 2021;15(5):e0009397.
12. Lwande OW, Obanda V, Lindström A, Ahlm C, Evander M, Näslund J, et al. Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 1º de fevereiro de 2020;20(2):71–81.
13. Ten health issues WHO will tackle this year [Internet]. [citado 4 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
14. WHO 2019. Dengue and severe dengue [Internet]. 2019 [citado 6 de maio de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
15. Biswal S, Borja-Tabora C, Martinez Vargas L, Velásquez H, Theresa Alera M, Sierra V, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4-16 years: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2 de maio de 2020;395(10234):1423–33.
16. Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz OG, Honório NA, Kuper H, et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *Int J Environ Res Public Health*. janeiro de 2018;15(1):96.
17. Zika virus [Internet]. [citado 4 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
18. WHO. Chikungunya [Internet]. 2019 [citado 7 de maio de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/chikungunya>
19. Ministerio da Saúde. Boletim epidemiológico 16. 2021.
20. Yellow fever [Internet]. [citado 5 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/yellow-fever>
21. Abreu FVS de, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, Santos AAC dos, Miranda RM de, Bonelly I de S, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus*

- janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg Microbes Infect.* 1º de janeiro de 2019;8(1):218–31.
22. Organização Pan-Americana de Saúde. Epidemiological Update - Arboviruses in the context of COVID-19 [Internet]. 2021 [citado 6 de setembro de 2021]. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/54497/EpiUpdate2July2021_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 23. Controle de vetores [Internet]. [citado 5 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/controle-de-vetores>
 24. Integrating vector management [Internet]. [citado 5 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/westernpacific/activities/integrating-vector-management>
 25. Gan SJ, Leong YQ, bin Barhanuddin MFH, Wong ST, Wong SF, Mak JW, et al. Dengue fever and insecticide resistance in Aedes mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasit Vectors.* 10 de junho de 2021;14(1):315.
 26. Ministério da Saúde. Cielo- UVL [Internet]. 2020 [citado 5 de setembro de 2021]. 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)
 27. Ministério da Saúde. II - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DO PRODUTO PARA APLICAÇÃO RESIDUAL. 2020;8.
 28. Saúde passa a distribuir larvicida biológico para o controle das arbovirose [Internet]. Ministério da Saúde. [citado 5 de setembro de 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/saude-passa-a-distribuir-larvicida-biologico-para-o-controle-das-arbovirose>
 29. Silvério MRS, Espindola LS, Lopes NP, Vieira PC. Plant Natural Products for the Control of Aedes aegypti: The Main Vector of Important Arboviruses. *Molecules* [Internet]. 31 de julho de 2020 [citado 6 de maio de 2021];25(15). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7435582/>
 30. Silva RL, Demarque DP, Dusi RG, Sousa JPB, Albernaz LC, Espindola LS. Residual Larvicidal Activity of Quinones against Aedes aegypti. *Molecules.* janeiro de 2020;25(17):3978.
 31. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 27 de março de 2020;83(3):770–803.
 32. With 264.9 million metric tons, 2021 crop can beat record by 4.2% | Agência de Notícias | IBGE [Internet]. [citado 6 de setembro de 2021]. Disponível em:

<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/en/agencia-news/2184-news-agency/news/30476-com-264-9-milhoes-de-toneladas-safra-2021-pode-superar-recorde-em-4-3>

