



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

1



ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Piper capitarianum* (PIPERACEAE)
PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus* (CULICIDAE)

LEANDRO PEREIRA FRANÇA

MANAUS – AM

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA



Área: Biotecnologia para saúde

Linha de Pesquisa: Princípios bioativos de recursos naturais contra patógenos de doenças de impacto social no Brasil;

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Piper capitarianum* (PIPERACEAE)
PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus* (CULICIDAE)

LEANDRO PEREIRA FRANÇA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva

Co-Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

MANAUS – AM

2021

Ficha Catalográfica

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

F837e França, Leandro Pereira
Estudo químico e biológico de *Piper capitarium* (Piperaceae)
para o controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Culicidae) /
Leandro Pereira França . 2021
143 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Jefferson Rocha de Andrade Silva
Coorientador: Wanderli Pedro Tadei
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Óleo essencial. 2. Inseticida natural. 3. Piper. 4. Aedes. I. Silva,
Jefferson Rocha de Andrade. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado esta oportunidade, por nunca ter me deixado fraquejar, mesmo nos momentos de maior agonia, e enfim, agora, concretizá-lo.

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade e a CAPES, pela concessão da bolsa durante período do Curso de Doutorado.

Aos meus orientadores Dr. Jefferson Rocha, Dr. Wanderli Tadei e Dra. Ana Claudia pela orientação, confiança e oportunidade, o que tornou possível a realização desse trabalho;

A minha família, Lourdes e Pedro (pais), Lucileide, Luciana, Leticia (irmãs), Liandra e João Pedro (sobrinhos), Cezar, Elwis e Washington, (cunhados), por todos os momentos de alegria e ensinamentos de vida, amor, apoio, compreensão, incentivo, palavras de conforto e fé.

A minha esposa Wynlara Braga, por ter caminhado ao meu lado, pela sua paciência, compreensão e, especialmente por apresentar sempre um sorriso, quando sacrificava os dias, as noites, os fins-de-semana e os feriados em prol da realização deste estudo.

Ao Laboratório de Malária e Dengue do INPA, Laboratório de Cromatografia da UFAM e Laboratório de Produtos Naturais da Fiocruz pelo auxílio na realização do trabalho.

RESUMO

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são vetores importantes na transmissão da dengue, chikungunya e zika no Brasil e em outros países. Devido à crescente resistência a inseticidas químicos entre as populações de vetores, estratégias ambientalmente corretas para o manejo de vetores estão recebendo cada vez mais atenção. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a composição química dos óleos essenciais e extratos de *Piper capitarianum*, bem como seu potencial inseticida, para o controle de *A. aegypti* e *A. albopictus*. A espécie vegetal foi coletada na EMBRAPA onde foram retiradas as folhas, galhos e inflorescências para extração dos óleos e preparação dos extratos. Os óleos essenciais foram analisados por CG-EM e o extratos foram analisados por CCD e RMN. As nanoemulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases, contendo água destilada (fase aquosa), óleo essencial, e os tensoativos (fase oleosa) misturados sob agitação ultrassônica a 100 rpm por 10 min. Os ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram obtidos do Laboratório de Malária e Dengue do INPA, mantidos até atingirem o terceiro instar larval, quando foram utilizados nos bioensaios. Os dados obtidos foram analisados no programa POLO PC®, para cálculos das respectivas CL₅₀ e CL₉₀. Nos óleos essenciais foram identificados, como substâncias principais, o *trans*-cariofileno, humuleno e linalol. O extrato mais ativo foi submetido a fracionamento guiado por bioensaio que resultou no isolamento de flavona e chalcona com atividade biológica. Os resultados deste estudo evidenciaram a atividade larvicida e adulticida dos óleos, nanoemulsões e extratos de *P. capitarianum*, indicando alterações morfológicas no intestino e sifão observados por microscopia óptica e eletrônica. Portanto, óleos e extratos obtidos de *P. capitarianum* pode ser considerada como uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos inseticidas para o controle de insetos vetores.

Palavras-chave: Óleo essencial; Inseticida natural; *Piper*; Mosquitos; *Aedes*.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes are important vectors in the transmission of dengue, chikungunya and Zika in Brazil and other countries. Due to increasing resistance to chemical insecticides among vector populations, environmentally sound vector management strategies are receiving increasing attention. Thus, the present study aimed to evaluate the chemical composition of essential oils and extracts of *Piper capitarianum*, as well as their insecticidal potential, for the control of *A. aegypti* and *A. albopictus*. The plant species was collected at EMBRAPA where they were removed from leaves, branches and inflorescences for oil extraction and preparation of extracts. Essential oils were analyzed by GC-MS and the extracts were analyzed by TLC and NMR. The nanoemulsions were prepared by the phase inversion method, containing distilled water (aqueous phase), essential oil, and the surfactants (oil phase) mixed under ultrasonic agitation at 100 rpm for 10 min. Eggs of *A. aegypti* and *A. albopictus* were obtained from the Laboratory of Malaria and Dengue at INPA, maintained until reaching the third larval instar, when they were used in bioassays. The data obtained were analyzed using the POLO PC® program to calculate the respective CL₅₀ and CL₉₀. In essential oils, trans-caryophyllene, humulene and linalool were identified as the main substances. The most active extract was subjected to bioassay-guided fractionation which resulted in the isolation of flavone and chalcone with biological activity. The results of this study showed the larvicidal and adulticidal activity of oils, nanoemulsions and extracts of *P. capitarianum*, indicating morphological changes in the intestine and siphon observed by optical and electronic microscopy. Therefore, oils and extracts obtained from *P. capitarianum* can be considered as a promising source for the development of new insecticides for the control of vector insects.

Keywords: Essential oil; Natural insecticide; *Piper*; Mosquitoes; *Aedes*.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	18
2. JUSTIFICATIVA	34
3.OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
4.METODOLOGIA.....	36
4.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	36
4.1.1 Obtenção dos extratos de <i>Piper capitarianum</i>	37
4.1.2 Extração do óleo essencial.....	38
4.2 Análise químicas.....	38
4.2.1 A cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada- CCD.....	38
4.2.2. Ressonância magnética nuclear - RMN de ¹³ C e ¹ H.....	39
4.2.3 Análise do óleo essencial em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas - CG-EM.....	40
4.3. Criação de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> no insetário.....	40
4.3.1 Bioensaios larvicidas	42
4.3.2 Bioensaios adulticidas.....	44
4.3.3 Estudo morfológico das larvas.....	41
4.3.4. Atividade tóxica contra <i>Artemia salina</i>	46
4.3.5 Modelagem molecular.....	47
4.4 Análise estatística.....	49
4.5 Avaliação das atividades químicas e biológicas de <i>P. capitarianum</i>	50
4.5.1 Atividade antioxidante (DPPH).....	50

