



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL COMO BIODENFENSOR
DE *Piper tuberculatum* CONTRA MOSQUITOS VETORES DA
DENGUE**

BRENDA REIS COELHO LEOCADIO
MESTRADO

MANAUS/AM
MARÇO/2024

BRENDA REIS COELHO LEOCADIO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL COMO BIODENFENSOR
DE *Piper tuberculatum* CONTRA MOSQUITOS VETORES DA
DENGUE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), exigida para o título de Mestre em Química, com ênfase na linha de pesquisa de Produtos Naturais e Biomoléculas.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA
COORIENTADOR: DR. FELIPE MOURA ARAUJO DA SILVA

MANAUS/AM
MARÇO/2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L576e Leocadio , Brenda Reis Coelho
Estudo fitoquímico e potencial como biodenfsensor de Piper
tuberculatum contra mosquitos vetores da dengue / Brenda Reis
Coelho Leocadio . 2024
70 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Coorientador: Felipe Moura Araujo da Silva
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.


1. Piperaceae. 2. Piper . 3. Atividade larvicida. 4. Aedes. 5.
Amidas . I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL COMO
BIODENFENSOR DE *Piper tuberculatum* CONTRA MOSQUITOS
VETORES DA DENGUE

BRENDA REIS COELHO LEOCADIO


Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como
requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre (a) em Química.

Aprovada em, 08 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente
 RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA
Data: 21/06/2024 16:15:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA (PPGQ-UFAM)

Presidente/Orientadora

Documento assinado digitalmente
 EMMANOEL VILAÇA COSTA
Data: 20/06/2024 18:30:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

EMMANOEL VILAÇA COSTA (PPGQ-UFAM)

Membro Interno

Documento assinado digitalmente
 GEONE MAIA CORREIA
Data: 21/06/2024 16:00:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

GEONE MAIA CORRÊA (ICET-UFAM)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 08 de março de 2024.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao senhor meu DEUS, por me sustentar até aqui, toda honra e toda a glória a Ti. À minha mãe Edsandra Reis e aos meus avôs Damião Leocadio e Josefá Leocadio pela incansável dedicação e empenho a minha educação. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por sempre se fazer presente na minha vida, principalmente nos momentos difíceis.

À minha mãe Edsandra Reis e aos meus avôs Damião Leocadio e Josefá Leocadio, pelo amor, cuidado, orações e por sempre apoiar as minhas decisões.

Ao Roney Azevedo pela ajuda, companheirismo, incentivo e força nos momentos difíceis do mestrado.

Aos meus irmãos Evelin, Yasmim e Henrique pelo apoio.

Às minhas tias Elizete, Ednalda, Eliane e Edilane por todo amor, preocupação, força e incentivo na minha caminhada pessoal e acadêmica.

À minha madrinha Antônia por todo apoio e incentivo.

À minha orientadora Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura, pela confiança depositada durante esses anos, pelos conhecimentos transmitidos, por todo o suporte financeiro e estrutural para finalização desse trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Felipe Moura Araujo da Silva por toda a disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Ingrity Suelen, sou extremamente grata por todo apoio durante o mestrado, por me conforta inúmeras vezes, pelas conversas, pela troca de conhecimento e conselhos.

Aos meus colegas do Laboratório de Abertura de Amostra e Ensaio Químicos (LAEQ), em especial ao Dr. André Correa, Emerson Freire, Natália Cabral, João Sampaio, Thomaz Bruno, Msc. Mídiã Rodrigues pela convivência e troca de conhecimentos. À minha amiga Msc. Yasmin Dias pelo reencontro no mestrado, pelas disciplinas, conselhos e por todo o apoio. Ao Msc. Richard Novais pelos momentos e pela ajuda na coleta botânica. Ao João Calixto pela convivência, apoio, carinho e troca de conhecimento.

Aos meus amigos da graduação, Jéssica Oliveira, Otaniel Vaz, Ewerton Ramos e Renan Martins pelos momentos compartilhados no curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio, carinho e incentivo nessa caminhada acadêmica.

À minha amiga Tainá Vinente pela amizade, conselhos e apoio.

À minha querida amiga Maysa Inácio mesmo de longe sempre enviando energias positivas, por sua amizade verdadeira e companheirismo nas aulas da graduação.

Aos meus colegas da Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFAM, Josias Martins, Aldimara Faba, Leandro Tavares, Brenna Ferreira, Márcia Araújo e Msc. Sarah Flores, por todos os momentos compartilhados nas aulas, pelas conversas durante o almoço e lanche, pelo conforto proporcionado durante o meu mestrado.

Aos meus colegas da Central Analítica da UFAM, Marcos e Elaine, pelas conversas e pelo apoio na minha qualificação e defesa. Aos meus colegas do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA), Msc. Ronei Negreiros e Dra. Rita Cynara pelo apoio, principalmente na minha qualificação, pela troca de conhecimentos e pelos momentos compartilhados durante os cursos realizados no INPA.

À UFAM, ao Departamento de Química (DQ) e ao PPGQ-UFAM pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

A todos os professores que contribuíram na minha formação pessoal e acadêmica em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFAM, Dr. Afonso Duarte, Dr. Alan Diego, Dr. Alison Meza, Dr. Anderson Guimarães, Dr. Héctor Koolen, Dr. Marcos Machado e Dra. Rita Nunomura.

Ao INPA, na pessoa do Dr. Sergio Massayoshi Nunomura pela contribuição na coleta botânica.

À Profa. Dra. Micheline Carvalho Silva do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília (UNB) pela identificação da espécie.

À Central Analítica da UFAM, LAEQ, Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab), Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM), pela disponibilidade do espaço e pela colaboração das análises realizadas desse estudo.

Ao Laboratório de Malária e Dengue do INPA pela colaboração nos ensaios larvicidas.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Maria Belém e Dr. Adrian Pohlit, por aceitarem o convite e por suas valiosas contribuições.

À CAPES e FAPEAM, pelos auxílios concedidos para realização desse trabalho.

Por fim, meus agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para concretização dessa dissertação.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor importante na transmissão do vírus da dengue, sendo responsável por causar problemas graves de saúde, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. É fundamental adotar medidas de controle vetorial e prevenção para evitar a proliferação desses mosquitos e minimizar a transmissão dessas doenças. O uso de plantas para o controle de mosquitos é uma alternativa promissora, especialmente em áreas amazônicas, devido à alta biodiversidade e abundância de espécies de plantas com compostos químicos com atividade larvicida, tal como a espécie *Piper tuberculatum* Jacq. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a investigação fitoquímica e avaliar a atividade larvicida de extratos, frações e substâncias isoladas das folhas de *P. tuberculatum* para o controle de *A. aegypti*. O extrato bruto das folhas foi obtido por maceração exaustiva em metanol com auxílio de ultrassom, sendo em seguida submetido a fracionamento em coluna filtrante. O extrato e suas frações tiveram o seu perfil químico investigado por espectrometria de massas. A fração AcOEt 100% (EMFPT-3) foi submetida à purificação em sistema CLAE semipreparativo, resultando no isolamento das amidas *cis*-piplartina, piplartina e 4,5-diidropiperlonguminina, as quais tiveram suas estruturas determinadas por métodos espectroscópicos e espectrométricos (RMN 1D e 2D; EM). O extrato metanólico e as frações resultantes da coluna filtrante foram submetidos ao ensaio larvicida frente à *A. aegypti* através do protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), com algumas modificações. As frações Hex/AcOEt 1:1 (EMFPT-2); AcOEt 100% (EMFPT-3) e AcOEt/MeOH 1:1 (EMFPT-4) apresentaram atividade larvicida com mortalidade entre 92 e 100% sobre *A. aegypti*, após 24 horas de exposição, demonstrando ser uma alternativa viável no controle do vetor. Enquanto, as amidas isoladas *cis*-piplartina, piplartina e 4,5-diidropiperlonguminina apresentaram atividade larvicida contra *A. aegypti*, causando mortalidade variando de 2 ± 0 a $97 \pm 2\%$ e CL_{50} de 23.77 e 30.18 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, os resultados obtidos reforçam o potencial larvicida previamente reportado para a espécie *P. tuberculatum* e outras espécies do gênero, além de demonstrar o potencial de amidas como agentes químicos promissores para o controle de doença tropical, tal como dengue.

Palavras chaves: Piperaceae, *Piper*, atividade larvicida, *Aedes*, amidas.

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* is an important vector in the transmission of the dengue virus, responsible for causing serious health problems, especially in tropical and subtropical regions. It is crucial to adopt vector control and prevention measures to prevent the proliferation of these mosquitoes and minimize the transmission of these diseases. The use of plants for mosquito control is a promising alternative, especially in Amazonian areas, due to the high biodiversity and abundance of plant species with chemical compounds exhibiting larvicidal activity, such as *Piper tuberculatum* Jacq. Therefore, the aim of this study was to conduct phytochemical investigation and evaluate the larvicidal activity of extracts, fractions, and isolated compounds from *P. tuberculatum* leaves against *A. aegypti*. The crude extract from the leaves was obtained by exhaustive maceration in methanol with ultrasound assistance, followed by fractionation using a column filter. The chemical profile of the extract and its fractions was investigated using mass spectrometry. The 100% ethyl acetate fraction (EMFPT-3) underwent purification by semi-preparative HPLC, resulting in the isolation of *cis*-piplartine, piplartine, and 4,5-dihydropiperlonguminine amides, whose structures were determined by spectroscopic and spectrometric methods (1D and 2D NMR; MS). The methanolic extract and fractions from the column filter were tested for larvicidal activity against *A. aegypti* following the World Health Organization (WHO, 2005) protocol, with some modifications. The Hex/EtOAc 1:1 (EMFPT-2), 100% EtOAc (EMFPT-3), and EtOAc/MeOH 1:1 (EMFPT-4) fractions exhibited larvicidal activity with mortality rates between 92% and 100% against *A. aegypti* after 24 hours of exposure, demonstrating to be a viable alternative for vector control. Meanwhile, the isolated amides *cis*-piplartine, piplartine, and 4,5-dihydropiperlonguminine showed larvicidal activity against *A. aegypti*, causing mortality ranging from 2 ± 0 to $97 \pm 2\%$ and LC₅₀ values of 23.77 and 30.18 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, the results reinforce the larvicidal potential previously reported for *P. tuberculatum* and other species of the genus, as well as demonstrating the potential of amides as promising chemical agents for the control of tropical diseases such as dengue.

Keywords: Piperaceae, *Piper*, larvicidal activity, *Aedes*, amides,

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D/2D: Uma dimensão/ Duas dimensões

AcOEt: Acetato de etila

APCI: Ionização química à pressão atmosférica (do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*)

C18: Octadecilsilano

CC: Cromatografia em coluna aberta

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

COSY: *Correlated spectroscopy*

Da: Dalton

DMSO: Dimetilsulfóxido

EM: Espectrometria de massas

EMFPT: Extrato metanólico das folhas de *Piper tuberculatum*

Fr: Fração

Hex: Hexano

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Hz: Hertz

IC₅₀: Capacidade inibitória

J: constante de acoplamento

m/z: Razão massa/carga

m: multiplete

MeOD: Metanol deuterado

MeOH: Metanol

MS²: Espectrometria de massa em tandem

RMN: Ressonância Magnética Nuclear (do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*)

s: simpleto

t: tripleto

TIC: Cromatograma de íons totais

TMS: Tetrametilsilano

Tr: Tempo de retenção

UV/ Vis: Ultravioleta/visível

δ_c : deslocamento químico de carbono

δ_H : deslocamento químico de próton

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da Família Piperaceae	20
Figura 2. Distribuição de Piperaceae nas regiões brasileiras	21
Figura 3. Distribuição fitogeográfica de espécies de <i>Piper</i> no Brasil	22
Figura 4. Estrutura química piperina	22
Figura 5. Estrutura química das principais kavalactonas presentes no rizoma de kava-kava.....	23
Figura 6. Estruturas de alguns fenilpropanoides isolados de <i>P. marginatum</i>	24
Figura 7. Estruturas de alguns cromenos e derivado de ácido benzoico isolados de <i>P. aduncum</i>	25
Figura 8. Estruturas de alguns flavonoides isolados de <i>P. hispidum</i>	25
Figura 9. Estruturas de algumas lignanas isoladas de <i>P. solmsianum</i>	26
Figura 10. Proposta biossintética da Piperina	27
Figura 11. Distribuição geográfica de <i>P. tuberculatum</i> no Brasil.....	30
Figura 12. Substâncias isoladas dos frutos de <i>P. tuberculatum</i>	31
Figura 13. Substâncias isoladas das sementes e de folhas de <i>P. tuberculatum</i>	31
Figura 14. Casos prováveis de dengue no Brasil, ano de 2023 e 2024	32
Figura 15. Espectro de massas full scan em fonte APCI, no modo positivo do extrato metanólico de <i>P. tuberculatum</i>	39
Figura 16. Espectro de APCI-MS ² (no modo positivo) do íon de <i>m/z</i> 318, presente nas folhas de <i>P. tuberculatum</i>	40
Figura 17. Proposta de fragmentação para o íon de <i>m/z</i> 318.....	40
Figura 18. Espectro de APCI-MS ² (no modo positivo) do íon de <i>m/z</i> 276, presente nas folhas de <i>P. tuberculatum</i>	41
Figura 19. Proposta de fragmentação para o íon de <i>m/z</i> 276.....	41
Figura 20. Espectro de APCI-MS ² (no modo positivo) do íon de <i>m/z</i> 274, presente nas folhas de <i>P. tuberculatum</i>	42
Figura 21. Proposta de fragmentação para o íon de <i>m/z</i> 274.....	42
Figura 22. Cromatograma da fração EMFPT-3 em CLAE-UV/vis (280 e 320nm).....	43
Figura 23. (A) Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da amostra PTF - 03 (B) ampliação da região dos prótons alifáticos e (C) ampliação da região dos prótons aromáticos e olefínicos.	44
Figura 24. Estrutura da amida PTF-03	45

Figura 25. (A) Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 500 MHz) da amostra PTF-06 (B) ampliação da região dos prótons alifáticos e (C) ampliação da região dos prótons aromáticos e olefínicos.	47
Figura 26. Estrutura da amida PTF-06	48
Figura 27. (A) Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 500 MHz) da amostra PTF-07 (B) ampliação da região dos prótons aromáticos e olefínicos, e (C) ampliação da região dos prótons alifáticos.	50
Figura 28. Mapa de correlação COSY (A) ampliação da região dos prótons olefínicos (B) ampliação da região dos prótons alifático e (C) ampliação da região dos prótons olefínicos.	51
Figura 29. Mapa de correlação HSQC (A) ampliação da região dos prótons alifáticos (B) ampliação da região dos prótons olefínicos e aromáticos.	53
Figura 30. Mapa de correlação HSQC	54
Figura 31. Estrutura da amida PTF-07	54
Figura 32. Atividade do extrato e frações frente a larvas de <i>A. aegypti</i>	56

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Procedimento realizado para obtenção do extrato metanólico..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amidas isoladas do gênero <i>Piper</i>	27
Tabela 2. Sistemas de eluentes utilizados no fracionamento do EMFPT.....	36
Tabela 3. Picos anotados da fração EMFPT-3 em CLAE-UV e EM	43
Tabela 4. Dados de RMN de ¹ H da amostra PTF-03.....	45
Tabela 5. Dados de RMN de ¹ H da amostra PTF-06.....	48
Tabela 6. Dados de RMN da amostra PTF-07.....	55
Tabela 7. Atividade larvicida frente as larvas de <i>A. aegypti</i> das substâncias isoladas da fração EMFPT-03 (<i>cis</i> -piplartina, piplartina e, 4,5-diidropiperlonguminina).....	57

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Geral.....	19
2.2	Específicos	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Piperaceae	20
3.2	O gênero <i>Piper</i>	21
3.2.1	Aspectos etnobotânicos	23
3.2.2	Aspectos fitoquímicos	24
3.2.2.1	Amidas.....	26
3.2.2.2	Amidas isoladas	27
3.2.3	Aspectos biológicos	28
3.3	A espécie <i>Piper tuberculatum</i> Jacq.	29
3.4	O vírus da dengue (DENV)	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Solventes	34
4.2	Análises cromatográficas	34
4.2.1	Cromatografia em coluna (CC).....	34
4.2.2	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	34
4.2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	34
4.3	Métodos espectroscópicos e espectrométricos	34
4.4	Coleta e identificação botânica	35
4.5	Processo de secagem e moagem do material botânico	35
4.6	Análise fitoquímica das folhas de <i>P. tuberculatum</i>	35
4.6.1	Preparo do extrato metanólico	35
4.6.2	Análise espectrométrica do extrato metanólico	36
4.6.3	Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico	36
4.6.4	Análise espectrométrica das frações obtidas na coluna filtrante.....	37
4.6.5	Fracionamento e isolamento da fração EMFPT-3	37
4.7	Ensaio larvicida.....	37
4.7.1	Ensaio larvicida frente às larvas de <i>A. aegypti</i>	37
4.7.1.1	Preparo das amostras do extrato e frações.....	38
4.7.1.2	Preparo das amostras das substâncias isoladas.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1	Perfil químico do extrato metanólico das folhas de <i>P. tuberculatum</i> por espectrometria de massas.....	39
5.2	Análise por CLAE-UV/Vis e isolamentos das substâncias de EMFPT-3	42
5.3	Determinação estrutural da amostra PTF-03	43
5.4	Determinação estrutural da amostra PTF-06	46
5.5	Determinação estrutural da amostra PTF-07	49
5.6	Atividade larvicida frente às larvas de <i>A. aegypti</i>	55
5.6.1	Atividade larvicida do extrato metanólico e frações das folhas de <i>P. tuberculatum</i>	55
5.6.2	Atividade larvicida das substâncias isoladas das folhas de <i>P. tuberculatum</i>	56
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos pertencentes à família Culicidae, popularmente conhecidos como “pernilongos”, “muriçocas” ou “carapanãs”. Esta família tem atraído atenção em termos de saúde pública devido esses vetores serem responsáveis por difundir agentes patogênicos causadores de doenças como a malária, dengue, febre amarela, zika e entre outras arboviroses (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Conforme o WHO (2023) a dengue anualmente afeta milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em países tropicais e subtropicais e, em vista disso, verifica-se a importância dos estudos em mosquitos para o controle da transmissão destas doenças. Entre os insetos vetores de patógenos, o mosquito *Aedes aegypti* é o principal transmissor do vírus da dengue no Brasil, e pode transmitir os vírus chikungunya, zika e febre amarela (GESTO *et al.*, 2021; WHO, 2023).

Devido ao seu papel como vetores de doenças, os mosquitos são alvo de intensos esforços de controle em muitas partes do mundo, cujo controle vetorial adotado em muitas vezes envolve medidas como uso de repelentes, mosquiteiros, a eliminação de criadouros de mosquitos e, em alguns casos, o uso de inseticidas químicos para reduzir as populações de mosquitos em áreas afetadas (ROZENDAAL, 1997; TAUIL, 2006). No entanto, esses inseticidas químicos têm levado a uma série de problemas ecológicos como desenvolvimento de cepas resistentes, desequilíbrio ecológico, bem como outros danos a outros organismos (CAMPOS; ANDRADE, 2001; FEO; ELJARRAT; BARCELÓ, 2010).

Assim, faz-se necessário desenvolver alternativas ecologicamente viáveis por meio de investigações com potencial larvicida (GARCEZ *et al.*, 2013). Diante disso, nos últimos anos, diversos estudos têm enfatizado a utilização de extratos e óleos essenciais com efeito larvicida (FURTADO *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2014).

Na Região Amazônica, concentra-se aproximadamente 60.000 espécies de plantas, apesar dessa potencialidade, muitas não foram estudadas do ponto de vista químico e outras ainda nem foram catalogadas (FÃO *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2017). Em meio a esta grande diversidade, ressalta-se a família Piperaceae, especialmente o gênero *Piper*, pelo uso de inúmeras espécies na medicina popular, algumas das quais são conhecidas por apresentarem uma ampla quantidade de metabólitos secundários com atividades biológicas comprovadas, em destaque com potencial larvicida (SPLETOZER *et al.*, 2021). A espécie *Piper tuberculatum* sendo amplamente encontrada em diversos

estados do Brasil, possui entre seus metabólitos secundários bioativos, amidas, substâncias promissoras como larvicida (GARCEZ *et al.*, 2013).

Neste contexto, o presente trabalho consistiu na investigação química da espécie *P. tuberculatum* da família Piperaceae, bem como na avaliação do potencial larvicida frente às larvas de *A. aegypti* do extrato metanólico e substâncias isoladas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar o estudo da composição química das folhas da espécie *Piper tuberculatum*, assim como avaliar a sua atividade larvicida contra *A. aegypti*.

2.2 Específicos

- Caracterizar o perfil químico do extrato metanólico das folhas de *P. tuberculatum* por espectrometria de massas;
- Avaliar o perfil cromatográfico de frações e substâncias obtidas por meio de métodos cromatográficos e espectrométricos;
- Desenvolver metodologia analítica de separação das substâncias obtidas por CLAE-UV/Vis;
- Isolar as substâncias por meio de técnicas modernas de cromatografia;
- Identificar através de RMN 1D/2D e espectrometria de massas (EM) as substâncias isoladas;
- Avaliar a atividade larvicida contra *A. aegypti* do extrato metanólico e substâncias isoladas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Piperaceae

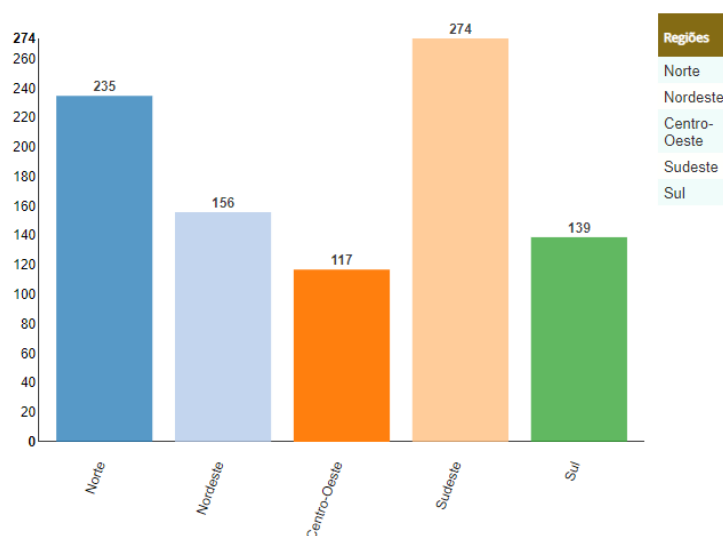
Piperaceae representa uma das angiospermas mais primitivas da ordem Piperales. É uma família com distribuição pantropical (Figura 1), constituída atualmente por cerca de 4.300 espécies, agrupadas em cinco gêneros: *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Manekia* Trel., *Zippelia* Blume e *Verhuellia* Miq. Dentre esses gêneros, o *Piper* é o mais abundante, seguido por *Peperomia* (APG IV, 2016; CALLEJAS, 2020).