33. Piplani M, Bhagwat DP, Singhvi G, Sankaranarayanan M, Balana-Fouce R, Vats T, et al. Plant-based larvicidal agents: An overview from 2000 to 2018. *Exp Parasitol.* abril de 2019;199:92–103.
34. Wang Y, Zhang L-T, Feng Y-X, Zhang D, Guo S-S, Pang X, et al. Comparative evaluation of the chemical composition and bioactivities of essential oils from four spice plants (Lauraceae) against stored-product insects. *Ind Crops Prod.* 15 de novembro de 2019;140:111640.
35. Louis MRLM, Pushpa V, Balakrishna K, Ganesan P. Mosquito larvicidal activity of Avocado (*Persea americana* Mill.) unripe fruit peel methanolic extract against *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi*. *South Afr J Bot.* 1º de setembro de 2020;133:1–4.
36. Pugliese M, Gaglio G, Passantino A, Brianti E, Napoli E. Natural Products against Sand Fly Vectors of Leishmaniasis: A Systematic Review. *Vet Sci.* 30 de julho de 2021;8(8):150.
37. Al-Mekhlafi FA, Abutaha N, Al-Doaiss AA, Ahmed Al- Keridis L, Alsayadi AI, Ali El Hadi Mohamed R, et al. Target and non-target effects of *Foeniculum vulgare* and *Matricaria chamomilla* combined extract on *Culex pipiens* mosquitoes. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 11 de junho de 2021 [citado 7 de setembro de 2021]; Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21004848>
38. Aungtikun J, Soonwera M. Improved adulticidal activity against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) from synergy between *Cinnamomum* spp. essential oils. *Sci Rep.* 25 de fevereiro de 2021;11(1):4685.
39. Soonwera M, Sittichok S. Adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (Stapf.) and *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oils and of their synergistic combinations against *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Musca domestica* (L.). *Environ Sci Pollut Res Int.* junho de 2020;27(16):20201–14.
40. Chen Y, Luo J, Zhang N, Yu W, Jiang J, Dai G. Insecticidal activities of *Salvia hispanica* L. essential oil and combinations of their main compounds against the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Ind Crops Prod.* 1º de abril de 2021;162:113271.
41. Raj GA, Chandrasekaran M, Krishnamoorthy S, Jayaraman M, Venkatesalu V. Phytochemical profile and larvicidal properties of seed essential oil from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and

- Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 1º de setembro de 2015;114(9):3385–91.
42. Minal SP, Prakash S. Laboratory analysis of Au–Pd bimetallic nanoparticles synthesized with Citrus limon leaf extract and its efficacy on mosquito larvae and non-target organisms. *Sci Rep.* 10 de dezembro de 2020;10(1):21610.
 43. Vinotha V, Yazhiniprabha M, Raj DS, Mahboob S, Al-Ghanim KA, Al-Misned F, et al. Biogenic synthesis of aromatic cardamom-wrapped zinc oxide nanoparticles and their potential antibacterial and mosquito larvicidal activity: An effective eco-friendly approach. *J Environ Chem Eng.* 1º de dezembro de 2020;8(6):104466.
 44. Feng C, Xu Q, Qiu X, Jin Y, Ji J, Lin Y, et al. Evaluation and application of machine learning-based retention time prediction for suspect screening of pesticides and pesticide transformation products in LC-HRMS. *Chemosphere.* 1º de maio de 2021;271:129447.
 45. Brown PN, Lister P. Current initiatives for the validation of analytical methods for botanicals. *Curr Opin Biotechnol.* 1º de fevereiro de 2014;25:124–8.
 46. Bridwell H, Dhingra V, Peckman D, Roark J, Lehman T. Perspectives on Method Validation: Importance of Adequate Method Validation. *Qual Assur J.* 2010;13(3–4):72–7.
 47. Produtos para combate ao *Aedes aegypti* - Anvisa [Internet]. [citado 7 de setembro de 2021]. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/en_US/produtos-aedes
 48. Mendes Gomes Magalhães N, Lima e Silva R, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, Brasil, Salmen Espindola L, Laboratório da Farmacognosia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil. Registro e perfil ecotoxicológico de produtos para controle de *Aedes aegypti*. *Vigilância Sanitária Em Debate Soc Ciênc Tecnol.* 26 de fevereiro de 2021;9(1):71–81.
 49. Sparks TC, Crouse GD, Durst G. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure–activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Manag Sci.* 2001;57(10):896–905.
 50. Lybrand DB, Xu H, Last RL, Pichersky E. How Plants Synthesize Pyrethrins: Safe and Biodegradable Insecticides. *Trends Plant Sci.* 1º de dezembro de 2020;25(12):1240–51.
 51. Kasaj D, Rieder A, Krenn L, Kopp B. Separation and quantitative analysis of natural pyrethrins by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia.* 1º de novembro de 1999;50(9):607–10.