4.5.2 Atividade antioxidantes (ABTS).....	50
4.5.3 Atividade enzimática (AChE).....	51
4.5.4 Ensaio antimicrobianos.....	52
4.6 Nanoemulsão contendo isolados ativos de <i>P. capitarianum</i>	54
4.6.1 Síntese de nanoemulsão.....	54
4.6.2 Caracterização das nanoemulsões.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1 CAPITULO 1- Óleos essenciais de <i>Piper capitarianum</i>	56
5.1.1 Rendimentos dos óleos de <i>Piper capitarianum</i>	57
5.1.2 Análise dos óleos essenciais por CG-EM.....	58
5.1.3 Atividade larvívica e adultívica.....	63
5.1.4 Observações morfológicas das larvas.....	68
5.1.5 Toxicidade dos óleos sobre <i>Artemia salina</i>	71
5.1.6 Modelagem molecular.....	74
5.1.7 Atividades antioxidantes e enzimática dos óleos de <i>P. capitarianum</i>	79
5.1.8 Atividade antimicrobiana dos óleos de <i>P. capitarianum</i>	83
5.2 Nanoemulsões contendo óleos essenciais de <i>P. capitarianum</i>	85
5.2.1 Atividade larvívica das nanoemulsões	87
5.2.2. Atividade antimicrobiana das nanoemulsões.....	90
5.3 CAPITULO 2- Extratos de <i>Piper capitarianum</i>	93
5.3.1 Rendimentos dos extratos de <i>Piper capitarianum</i>	94
5.3.2 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada - CCD.....	95
5.3.3 Atividade larvívica e adultívica dos extratos.....	99
5.3.4 Fracionamento cromatográfico do extrato EMI de <i>P. capitarianum</i>	104

5.3.5 Atividade antioxidante dos extratos sobre radicais (DPPH e ABTS).....	109
5.3.6 Atividade toxica dos extratos sobre <i>A. salina</i>	112
5.3.7 Atividade antimicrobiano dos extratos.....	113
5.3.8 Análise morfológica das larvas.....	116
6. CONCLUSÃO	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
8. ANEXO	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massas e rendimentos dos óleos essenciais de <i>P. capitarianum</i>	57
Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais da folha, caule e inflorescência de <i>P. capitarianum</i>	60
Tabela 3. Atividade larvicida dos óleos essenciais de <i>Piper capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> após 24 e 48 horas de aplicação.....	65
Tabela 4. Atividade adulticida dos óleos essenciais contra as fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> após 90 minutos de exposição.....	67
Tabela 5. Atividade tóxica dos óleos essenciais de <i>Piper capitarianum</i> em <i>Artemia salina</i> após 24 h de exposição.....	72
Tabela 6. Atividade antioxidante e enzimática observada para os óleos essenciais obtidos de <i>P. capitarianum</i>	82
Tabela 7. Atividade antimicrobiano dos óleos de <i>P. capitarianum</i> sobre bactérias patogênicas.....	84
Tabela 8. Caracterização das nanoemulsões.....	86
Tabela 9. Atividade larvicida das nanoemulsões do óleo da inflorescência (OEI), transcariofileno (TCA), humuleno (HM) contra <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> em laboratório.....	89
Tabela 10. Atividade antimicrobiano das nanoemulsões sobre bactérias patogênicas...91	91
Tabela 11. Descrição e quantificação das partes coletadas de <i>Piper capitarianum</i>	94
Tabela 12. Rendimentos dos extratos obtidos das partes coletadas de <i>Piper capitarianum</i>	95
Tabela 13. Reveladores químicos e classes de químicas identificadas nos extratos de <i>Piper capitarianum</i> em placas de CCD.....	96

Tabela 14. Atividade larvicida dos extratos de <i>Piper capitarianum</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> após 24 e 48 horas de aplicação.....	100
Tabela 15. Atividade adulticida dos extratos de <i>Piper capitarianum</i> contra as fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> após 90 minutos de exposição.....	103
Tabela 16. Atividade larvicida das frações do extrato metanol da inflorescência (EMI) de <i>P. capitarianum</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> após 24 de aplicação.....	107
Tabela 17. Classes químicas identificadas nas frações em placas de CCD.....	108
Tabela 18. Os valores de IC ₅₀ das atividades antioxidante dos extratos de <i>Piper capitarianum</i>	111
Tabela 19. Atividade tóxica dos extratos de <i>Piper capitarianum</i> em larvas de <i>Artemia salina</i> após 24 h de exposição.....	113
Tabela 20. Atividade antimicrobiano dos extratos de <i>Piper capitarianum</i> sobre bactérias patogênicas.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global das áreas de transmissão de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> no mundo.....	19
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	20
Figura 3. Diferenças entre <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	21
Figura 4. Cabeça do mosquito em vista superior do macho e fêmea.....	22
Figura 5. Taxa de incidência de dengue, chikungunya e Zika por região no Brasil.....	24
Figura 6. Estratégias de controle diferentes estágios do mosquito.....	26
Figura 7. Esquema da nanoemulsão e do tensoativo.....	27
Figura 8. Alguns metabolitos larvicidas isolados de espécies do gênero Piper.....	31
Figura 9. Coleta do material vegetal. A) Exemplar de <i>Piper capitarianum</i> cultivada em área experimental da Embrapa.....	36
Figura 10. Fluxograma para obtenção de extratos da <i>Piper capitarianum</i>	37
Figura 11. Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação.....	38
Figura 12. Criação de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> no insetário.....	42
Figura 13. Realização dos bioensaios com extratos, nanoemulsões e óleos essenciais de <i>Piper capitarianum</i>	43
Figura 14. Realização dos ensaios adulticida com extratos e óleos de <i>P. capitarianum</i>	44
Figura 15. Realização das análises morfológicas das larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	46
Figura 16. Realização dos bioensaios com óleos e extratos de <i>P. capitarianum</i> sobre <i>Artemia salina</i>	47
Figura 17. Ensaios antimicrobianos com extratos e óleos essenciais de <i>Piper capitarianum</i>	53

Figura 18. Micrografias de luz das larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> , tratadas com OE de <i>P. capitarianum</i>	69
Figura 19. Micrografia eletrônica de varredura das larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> . tratadas com OE.....	71
Figura 20. Interações entre as moléculas e AeSPC-2. (a) Cariofileno. (b) Humuleno. (c) Diagrama da interação do ácido palmítico com a proteína AeSPC-2.....	76
Figura 21. Energia livre de hidratação total (ΔG_{hyd}) das moléculas cariofileno e humuleno (em kcal/mol), com as respectivas contribuições das interações de Coulomb e van der Waals.....	78
Figura 22. Nanoemulsão formulado com os tensoativos Tween80 e Span.....	86
Figura 23. Perfil cromatográfico dos extratos de <i>P. capitarianum</i> por cromatografia em camada delgada -CDD.....	97
Figura 24. Fracionamento cromatográfico do extrato metanol da inflorescência (EMI) de <i>Piper capitarinaum</i>	105
Figura 25. Perfil cromatográfico das frações do extrato (EMI) por CDD.....	106
Figura 26. Estruturas químicas das amostras F4 e F7.....	119
Figura 27. Micrografias de luz das larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> tratadas com extrato EMI de <i>P. capitarianum</i>	117
Figura 28. Micrografia eletrônica de varredura das larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> . tratadas com extrato EMI.....	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)

AChE - Acetilcolinesterase

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CG-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

CEUA - Comitê de Ética de Uso Animal

IC₅₀ - Concentração Inibitória Mediana

CL₅₀ - Concentração Letal Mediana

CL₉₀ - Concentração Letal Final

DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila

NP/PEG – Difenilboratoaminoetanol/polietilenoglicol

DTNB - 5',5'-ditiobis- (2-ácido nitrobenzóico)

DMSO - Dimetilsulfóxido

IC - Intervalo de Confiança

IR - Índice de Retenção

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

OE - Óleo Essencial

pH - Potencial Hidrogeniônico

DP - Desvio padrão

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos conhecidos como pernilongos muriçocas ou carapanãs, pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera e família Culicidae, são considerados uma causa importante de problemas de saúde no mundo, representando uma ameaça importante para bilhões de pessoas, sendo o papel predominante na transmissão de uma variedade de patógenos em áreas tropicais e subtropicais, incluindo malária, filariose, febre amarela, dengue, chikungunya e o vírus Zika (BENELLI, 2016a; GLOUD et al. 2017).