Figura 1. Distribuição mundial da Família Piperaceae



FONTE: THE COMPOSITA E HUT (2023)

Em todo o Brasil foram relatados 3 gêneros (*Manekia*, *Peperomia* e *Piper*) e 472 espécies, ocorrendo preferencialmente em locais úmidos e sombreados. Na região Norte têm a distribuição de 235 espécies registradas (Figura 2), das quais 172 encontram-se no estado do Amazonas, (GUIMARÃES *et al.*, 2023). Os representantes desta família são conhecidos por diversas formas, que podem variar de ervas, herbáceas a pequenas árvores, ainda arbustos, lianas e epífitas (WANKE *et al.*, 2007).

Figura 2. Distribuição de Piperaceae nas regiões brasileiras

FONTE: REFLORA (2023)

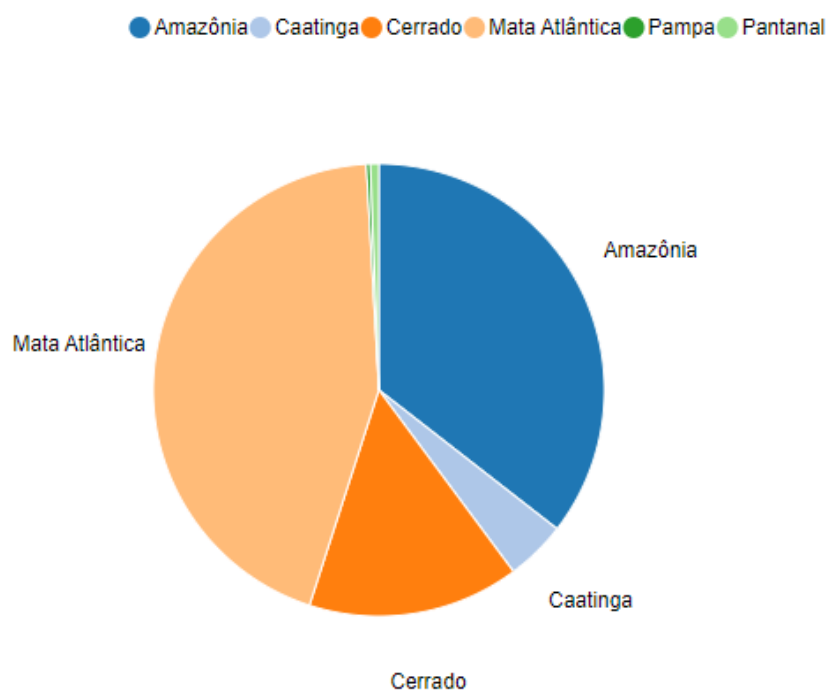
Esta família é caracterizada quimicamente pela produção de amidas como principal metabólito secundário, e além dessas, são comumente encontradas em suas espécies: alcaloides, fenilpropanoides, derivados de ácidos benzoicos, cromenos, flavanoides, lignanas, neolignanas, terpenos e outras classes de produtos naturais (AVELLA; DÍAZ; DE DÍAZ, 1994; ALÉCIO *et al.*, 1998; MARTINS *et al.*, 1998; DE SOUZA, 2005; KITAMURA *et al.*, 2006; LAGO *et al.*, 2009; TICONA *et al.*, 2022).

Devido à rica diversidade de compostos químicos relatados nas espécies de Piperaceae tem-se resultados promissores em ensaios biológicos de diferentes tipos, tais como anti-inflamatório (EE *et al.*, 2010), antimalárico (PUTRI; NOLI, 2021), antimicrobiana (CUNICO *et al.*, 2004), antitumoral (MENDES *et al.*, 2017), ansiolíticos (ZIMATH *et al.*, 2017), antioxidante (YAMAGUCHI *et al.*, 2006), inseticida (SANTOS *et al.*, 2010) e larvicida (LIMA MOREIRA *et al.*, 2014).

3.2 O gênero *Piper*

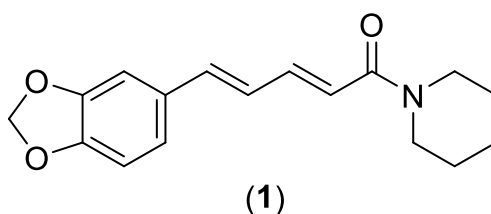
Piper é considerado o gênero mais representativo da família Piperaceae, constituído botanicamente por 2.600 espécies distribuídas pantropicalmente, com a maioria concentrada nas regiões neotropicais (MARTINEZ *et al.*, 2015; CALLEJAS, 2020). As espécies de *Piper* são representadas como árvores, arbustos, ervas e, raramente, lianas e epífitas (JARAMILLO; MANOS, 2001).

No Brasil estão catalogadas 299 espécies do gênero *Piper*, dentre essas 194 são endêmicas. Distribuem-se de forma expressiva nos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica e Amazônia, conforme mostra a figura 3 (GUIMARÃES; MEDEIROS; QUEIROZ, 2023).

Figura 3. Distribuição fitogeográfica de espécies de *Piper* no Brasil

FONTE: REFLORA (2023)

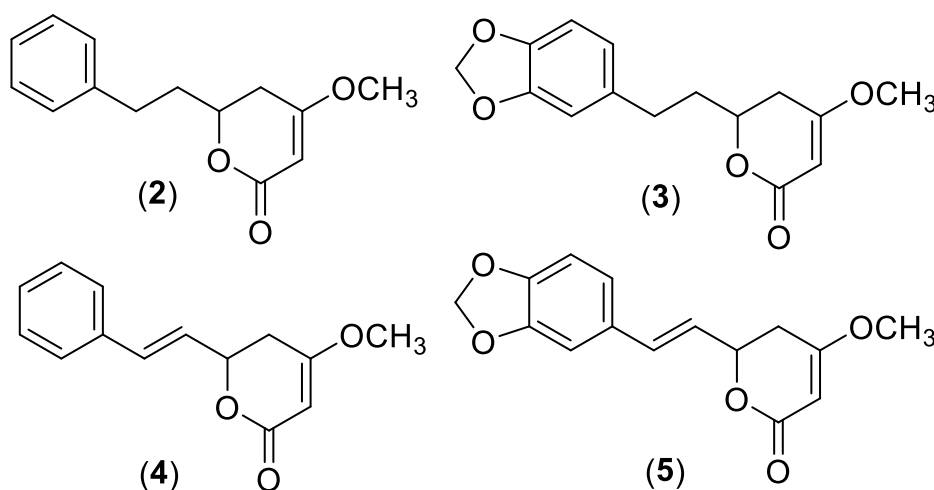
Do ponto de vista econômico, o gênero *Piper* é extremamente importante, especialmente devido a espécie *Piper nigrum* L. (denominação popular: pimenta-do-reino), uma das especiarias mais comercializadas em todo o mundo. A substância responsável pelo sabor pungente e característico da pimenta-do-reino é a piperina (1) representada na Figura 4, a primeira amida representada isolada de espécies de *Piper* (DYER; PALMER, 2004; SRINIVASAN, 2007; FRANÇA *et al.*, 2021).

Figura 4. Estrutura química piperina

Outra espécie de interesse econômico é a *Piper methysticum* G. Forster (denominação popular: kava-kava), cujos rizomas são utilizados para preparar o chá de kava-kava, um potente ansiolítico e relaxante difundido na região da Oceania. Estas atividades foram atribuídas aos seus princípios ativos conhecidos como as kavalactonas denominadas: diidrokaína (2), diidrometisticina (3), kavaína (4) e metisticina (5) reportadas na Figura 5 (CLOUATRE, 2004). Além disso, é a única do gênero reconhecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil como medicamento

fitoterápico, onde a Resolução nº 356, 2002 e IN nº 2/2014 estabelecem registros simplificados de produtos à base dessa espécie no país (BRASIL, 2002; 2014).

Figura 5. Estrutura química das principais kavalactonas presentes no rizoma de kava-kava



3.2.1 Aspectos etnobotânicos

Diversas espécies pertencentes ao gênero *Piper* apresentam relatos de aplicações medicinais. Por exemplo, a *Piper marginatum* Jacq. (denominação popular: bitre, caapeba-cheirosa, nhandi, nhambui, pimenta do cheiro, pimenta-do-mato e pimenta-dos-índios) é predominante no Brasil, Suriname e Guiana Francesa, citada pelo uso medicinal para tratamento de dores de cabeça, erisipela, tumores e doenças hepáticas (RIOS; PASTORE, 2011). As raízes amassadas são empregadas por povos indígenas para alívio da dor e coceira causadas pela picada de insetos; os frutos são descritos como excitantes, enquanto as folhas estimulatórias (DI STASI; HIRUMA LIMA, 2002).

A espécie *Piper hispidum* Sw. é outra de interesse medicinal popular (denominação popular: jabori, falso-jaborandi, matico, aperto-joão, matico-falso, aperta-ruão e beque), no Brasil suas folhas, raízes e frutos possuem propriedades adstringentes, diuréticos e estimulantes, e empregado como desobstruentes do fígado (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004). Esta espécie também tem sido usada contra dores de estômago e como repelente de insetos.

A *Piper aduncum* L. (denominação popular: pimenta-de-macaco, pimenta-de-fruto-ganchoso, tapa-buraco, aperta-ruão e pimenta-longa) é nativa da Amazônia, encontrada desde a América do Sul e em todo o Brasil (Yuncker, 1972). No Amazonas e Peru Amazônico a utilização medicinal é através da infusão e decocção das suas folhas, para o tratamento de infecções do trato urinário, resfriados e bronquite e úlceras (Mejía; RENGIFO, 2000). No Nordeste as suas inflorescências têm sido utilizadas na forma de

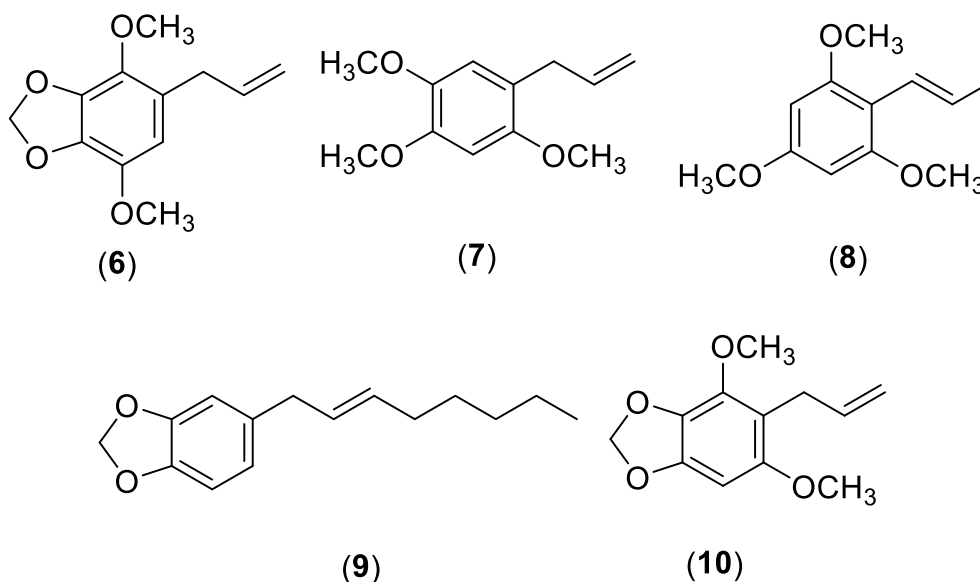
decoção no tratamento de doenças venéreas e infecções do trato urinário (AGRA; FREITAS; BARBOSA, 2007).

3.2.2 Aspectos fitoquímicos

Muitos estudos químicos com espécies de *Piper* têm relevado uma grande variedade de compostos bioativos isolados, tais como kavalactonas (XUAN *et al.*, 2008), cromenos (BALDOQUI *et al.*, 1999; PUHL *et al.*, 2011), fenilpropanoides (BEZERRA; RAMOS, 2021), lignanas e neolignanas (BENEVIDES; SARTORELLI; KATO, 1999; MARTINS *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2016), terpenos (SCOTT *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2018), e ainda amidas (MIRANDA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002) sendo estes os metabólitos mais característicos deste gênero.

O estudo químico realizado com raízes de *P. marginatum* Jacq., resultou no isolamento de cinco fenilpranoides, denominados de apiol (6), isoasarona (7), marginatina (8), pipermagina (9) e 2,6-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-1-(2-propenil) benzeno (10) (Figura 6), (Santos *et al.*, 1998). Em outro estudo, a partir do extrato hexânico do fruto *P. marginatum*, foram isolados 1-(1-Z-propenil) -2,4,6-trimetoxibenzeno e o ácido 3-farnesil-4-hidroxi-benzóico e do extrato clorofórmico, foi isolado o óxido cariofileno (CHAVES; SANTOS, 2002).

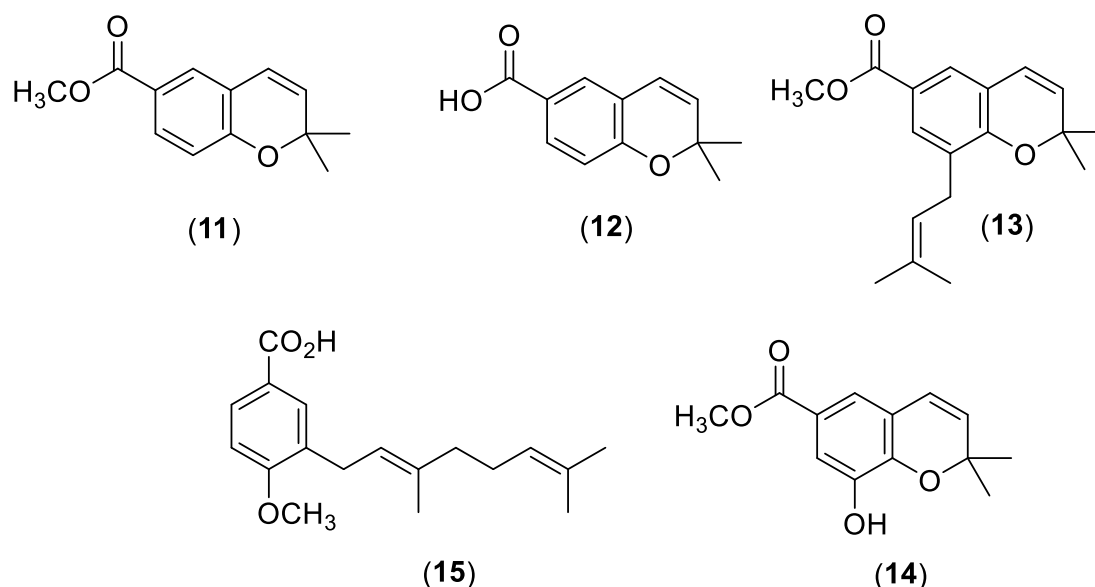
Figura 6. Estruturas de alguns fenilpropanoides isolados de *P. marginatum*



Baldoqui *et al.* (1999) isolaram do extrato metanólico das folhas de *P. aduncum* um cromeno, 2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila (11). Ainda no mesmo trabalho isolaram cromenos conhecidos: ácido 2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico (12), 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metila (13) e 8-

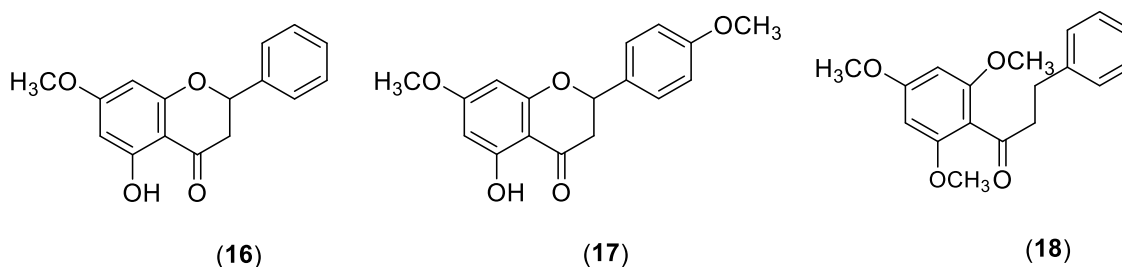
hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de metil (**14**), bem como derivado do ácido benzoico 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-ácido metoxibenzoico (**15**), (Figura 7).

Figura 7. Estruturas de alguns cromenos e derivado de ácido benzoico isolados de *P. aduncum*



O extrato etanólico das inflorescências de *P. hispitum* Kunth foi investigado fitoquimicamente por Plazas *et al.* (2008), em que permitiu o isolamento de três flavonoides: 5-hidroxi-7-metoxiflavona (**16**), 2',4,6'-trimetoxidihidrochalcona (**17**) e 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona (**18**), (Figura 8).

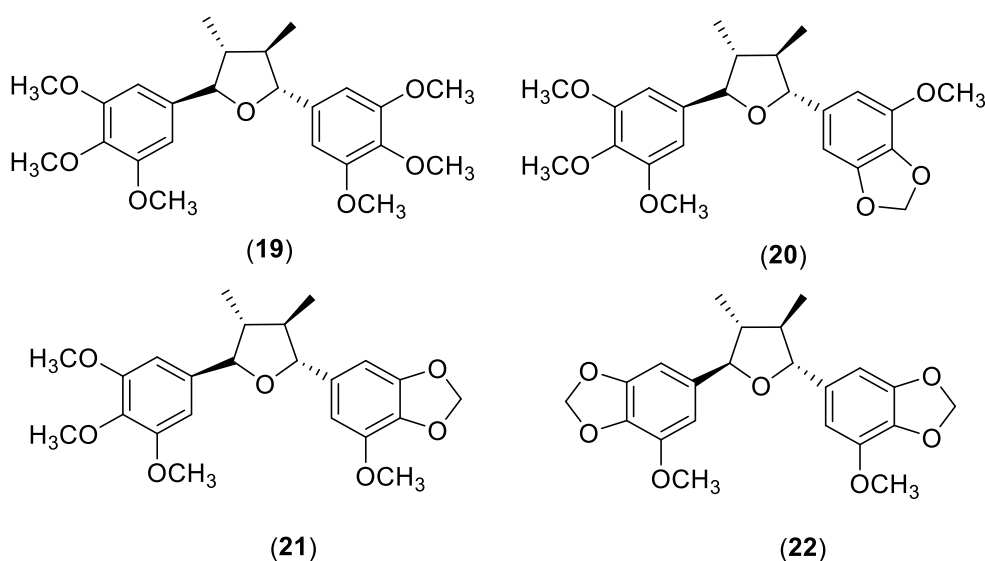
Figura 8. Estruturas de alguns flavonoides isolados de *P. hispitum*



No estudo conduzido por Martins *et al.* (2000), foram avaliados os aspectos químicos de *Piper solmsianum* C.D.C, resultando no isolamento de cinco fenilpropanoides e duas lignanas tetrahydrofurânicas denominadas de (-)-grandisina (**19**), e (7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (**20**), obtidas do extrato acetato de etila de folhas e caules. Em uma continuação da investigação química de *P. solmsianum*, Martins *et al.*, 2003 relataram o isolamento de dois fenilpropanoides, juntamente com duas lignanas tetrahydrofurânicas, a rel-(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (**21**) e rel-(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimetilenodioxi-5,5'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana (**22**) e, ainda

uma lignana tretahidrofurânica conhecida: (-)-grandisina (**19**) a partir o extrato acetato de etila da inflorescência dessa espécie (Figura 9).

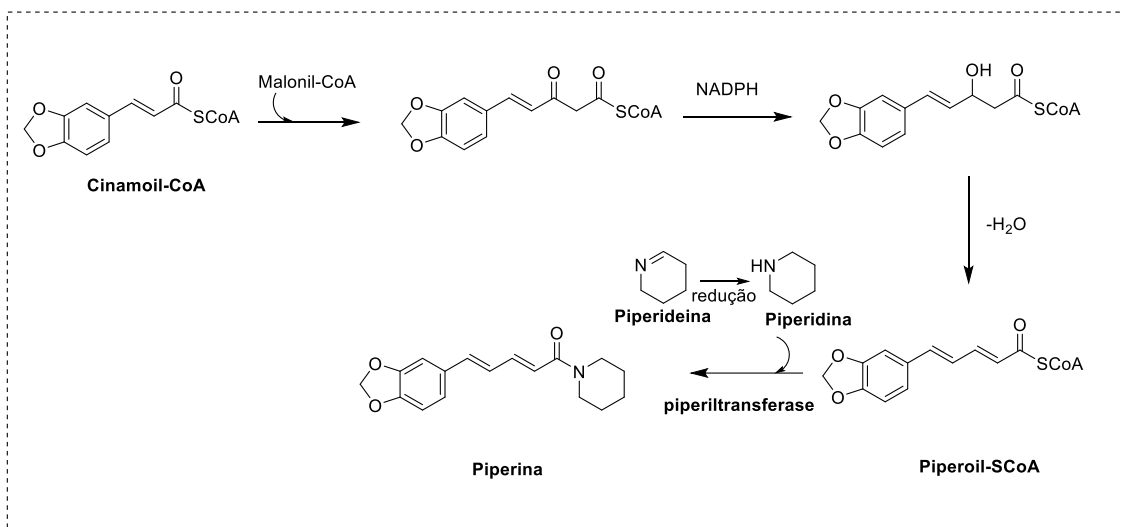
Figura 9. Estruturas de algumas lignanas isoladas de *P. solmsianum*



3.2.2.1 Amidas

As amidas são substâncias nitrogenadas, derivadas da amônia (NH_3), pela substituição de um ou mais átomos de hidrogênio por igual número de radicais monoacilas (GARCEZ *et al.*, 2013). Do ponto de vista biossintético, há poucos relatos detalhados na literatura, no entanto sua biossíntese está diretamente ligada à classe a qual pertence. Estudos têm permitido a caracterização de diversos grupos de Piperaceae contendo amidas, oriundas da condensação de ácidos graxos e pela via mista (ácido chiquímico/policetídic) (KATO *et al.*, 2004).