52. Fernandes SR, Barreiros L, Oliveira RF, Cruz A, Prudêncio C, Oliveira AI, et al. Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State-of-the-art. *Fitoterapia*. 1º de abril de 2019;134:141–50.
53. Custódio KM, Oliveira JG de, Moterle D, Zepon KM, Prophiro JS, Kanis LA. A biodegradable device for the controlled release of *Piper nigrum* (Piperaceae) standardized extract to control *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. *Rev Soc Bras Med Trop*. dezembro de 2016;49:687–92.
54. Schulte HL, Barreto Sousa JP, Sousa-Moura D, Grisolia CK, Espindola LS. Degradation evaluation and toxicity profile of bilobol, a promising eco-friendly larvicide. *Chemosphere*. janeiro de 2021;263:128323.
55. Piper nigrum L. | Plants of the World Online | Kew Science [Internet]. Plants of the World Online. [citado 15 de novembro de 2021]. Disponível em: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:682369-1>
56. Takooree H, Aumeeruddy MZ, Rengasamy KRR, Venugopala KN, Jeewon R, Zengin G, et al. A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 27 de junho de 2019;59(sup1):S210–43.
57. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de Pimenta-do-reino no Brasil | IBGE [Internet]. 2021 [citado 4 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimenta-do-reino/br>
58. Liang J, Sun J, Chen P, Frazier J, Benefield V, Zhang M. Chemical analysis and classification of black pepper (*Piper nigrum* L.) based on their country of origin using mass spectrometric methods and chemometrics. *Food Res Int*. 1º de fevereiro de 2021;140:109877.
59. Stojanović-Radić Z, Pejčić M, Dimitrijević M, Aleksić A, V. Anil Kumar N, Salehi B, et al. Piperine-A Major Principle of Black Pepper: A Review of Its Bioactivity and Studies. *Appl Sci*. janeiro de 2019;9(20):4270.
60. Santiago VS, Alvero RG, Villaseñor IM. *Aedes aegypti* larvicide from the ethanolic extract of *Piper nigrum* black peppercorns. *Nat Prod Res*. 4 de março de 2015;29(5):441–3.
61. Rajkumar V, Gunasekaran C, Dharmaraj J, Chinnaraj P, Paul CA, Kanithachristy I. Structural characterization of chitosan nanoparticle loaded with *Piper nigrum* essential oil for biological efficacy against the stored grain pest control. *Pestic Biochem Physiol*. 1º de junho de 2020;166:104566.
62. Il-Kwon Park †, Sang-Gil Lee ‡, Sang-Chul Shin ‡, Ji-Doo Park ‡ and, Young-Joon Ahn* †. Larvicidal Activity of Isobutylamides Identified in *Piper nigrum* Fruits against Three Mosquito Species [Internet]. ACS Publications. American Chemical

- Society; 2002 [citado 6 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf011457a>
63. Sousa JPB, Brancalion APS, Souza AB, Turatti ICC, Ambrósio SR, Furtado NAJC, et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *J Pharm Biomed Anal.* 25 de março de 2011;54(4):653–9.
 64. CNS. Farmacopéia Brasileira- Quarta edição. 1988.
 65. World Health Organization. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides [Internet]. 2005. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>
 66. Höferl M, Wanner J, Tabanca N, Ali A, Gochev V, Schmidt E, et al. Biological Activity of *Matricaria chamomilla* Essential Oils of Various Chemotypes. *Planta Medica Int Open.* agosto de 2020;07(3):e114–21.
 67. Torres RC, Garbo AG, Walde RZML. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. *Asian Pac J Trop Med.* 1º de setembro de 2014;7:S167–70.
 68. Grzybowski A, Tiboni M, Silva MA, Chitolina RF, Passos M, Fontana JD. Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic extracts of *Annona muricata* and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. *Pest Manag Sci.* 1º de maio de 2013;69(5):589–601.
 69. J L-E, S S-N, A T, V P, P V-S, A P, et al. Physiological and biochemical effects of botanical extract from *Piper nigrum* Linn (Piperaceae) against the dengue vector *Aedes aegypti* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* [Internet]. novembro de 2015 [citado 4 de outubro de 2021];114(11). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26277727/>
 70. Competition among *Aedes aegypti* larvae [Internet]. [citado 14 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0202455>
 71. Gomes SVF, Portugal LA, dos Anjos JP, de Jesus ON, de Oliveira EJ, David JP, et al. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchem J.* 1º de maio de 2017;132:28–35.
 72. Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod Process.* 1º de maio de 2018;109:52–73.