Os arbovírus têm sido uma ameaça constante devido à facilidade de adaptação desses vírus a novos ambientes e sua capacidade de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados. No entanto, fatores ambientais antropogênicos, como urbanização desorganizada, deslocamento populacional e saneamento básico precário, favoreceram a transmissão e disseminação desses vírus (FORRANTI et al. 2002; LORENÇO et al. 2015).

Com base em investigações epidemiológicas relatadas à Organização Mundial da Saúde (WHO), estima-se que mais de 2,5 bilhões de pessoas já foram infectadas com arbovírus em mais de 100 países endêmicos (Figura 1). Além disso, cerca de 5 milhões de pacientes necessitaram de hospitalização e 700.000 morreram como resultado desses arbovírus (WHO, 2019). No entanto, os casos estão concentrados em regiões tropicais e subtropicais, uma vez que os insetos vetores estão amplamente distribuídos nessas áreas (DING et al. 2018).

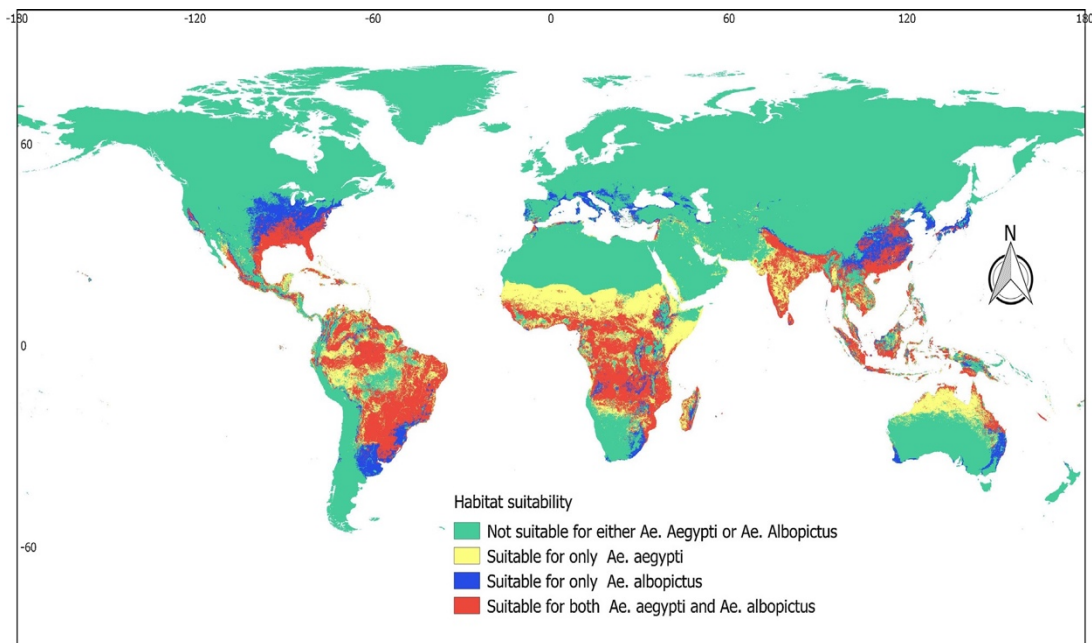


Figura 1. Distribuição global das áreas de transmissão por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no mundo. **Fonte:** WHO, 2020.

Dentre os insetos vetores de patógenos de maior importância ao homem, o mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 é o principal transmissor do dengue no Brasil, e no continente asiático o *Aedes albopictus* Skuse, 1899, sendo que também podem transmitir os vírus chikungunya, zika e a febre amarela em áreas urbanizadas (FORRANTI, 2002; HARBACH, 2019).

O mosquito *Aedes aegypti* é nativo da África, possivelmente da região etiópica e, posteriormente, se propagou para os demais continentes por meio de navios de comércio de escravos no período colonial por sua associação com o homem (CONSOLI & LORENÇO 1994). Atualmente esta espécie é totalmente cosmopolita e se encontra distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, dada sua incapacidade de suportar invernos rigorosos (POWELL et al. 2018).

O mosquito *Aedes albopictus* é originário do Sudeste Asiático, e possui uma amplitude de distribuição (regiões tropicais e subtropicais) e capacidade de adaptação a diferentes ambientes e situações determina dificuldades para a erradicação por meio da mesma metodologia seguida para *A. aegypti*. Além de sua maior valência ecológica, tem como fonte alimentar tanto o sangue humano como de outros mamíferos e aves. Além disso, é mais resistente ao frio do que o *A. aegypti* (KAMAL et al. 2018).

Ambas espécies possuem o desenvolvimento do tipo holometábolo, ou seja, passa pelos estágios de ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto (Figura 2). O ciclo de vida desde o ovo até a emergência do adulto ocorre em um período de 7 a 14 dias, dependendo das condições climáticas, da disponibilidade de alimentos e quantidade de larvas presentes no mesmo criadouro (FORATTINI 2002; CARVALHO et al. 2015).

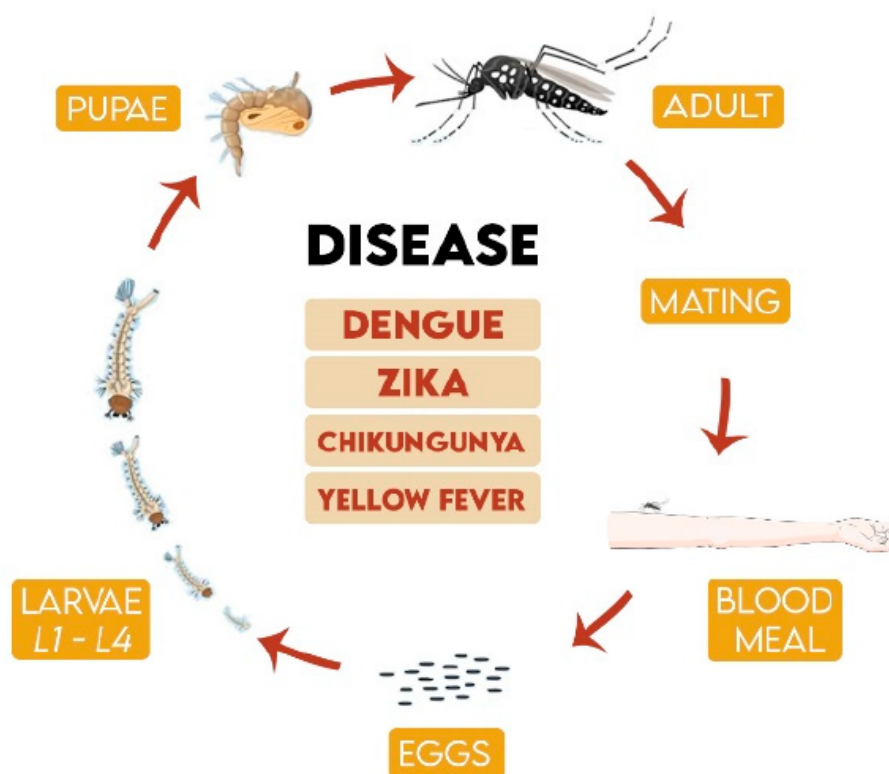


Figura 2. Ciclo biológico de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