Na figura 10 (p. 27), tem-se a proposta biossintética da piperina, uma amida isolada de espécies de Piperaceae. A porção acil da molécula da piperina, tem como precursor o derivado do cinamoil-CoA, no qual é oriundo do ácido chiquímico. Posteriormente, o derivado do cinamoil-CoA tem sua cadeia carbônica estendida por meio da incorporação de uma unidade de malonil-CoA, a qual sofre posterior redução, via catálise enzimática, seguida por uma desidratação, formando o tioéster piperoil-CoA. Em seguida, o anel piperidina é incorporado através do produto de redução da piperideina, onde o tioéster piperoil-CoA reage com a piperidina originando a piperina (DEWICK, 2002).

Figura 10. Proposta biossintética da Piperina

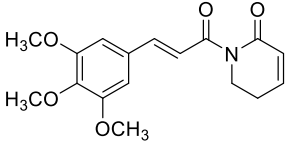
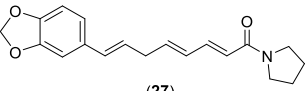
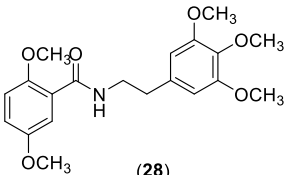
FONTE: ADAPTADO DE DEWICK (2002)

3.2.2.2 Amidas isoladas

Desde o isolamento da piperina, uma variedade de outras amidas foram isoladas de diferentes espécies desse gênero, tornando-as fontes promissoras de metabólitos bioativos (ADDAE; ACHIENG, 1986; TANG *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2017), com atividades biológicas variadas. Na tabela 1, encontram-se algumas amidas isoladas do gênero *Piper* com propriedades biológicas.

Tabela 1. Amidas isoladas do gênero *Piper*

Substância	Espécie de <i>Piper</i>	Atividade biológica	Referência
Aduncamida (23)	<i>P. aduncum</i>	Citotóxica Antibacteriana	ORJALA <i>et al.</i> , 1994
Corcovadina (24)	<i>P. scutifolium</i>	Antifúngica	MARQUES <i>et al.</i> , 2007
Piperovatina (25)	<i>P. ovatum</i>	Anti-tripanosoma	VEIGA-SANTOS <i>et al.</i> , 2013

<p style="text-align: center;">Piplartina</p>  <p style="text-align: center;">(26)</p>	<p style="text-align: center;"><i>P. arborens</i> <i>P. divaricatum</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. longum</i> <i>P. chaba</i></p>	<p style="text-align: center;">Antitumoral Bactericida Anti-inflamatória</p>	<p style="text-align: center;">TSAI <i>et al.</i>, 2005; BEZERRA <i>et al.</i>, 2008 SRINIVASA REDDY <i>et al.</i>, 2001; MORIKAWA <i>et al.</i>, 2004</p>
<p style="text-align: center;">Sarmentosina</p>  <p style="text-align: center;">(27)</p>	<p style="text-align: center;"><i>P. nigrum</i></p>	<p style="text-align: center;">Antituberculose</p>	<p style="text-align: center;">KIUCHI <i>et al.</i>, 1987</p>
<p style="text-align: center;">Taiwanamida C</p>  <p style="text-align: center;">(28)</p>	<p style="text-align: center;"><i>P. taiwanese</i></p>	<p style="text-align: center;">Anti-agregação de plaquetas</p>	<p style="text-align: center;">CHEN <i>et al.</i>, 2004.</p>

3.2.3 Aspectos biológicos

Estudos com extratos brutos e substâncias isoladas de espécies de *Piper* têm demonstrado resultados satisfatórios em testes de atividade biológica, indicando potencial terapêutico nas espécies desse gênero.

Santos *et al.* (2010) avaliaram o potencial inseticida do extrato acetônico das folhas de *P. hispidum* sobre a broca do café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera) em aplicação tópica, superfície contaminada e efeito de repelência. Na exposição em superfície contaminada, observaram 100% de mortalidade, na concentração de 25,0 mg/mL, após 48 h. Enquanto, na aplicação tópica, observaram 60 a 65 % de mortalidade, após 48 h de exposição na concentração de 0,1 a 25,0 mg/mL.

O extrato etanólico obtido das folhas de *P. aduncum* apresentou atividade antidepressivas e anisolíticas (OESTERREICH *et al.*, 2015). Além disso, o extrato diclorometano, etanólico e hexânico apresentaram 100% de mortalidade contra larvas de *A. aegypti*, nas concentrações de 12,5 mg/mL, 25 mg/mL e 50 mg/mL, respectivamente, após 24 h de tratamento, conforme observado no estudo de Ridzuan *et al.* (2019).

Na investigação com extratos etanólicos de folhas e inflorescências de *P. marginatum*, os mesmos apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 e *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (GAMBOA *et al.*, 2018).

Os extratos hexânicos e metanólicos de *Piper peltatum* e *Piper umbellatum* foram testados *in vitro* e *in vivo* frente a espécies de *Plasmodium* demonstrando atividade antimalárica (FÁTIMA FERREIRA-DA-CRUZ *et al.*, 2000). A substância majoritária de *P. peltatum* é o 4-nerolidilcatecol, um terpeno/fenil propanoide, a quem é atribuída a atividade antimalárica para estas espécies (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007).

O estudo da atividade antioxidante do extrato etanólico de *Piper cubeba* exibiu a eliminação dos radicais livres, assim atividade foi atribuída aos compostos presentes, especialmente os polifenóis (NAHAK; SAHU, 2011). Agbor *et al.* (2012) também observaram o efeito antioxidante de *Piper guineense*, *Piper umbellatum* e *P. nigrum*.

As lignanas (**19**, **21** e **22**, p. 26) isoladas da inflorescência de *P. solmsianum* apresentaram atividade antichagásica *in vitro* contra a forma tripomosatigota do *Trypanosoma cruzi*, com IC₅₀ de 8,74 µg/mL, 17,6 µg/mL e 3,74 µg/mL, respectivamente (MARTINS *et al.*, 2003).

O flavonoide 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona (**16**, p. 25), isolado da inflorescência de *P. hispidum* quando submetida ao bioensaio de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, apresentou atividade tóxica frente ao microcrustáceo (CL₅₀ 1,8 µg/mL) (PLAZAS *et al.*, 2008).

3.3 A espécie *Piper tuberculatum* Jacq.

A *P. tuberculatum* tem a denominação popular de pimenta-de-macaco, pimenta-longa ou pimenta-d'Arda e apresenta-se como arbusto medindo aproximadamente de 2 a 2,5 m de altura. É uma planta medicinal, utilizada na forma de infusão de seus frutos e folhas como analgésico, sedativo, além de antidoto para veneno de cobra e problemas estomacais. Esta espécie encontra-se distribuída geograficamente em todo o Continente Americano e Antilhas (ARAUJO-JUNIOR, 1997; Guimarães, Giordano, 2004).

No Brasil, *P. tuberculatum* ocorre nas Regiões Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná), (Figura 11), (GUIMARÃES, MEDEIROS, QUEIROZ, 2023).

Figura 11. Distribuição geográfica de *P. tuberculatum* no Brasil

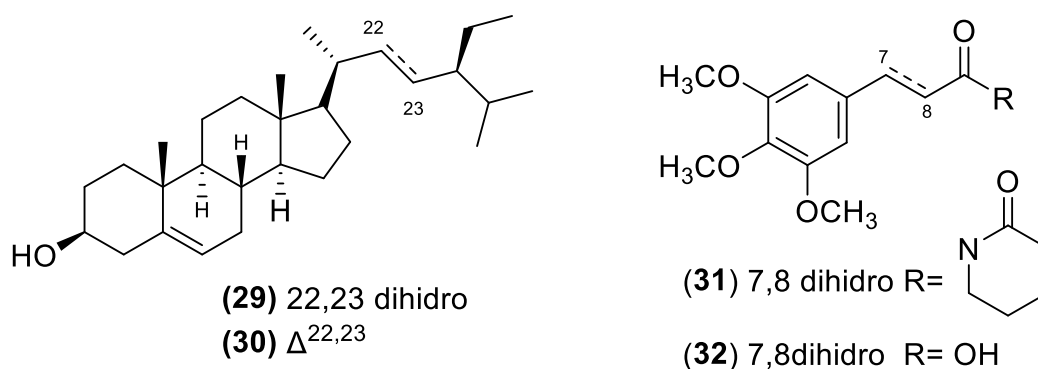


FONTE: REFLORA (2023)

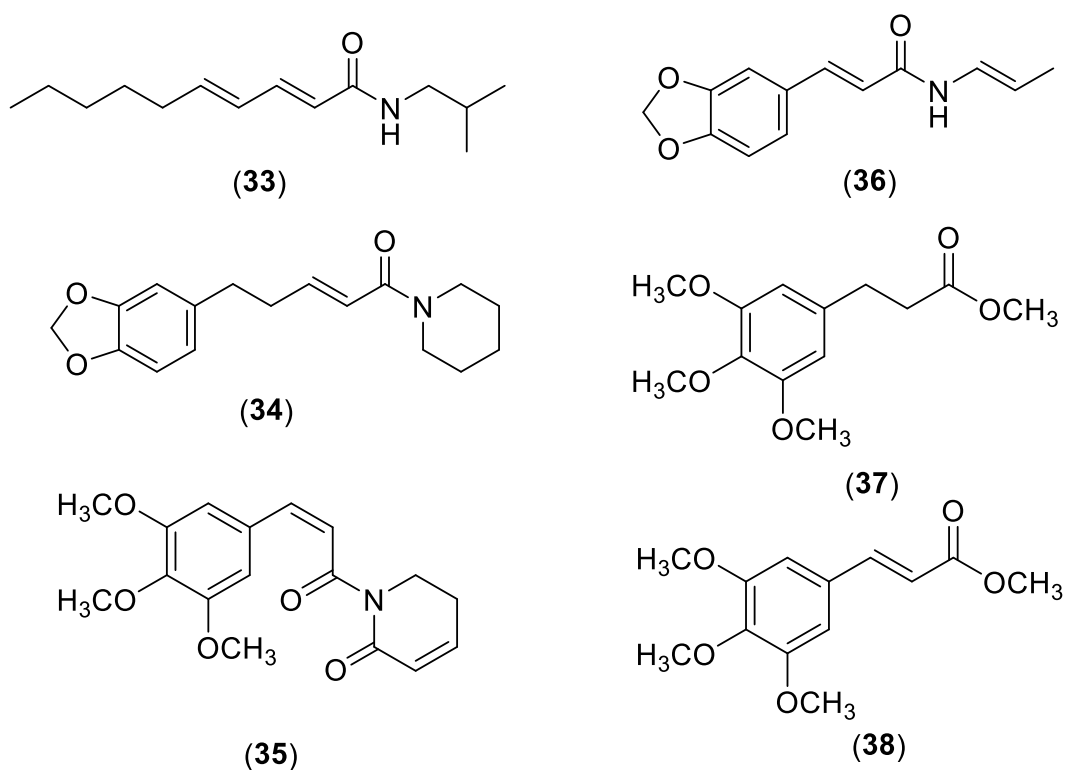
As investigações fitoquímicas de constituintes fixos realizados com a espécie relatam a predominância de amidas, com núcleo do tipo isobutílicas, pirrolidínicas, dihidropiridonas, piperidinas (NAVICKIENE *et al.*, 2000; RAJ *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2002).

Dentre as amidas encontradas em *P. tuberculatum*, destaca-se a amida piplartina (Tabela 1, p. 28 estrutura química **26**) substância majoritária extraída das raízes desta espécie (Schaab *et al.*, 2010). A piplartina apresenta diversas atividades biológicas registradas, incluindo anticancerígena, larvicida, antifúngica, antinociceptiva e ansiolítica.

Em estudos realizados com extrato etanólico dos frutos de *P. tuberculatum* foram isolados dois esteróides: o β -sitosterol (**29**) e o stigmasterol (**30**) em mistura, duas amidas: a piplartina e a dihidropiplartina (**31**) e um derivado do ácido cinâmico, o ácido 3,4,5-trimetoxi-dihidrocinâmico (**32**) (Figura 12) (FACUNDO *et al.*, 2008).

Figura 12. Substâncias isoladas dos frutos de *P. tuberculatum*

O fracionamento do extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (2:1) das sementes de *P. tuberculatum* resultaram no isolamento das amidas pelitorino (33), $\Delta^{\alpha\beta}$ dihidropiperina (34), piplartina, dihidropiplartina e cis pilartina (35). Neste mesmo estudo, realizaram outro fracionamento do extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (2:1) das folhas de *P. tuberculatum*, onde foram isolados piplartina, fagaramida (36), além das amidas foram isolados dois derivados de cinamoíla, 6,7,8-trimetoxidihidrocinamato de metila (37) e *trans*-6,7,8-trimetoxicinamato de metila (38) (Figura 13) (SILVA *et al.*, 2002).

Figura 13. Substâncias isoladas das sementes e de folhas de *P. tuberculatum*

3.4 O vírus da dengue (DENV)

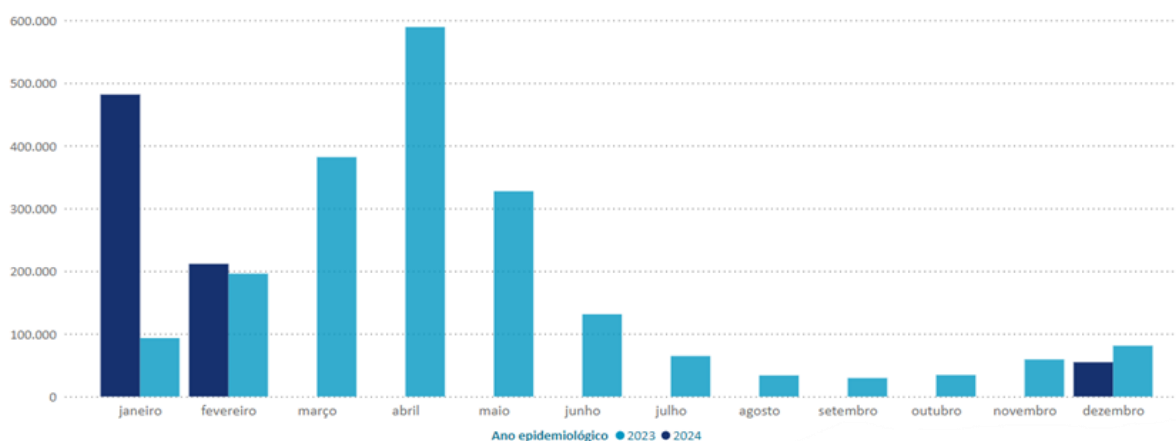
A dengue é uma doença transmitida por mosquitos fêmea de *A. aegypti* (principal vetor) e *Aedes albopictus* vetor secundário, sendo causada por um agente etiológico pertencente à família Flaviviridae e o gênero *Flavivírus*. Esta doença viral é disseminada especialmente nos países tropicais e subtropicais (BRASIL, 2016). A dengue possui cinco sorotipos antigenicamente distintos como DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5 (KOK *et al.*, 2023).

Atualmente, a dengue pode ser classificada na forma clínica não grave, sendo subdividida com e sem sinais de alerta ou na forma grave. A dengue não grave e sem sinais de alerta, atinge os residentes/viajantes de áreas endêmicas, causando febre, dor, erupção cutânea, leucopenia e teste do torniquete positivo. A dengue não grave com sinais de alerta, caracteriza por sintomas citados anteriormente, além de dor abdominal, vômitos persistentes ou acúmulo de líquidos. A dengue grave é caracterizada por extravasamento grave de plasma, choque, desconforto respiratório, sangramento grave ou comprometimento de órgãos (MARCHIORI; HOCHHEGGER; ZANETTI, 2020).

A dengue é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o arbovírus mais difundido. Em 2023, de acordo com a OMS a incidência da dengue cresceu drasticamente, resultando num máximo histórico de mais de cinco milhões de casos e em mais de 5.000 mortes em nível global, onde cerca de 80% desses casos foram registrados nas Américas, tornando-se esta região com maior número de casos de doenças arbovirais e com epidemias cíclicas recorrentes a cada 3 a 5 anos.

No Brasil, até o momento foi registrado 688.461 casos prováveis de dengue, quase quatro vez mais do que os registrados no mesmo período de 2023, com 94 mortes confirmadas em decorrência da doença neste ano (Figura 14) (BRASIL, 2024).

Figura 14. Casos prováveis de dengue no Brasil, ano de 2023 e 2024



FONTE: BRASIL (2024).

O Brasil em 21 de dezembro de 2023 incorporou ao Sistema Único de Saúde (SUS) a vacina contra dengue Qdenga, sendo o primeiro país do mundo a oferecer o imunizante no sistema público de saúde. A vacina entrou pela primeira vez no calendário Nacional de Vacinação em fevereiro de 2024, em questões de capacidade de produção laboratorial, atende 521 municípios distribuídos em 37 regiões de saúde do país (Brasil, 2024). Outro imunizante usado no Brasil é o Dengvaxia, aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), recomenda apenas para indivíduos soropositivo (BRASIL, 2017).

Embora existam vacinas contra a dengue, o principal método para prevenir ou controlar o vetor *A. aegypti* é evitar a criação de criadoura, além de aplicação de inseticidas. Ainda não existe tratamento específico para a dengue, no entanto, a recomendação é baseado principalmente na reposição de líquidos adequada (BRASIL, 2024).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes

Para o preparo do extrato metanólico, utilizou-se solvente grau P.A. (Nuclear®). Todos os solventes utilizados para as análises cromatográficas e experimentos de EM eram grau CLAE (Tedia®) e a água ultrapura obtida por um sistema Mili-Q (marca Millipore, modelo Direct-Q® 3UV). As análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas com solvente deuterado (Tedia®).

4.2 Análises cromatográficas

4.2.1 Cromatografia em coluna (CC)

O fracionamento cromatográfico em coluna de vidro (CC: $\Phi = 4,5$ cm x h= 50 cm) foi realizado utilizando como fase estacionária sílica gel 60, 70-230 mesh (Sigma-Aldrich, USA). Como fases móveis foram utilizados hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH).

4.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por CCD foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 (Merck®) de 0,25 mm de espessura, com indicador de fluorescência F₂₅₄. Os spots foram revelados com luz UV (254 e 365 nm) e revelador anisaldeído.

4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE analítico e semipreparativo foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de massas (LABCEM) da Central Analítica (UFAM), coordenado pelo Dr. Felipe Moura Araujo da Silva. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo líquido modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário), degaseificador DGU-20A5, detector de ultravioleta (UV/Vis) SPD-20AV, modulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (25 μ L e 500 μ L).

4.3 Métodos espectroscópicos e espectrométricos

As análises por EM foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da Central Analítica (UFAM). Os espectros de massas no modo *full scan* e tandem (MS²) foram registrados em espectrômetro do tipo *ion trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific), equipado com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e operando nos modos positivo e negativo. Os

espectros foram adquiridos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific).

As análises por RMN 1D e 2D foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB) da Central Analítica UFAM, coordenado pelo professor Dr. Marcos Batista Machado. Os espectros de RMN 1D e 2D foram obtidos em espectrômetro Bruker modelo Advance III 500 operando a 11,75 Teslas (T) observado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas com metanol deuterado (CD_3OD) e referência interna de tretametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) registradas em Hertz (Hz). Os dados espectrais foram processados no software ACD/RMN Processor Academic Edition (ACD/Labs).

4.4 Coleta e identificação botânica

O material botânico de *P. tuberculatum* foi coletado no Museu da Amazônia (MUSA), situado na área urbana da cidade de Manaus – Amazonas, com latitude $3^{\circ}00'75''$ S e longitude $59^{\circ}93'97''$ W. A espécie foi identificada pela profa. Dra. Micheline Carvalho Silva do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília. Uma exsicata sob o número HUAM 12425 foi depositada no Herbário da UFAM. O registro do acesso ao patrimônio genético da espécie foi realizado junto ao Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AE3F373.

4.5 Processo de secagem e moagem do material botânico

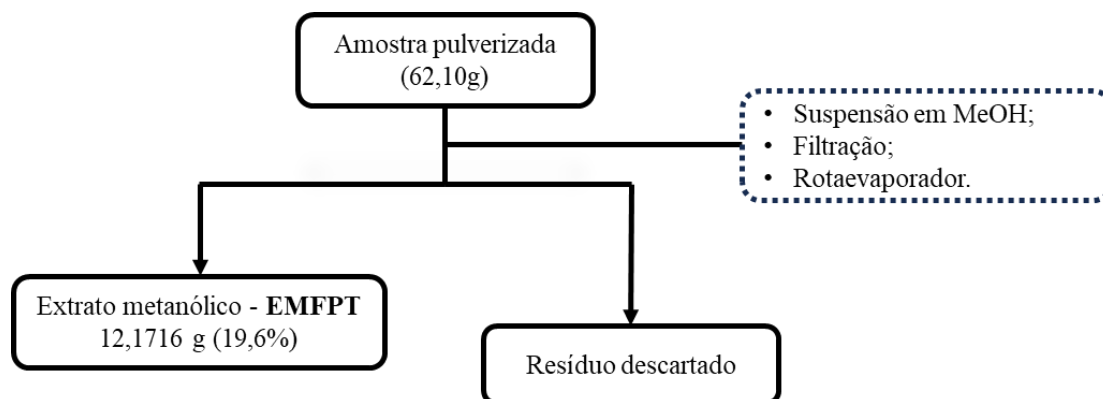
As folhas foram secas à temperatura ambiente por 7 dias. Após a secagem, amostra vegetal seca foi pulverizada em moinho de facas e armazenada em recipiente apropriado para análises posteriores.

4.6 Análise fitoquímica das folhas de *P. tuberculatum*

4.6.1 Preparo do extrato metanólico

A amostra pulverizada (62,10 g) foi submetida à extração em aparelho ultrassônico com metanol (1L) por cerca de 30 min. Posteriormente, a amostra foi mantida em repouso com solvente extrator por cerca de 48 h pelo método de maceração, com renovação a cada 48 h (três repetições). Nesse procedimento, em cada etapa de maceração, a mistura era filtrada, o filtrado concentrado em rotoevaporador à pressão reduzida e temperatura controlada entre 40 e 50°C. Após isto, foi adicionado em frasco e

seco sob corrente de nitrogênio. Ao final deste processo, realizou cálculo do teor extrativo e codificação da amostra (Fluxograma 1).



Fluxograma 1. Procedimento realizado para obtenção do extrato metanólico.