73. de Souza Grinevicius VMA, Kwiecinski MR, Santos Mota NSR, Ourique F, Porfirio Will Castro LSE, Andregueti RR, et al. Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2 de agosto de 2016;189:139–47.
74. Machaerium acutifolium compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti* - Melo - 2021 - *Pest Management Science* - Wiley Online Library [Internet]. [citado 17 de novembro de 2021]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.6163>
75. Hashimoto K, YAOI T, KOSHIBA H, YOSHIDA T, MAOKA T, FUJIWARA Y, et al. Photochemical isomerization of piperine, a pungent constituent in pepper. *Food Sci Technol Int Tokyo.* 1996;2(1):24–9.
76. Tiwari A, Mahadik KR, Gabhe SY. Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties. *Med Drug Discov.* 1º de setembro de 2020;7:100027.
77. ANVISA. RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 - Imprensa Nacional [Internet]. 2017 [citado 7 de maio de 2021]. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia>
78. ABNT Catalogo [Internet]. [citado 8 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=375141>
79. ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [citado 8 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology>
80. Luca SV, Gawel-Bęben K, Strzypek-Gomółka M, Czech K, Trifan A, Zengin G, et al. Insights into the Phytochemical and Multifunctional Biological Profile of Spices from the Genus *Piper*. *Antioxidants.* 2021;10(10).
81. Setyaningsih D, Santoso YA, Hartini YS, Murti YB, Hinrichs WLJ, Patramurti C. Isocratic high-performance liquid chromatography (HPLC) for simultaneous quantification of curcumin and piperine in a microparticle formulation containing *Curcuma longa* and *Piper nigrum*. *Heliyon.* 1º de março de 2021;7(3):e06541.
82. Carrara V da S, Serra LZ, Cardozo-Filho L, Cunha-Júnior EF, Torres-Santos EC, Cortez DAG. HPLC Analysis of Supercritical Carbon Dioxide and Compressed Propane Extracts from *Piper amalago* L. with Antileishmanial Activity. *Molecules.* janeiro de 2012;17(1):15–33.
83. Poole CF. Chapter 4 - The Column in Liquid Chromatography. In: Poole CF, organizador. *The Essence of Chromatography* [Internet]. Amsterdam: Elsevier

- Science; 2003 [citado 18 de outubro de 2021]. p. 267–429. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444501981500173>
84. van Ruth SM, Silvis ICJ, Ramos ME, Luning PA, Jansen M, Elliott CT, et al. A cool comparison of black and white pepper grades. *LWT*. 1º de junho de 2019;106:122–7.
 85. Ahmad R, Ahmad N, Shehzad A. 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. *Ind Crops Prod*. 15 de setembro de 2019;136:37–49.
 86. Gorgani L, Mohammadi M, Najafpour GD, Nikzad M. Piperine—The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017;16(1):124–40.
 87. Luca SV, Minceva M, Gertsch J, Skalicka-Woźniak K. LC-HRMS/MS-based phytochemical profiling of Piper spices: Global association of piperamides with endocannabinoid system modulation. *Food Res Int* [Internet]. 003-002 de 2021 [citado 16 de novembro de 2021]; Disponível em: <https://www.meta.org/papers/lc-hrmsms-based-phytochemical-profiling-of-piper/33641990>
 88. Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, et al. Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules*. 7 de abril de 2019;24(7):1364.
 89. Park I-K, Lee S-G, Shin S-C, Park J-D, Ahn Y-J. Larvicidal Activity of Isobutylamides Identified in Piper nigrum Fruits against Three Mosquito Species. *J Agric Food Chem*. 1º de março de 2002;50(7):1866–70.
 90. Maleck M, Ferreira B, Mallet J, Guimarães A, Kato M. Cytotoxicity of piperamides towards *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. março de 2014;51(2):458–63.
 91. Jeon H-J, Kim K, Kim Y-D, Lee S-E. Naturally occurring Piper plant amides potential in agricultural and pharmaceutical industries: perspectives of piperine and piperlongumine. *Appl Biol Chem*. 4 de novembro de 2019;62(1):63.
 92. Hernández-Morales A, Arvizu-Gómez JL, Carranza-Álvarez C, Gómez-Luna BE, Alvarado-Sánchez B, Ramírez-Chávez E, et al. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. *J Asia-Pac Entomol*. 1º de junho de 2015;18(2):227–31.