Fonte: SILVÉRIO, 2020

Após a imersão, os adultos realizam a cópula e alimentam-se de substâncias açucaradas como as extraídas do néctar e seiva, o que constitui parte essencial da dieta destes mosquitos. As fêmeas realizam ainda o repasto sanguíneo, o que proporciona o desenvolvimento de seus ovários e, conseqüentemente, o desenvolvimento e maturação dos ovos. Este comportamento hematófago ocorre ao amanhecer e pouco antes do anoitecer, mas pode ser realizado a qualquer hora do dia, caso o hospedeiro venha se aproximar de seu abrigo (SILVA et al. 2018).

A diferenciação entre as duas espécies é relativamente fácil a olho nu nos adultos (Figura 3), por apresentarem um clipeo com dois tufos de escamas branco-prateadas formando um desenho em formato de lira no mosquito *Aedes aegypti*, e um clipeo com escamas branco-prateadas em formato de uma linha no mosquito *Aedes albopictus* (LOURENÇO et al. 2015; WRBU 2019).

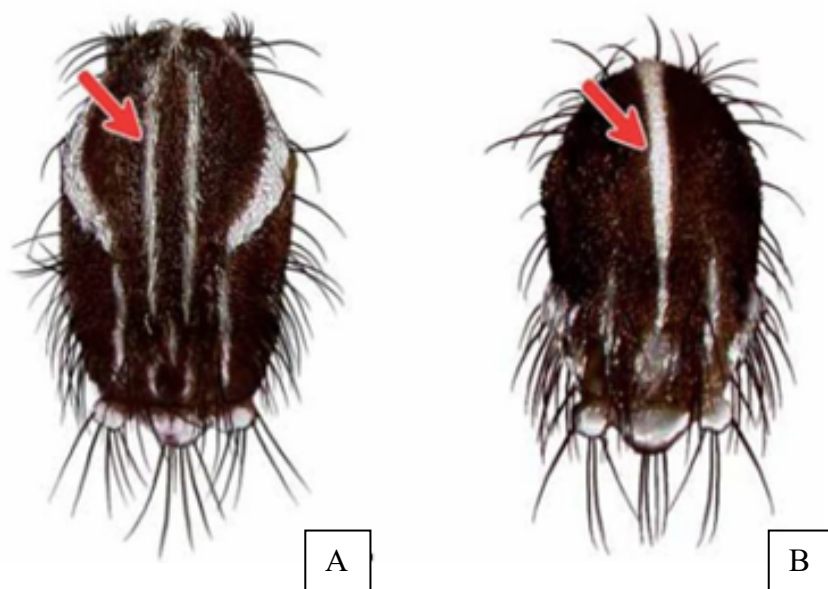


Figura 3. Diferenças entre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **(A)** Clipeo de *A. aegypti* com escamas formando uma lira e duas linhas paralelas; **(B)** Clipeo de *A. albopictus* com escamas formando somente uma linha. **Fonte:** WRBU, 2019

Além disso, para a diferenciação do sexo, utiliza-se a morfologia da antena e a estrutura do aparelho bucal, ou seja, os machos podem ser identificados por apresentarem antenas do tipo plumosa e palpos longos e as fêmeas por possuírem antenas do tipo filiforme e palpos curtos (HARBACH et al. 2019).

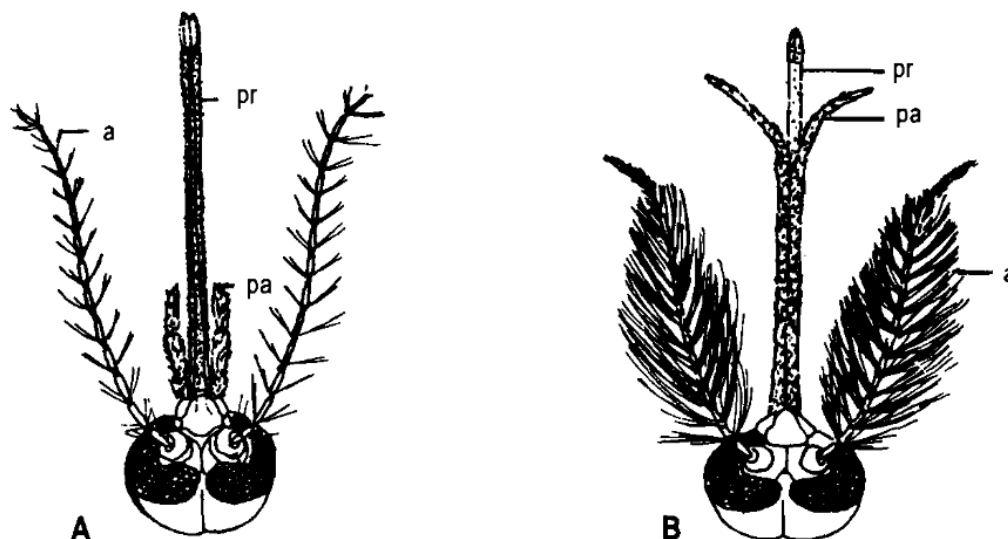


Figura 4. Cabeça do mosquito em vista superior: **A:** fêmea, com destaque a antena pilosa e o palpo menor; **B:** Macho, destacando a antena plumosa e o palpo maior. **a:** Antena; **pa:** Palpo maxila; **pf:** Probóscida **Fonte:** LOURENÇO, 2005.

Nesse contexto, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são insetos que têm recebido grande atenção em todo o mundo, pois ambas as espécies são vetores eficientes para as doenças dengue, chikungunya e zika, que se destacam entre as doenças de grande impacto na saúde pública em todo o mundo (KRAEMER et al. 2015; LETA et al. 2018). Nos últimos anos, a incidência de doenças causadas por arbovírus mostrou um aumento global relevante, correlacionado com fatores como dispersão mais rápida e geograficamente mais extensa de vírus devido ao crescimento intensivo do transporte

global, adaptação de vetores à crescente urbanização, incapacidade para conter a população de mosquitos e alterações nos fatores ambientais (GOULD et al. 2017).

Segundo a OMS, estima-se que houve 100 milhões de casos de dengue, o que indica que metade da população mundial está em risco (WHO, 2019). Outros arbovírus que afetam a população são a chikungunya e o zika, que têm sido motivo de preocupação para os órgãos de saúde pública, principalmente devido à associação do vírus zika com complicações neurológicas, como microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (ARAÚJO et al. 2018; SALINA et al. 2017). Em 2019, houve 5 a 10 milhões de casos confirmados de chikungunya e zika em 87 países nas regiões (Ásia, Américas, África e Ásia) (WHO, 2019).