4.6.2 Análise espectrométrica do extrato metanólico

O extrato metanólico foi preparado na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau CLAE) e posterior analisadas por inserção direta em espectrômetro de massas do tipo íon trap, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific), operando com fonte APCI (modo positivo). Em seguida, alguns íons selecionados foram submetidos à fragmentação tandem (MS^2). A faixa de massas analisada foi de m/z 100-1000. Os espectros foram obtidos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific).

4.6.3 Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico

O extrato **EMFPT** (9 g) foi fracionado em coluna cromatográfica filtrante de sílica gel (70-230 mesh) e eluída em misturas de solventes orgânico em ordem crescente de polaridade, conforme a tabela 2, onde utilizou-se 600 mL para o primeiro sistema de eluente e para os outros sistemas foram 500 mL. Foram coletadas 5 frações. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e monitoradas por CCD de sílica gel de fase normal e reversa. Após as análises por CCD, observou que as frações não apresentaram o perfil de similaridade, sendo assim não foram reunidas.

Tabela 2. Sistemas de eluentes utilizados no fracionamento do EMFPT.

Eluentes	Frações	Códigos	Massa (g)	Rendimento (%)
Hex 100%	Fr-1	EMFPT-1	0,0215	0,2
Hex/AcOEt 1:1	Fr-2	EMFPT-2	0,9190	7,9
AcOEt 100%	Fr-3	EMFPT-3	0,4946	4,0
AcOEt/MeOH 1:1	Fr-4	EMFPT-4	2,4716	20,3
MeOH 100%	Fr-5	EMFPT-5	1,7155	14,1

Foram separados e enviados 10 mg de cada fração (Fr 1-5) para a realização dos ensaios de atividade larvicida frente à *A. aegypti* no Laboratório de Malária e Dengue (LMD) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.6.4 Análise espectrométrica das frações obtidas na coluna filtrante

As frações foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau CLAE) e posterior analisadas por inserção direta em espectrômetro de massas do tipo íon trap, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific), operando com fonte APCI (modo positivo). A faixa de massas analisada foi de m/z 100-1000. Os espectros foram obtidos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific).

4.6.5 Fracionamento e isolamento da fração EMFPT-3

Com base nos resultados do ensaio larvicida, a fração **EMFPT-3** foi selecionada para análises por CLAE em escala analítica e semipreparativa. A fração **EMFPT-3** foi solubilizada em metanol grau HPLC a 1 mg/mL. Em seguida, foi analisada por CLAE-UV/Vis, utilizando-se cromatógrafo modelo UFLC® (Shimadzu). A separação cromatográfica foi realizada em coluna analítica de fase reversa C18 (5µm, 150 x 460 mm) Phenomenex, empregando o seguinte gradiente de eluição: 0-15 min, 50-100% **B**; 15-20 min, 100% de **B** a fluxo de 1,0 mL/min. A fase móvel constituiu-se de solventes binários: água Milli-Q (**A**) e metanol (**B**). O detector na faixa fixa de 280 e 300 nm.

Após a otimização do método e os reajustes da condição cromatográfica no modo analítico e os devidos cálculos escalonados, o isolamento das substâncias foi realizado por CLAE-UV/Vis semipreparativo, utilizando-se um cromatógrafo cromatográfico modelo UFLC® (Shimadzu). Para isso, cerca de 30 mg da fração **EMFPT-3** foi solubilizada em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) grau CLAE, sendo realizado o isolamento em coluna Luna C18 (5µm, 250 x 10 mm) Phenomenex, empregando o seguinte gradiente de eluição: 0-15 min, 50-100% **B**; 15-20 min, 100% de **B** a fluxo de 3,5 mL/min, monitorado canais de UV de 280 e 300 nm, sendo coletadas 11 subfrações. Posteriormente, essas subfrações foram analisadas por APCI-MS e MS², e as com maior grau de pureza foram encaminhadas para análise de RMN 1D e 2D.

4.7 Ensaio larvicida

4.7.1 Ensaio larvicida frente às larvas de *A. aegypti*

O teste para identificar ação larvicida dos extratos e frações obtidos de *P. tuberculatum* foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, coordenado pelo Dr. Rosemary Aparecida Roque. Seguindo as

Diretrizes de Testes Larvicidas em Laboratório e Campo do protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), com algumas modificações. Todos os ensaios foram conduzidos 28 ± 2 °C e 70-85% de umidade relativa.

4.7.1.1 Preparo das amostras do extrato e frações

As alíquotas do extrato metanólico e das frações (10 mg) foram dissolvidas em 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) e 100 mL de água destilada, e transferidas para recipientes de plásticos de 250 mL. Posteriormente, foram adicionadas, 10 larvas de 3º estágio de *A. aegypti*. Paralelamente, foi realizado o controle negativo, onde foi utilizado 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) e 100 mL de água destilada. As mortalidades das larvas foram registradas em intervalos de 24 h após o tratamento. O percentual de mortalidade em cada concentração foi calculado usando a fórmula (1):

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{LM}{LT} \times 100$$

Onde:

LM: Larvas mortas;

LT: Larvas totais.

Sendo consideradas ativas ao causar a morte de $\geq 50\%$ das larvas de *A. aegypti*.

4.7.1.2 Preparo das amostras das substâncias isoladas

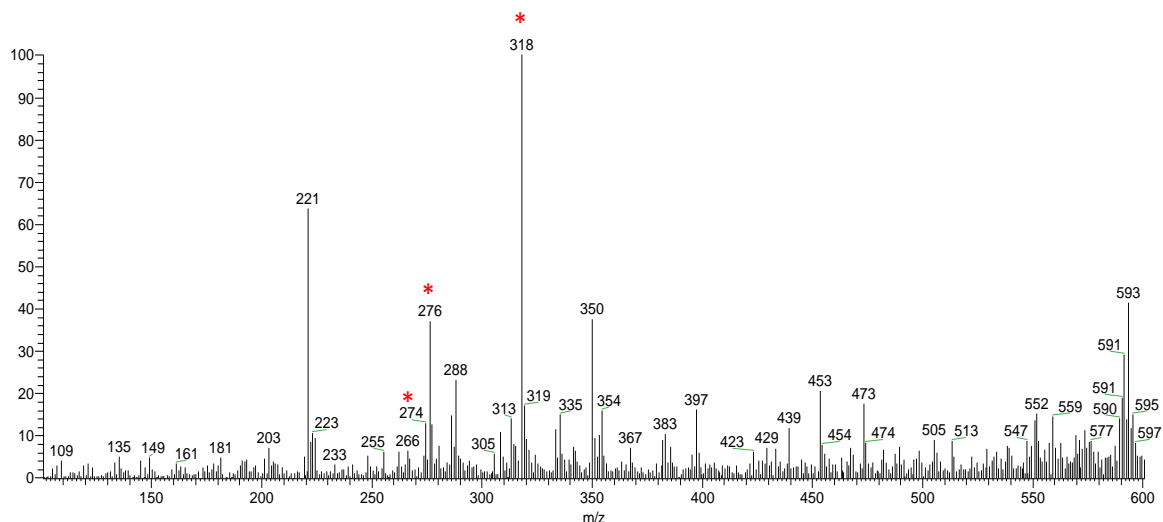
As larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* foram distribuídas em cinco recipientes de plásticos (200 mL) contendo 99 mL de água destilada e cinco concentrações das substâncias isoladas da fração **EMFPT-3**, **piplartina**, **cis-piplartina** e **4,5-diidropiperlonguminina** (10 a 50 $\mu\text{g/mL}$), ambas preparadas em 1 mL de DMSO. O controle negativo (DMSO) também foi avaliado nessas concentrações. O controle positivo α -cipermetrina foi avaliado em concentrações variando de 0,13 a 0,65 $\mu\text{g/mL}$. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. A porcentagem de atividade larvicida em cada concentração foi calculada após 24 h usando a fórmula 1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Perfil químico do extrato metanólico das folhas de *P. tuberculatum* por espectrometria de massas

O espectro de massas *full scan* do extrato metanólico (Figura 15), no modo positivo, exibiu um perfil complexo, com diversos íons protonados na faixa de m/z 100-600, destacando-se o pico de maior intensidade de m/z 318, e outros íons menos intensos de m/z 274 e 276. Esses íons detectados destacados foram submetidos ao processo de fragmentação em tandem (MS^2) e comparados com a literatura (LIU *et al.*, 2013; CHANDRA *et al.*, 2015).

Figura 15. Espectro de massas *full scan* em fonte APCI, no modo positivo do extrato metanólico de *P. tuberculatum*.



O espectro de APCI- MS^2 do íon de m/z 318 $[M+H]^+$ (Figura 16), apresentou uma perda principal neutra de 97 Da ($-C_5H_7NO$, m/z 318 \rightarrow m/z 221), correspondente a ruptura heterolítica da ligação amida no anel lactâmico, o qual resultou na formação do pico base, o íon acílio. Esta proposta mecanicista de fragmentação (Figura 17) é compatível para amida piplartina (SILVA-JUNIOR, 2017), sendo previamente reportada em espécies de Piperaceae como *Piper longum* L, *P. nigrum* e *P. tuberculatum* (SILVA, 2019).

Figura 16. Espectro de APCI-MS² (no modo positivo) do íon de m/z 318, presente nas folhas de *P. tuberculatum*

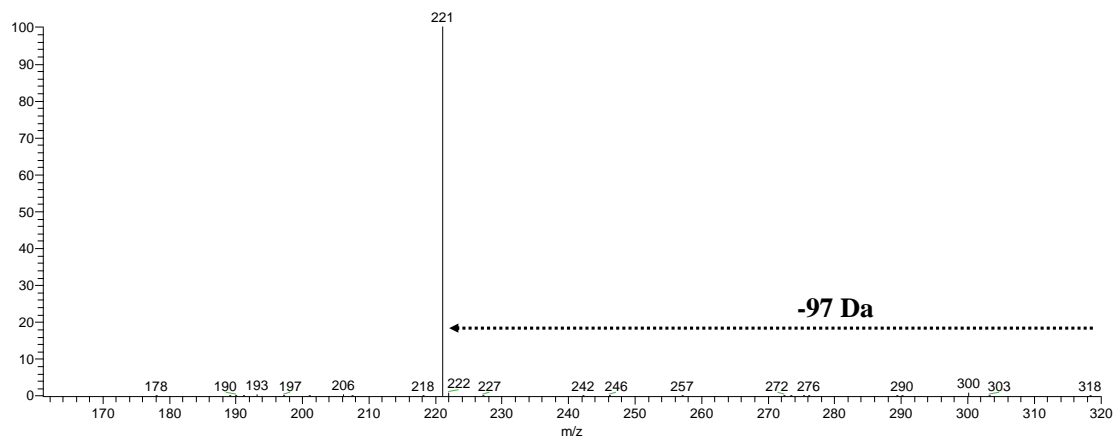
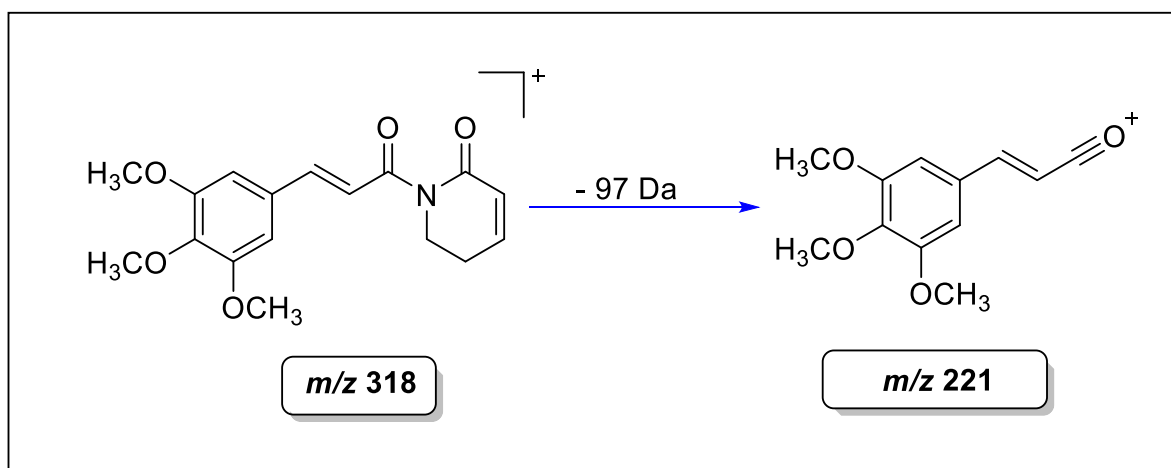


Figura 17. Proposta de fragmentação para o íon de m/z 318



O espectro de APCI-MS² do íon de m/z 276 $[M+H]^+$ (Figura 18) apresentou três fragmentações competitivas, na qual a primeira é a perda neutra de 73 Da ($-C_4H_9N$, m/z 276 \rightarrow m/z 203), a segunda é a perda neutra de 115 Da ($-C_6H_{13}NO$, m/z 276 \rightarrow m/z 161) e a última perda de 141 Da ($-C_8H_{15}NO$, m/z 276 \rightarrow m/z 135), o que resulta na formação do íon de m/z 203, m/z 135 e m/z 161, respectivamente, sendo compatíveis com o padrão de fragmentação (Figura 19) da amida 4,5-diidropiperlonguminina, previamente reportada em *P. longum* (LIU et al., 2013).

Figura 18. Espectro de APCI-MS² (no modo positivo) do íon de m/z 276, presente nas folhas de *P. tuberculatum*.

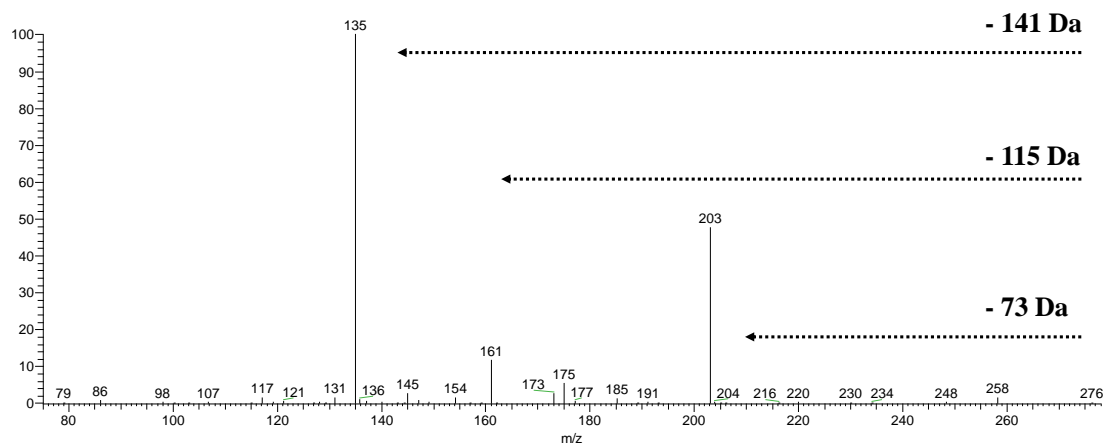
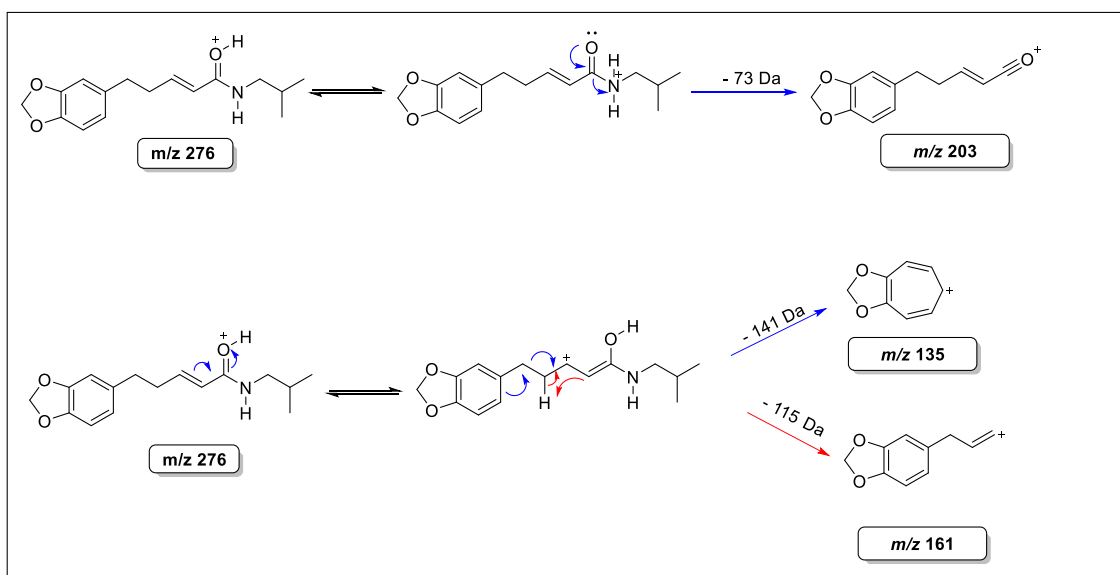


Figura 19. Proposta de fragmentação para o íon de m/z 276



O espectro de APCI-MS² do íon de m/z 274 $[M+H]^+$ (Figura 20) apresentou duas fragmentações competitivas, na qual a primeira é a perda neutra de 73 Da ($-C_4H_9N$, m/z 274 \rightarrow m/z 201) e a segunda é a perda neutra de 139 Da ($-C_6H_{13}NO$, m/z 274 \rightarrow m/z 135) o que resulta na formação no íon de m/z 201 e m/z 135, respectivamente, sendo compatíveis com o padrão de fragmentação (Figura 21) da amida, piperlonguminina, previamente reportada em *P. longum* (LIU et al., 2013).

Figura 20. Espectro de APCI-MS² (no modo positivo) do íon de m/z 274, presente nas folhas de *P. tuberculatum*.

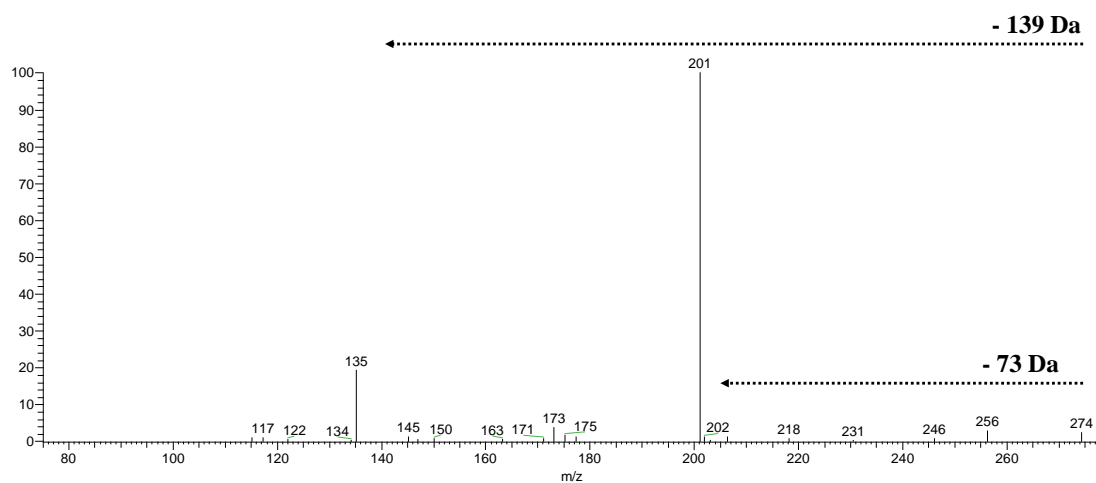
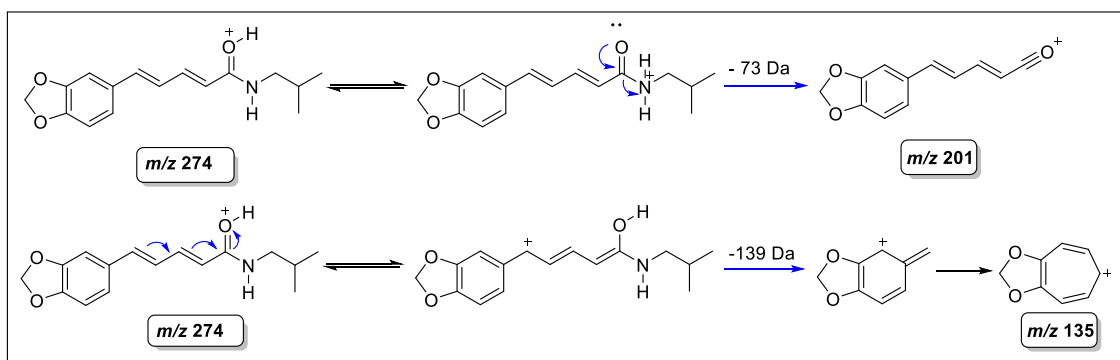


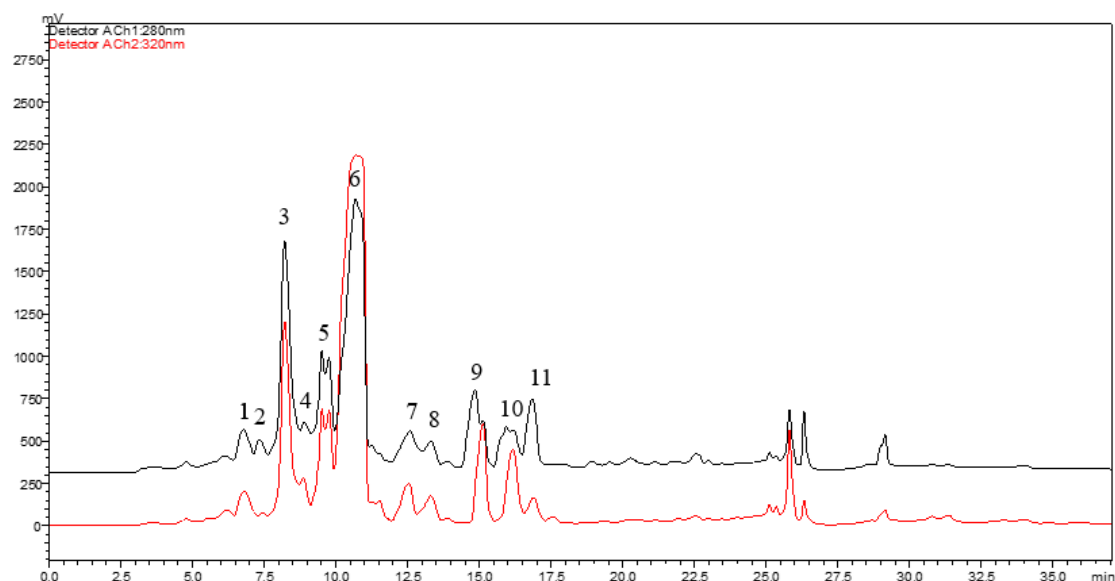
Figura 21. Proposta de fragmentação para o íon de m/z 274



A análise do perfil químico através da APCI-MS² com inserção direta da amostra, possibilitou anotações de substâncias conhecidas, como as três amidas denominadas: pipartina de m/z 318; 4,5 diidropiperlonguminina de m/z 276 e piperlonguminina de m/z 274.

5.2 Análise por CLAE-UV/Vis e isolamentos das substâncias de EMFPT-3

O cromatograma CLAE-UV/Vis da fração EMFPT-3 (Figura 22) mostrou a presença de pelo menos 6 picos cromatográficos majoritários (3, 5, 6, 9, 10 e 11) e 5 picos cromatográficos minoritários (1, 2, 4, 7 e 8). Assim, todos esses compostos foram submetidos à análise por meio de espectrometria de massas com fonte APCI-MS. Posteriormente, analisados por fragmentação tandem MS², sendo as amostras promissoras representadas na Tabela 3. Os espectros de *full scan* confirmaram a presença dos íons de m/z 276 e 318 descritos no item 5.1, como sendo os picos 6 e 7, respectivamente.

Figura 22. Cromatograma da fração EMFPT-3 em CLAE-UV/vis (280 e 320nm)**Tabela 3.** Picos anotados da fração EMFPT-3 em CLAE-UV e EM

Pico	Código das amostras	tr (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ²
3	PTF-03	8,2	318	221
6	PTF-06	10,6	318	221
7	PTF-07	12,5	276	203, 161, 135 e 203

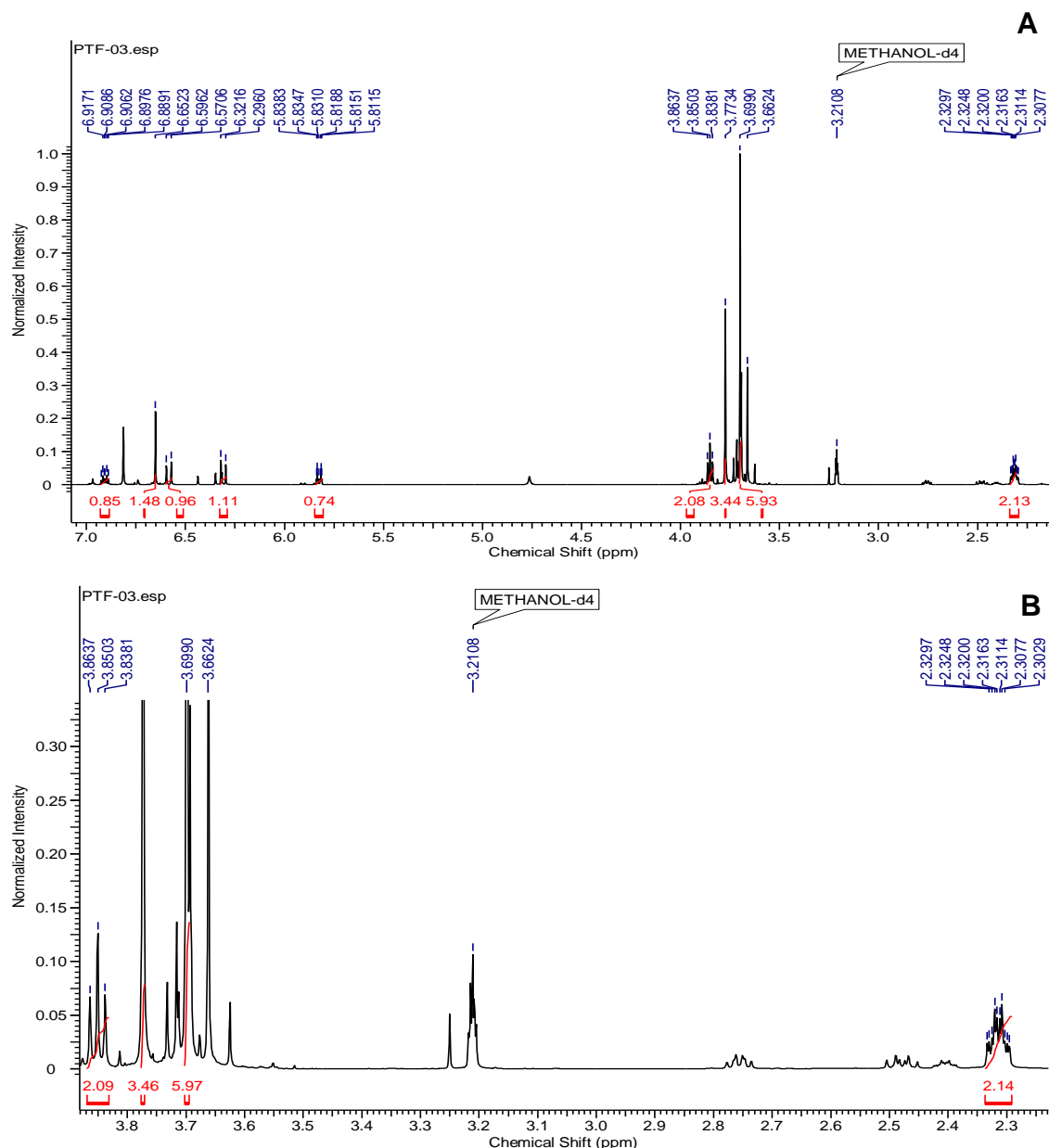
5.3 Determinação estrutural da amostra PTF-03

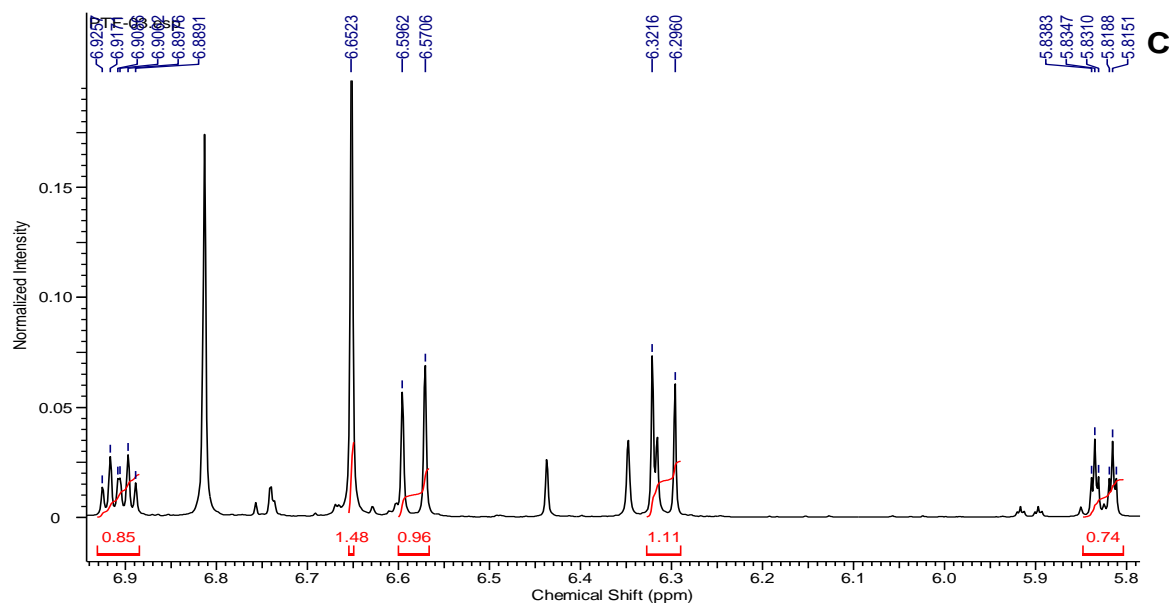
A amostra **PTF-03** (1,5 mg), apresentou-se como sólido cristalino branco. No espectro de massas *full scan* (Figura A1, p. 68) foi observado o pico base de m/z 318 [M+H]⁺ e ao ser submetido a fragmentação (Figura A2, p. 68) apresentou uma perda inicial de 97 Da, gerando o íon de m/z 221, estando esta perda de acordo com a estrutura da amida piplartina, previamente reportada em espécies de Piperaceae (NAVICKIENE *et al.*, 2000).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 23) da amostra PTF-03, observou-se um simpleto em δ_H 6,75 (2H; s; H-11/ H-15), referente a presença de um sistema aromático tetrasubstituído e simétrico. Observou-se também, sinais de prótons olefínicos do tipo vicinal, conjugados à carbonila, em δ_H 6,41 (1H; d; $J=12,8$ Hz; H-8) e δ_H 6,68 (1H; d; $J=12,8$ Hz; H-9), com constantes evidenciando acoplamento *cis*, bem como a presença de outros sinais de prótons olefínicos em δ_H 6,91 (1H; dt; $J=9,8$ e 4,4 Hz; H-4) e δ_H 5,92 (1H; dt; $J=9,8$ e 1,8 Hz; H-3), ambos acoplados por uma constante típica de prótons

vicinais *trans*. Ainda, foram observados acoplamento alílico entre o H-3 com o próton em δ_H 2,31 (2H; *ddt*; $J=6,3$; 4,2 e 1,7 Hz; H-5), bem como o H-4 acoplado com H-5 com uma constante de 4,1 Hz. Por sua vez, observou-se um tripleto em δ_H 3,95 (2H; *t*; $J=6,4$ Hz; H-6), consistente com a presença de prótons metilênicos próximo ao átomo eletronegativo (nitrogênio). Na região alifática, foi possível observar sinais característicos de prótons metoxílicos de éter aromáticos em δ_H 3,77 (3H; *s*) e em 3,70 (6H, *s*). 1H

Figura 23. (A) Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da amostra PTF-03 (B) ampliação da região dos prótons alifáticos e (C) ampliação da região dos prótons aromáticos e olefínicos.





Através dos dados espectrais de RMN de ^1H (Tabela 4), acompanhado com as análises de espectrometria de massas, além da comparação aos dados espectrais descritos da literatura (NAVICKIENE *et al.*, 2000), foi possível confirmar a amostra PTF-03 (Figura 24), como a amida isômero da piplartina, denominada *cis*-piplartina.

Figura 24. Estrutura da amida PTF-03

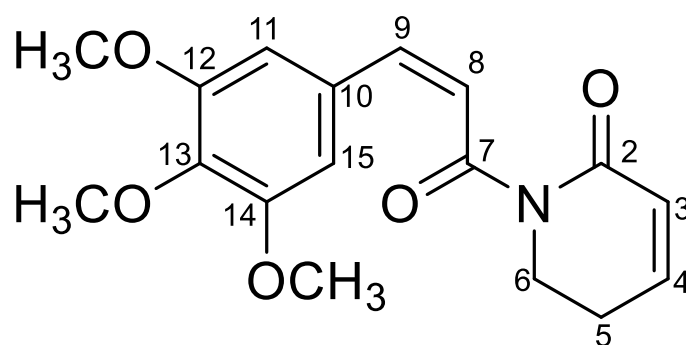


Tabela 4. Dados de RMN de ^1H da amostra PTF-03

PTF-03 (<i>Cis</i> Piplartina)		
Posição	δ_{H}	δ_{H}
	(multiplicidade; J em Hertz) ^a	(multiplicidade; J em Hertz) ^b
2	-	
3	5,92 (<i>dt</i> ; 9,8; 1,8) 1H	5,98 (<i>dt</i> ; 9,7; 1,9) 1H

4	6,91 (<i>dt</i> ; 9,8; 4,4) 1H	6,89 (<i>dt</i> ; 9,7; 4,3) 1H
5	2,31 (<i>ddt</i> ; 6,3; 4,2; 1,7) 2H	2,39 – 2,42 (<i>m</i>) 2H
6	3,95 (<i>t</i> ; 6,4) 2H	3,97 (<i>t</i> ; 7,0) 2H
7	-	-
8	6,41 (<i>d</i> ; 12,8) 1H	6,48 (<i>d</i> ; 12,4) 1H
9	6,68 (<i>d</i> ; 12,8) 1H	6,71 (<i>d</i> ; 12,4) 1H
10	-	-
11 e 15	6,75 (<i>s</i>) 2H	6,76 (<i>s</i>) 2H
12	-	-
13	-	-
14	-	-
OCH ₃	3,80 (<i>s</i>), 6H	3,84 (<i>s</i>) 6H
OCH ₃	3,87 (<i>s</i>), 3H	3,85 (<i>s</i>) 3H

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H em MeOD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo NAVICKIENE *et al.*, 2000 (¹H em CDCl₃ 200 MHz)

5.4 Determinação estrutural da amostra PTF-06

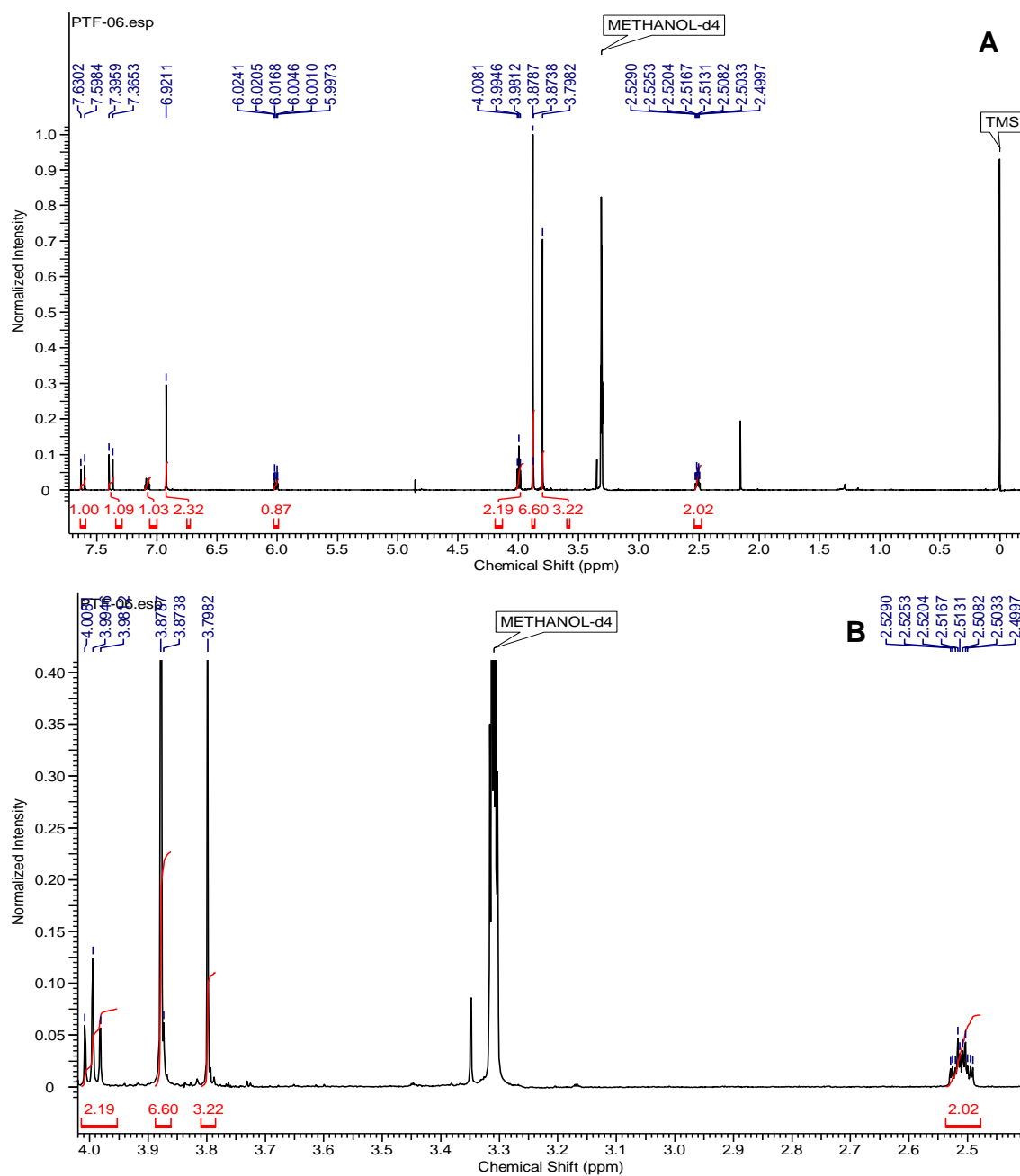
A amostra **PTF-06** (1,2 mg), apresentou-se como sólido cristalino branco. No espectro de massas *full scan* (Figura A3, p. 69) foi observado o pico base de *m/z* 318 [M+H]⁺ e ao ser submetido a fragmentação (Figura A4, p. 69) apresentou uma perda inicial de 97 Da. Como descrito anteriormente, esta perda é consistente com a amida piplartina, previamente reportada em espécies de Piperaceae (NAVICKIENE *et al.*, 2000).

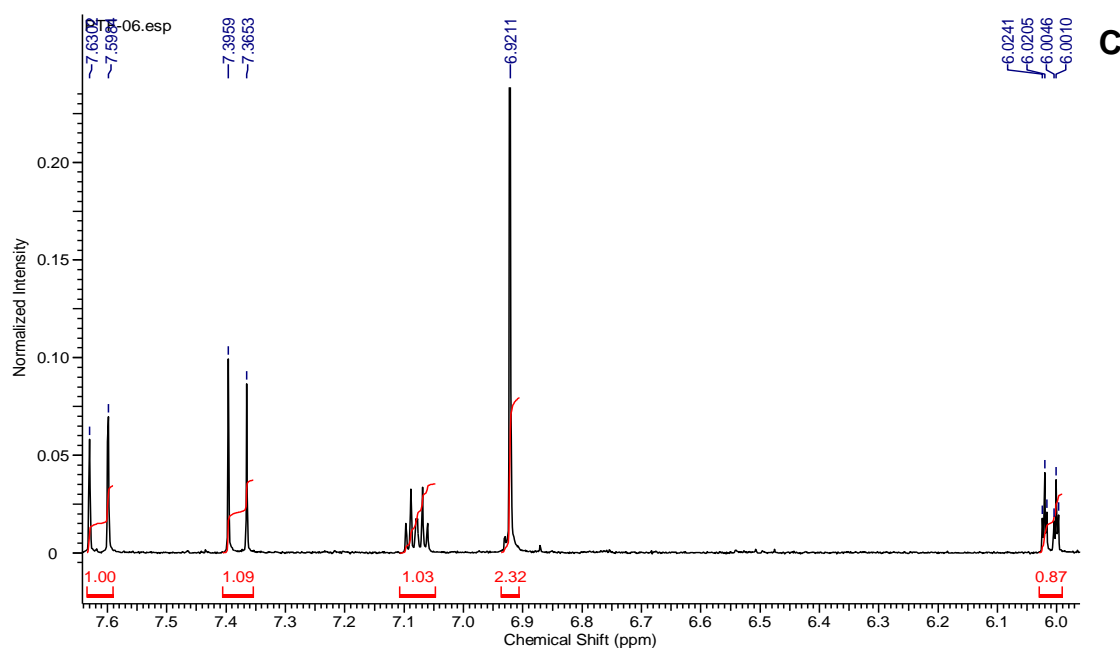
A partir da análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 25), verificou-se que a substância PTF-06 apresenta semelhança estrutural com a substância PTF-03. Entretanto, a diferença observada foi dos valores das constantes de acoplamento entre os prótons olefínicos H-8 (1H; *d*) e H-9 (1H; *d*), ambos com *J*= 15, 6 Hz, característicos de prótons vicinais *trans*.

Foi observado também, na região aromática um sinal δ_{H} 6,91 (2H; *s*; H-11/ H-15), indicando a presença de um sistema aromático tetrasubstituído e simétrico. Além disso, observaram-se os prótons vinílicos em δ_{H} 6,03 H-3 (*dt*, 1H, *J*=9,7 e 1,8 Hz) e δ_{H} 7,09 H-2 (*dt*, 1H, *J*=9,7 e 4,4 Hz), com constantes evidenciando acoplamento *cis*.

Na região alifática, verificara-se dois grupos metilênicos em δ_{H} 2,59 (2H; *ddt*; 1H, *J*=6,4; 4,3 e 1,8 Hz; H-5) e δ_{H} 3,99 (2H; *t*; *J*=6,5 Hz H-6), sendo este último deslocamento característico de metilênico próximo a átomo eletronegativo (nitrogênio). Ainda, a presença de prótons metoxílicos em δ_{H} 3,89 (6H; *s*) e em 3,87 (3H; *s*).

Figura 25. (A) Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da amostra PTF-06 (B) ampliação da região dos prótons alifáticos e (C) ampliação da região dos prótons aromáticos e olefínicos.





Através dos dados espectrais de RMN de ^1H (Tabela 5), acompanhado com as análises de espectrometria de massas, além da comparação aos dados espectrais descritos da literatura (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2017), foi possível sugerir a substância PTF-06 (Figura 26), como a amida piplartina.