No Brasil, de acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (Figura 5), em 2020, 914.310, 63.854 e 2.650 casos confirmados foram registrados no Brasil para dengue, chikungunya e zika, respectivamente, resultando em um aumento de 48% dos casos de dengue em comparação com 2018 (MS, 2019).

Desse total, 782 pessoas morreram como resultado desses arbovírus no país. Essas doenças têm um alto impacto social e econômico, com efeitos sobre as pessoas infectadas e o mundo ao seu redor, com danos devastadores e permanentes. Além disso, com a recente pandemia do COVID-19, as autoridades de saúde brasileiras estão preocupadas com os arbovírus, cujos maiores picos ocorrem nos primeiros cinco meses do ano e podem ser outra preocupação a ser adicionada ao COVID-19 (WHO, 2019).

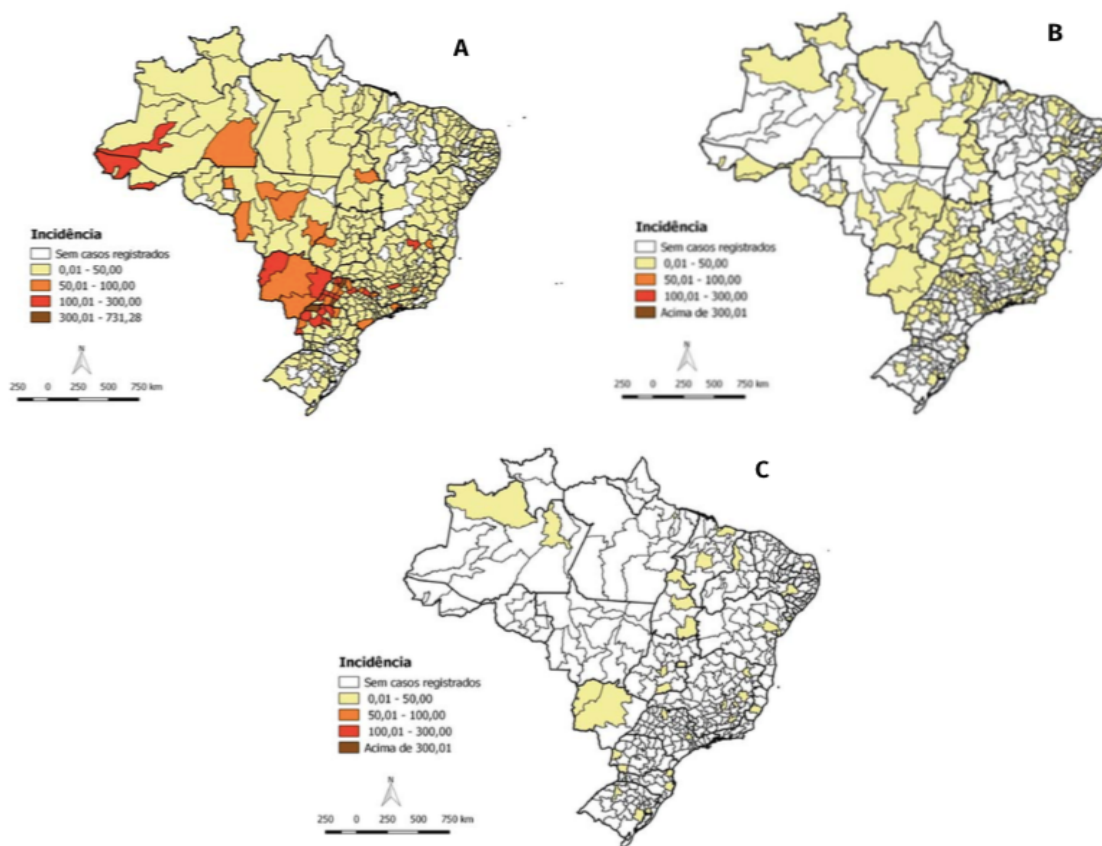


Figura 5. Taxa de incidência de dengue (A), chikungunya (B) e Zika (C) por localidade no Brasil. **Fonte:** SINAN, 2020.

A maneira mais eficiente de lidar com essas doenças é controlar os vetores, uma vez que a vacina quimérica (CYD-TDV) não é totalmente eficaz contra diferentes arbovírus (ZAHID et al. 2020). Os atuais programas de controle de mosquitos de importância médica e veterinária baseiam-se principalmente no uso de inseticidas sintéticos, como organofosfatos (temefós e fentião), carbamatos (carbaril e carbofurano) e reguladores de crescimento de insetos (IGRs) (diflubenzurônio e metopreno) (HUANG et al. 2017; THOMAS, 2018; ACHEE et al. 2019).

Tais agentes de controle são eficazes, mas podem causar efeitos indesejados em organismos não-alvo, além de favorecer a seleção de insetos vetores e pragas resistentes. Esse fato foi observado em pragas agrícolas como *Spodoptera exigua* (Lepidoptera), *Tribolium castaneum* (Coleoptera) e *Drosophila suzukii* (Diptera)

(GOMES et al. 2017; KHAN et al. 2017; GRESS & ZALOM 2018), e, em populações de mosquitos, como *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (LAWLER et al. 2017). No entanto, foram encontradas evidências de resistência a inseticidas de 4 classes como carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretroides para os vetores *A. aegypti* e *A. albopictus* detectadas nos continentes Américas, África e Ásia (MOYES et al. 2017). Esta resistência possibilita a sobrevivência dos mesmos quando expostos a inseticidas pelos mecanismos como alterações comportamentais, penetração reduzida pela cutícula, resistência metabólica e alterações nas proteínas alvo (BRAGA & VALLE 2007; VALBON et al. 2019; SIMMA et al. 2018; KARUNARATNE et al. 2018). Além disso, esses produtos podem ser prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente devido à aplicação intensiva e prolongada (ROIZ et al. 2018; BADOLO et al. 2019). Por exemplo, alguns estudos têm ressaltado o impacto negativo de pesticidas químicos ao meio ambiente como contaminação do solo (LAWLER 2017), morte de herbívoros (MOSSA et al. 2018) e da fauna associada (MONTEIRO et al. 2019).

No entanto, outros métodos de controle (Figura 6) foram propostos, incluindo: larvicidas bacterianos (*Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*) produzindo cristais tóxicos (BENELLI et al. 2016b); criação de insetos estéreis por radiação (ALPHEY et al. 2010); e desenvolvimento de tecnologias transgênicas para vetores e pragas de insetos (CARVALHO et al. 2015, CAMPOS, 2020).