Figura 26. Estrutura da amida PTF-06

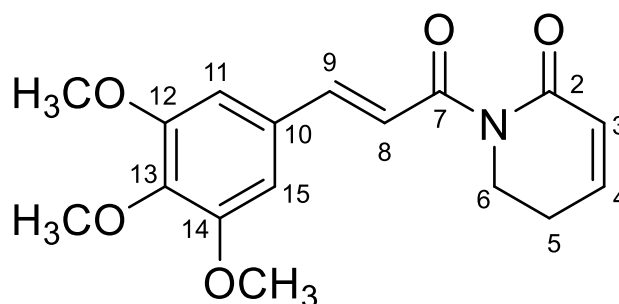


Tabela 5. Dados de RMN de ^1H da amostra PTF-06

PTF-06 (Piplartina)		
Posição	δ_{H}	δ_{H}
	(multiplicidade; J em Hertz) ^a	(multiplicidade; J em Hertz) ^b
2	-	-
3	6,03 (<i>dt</i> ; 9,7; 1,8) 1H	6,03 (<i>dt</i> ; 9,7; 1,6) 1H
4	7,09 (<i>dt</i> ; 9,7; 4,4) 1H	6,94 (<i>dt</i> ; 9,7; 4,1) 1H
5	2,59 (<i>ddt</i> ; 6,4; 4,3; 1,8), 2H	2,47 (<i>m</i>) 2H
6	3,99 (<i>t</i> ; 6,5), 2H	4,03 (<i>t</i> ; 6,4) 2H
7	-	-

8	7,39 (<i>d</i> ; 15,6) 1H	7,41 (<i>d</i> ; 15,6) 1H
9	7,63 (<i>d</i> ; 15,6) 1H	7,66 (<i>d</i> ; 15,6) 1H
10	-	-
11/15	6,93 (<i>s</i>) 2H	6,79 (<i>s</i>) 2H
12	-	-
13	-	-
14	-	-
OCH ₃	3,89 (<i>s</i>), 6H	3,88 (<i>s</i>) 6H
OCH ₃	3,81 (<i>s</i>), 3H	3,86 (<i>s</i>) 3H

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H em MeOD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo DA SILVA-JUNIOR *et al.*, 2017 (¹H em CDCl₃ 500 MHz)

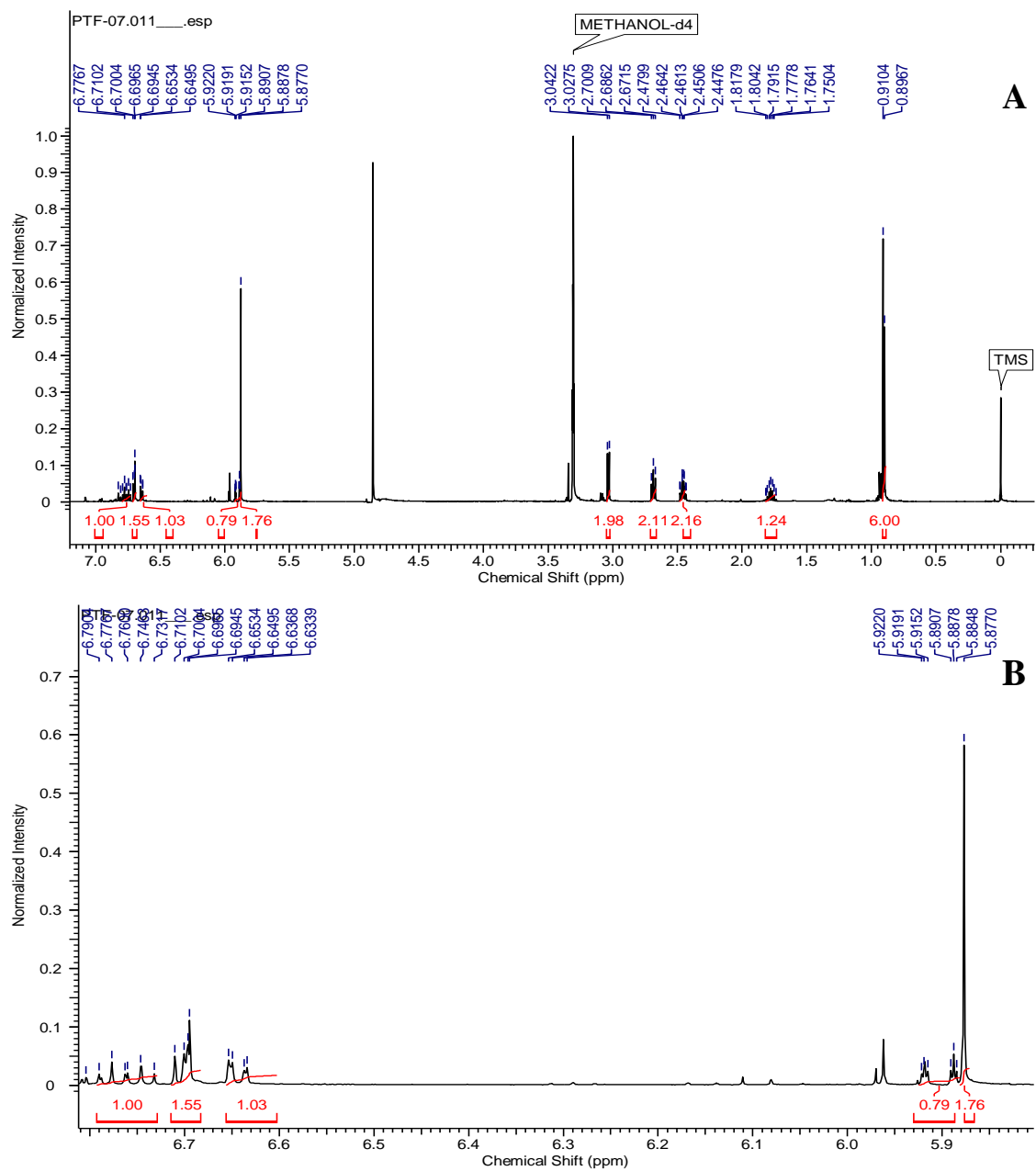
5.5 Determinação estrutural da amostra PTF-07

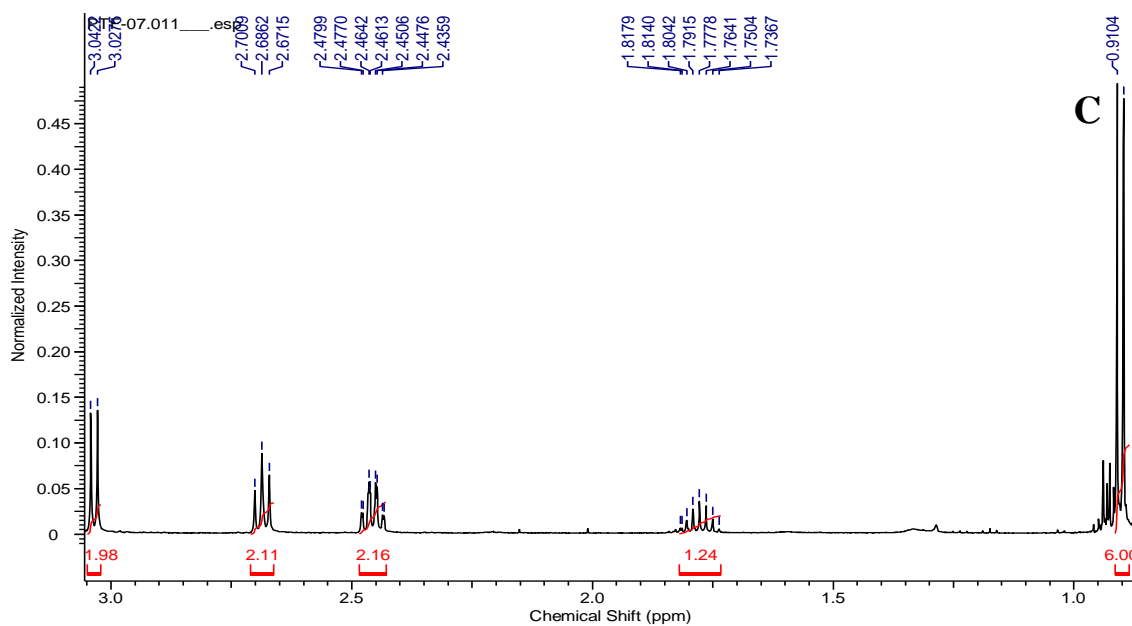
A amostra **PTF-07** (1,5 mg), apresentou-se como sólido cristalino amarelo. No espectro de massas *full scan* (Figura A6, p. 69) observou-se o pico base de *m/z* 276 [M+H]⁺. O espectro de MS² da amostra (Figura A7, p. 70) evidenciou perdas competitivas de 73 Da; 141 Da e 115 Da.

No espectro de RMN de ¹H da amostra **PTF-07** (Figura 27) foram observados na região dos prótons aromáticos sinais em δ_H 6,64 (1H; *dd*, *J* = 7,9 e 1,4 Hz; H-6'), δ_H 6,69-6,71 m (2H; H-2'/H-5'). Observou-se ainda, na região dos prótons olefinícos, a presença de dois duplos tripletos, em δ_H 6,76 (1H; *dt*; *J* = 15,3 e 6,9 Hz; H-3) e δ_H 5,89 (1H; *dt*; *J* = 15,3 e 1,5 Hz; H-2) indicando acoplamento *trans*. Adicionalmente, foi observado sinal em δ_H 5,88 (2H; *s*, -OCH₂), típicos de prótons do grupo metilenodióxi.

Na região dos prótons alifáticos foram observados sinais característicos do grupo isobutila, onde observou-se um dubleto em δ_H 0,90 (6H; *d*, *J* = 6,6 Hz; H-3'' /H-4''), atribuído aos prótons metílicos, bem como a presença de sinais em δ_H 1,76 (1H; *non*; *J* = 6,7 Hz; H-2'') e δ_H 3,03 (2H; *d*, *J* = 7,3; Hz H-1''), referente aos prótons do grupo metino e metilênico, respectivamente. Ainda foram observados um duplo quarteto em δ_H 2,46 (2H; *dq*, *J* = 7,3 e 1,5 Hz; H-4) e um tripleto em δ_H 2,68 (2H; *t*, *J* = 7,5 Hz; H-5), referente aos prótons metilênicos.

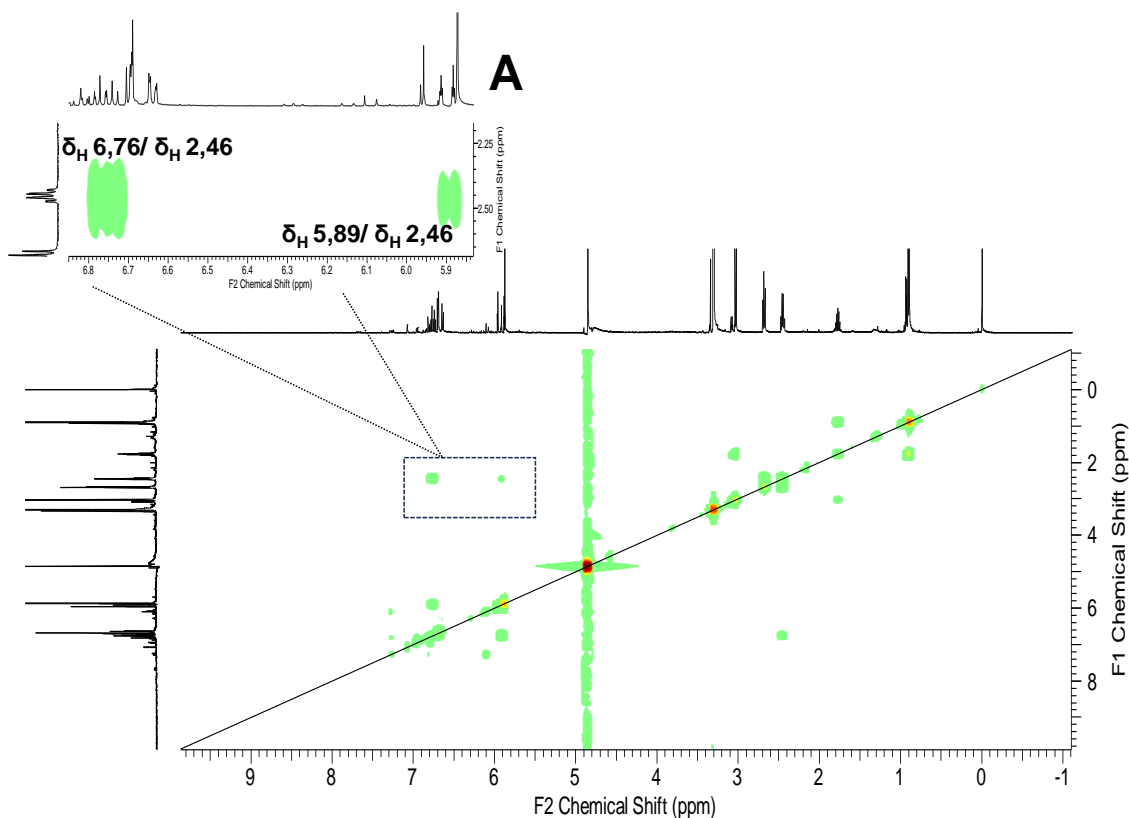
Figura 27. (A) Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da amostra PTF-07 (B) ampliação da região dos prótons aromáticos e olefínicos, e (C) ampliação da região dos prótons alifáticos.

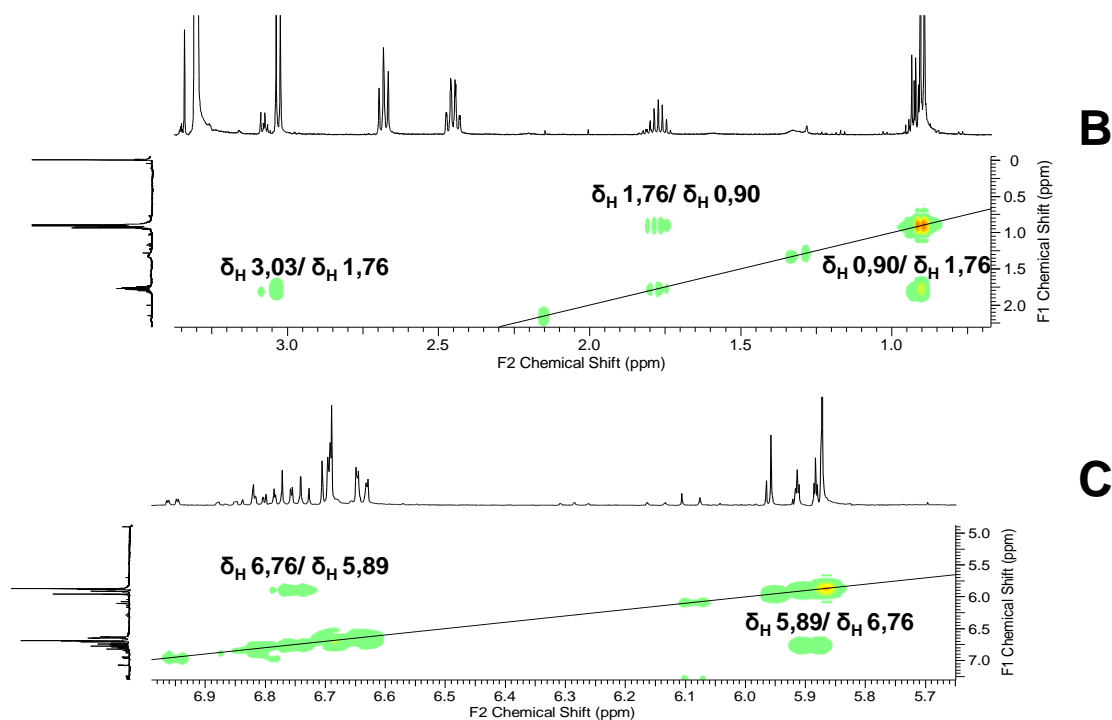




Através do mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (Figura 28) foram observadas as correlações homonucleares dos seguintes sinais dos prótons entre δ_{H} 1,76 (H-2'') e δ_{H} 0,90 (H-3'' /H-4''); δ_{H} 3,03 (H-1'') e δ_{H} 1,76 (H-2''), com acoplamentos 3J . Além dos sinais entre δ_{H} 6,76 (H-3) e δ_{H} 2,46 (H-4) com acoplamento 3J ; δ_{H} 6,76 (H-3) e δ_{H} 5,89 (H-2), indicativo da existência de um sistema *trans*-olefínicos, e ainda correlação entre δ_{H} 5,89 (H-2) e δ_{H} 2,46 (H-4) com acoplamento 4J indicando um sistema alílico.

Figura 28. Mapa de correlação COSY (A) ampliação da região dos prótons olefínicos (B) ampliação da região dos prótons alifático e (C) ampliação da região dos prótons olefínicos.



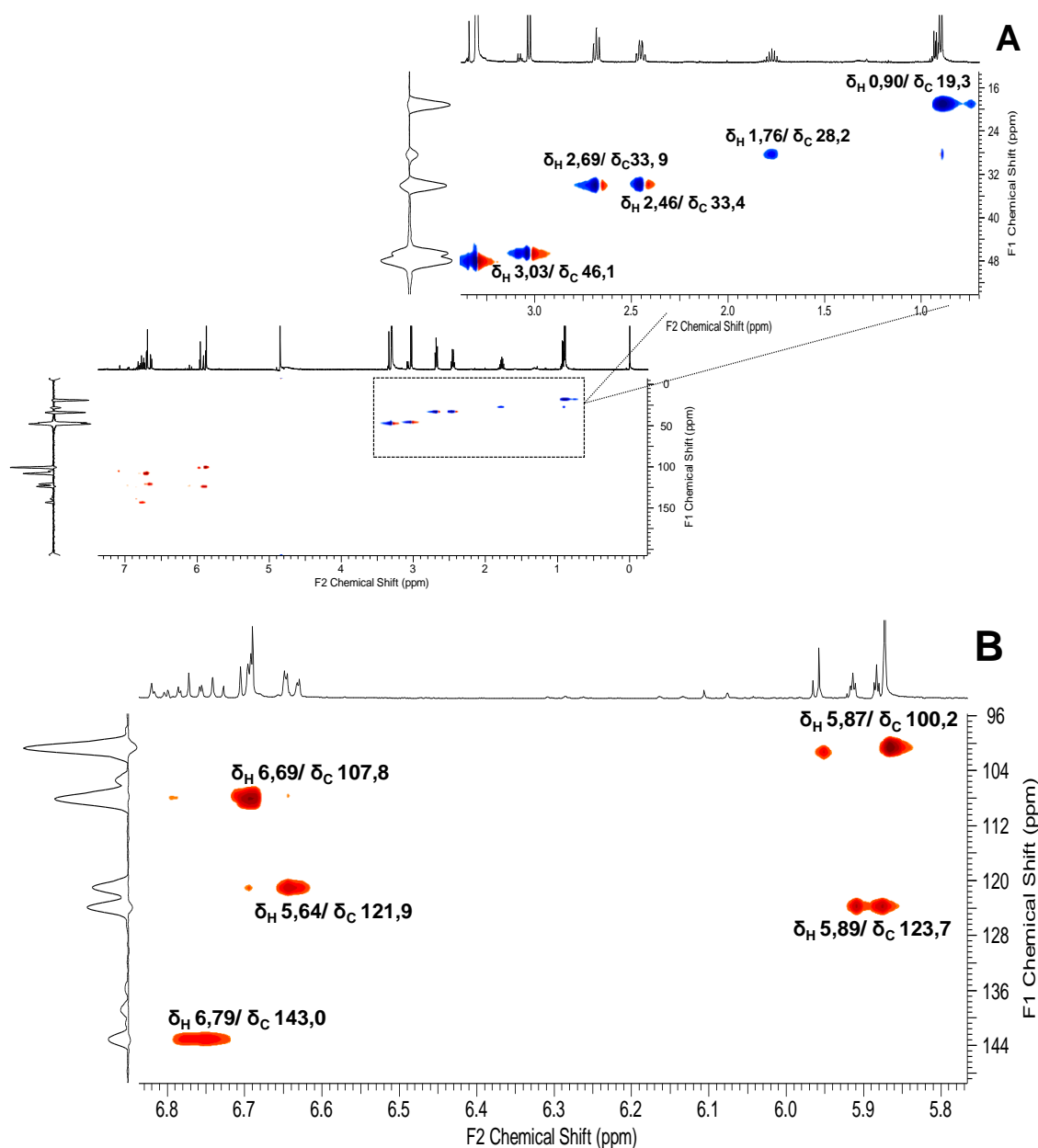


Ao analisar o mapa de contorno HSQC (Figura 29) foi possível assinalar todos os carbonos hidrogenados da substância. Onde, observou-se as correlações do multipletto na região dos prótons aromáticos em $\delta_{\text{H}} 6,69 - 6,71$ (H-2'/H-5') com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 108,1$ (C-2'/C-5'), bem como a correlação do duplo dubleto em $\delta_{\text{H}} 6,64$ (H-6') com carbono em $\delta_{\text{C}} 121,2$, evidenciando um sistema aromático.

Na região dos prótons olefínicos, os dois duplos tripletos em $\delta_{\text{H}} 6,76$ (H-3) e $\delta_{\text{H}} 5,89$ (H-2), foram atribuídos aos deslocamentos em $\delta_{\text{C}} 143,3$ (C-3) e $\delta_{\text{C}} 124,0$ (C-2). Além do mais, o singletto em $\delta_{\text{H}} 5,88$ (-OCH₂O) foi atribuído ao deslocamento em $\delta_{\text{C}} 100,6$ (-OCH₂O).

Os sinais dos prótons do grupo isobutila foram observados pela correlação do sinal do próton metilênico em $\delta_{\text{H}} 3,03$ (H-1'') com $\delta_{\text{C}} 46,1$ (C-1''), do próton metino em $\delta_{\text{H}} 1,76$ (H-2'') com $\delta_{\text{C}} 28,2$ (C-2'') e os prótons do grupo metila em $\delta_{\text{H}} 0,90$ (H-3'' / H-4'') com $\delta_{\text{C}} 19,3$ (C-3'' / C-4''). Pelo valor da integração (6H) verificada para o grupo metila, confirmou a presença desses prótons em ambientes químicos equivalentes. Ainda foi possível visualizar as correlações dos prótons metilênicos em $\delta_{\text{H}} 2,69$ (H-5) e $\delta_{\text{H}} 2,46$ (H-4) correlacionado com os carbonos em $\delta_{\text{C}} 33,9$ (C-5) e $\delta_{\text{C}} 33,4$ (C-4), respectivamente.

Figura 29. Mapa de correlação HSQC (A) ampliação da região dos prótons alifáticos (B) ampliação da região dos prótons olefínicos e aromáticos.



Através do mapa de contorno HMBC (Figura 30) foi possível observar as correlações à longa distância dos H-C (2J e 3J).

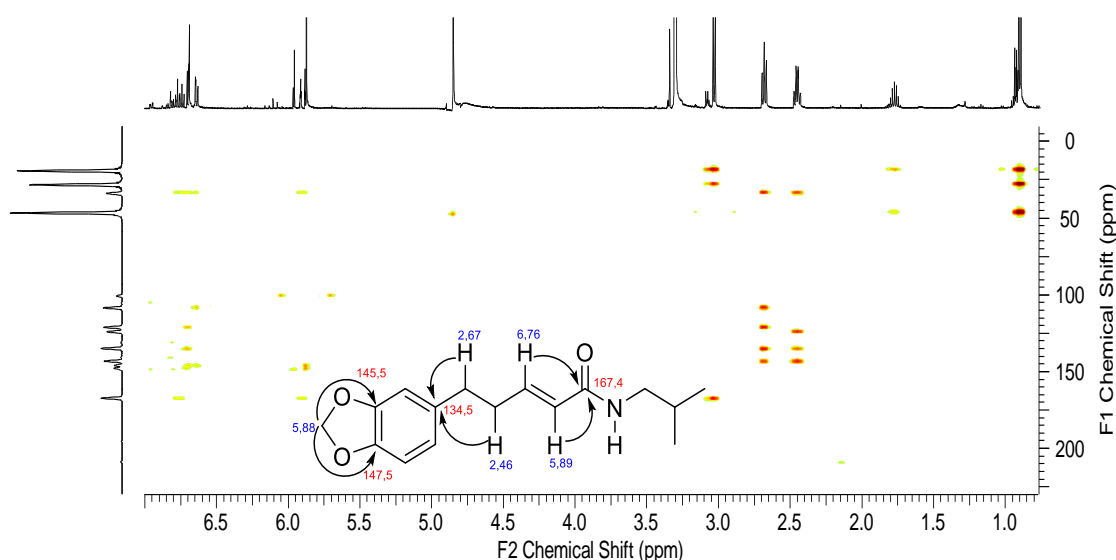
A confirmação do grupo isobutila da estrutura ficou pelas correlações em δ 0,96 (H-3'' / H-4'') correlacionado a 2J com o sinal do carbono em δ_C 28,4 (C-2''), e 3J com o carbono em δ_C 46,8 (C-1''). Ainda, em δ_H 3,03 (H-1'') correlacionando em 2J com o sinal do carbono em δ_C 28,4 (C-2''), e 3J com o carbono em δ_C 19,3 (C-3'' / C-4''). Além disso, correlação em 2J foi observada em δ_H 1,78 (H-2'') com os sinais do carbono em δ_C 46,8 (C-1'') e δ_C 19,3 (C-3'' / C-4'').

O sinal dos prótons olefínicos δ_H 5,89 (H-2) e δ_H 6,76 (H-3) apresentaram principais correlações com os carbonos em δ_C 33,4 (C-4), δ_C 167,4 (C-1), esta última

determina a posição do carbono quaternário do grupo amida da estrutura. Os prótons metilênicos foram confirmados pelas correlações de δ 2,46 correlacionado a 2J com o sinal dos carbonos em δ_C 143,3 (C-3), e 3J com o carbono em δ_C 120,0 (C-2), δ_C 134,5 (C-1) e, também pelas observações do sinal em δ 2,67 correlacionado a 2J com o sinal dos carbonos em δ_C 33,4 (C-4), δ_C 134,5 (C-1'), sendo esta última confirmando a presença do carbono quaternário do anel aromático.

Ainda o grupo metilenodióxi substituído em C-3' e C-4' foi confirmado pela correlação de δ 5,88 a 3J com o sinal dos carbonos em δ_C 145,5 (C-3'), δ_C 147,5 (C-4').

Figura 30. Mapa de correlação HSQC



Através dos dados espectrais de RMN de 1H , COSY, HSQC e HMBC (Tabela 6), acompanhado com as análises de espectrometria de massas, além da comparação aos dados espectrais descritos da literatura (BERNARD *et al.*, 1995; NAVICKIENE *et al.*, 2000), foi possível confirmar a substância PTF-07 (Figura 31), como a amida 4,5 diidropiperlonguminina.

Figura 31. Estrutura da amida PTF-07

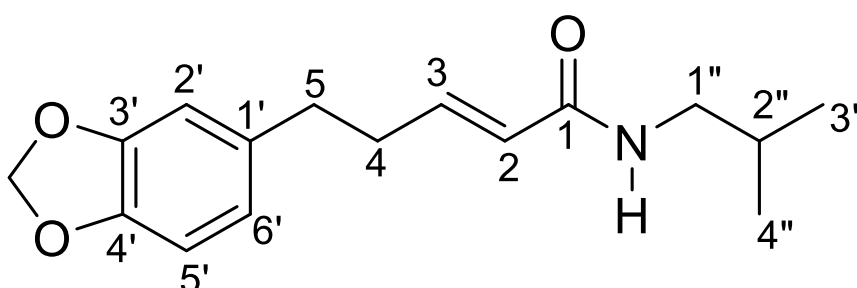


Tabela 6. Dados de RMN da amostra PTF-07

Posição	PTF-07			4,5 dihidropiperlongumina	
	δ_C^d	δ_H^a (multiplicidade; <i>J</i> em Hertz) ^a	HMBC ^a	δ_H^b (multiplicidade; <i>J</i> em Hertz) ^b	δ_C^c
1	167,4	-	-	-	166,0
2	120,0	5,89 (<i>dt</i> ; 15,3; 1,5) 1H	33,9; 167,4	5,96 (<i>dt</i> ; 15,2; 1,5) 1H	120,8
3	143,3	6,79 (<i>dt</i> ; 15,3; 6,9) 1H	33,9; 167,4	6,75 (<i>dt</i> ; 15,2; 7,5) 1H	142,6
4	33,9	2,46 (<i>dq</i> ; 7,3; 1,5) 2H	33,4; 120,0; 134,5; 143,3	2,44 (<i>dq</i> ; 7,5; 1,5) 2H	33,8
5	33,4	2,68 (<i>t</i> ; 7,5) 2H	107,9; 120,0; 134,5; 33,9	2,69 (<i>t</i> ; 7,5) 2H	34,1
1'	134,5	-	-	-	135,4
2'	108,1	6,69-6,71 (<i>m</i>) 1H	46,8; 19,3	6,79 (<i>d</i> ; 1,7) 1H	108,1
3'	145,5	-	-	-	145,6
4'	147,5	-	-	-	147,5
5'	108,1	6,69-6,71 (<i>m</i>) 1H	-	6,75 (<i>d</i> ; 7,9) 1H	108,8
6'	121,2	6,64 (<i>dd</i> ; 7,9; 1,4) 1H	-	6,64 (<i>dd</i> ; 7,9; 1,4) 1H	121,1
1''	46,8	3,03 (<i>d</i> ; 7,3) 2H	28,4; 19,3	3,16 (<i>t</i> ; 6,9) 2H	46,7
2''	28,4	1,76 (<i>non</i> ; 6,7) 1H	46,1; 19,3	1,77 (<i>non</i> ; 6,9) 1H	28,6
3''	19,3	0,90 (<i>d</i> ; 6,6) 6H	28,2; 46,7	0,89 (<i>d</i> ; 6,9) 6H	20,1
4''	19,3	0,90 (<i>d</i> ; 6,6) 6H	28,4; 46,7	0,89 (<i>d</i> ; 6,9) 6H	20,1
OCH ₂ O	100,6	5,88 (<i>s</i>) 2H	145,5; 147,5	5,95 (<i>s</i>) 2H	100,7

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H em MeOD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo BERNARD *et al.*, 1995 (¹H em Acetona-d, 100 MHz)

^c Dados da literatura de acordo NAVICKIENE *et al.*, 2000 (¹³C em CDCl₃, 50 MHz)

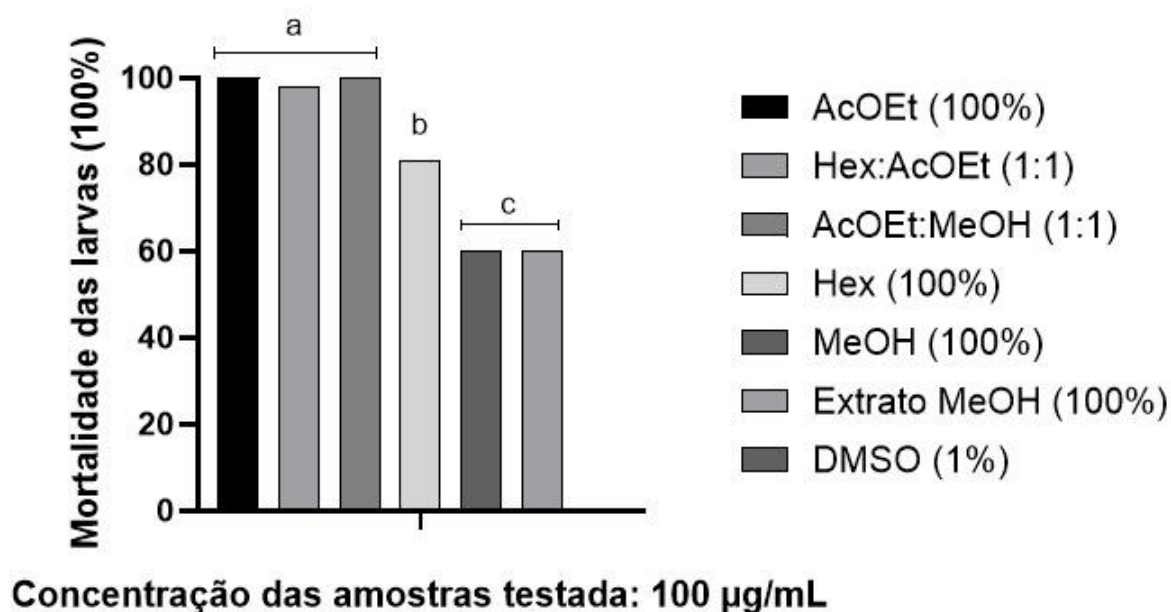
^d Os carbonos hidrogenados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

5.6 Atividade larvicida frente às larvas de *A. aegypti*

5.6.1 Atividade larvicida do extrato metanólico e frações das folhas de *P. tuberculatum*

Os resultados da atividade larvicida com o extrato metanólico e frações de *P. tuberculatum*, avaliados na concentração de 100 µg/mL frente às larvas de *A. aegypti*, após 24 h de exposição, são apresentados na figura 32. Entre as amostras avaliadas, as frações **EMFPT-2**, **EMFPT-3** e **EMFPT-4** demonstraram o maior potencial larvicida, com uma taxa de mortalidade larval registrada entre 94% e 100%. A fração **EMFPT-1** causou uma mortalidade de 81%. Por outro lado, tanto a **EMFPT-5** quanto o **EMFPL** apresentaram um menor potencial larvicida, resultando em uma taxa de mortalidade de 60%. Não foi observada mortalidade no grupo controle negativo (DMSO).

Figura 32. Atividade do extrato e frações frente a larvas de *A. aegypti*



Pohlit *et al.* (2004) avaliaram atividade larvicida do extrato metanólico das folhas de *P. tuberculatum* frente às larvas de *A. aegypti*, apresentando mortalidade de 100%, após 24 h de aplicação na concentração de 500 µg/mL. Portanto, o resultado obtido neste trabalho e com a literatura reforça que o extrato metanólico de *P. tuberculatum* e a sua utilização pode ser promissor como método alternativo no controle de mosquitos vetores da dengue.

5.6.2 Atividade larvicida das substâncias isoladas das folhas de *P. tuberculatum*

As substâncias isoladas da fração **EMFPT-03**, *cis*-piplartina (**PTF-03**), piplartina (**PTF-06**) e a 4,5-diidropiperlonguminina (**PTF-07**), foram avaliadas como agentes de mortalidade das larvas de *A. aegypti*, na concentração de 10 a 50 µg/mL. Os tratamentos dos dados obtidos com a quantidade de larvas mortas foram realizados com base na concentração letal 50% (CL₅₀) e concentração letal 90% (CL₉₀). Os resultados são expressos a seguir, na tabela 7.

Tabela 7. Atividade larvicida frente as larvas de *A. aegypti* das substâncias isoladas da fração EMFPT-03 (*cis*-piplartina, piplartina e, 4,5-diidropiperlonguminina).

Amostras	Concentrações (µg/mL)	Mortalidade (%)	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₉₀ (µg/mL)
<i>Cis</i> -piplartina	10	5 ± 2	23,77 (22,060-25,464)	45,52 (41,440-51,225)
	20	36 ± 5		
	30	61 ± 5		
	40	81 ± 4		
	50	97 ± 2		
Piplartina	10	2 ± 0	30,18 (28,091-32,10)	60,93 (54,101-71,453)
	20	22 ± 6		
	30	49 ± 5		
	40	69 ± 6		
	50	81 ± 1		
4,5-diidropiperlonguminina	10	2 ± 0	29,04 (27,199-30,938)	53,05 (48,178-60,148)
	20	21 ± 4		
	30	51 ± 4		
	40	71 ± 5		
	50	92 ± 3		
α -Cypermethrin	0.13	1 ± 0	0,35 (0,331-0,378)	0,650 (0,593-0,733)
	0.26	25 ± 6		
	0.39	57 ± 6		
	0.52	79 ± 5		
	0.62	91 ± 5		

Conforme observado na tabela 7, as amidas *cis*-piplartina e piplartina, isoladas das folhas de *P. tuberculatum* exibiram importante atividade larvicida contra *A. aegypti*, causando mortalidade variando de 2 ± 0 a 97 ± 2% e CL₅₀ de 23,77 e 30,18 µg/mL, respectivamente, quando comparados ao controle positivo, que apresentou atividade larvicida de 1 ± 0 a 91 ± 5 e CL₅₀ de 0,35 µg/mL.

Com relação a amida *cis*-piplartina, observa-se atividade larvicida nas três maiores concentrações testadas (30, 40 e 50 µg/mL), com percentuais de mortalidade de 61 ± 5, 81 ± 4 e 97 ± 2%, respectivamente, em 24 h de exposição. Nas demais concentrações, a mortalidade foi inferior a 50% na leitura de 24 h. Este é o primeiro relato de atividade larvicida contra *A. aegypti* para esta substância.

A amida piplartina, nas duas maiores concentrações (40 e 50 µg/mL) apresentaram percentuais de mortalidade elevadas de 71 ± 5% e 81 ± 1%, respectivamente. Estudos realizados por Maleck *et al.* (2014) também avaliaram a

piplartina, no entanto em sete concentrações (1, 10, 30, 50, 70, 100 e 300 µg/mL), em larvas de terceiro ínstar de *A. aegypti*, estes autores observaram percentual de mortalidade elevada de 100%, somente na maior concentração (300 µg/mL) e nas concentrações inferiores não apresentaram atividade larvicida. Comparando a substância avaliada neste trabalho com a literatura, este estudo mostrou que na concentração de 50 µg/mL, observou-se atividade mais significativa do que reportada na literatura.

A amida 4,5-diidropiperlonguminina, apresentou atividade larvicida elevada com percentuais de $71 \pm 5 \%$ e $92 \pm 3 \%$, nas concentrações (40 e 50 µg/mL), respectivamente. Não há relato na literatura de bioensaios em larvas de terceiro ínstar de *A. aegypti* para esta amida isolada.

De acordo com a investigação de Garcez *et al.* (2013), foi observado que de onze substâncias ativas testadas na família Piperaceae frente larvas de *A. aegypti*, dez ocorrem no gênero Piper e são pertencentes as amidas. Isso ressalta a importância do estudo desse gênero, pois a significativa atividade larvicida apresentada pelo gênero pode ser atribuída à presença de composto contendo amidas.

6 CONCLUSÃO

A partir do estudo fitoquímico dos constituintes químicos do extrato metanólico bruto das folhas de *P. tuberculatum* realizados por métodos cromatográficos clássicos e moderno, bem como métodos espectroscópios e espectrométrico (RMN 1D e 2D; EM), a (EMFPT-3) resultou no isolamento e identificação das amidas *cis*-piplartina (**21**), piplartina (**23**) e 4,5-diidropiperlongumina (**29**), todas já reportados para a espécie *P. tuberculatum*.

O extrato metanólico bruto das folhas de *P. tuberculatum* apresentou atividade larvicida frente larvas de *A. aegypti*, com mortalidade de 60%, em 24 h. Enquanto, as frações codificadas EMFPT-2; EMFPT-3; EMFPT-3, apresentaram atividade larvicida com mortalidade de 92 a 100%. Esses resultados corroboram com o potencial larvicida de extratos vegetais brutos de espécies do gênero *Piper*.

As amidas isoladas *cis*-piplartina, piplartina e 4,5-diidropiperlongumina apresentaram atividade larvicida elevada frente larvas de *A. aegypti* com 50 µg/mL, após 24 h de exposição, demonstrando ser uma alternativa viável no controle do vetor da dengue. Sendo este trabalho o primeiro trabalho a reportar atividade larvicida das amidas *cis*-piplartina e 4,5-diidropiperlongumina frente vetores da dengue.

Assim, este presente trabalho contribuiu para conhecimento químico e biológico do gênero *Piper* e da espécie botânica investigada. Além disso, os resultados obtidos reforçam o potencial larvicida de *P. tuberculatum* frente larvas de *A. aegypti*, bem como amidas isoladas *cis*-piplartina, piplartina e 4,5-diidropiperlongumina como possível indicador da atividade larvicida do extrato metanólico, podendo ser sugeridas como fonte larvicida promissoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDAE, I. M., ACHIENG, G. Larvicidal effects of six amide alkaloids from *Piper guineense*. **Planta medica**, v. 52, n. 05, p. 432-432, 1986.
- AGBOR, G. A., VINSON, J. A., JOHNSON, R. Antioxidant and anti-atherogenic activities of three species on atherogenic diet fed hamsters, *Experimental and Toxicologic Pathology*. v. 64, n. 4, p. 387-39, 2012
- AGRA, M. F., FREITAS, P. F., BARBOSA, J. M. F. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- ALÉCIO, A. C., BOLZANI, V. D. S., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J., FURLAN, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 5, p. 637-639, 1998.
- ANDRADE-NETO, V. F., POHLIT, A. M., PINTO, A. C. S., SILVA, E. C. C., NOGUEIRA, K. L., MELO, M. R., ... & VIEIRA, P. P. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 359-366, 2007.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP *et al.* An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- ARAÚJO-JUNIOR, J. X., DA-CUNHA, E. V., CHAVES, M. C. D. O., GRAY, A. I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 559-561, 1997.
- AVELLA, E., DÍAZ, P. P., DE DÍAZ, A. M. P. Constituents from *Piper divaricatum*. **Planta medica**, v. 60, n. 02, p. 195-195, 1994.
- BALDOQUI, D. C., KATO, M. J., CAVALHEIRO, A. J., DA SILVA BOLZANI, V., YOUNG, M. C. M., FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899-902, 1999.
- BENELLI, Giovanni. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology research**, v. 114, n. 8, p. 2801-2805, 2015.
- BENEVIDES, P. J. C., SARTORELLI, P., KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry*, v. 52, n. 2, p. 339-343, 1999. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 801-814, 1995.
- BERNARD, C. B. *et al.* Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 801-814, 1995.
- BEZERRA, D. P., PESSOA, C., MORAES, M. O. D., ALENCAR, N. M. D., MESQUITA, R. O., LIMA, M. W., COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the *Piper* species. **Journal of Applied toxicology**, v. 28, n. 5, p. 599-607, 2008.
- BEZERRA, G. B., RAMOS, C. S. Perfil químico biomonitorado das folhas de *Piper marginatum* durante a ontogenia. **Rev. Virtual Quim**, v. 13, n. 1, p. 260-9, 2021.
- BRASIL. ANVISA. **RE nº 356, de 28 de fevereiro de 2002. Venda sob prescrição médica da *Piper methycticum* (Kava Kava)**. Anvisa, 28 fev.2002 [S.l.] Disponível em: <http://elevis.bvs.br/leisref/public/search.php> Acesso em: 15 mar. 23

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. (2016). Guia de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/guia_vigilancia_saude_led_atual.pdf. Acesso em: 20 de jan. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **DENGUE** [S. l.] Ministério da Saúde, 10 fevereiro. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dengue>. Acesso em 10 fev. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instrução Normativa IN nº2, de 13 de maio de 2014.** [S. l.] Ministério da Saúde, 13 mai. 2014 Atualizado em 06 dez. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnmpf/orientacao-ao-prescritor/Publicacoes/instrucao-normativa-in-no-2-de-13-de-maio-de-2014.pdf/view>. Acesso em 15 mar. 23.

BRESSANIN, G.G. N., MELO, A. L. T., DE SOUZA PERINOTTO, W. M. Óleos Essenciais com Atividade Acaricida para Controle de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* no Brasil. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 5-esp., p. 480-488, 2020.

CALLEJAS, P. R. Flora Mesoamericana, Volumen 2, Parte 2: **Piperaceae**. Ed. **Universidad Nacional Autónoma de México**, Missouri Botanical Garden Press e o Natural History Museum - Londres, 2020, 618p. ISBN-13: 978-1935641209.

CAMPOS, J., ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 232-236, 2001.

CHANDRA, P., PANDEY, R., SRIVASTVA, M., RAMESHKUMAR, K. B., KUMAR, B. Quantitative determination of chemical constituents of *Piper* spp. using UPLC–ESI–MS/MS. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 967-976, 2015.

CHAVES, M. C. D. O., SANTOS, B. O. D. V. Constituents from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 547-549, 2002.

CHEN, J. J., CHANG, Y. L., TENG, C. M., LIN, W. Y., WU, C. C., CHEN, I. S. A new aristolactam alkaloid and anti-platelet aggregation constituents from *Piper taiwanense*. **Planta medica**, v. 70, n. 02, p. 174-177, 2004.

CLOUATRE, D. L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 1, p. 85-96, 2004.

CONSOLI, R. AG. B., OLIVEIRA, R. L. D. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

CUNICO, M. M., CARVALHO, J. L. S., KERBER, V. A., HIGASKINO, C. E. K., CRUZ ALMEIDA, S. C., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p.97-103, 2004.

DEWICK, Paul M. **Produtos medicinais naturais: uma abordagem biossintética**. John Wiley e Filhos, 2002.

DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora Unesp, 2002.

DYER, L. A., PALMER, A. DN (Ed.). **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution**. New York: Kluwer academic/Plenum publishers, 2004.