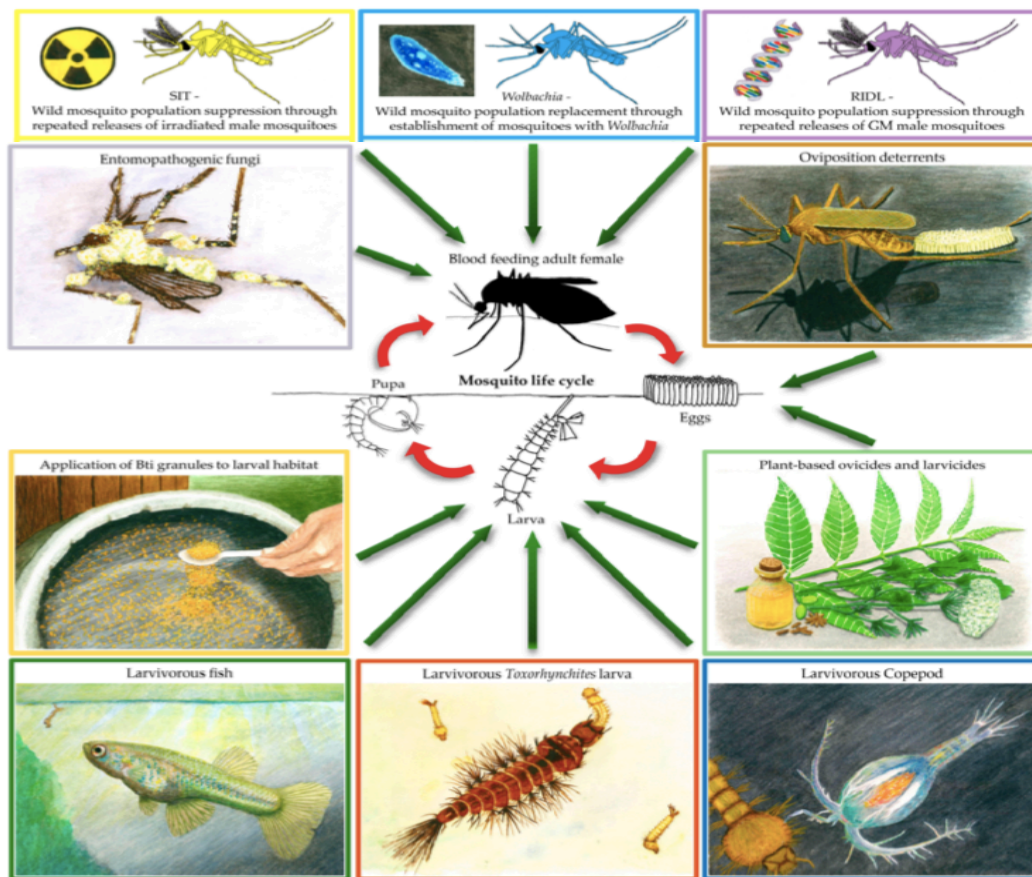


Figura 6. Estratégias de controle visando diferentes estágios do ciclo de biológico do mosquito. **Fonte:** BENELLI, 2016b.

Nesse cenário, a nanobiotecnologia tem se tornado uma linha de estudos de grande interesse mundial, visando o desenvolvimento de nano inseticida a partir da nanoencapsulação e nanoemulsão usando substâncias bioativas de produtos naturais (BENELLI, 2018b).

As nanoemulsões são sistemas dispersos constituídos por dois líquidos imiscíveis que são frequentemente estabilizados por um ou mais surfactantes. Eles têm um tamanho médio de gotícula abaixo de 200nm, estabilidade cinética, biodisponibilidade aprimorada e estabilidade química e física aprimorada dos compostos bioativos (CAMPOS et al. 2020). Esses sistemas permitem a dispersão de ativos lipofílicos em

meio aquoso, o que é atraente para uso como agentes larvicidas, visto que o desenvolvimento das larvas é neste ambiente (DUARTE et al. 2015). Além disso, esses sistemas melhoram a bioatividade dos produtos naturais principalmente devido ao aumento da área superficial e facilitação da absorção visto o pequeno tamanho das partículas. Este sistema tem chamado a atenção como agentes de controle de mosquitos medicamente importantes, sendo empregado como larvicida (PAVELA et al. 2019) ou como agente repelente (SARWAR et al. 2020).

De fato, as nanoemulsões a base de óleo em água (Figura 8) representam uma importante ferramenta nanobiotecnológica para promover o aumento da estabilidade de diferentes substâncias químicas, permitindo que sua liberação ocorra em taxas controladas e moduladas, incluindo aumento da potência, durabilidade, redução na quantidade de ingredientes ativos que precisam ser usados e segurança para os seres humanos e o meio ambiente (OLIVEIRA et al. 2017).

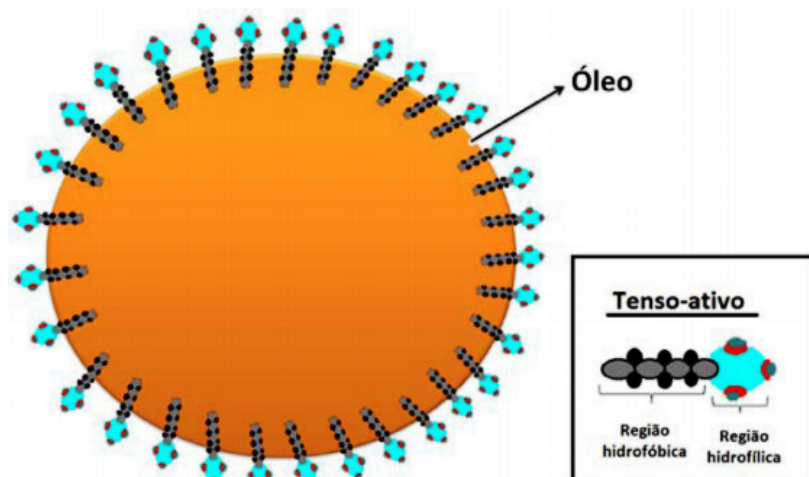


Figura 7. Esquema da nanoemulsão e do tensoativo. **Fonte:** CAMPOS, 2020.

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados com o objetivo de desenvolver novas formulações larvicidas utilizando nanotecnologia. Os produtos nanoestruturados preparados com óleos naturais à base de plantas, incluindo óleos essenciais, são considerados uma excelente opção ecológica quando comparados aos pesticidas sintéticos (BENELLI & PAVELA 2018). Do ponto de vista tecnológico, essa técnica é considerada relativamente simples e de baixo custo, podendo ser aplicada para diversas finalidades, como a encapsulação de bioinseticidas, produtos para área alimentícia, produtos destinados à área têxtil, cosméticos e medicamentos.

Portanto, é essencial encontrar alternativas ambientalmente seguras, potencialmente mais eficazes e adequadas para uso em programas de controle de larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. No Brasil encontra-se a maior diversidade de plantas do planeta, com cerca de 55.000 espécies catalogadas correspondendo a 30% da flora mundial, o que torna o país promissor na busca de novos compostos com atividade inseticida (JOLY et al. 2011; ZAPPI et al. 2015). De fato, estudos recentes estão renovando o interesse de pesquisas sobre produtos à base de plantas que podem ser usados como ovicidas, larvicidas, aduictidas e repelentes de adultos contra insetos importantes na saúde pública (BENELLI et al. 2016b; HEMATPOOR et al. 2017).