- EE, G. C. L., LIM, C. M., RAHMANI, M., SHAARI, K., BONG, C. F. J. Pellitorine, a potential anti-cancer lead compound against HL60 and MCT-7 cell lines and microbial transformation of piperine from *Piper nigrum*. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2398-2404, 2010.
- FACUNDO, V. A., POLLLI, A. R., RODRIGUES, R. V., MILITÃO, J. S. T., STABELLI, R. G., CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* HBK. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 743-748, 2008.
- FÃO, F., ZAN, R. A., BRONDANI, F. M., RAMOS, L. J., DE OLIVEIRA MENEGUETTI, M. D. U. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de Croton lechleri (Müll. Arg), no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, 2012.
- FÁTIMA FERREIRA-DA-CRUZ, M., ADAMI, Y. L., DA CRUZ ESPINOLA-MENDES, E., FIGUEIREDO, M. R., DANIEL-RIBEIRO, C. T. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiparasitic activity in the Pothomorphe plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 243-247, 2000.
- FEO, M. L., ELJARRAT, E., BARCELÓ, D. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 692-705, 2010.
- FERREIRA, E. F., SÃO JOSE, A.R., BOMFIM, M. P., PORTO, J. S. JESUS, J. S. D. Uso de extratos vegetais no controle in vitro do Colletotrichum gloeosporioides Penz. coletado em frutos de mamoeiro (Carica papaya L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 346-352, 2014.
- FERREIRA, P. **Glossário de Doenças**. Malária. Agência Fiocruz de Notícias/Saúde e Ciências para Todos, 2006. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/doenca/malaria> Acesso em: 10 jun. 2023.
- FORATTINI, O. P. Identificação, biologia e epidemiologia. **Culicidologia Médica. V2 ed. Universidade de Sao Paulo**, 2002.
- FRANÇA, A. A. C., PEREIRA, A. D., FERNANDES, K. A., COSTA, A. K. B., RAMOS, M. A. B., MARTINS, F. A., SA, J. L. S. Potencialidades da Piperina: um estudo realizado por meio das técnicas de Prospecção Científica e Tecnológica. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 2, 2021.
- FURTADO, R. F., DE LIMA, M. G., NETO, M. A., BEZERRA, J. N. S., SILVA, M. G. DE V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 843-847, 2005.
- GAMBOA, F., MUÑOZ, C. C., NUMPAQUE, G., SEQUEDA-CASTAÑEDA, L. G., GUTIERREZ, S. J., TELLEZ, N. Antimicrobial activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on microorganisms associated with periodontal disease. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, 2018.
- GARCEZ, W. S., GARCEZ, F. R., SILVA, L. M. G. E. DA.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.
- GESTO, J. S., RIBEIRO, G. S., ROCHA. M.N., DIAS, B. S., PEIXTO, J., CARVALHO, F. D.; PEREIRA, T. N.; MOREIRA, L. A. Reduced competence to arboviruses following the sustainable invasion of Wolbachia into native *Aedes aegypti* from Southeastern Brazil. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 10039, 2021.

- GUIMARÃES, E. F., CARVALHO-SILVA, M., MEDEIROS, E. V. S. S., MONTEIRO, D., QUEIROZ, G. A. **Piperaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB190>>. Acesso em: 28 abr. 2023.
- GUIMARÃES, E. F., GIORDANO, L. C. D. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, p. 21-46, 2004.
- GUIMARÃES, E. F., MEDEIROS, E. V. S. S., QUEIROZ, G. A. **Piper in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12735>>. Acesso em: 28 abr. 2023.
- JARAMILLO, M. A., MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.
- JIN, Z., KWON, M., LEE, A. R., RO, D. K., WUNGSINTAWEEKUL, J., KIM, S. U. Molecular cloning and functional characterization of three terpene synthases from unripe fruit of black pepper (*Piper nigrum*). **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 638, p. 35-40, 2018.
- KATO, M. J. et al. **Evolução metabólica em espécies de Piperaceae**. XXVI Reunião Anual sobre evolução, sistemática e ecologia micromolecular. Instituto de Química, Univ. Fed. Fluminense, p. 27, 2004.
- KITAMURA, R. O. S., ROMOFF, P., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J., LAGO, J. H. G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2398-2402, 2006.
- KIUCHI, F., MIYASHITA, N., TSUDA, Y., KONDO, K., YOSHIMURA, H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 7, p. 2880-2886, 1987.
- KOK, Boon Hui et al. Dengue virus infection—a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. **Virus research**, v. 324, p. 199018, 2023.
- LAGO, J. H. G., CHEN, A., YOUNG, M. C. M., GUIMARAES, E. F., DE OLIVEIRA, A.; KATO, M. J. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 96-98, 2009.
- LIMA MOREIRA, D., SIQUEIRA, M. R. P., DO AMARAL, T. M., CANDIDO, F. S. Atividade larvicida de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de Piperaceae do Estado do Rio de Janeiro. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 35, 2014.
- LIMA, D. M. D. et al. Bioactive neolignans from the leaves of *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae). **Records of Natural Products**, v. 10, n. 4, p. 472, 2016.
- LIMA, D. M., DE PAIVA, R. A., MARQUES, A. M., BORGES, R. M., BARRETO, A. L. S., DA ROCHA CURVELO, J. A., KAPLAN, M. A. C. Bioactive neolignans from the leaves of *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae). **Records of Natural Products**, v. 10, n. 4, p. 472, 2016.
- LIU, H., LUO, R., CHEN, X., LIU, J., BI, Y., ZHENG, L., WU, X. Tissue distribution profiles of three antiparkinsonian alkaloids from *Piper longum* L. in rats determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 78-82, 2013.
- MALECK, M., FERREIRA, B., MALLET, J., GUIMARÓES, A., KATO, M. Cytotoxicity of piperamides towards *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 51, n. 2, p. 458-463, 2014.

- MARCHIORI, Edson; HOCHHEGGER, Bruno; ZANETTI, Gláucia. Manifestações pulmonares da dengue. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, 2020.
- MARQUES, J. V., KITAMURA, R. O. S., LAGO, J. H. G., YOUNG, M. C. M., GUIMARÃES, E. F., KATO, M. J. Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 12, p. 2036-2039, 2007.
- MARTINEZ, C., CARVALHO, M. R., MADRINAN, S., JARAMILLO, C. A. A Late Cretaceous *Piper* (Piperaceae) from Colombia and diversification patterns for the genus. **American Journal of Botany**, v. 102, n. 2, p. 273-289, 2015.
- MARTINS, A. P., SALGUEIRO, L., VILA, R., TOMI, F., CANIGUERAL, S., CASANOVA, J.; ADZET, T. Essential oils from four *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2019-2023, 1998.
- MARTINS, R. C., LAGO, J. H. G., ALBUQUERQUE, S., KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667-670, 2003.
- MARTINS, R. C., LATORRE, L. R., SARTORELLI, P., KATO, M. J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 843-846, 2000.
- MEJÍA, K. C., RENGIFO, E. L. S. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía peruana. 2000.
- MENDES, A. N., FILGUEIRAS, L. A., SIQUEIRA, M. R. P., BARBOSA, G. M., HOLANDINO, C., DE LIMA MOREIRA, D., NELE, M. Encapsulation of *Piper cabralanum* (Piperaceae) nonpolar extract in poly (methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of increase in the effectiveness of antileukemic activity in K562 cells. **International Journal of Nanomedicine**, p. 8363-8373, 2017.
- MILLER, L. H., ACKERMAN, H. C., SU, X. Z., WELLEMS, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nat Med**, v. 19, n. 2, p. 156-67, 2013.
- MIRANDA, J. E., NAVICKIENE, H. M. D., NOGUEIRA-COUTO, R. H., DE BORTOLI, S. A., KATO, M. J., DA SILVA BOLZANI, V., FURLAN, M. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, n. 4, p. 409-415, 2003.
- MORIKAWA, T., MATSUDA, H., YAMAGUCHI, I., PONGPIRIYADACHA, Y., YOSHIKAWA, M. New amides and gastroprotective constituents from the fruit of *Piper chaba*. **Planta medica**, v. 70, n. 02, p. 152-159, 2004.
- NAHAK, G., SAHU, R.K. Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*). **Journal of Applied Scienses**, v. 1, n. 8, p. 153-157, 2011.
- NASCIMENTO, J. É. C., REATGUI, W. D. S., ARAÚJO, L. S. D., RIBEIRO, M. E. D. S., MAIA, D. C. D. S., GIACOMIN, L. L., BARATTO, L. C. Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. 2017.
- NAVICKIENE, H. M. D., ALÉCIO, A. C., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., YOUNG, M. C. M., CAVALHEIRO, A. J., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000.
- OESTERREICH, S. A., TRAESEL, G. K., PICCINELLI, A. C., AQUINO, D. F. S., MOTA, J., ESTANISLAU, C., KASSUYA, C. A. L. Antidepressant and anxiolytic effects of ethanol extracts from four *Piper* species. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 1, p. 34-42, 2015.

- ORJALA, J., WRIGHT, A. D., BEHREND, H., FOLKERS, G., STICHER, O., RÜEGGER, H., RALI, T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 18-26, 1994
- PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISHT, K. S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PLAZAS, G., CUCA, L. E., DELGADO, W. A. FLAVONOIDES AISLADOS DE LAS INFLORESCENCIAS DE *Piper hispidum* Kunth (PIPERACEAE) Y DERIVADOS ACETILADOS ISOLATED. **Revista Colombiana de Química**, v. 37, n. 2, p. 135-144, 2008.
- POHLIT, Adrian Martin et al. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta amazonica**, v. 34, p. 97-105, 2004.
- PUHL, M. C. M. N., CORTEZ, D. A. G., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., FILHO, B. P. D. Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9925-9938, 2011.
- PUTRI, N. S., NOLI, Z. L. Callus culture as the method in providing antimalarial compounds of *Piper* genus. **Journal of Environmental Science for Sustainable Society**, v. 10, n. Supplement, p. PP03_p8-PP03_p11, 2021.
- RIDZUAN, P. M., ALAINA, H. Y., ATIKA, A. R., NAZIRA, C. M., AFRINA, A., ALYA-SYARAFINA, M. S., HALIM, S. The efficacy of *Piper aduncum* extracts as natural larvicides against *Aedes aegypti* larvae. **Inter. J. Med. Toxicol. Legal Med.** 2019; 22(1):152-59.
- RIOS, M. N. D. S., PASTORE, F. J. (org.). **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. 3378 p., il.
- ROZENDAAL, J. A. **Vector control: methods for use by individuals and communities**. World Health Organization, 1997.
- SANTOS, M. R. A. D., SILVA, A. G., LIMA, R. A., LIMA, D. K. S., SALLET, L. A. P., TEIXEIRA, C. A. D., FACUNDO, V. A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, p. 319-324, 2010.
- SCHAAB, E. H., CROTTI, A. E. M., IAMAMOTO, Y., KATO, M. J., LOTUFO, L. V. C., LOPES, N. P. Biomimetic oxidation of piperine and pipartine catalyzed by iron (III) and manganese (III) porphyrins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 912-916, 2010.
- SCOTT, I. M., JENSEN, H. R., PHILOGÈNE, B. J., ARNASON, J. T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 65-75, 2008.
- SHI, Y. N., LIU, F. F., JACOB, M. R., LI, X. C., ZHU, H. T., WANG, D., ZHANG, Y. J. Antifungal amide alkaloids from the aerial parts of *Piper flaviflorum* and *Piper sarmentosum*. **Planta Medica**, v. 83, n. 01/02, p. 143-150, 2017.
- SILVA, M. A., DA SILVA, F. B., PASSARINI, G. M., FIALHO, S. N., DOS SANTOS, A. P. D. A., MARTINEZ, L. D. N., KUEHN, C. C. PIPLARTINE AND PIPERINE: a review of their biological activities. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 2, p. 818-858, 2019.
- SILVA, R. V., NAVICKIENE, H. M. D., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., MÉDA, C. I., YOUNG, M. C. M., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.

SILVA-JUNIOR, E. A., PALUDO, C. R., GOUVEA, D. R., KATO, M. J., FURTADO, N. A. J. C., LOPES, N. P., PUPO, M. T. Gas-phase fragmentation of protonated piplartine and its fungal metabolites using tandem mass spectrometry and computational chemistry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 8, p. 517-525, 2017.

SOUZA, V. A.; DA SILVA, R.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. D. A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; SILVA, M. L. *Trypanocidal* activity of (–)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 2, p. 303-307, 2005.

SPLETOZER, A. G.; SANTOS, C. R. D.; SANCHES, L. A.; GARLET, J. Plantas com potencial inseticida: enfoque em espécies amazônicas. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 974-997, 2021.

SRINIVASA REDDY, P., JAMIL, K., MADHUSUDHAN, P., ANJANI, G., DAS, B. Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. **Pharmaceutical biology**, v. 39, n. 3, p. 236-238, 2001.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007.

TANG, G. H., CHEN, D. M., QIU, B. Y., SHENG, L., WANG, Y. H., HU, G. W., LI, J. Cytotoxic amide alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 1, p. 45-49, 2011.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 39, p. 275-277, 2006.

THE COMPOSITA E HUT. **Distribución geográfica la familia Piperaceae**. Disponível em

https://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/piperaceae.html Acesso em: 13 jul. 23.

TICONA, J. C.; BILBAO-RAMOS, P.; AMESTY, Á., FLORES, N.; DEA-AYUELA, M. A.; BAZZOCCHI, I. L.; JIMÉNEZ, I. A. Flavonoids from *Piper* Species as Promising Antiprotozoal Agents against *Giardia intestinalis*: Structure-Activity Relationship and Drug-Likeness Studies. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 11, p. 1386, 2022.

TSAI, I. L., LEE, F. P., WU, C. C., DUH, C. Y., ISHIKAWA, T., CHEN, J. J., CHEN, I. S. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. **Planta medica**, v. 71, n. 06, p. 535-542, 2005.

VEIGA-SANTOS, P., DESOTI, V. C., MIRANDA, N., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B. P., SILVA, S. O., NAKAMURA, C. V. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. **Acta tropica**, v. 125, n. 3, p. 349-356, 2013.

WANKE, S., JARAMILLO, M. A., BORSCH, T., SAMAIN, M. S., QUANDT, D., NEINHUIS, C. Evolution of Piperales—matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 42, n. 2, p. 477-497, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2023. **Dengue**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> Acesso em: 30 de set. de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization Communicable Disease Control, Prevention and Eradication Who Pesticide Evaluation Scheme 1–41.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report 2020. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2020.

XUAN, T. D., FUKUTA, M., WEI, A. C., ELZAAWELY, A. A., KHANH, T. D., TAWATA, S. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum*) roots. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 188-194, 2008.

YAMAGUCHI, L. F., LAGO, J. H. G., TANIZAKI, T. M., DI MASCIO, P., & KATO, M. J. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1838-1843, 2006.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. **Hoehnea**. 2:19-366. 1972.

ZIMATH, P. L., RIBEIRO, T. C., DALMAGRO, A. P., SANTOS, M. E. D., GASPARETTO, A., CRUZ, A. B., SOUZA, M. M. D. Avaliação psicofarmacológica do óleo essencial de *Piper amplum*. 2017.

ANEXOS

Figura A1. Espectro de APCI- MS (modo positivo) da amostra PLF-03

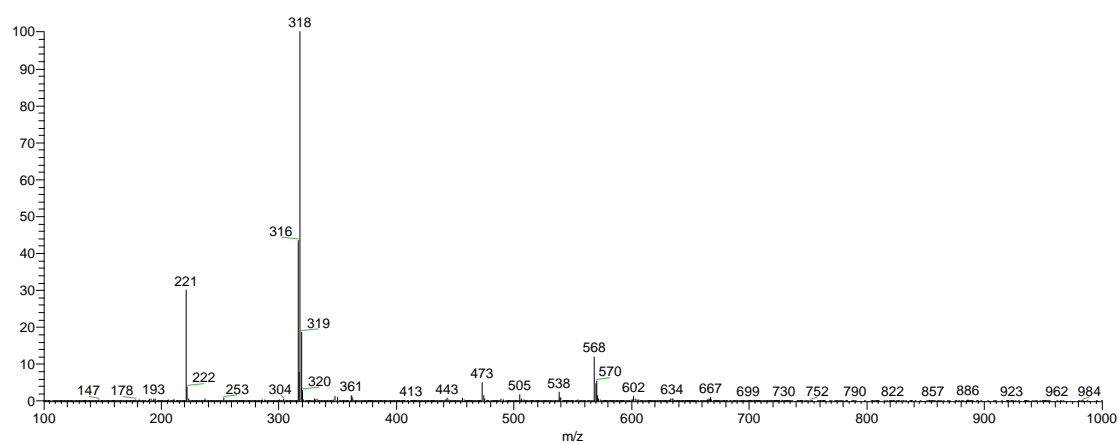
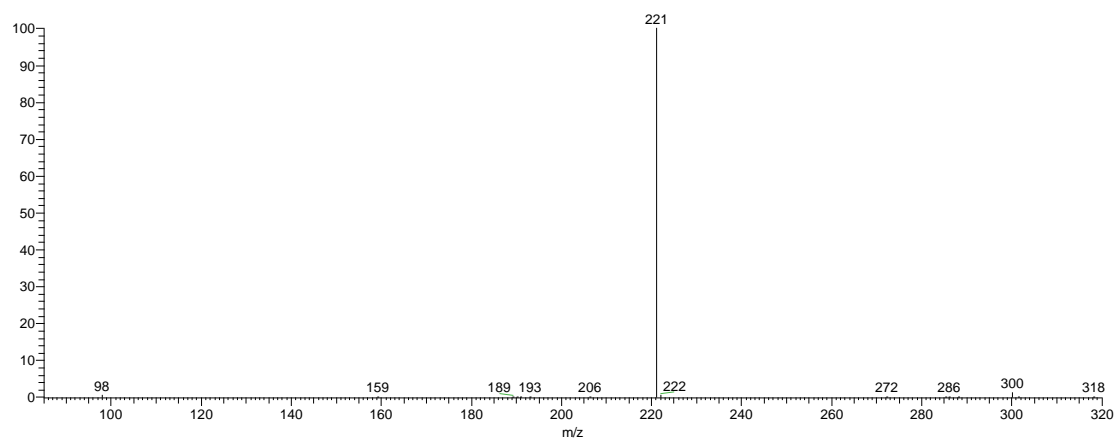
Figura A2. Espectro de APCI- MS² (modo positivo) da amostra PLF-03

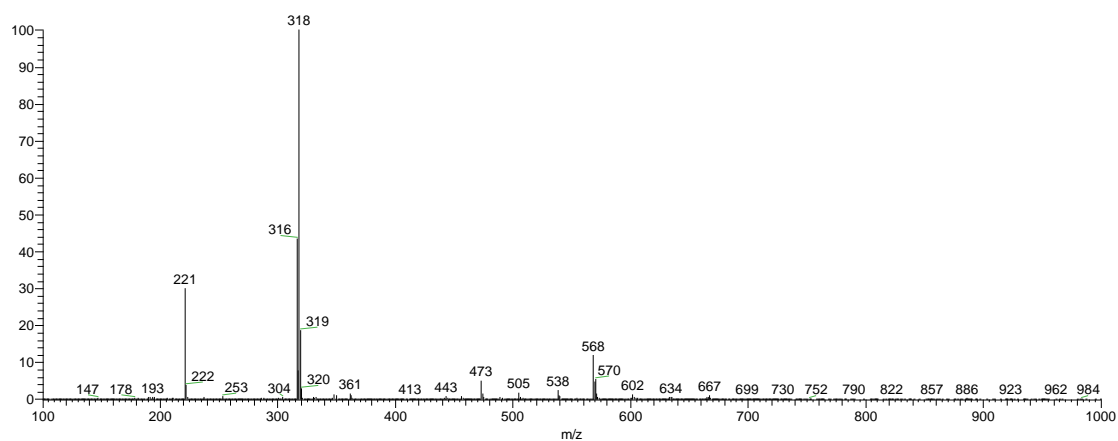
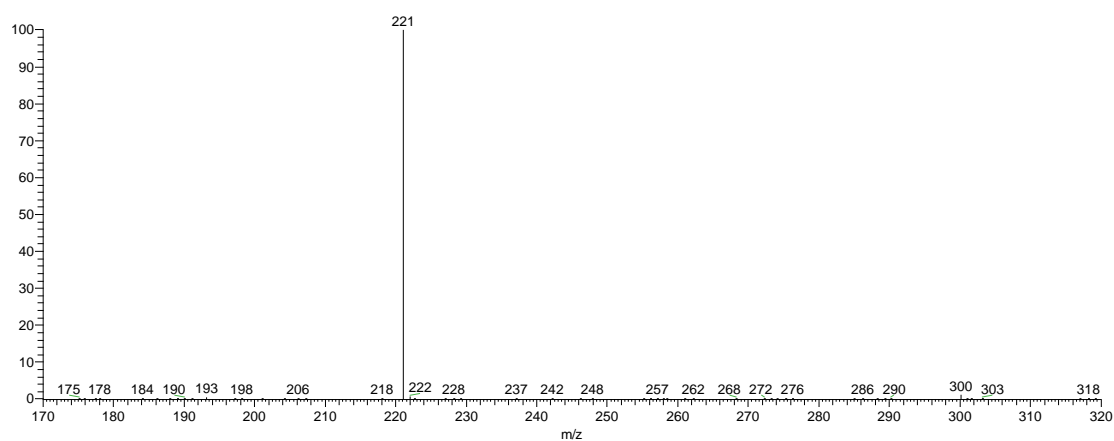
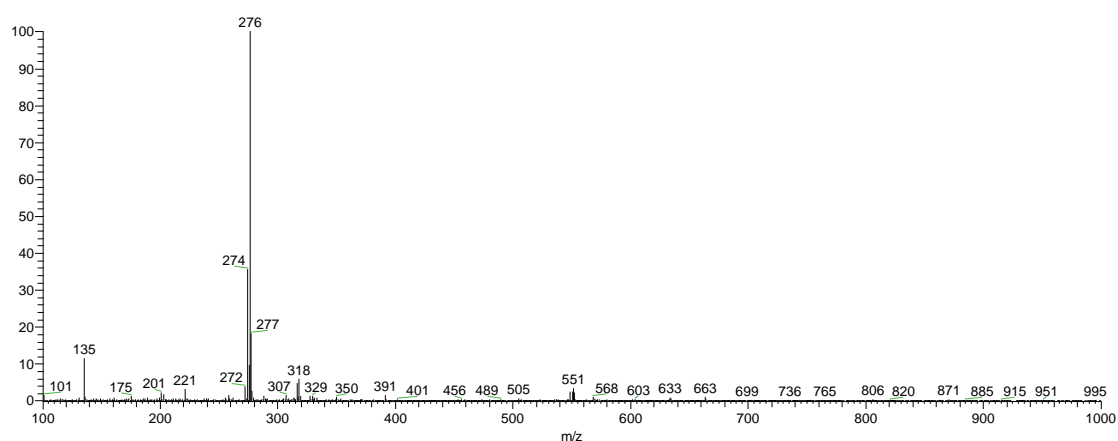
Figura A4. Espectro de APCI- MS (modo positivo) da amostra PLF-06**Figura A5. Espectro de APCI- MS² (modo positivo) da amostra PLF-06****Figura A6. Espectro de APCI- MS (modo positivo) da amostra PLF-07**

Figura A7. Espectro de APCI- MS² (modo positivo) da amostra PLF-07