Esses produtos de origem botânica são ferramentas eficazes, ecológicas na luta contra os mosquitos e tornam o desenvolvimento da resistência um evento raro, uma vez que geralmente exercem toxicidade através de múltiplos mecanismos de ação (LUZ et al. 2020). Por exemplo, a lipofilicidade dos produtos naturais tem um papel importante na absorção compostos nos insetos que pode ocorre através da cutícula, sifão respiratório ou ingestão, o que está diretamente relacionado à capacidade de proporcionar um efeito inseticida (PAVELA et al. 2019). No entanto, estudos apontam que ação dos metabólitos secundários das plantas contra larvas de mosquitos,

demonstram interferências no sistema nervoso central na inibição de receptores de neurotransmissores como colinérgicos (ACh), ácido gama-aminobutírico (GABA) e octopaminérgico (AO), impedindo a transmissão impulsos nervosos, levando a paralisia e morte. Por outro lado, estudos informam que a região intestinal das larvas é um dos locais-alvo comuns para os compostos inseticidas, que causa graves danos na região do intestino médio interrompendo a integridade e função do epitélio intestinal, levando à morte por intoxicação (SILVÉRIO et al. 2020). Portanto, a compreensão dos mecanismos de ação dos metabólitos secundários pode ajudar a reduzir a resistência dos inseticidas e auxiliar na produção de produtos naturais com atividade em locais de ação específicos ou múltiplos.

Nesse cenário, produtos naturais, especialmente óleos essenciais (OE), podem se tornar um método de controle alternativo, pois são seguros e biodegradáveis (PAVELA, 2015). Os óleos essenciais podem ser obtidos por destilação a vapor dos órgãos da planta em estudo. Esses óleos geralmente são responsáveis pelo odor da planta e são uma importante estratégia de defesa contra microorganismos patogênicos e pragas com diferentes efeitos nas larvas, como bloquear os orifícios de ar (espirais) que levam à morte por asfixia (TAKEARA et al. 2017).

Em alguns casos, os óleos essenciais têm ações neurotóxicas, citotóxicas, fototóxicas e mutagênicas nos insetos (BENELLI et al. 2017c; CHELLAPPANDIAN et al. 2018a). Por exemplo, o óleo essencial obtido de *Licaria puchury* Linnaeus tem um efeito neurotóxico (inibição da AChE) nas larvas de *A. aegypti* com um valor de CL_{50} de 98.5µg/mL (concentração letal que mata 50% das larvas expostas) (AZEVEDO et al. 2018); *Lippia organanoides* Kunth possui atividade tóxica (efeito fumigante) com CL_{50} de 25.5µg/mL e 6.8µg/mL em ácaros e pulgões, respectivamente (MAR et al. 2018); *Sphaeranthus indicus* e *Piper betle* Linnaeus têm ação fototóxica e mutagênica

(efeito de contato da cutícula) com mortalidade de 96% e 95% em adultos de *Culex quinquefasciatus* e *A. aegypti*, respectivamente (CHELLAPPANDIAN et al. 2018b; VASANTHA et al. 2017).

Neste contexto, os óleos essenciais obtidos de espécies do gênero *Piper* receberam considerável atenção devido à sua diversidade química e propriedades biológicas ($CL_{50} = 0.4 - 100\mu\text{g/mL}$) (Figura 08) (SILVA et al. 2017; LUZ et al. 2020). Uma revisão apresentada por MARQUES & KAPLAN (2015) descreveu que os OEs obtidos das folhas das espécies *P. gaudichaudianum*, *P. betle*, *P. tuberculatum*, *P. longum*, *P. nigrum*, *P. hostmannianum*, *P. aduncum*, *P. klotzschianum*, *P. humaytatum*, *P. marginatum* e *P. sarmentosum* são potencialmente tóxicos contra o vetor da dengue *A. aegypti*. Por exemplo, o OE extraído das folhas de *Piper aduncum* apresentou altos níveis de dilapiol e exibiu CL_{50} de $57\mu\text{g/mL}$ e $100\mu\text{g/mL}$ contra larvas e adultos de *A. aegypti*, respectivamente (ALMEIDA et al. 2009; PINTO et al. 2012). O dilapiol também foi encontrado como o principal componente dos óleos essenciais de *P. hostmannianum* (34,20%) e *P. tuberculatum* (32,10%), que mostraram ser potentes contra as larvas de *A. aegypti*, com CL_{50} de $36\mu\text{g/mL}$ e $54\mu\text{g/mL}$, respectivamente (MORAIS et al. 2007). Ambas as espécies estão amplamente distribuídas na Floresta Amazônica, no norte do Brasil.

Os óleos essenciais extraídos das folhas de outras espécies da Mata Atlântica, como *P. nigrum*, *P. betle*, *P. marginatum* e *P. sarmentosum*, mostraram-se ativos contra larvas de *A. aegypti* com CL_{50} de $9.21\mu\text{g/mL}$, $28\mu\text{g/mL}$, $20\mu\text{g/mL}$, $16.03\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os principais constituintes desses óleos essenciais foram o safrol e o timol (NAWAZ et al. 2011; AUTRAN et al. 2009; LAVOR et al. 2012). Além disso, outros estudos indicaram a atividade aduicida dos óleos obtidos das folhas de *P. nigrum* e *P. betle*, que mostraram 82% e 78,9% de mortalidade após 90 minutos de

exposição (CHAITHONG et al. 2006; NAGORI et al. 2011). Por outro lado, alguns constituintes voláteis de *Piper* mostraram atividade larvívica contra *A. aegypti*, como o β -selineno com CL_{50} 121 μ g/mL encontrado em *P. gaudichaudianum*; limoneno com CL_{50} de 13.5 μ g/mL encontrado em *P. klotzschianum*; β -cariofileno com 156 μ g/mL encontrado em *P. humaytatum* e nerolidol com CL_{50} de 10.0 μ g/mL encontrado em *P. longum* (CHAIYASIT et al. 2006; NASCIMENTO et al. 2013; MORAIS et al. 2007).

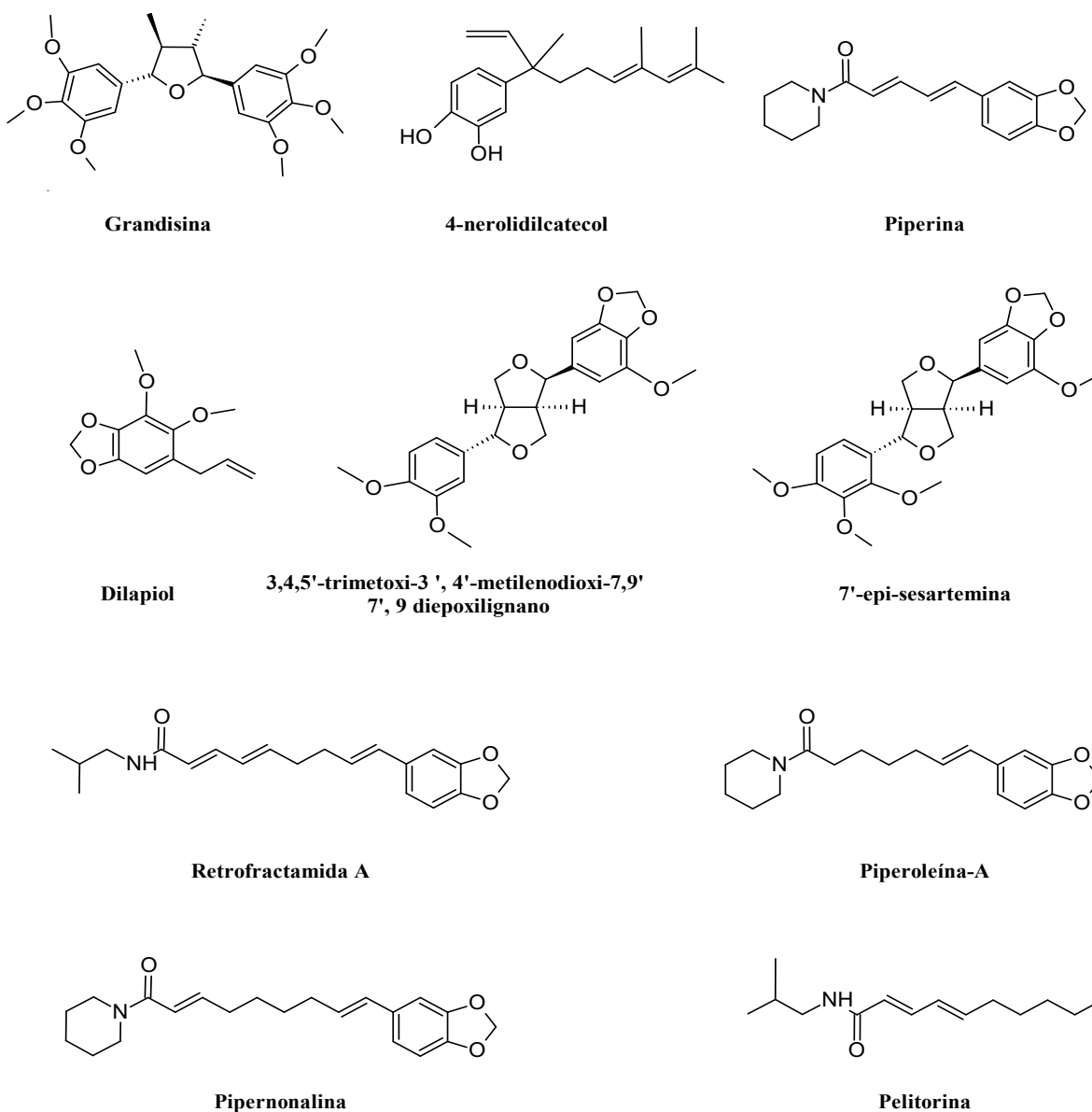


Figura 8. Alguns metabolitos larvívicos isolados de espécies do gênero *Piper*.

Embora vários estudos reconheçam o potencial inseticida de espécies pertencentes ao gênero *Piper*, existem poucos estudos relacionados ao *Piper capitarianum*, arbusto abundante na região amazônica, nativo do Brasil (YUNCK, 1972; GUIMARÃES & GIORDANDO 2004). No melhor de nosso conhecimento, o estudo dessa espécie relata o efeito do extrato em metanol das folhas nas larvas de *Aedes aegypti* (POHLIT et al. 2004; 2011). No entanto, há pouco estudo sobre esta espécie do ponto de vista fitoquímico, havendo necessidade de ampliar os conhecimentos sobre a composição química e suas atividades biológicas visando a obtenção de compostos ativos que permitam a síntese de novos produtos inseticidas com o uso direto no controle de insetos vetores.

Diante essas premissas, o presente trabalho consistiu na caracterização química dos óleos essenciais e extratos obtidos das partes aéreas (folhas, caules e inflorescências) de *Piper capitarianum*. As avaliações biológicas foram realizadas com os óleos e extratos para demonstrar as atividades antimicrobiana com bactérias patogênicas; larvicidas e adulticidas contra os vetores *A. aegypti* e *A. albopictus*, e o efeito tóxico contra o microcrustáceo *A. salina*, um organismo não-alvo. Para investigar o mecanismo de ação do óleo essencial e extratos mais ativo, também foi determinada sua atividade antioxidante *in vitro* dos radicais DPPH e ABTS, bem como atividade inibidora da acetilcolinesterase (AChE), com o objetivo de correlacionar esses resultados com a dosagem letal obtida nos bioensaios realizados. Além disso, alterações morfológicas nas larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* induzidas pelos óleos e extratos de *P. capitarianum* foram demonstradas por microscopia óptica e técnicas de varredura eletrônica. Adicionalmente, a modelagem molecular da interação entre os principais constituintes dos óleos, como trans-cariofileno e humuleno com a enzima AeSCO-2 também foi determinada. A influência de diferentes pares de surfactantes na formação

de nanoemulsão à base de óleo e extratos de *P. capitarianum*, bem como sua atividade larvicida promissora contra os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* foi também investigada.

Este é o primeiro relato sobre composição química e atividade biológica dos óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas de *P. capitarianum*.

2. JUSTIFICATIVA

Os insetos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* têm recebido grande atenção em todo o mundo, uma vez que ambas as espécies são vetores eficientes para doenças dengue, chikungunya e Zika, que ocupam lugar de destaque dentre as doenças de impacto na saúde pública do Brasil (KRAEMER et al. 2015; LETA et al. 2018). Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, no ano 2019, foram registrados no Brasil, 914.310, 63.854, 2.650 casos confirmados respectivamente para dengue, chikungunya e Zika, resultando um aumento de 48% dos casos em relação ao ano de 2018 (MS, 2019). Desse total, 782 pessoas morreram em consequência dessas arbovirose no país. Essas doenças têm um alto impacto social e econômico, com efeitos entrelaçados entre a pessoa infectada e o universo que a cerca, com danos devastadores e permanentes.

Neste contexto, a dengue, chikungunya e zika são consideradas doenças passíveis de intervenção sendo importante o desenvolvimento de pesquisas para fornecer subsídios, que contribuam para o combate ao vetor. No que se refere ao meio ambiente, o uso constante de inseticidas químicos causa descontrole da população de mosquito, levando à seleção de populações resistentes e também tem provocado outros efeitos indesejáveis, como poluição ambiental e toxicidade para seres humanos e outros organismos da fauna associada.

Assim, há necessidade de buscar novas alternativas ambientalmente seguras, potencialmente adequadas e mais eficazes para uso em programas de combate aos vetores. Uma das tendências atuais é a bioprospecção de plantas e o uso da nanobiotecnologia na expectativa de conseguir compostos ativos para desenvolvimento de nanoinseticida visando o controle dos vetores no ambiente urbano.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Análise química e biológica dos óleos essenciais e extratos obtidos das partes aéreas de *Piper capitarianum* visando o controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no ambiente amazônico.

3.2 Específicos

- Caracterizar e isolar os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais e extratos ativos de *P. capitarianum*.
- Avaliar as atividades químicas e biológicas dos óleos e extratos por meio de ensaios biológicos;
- Sintetizar e caracterizar nanoemulsões;
- Avaliar o potencial inseticida dos óleos essenciais, extratos e nanoemulsões de *P. capitarianum* sobre larvas e adultos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação do material vegetal

As partes aéreas (folhas, caule e inflorescência) de *P. capitarianum* foram coletadas em fevereiro de 2015, durante a manhã, no setor de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental, situado na Rodovia AM-010 (03° 06 '23 .04 "S e 60° 01 '35,14"W) (Figura 9A), acondicionados em sacos plásticos pretos devidamente etiquetados e transportado ao Laboratório de Malária de Dengue do INPA. Posteriormente foi feita a confecção das exsicatas que foram secas em estufa a temperatura de 50°C por um período de 72 horas.

As exsicatas foram identificadas pelo botânico Dr. José Gomes, por meio de comparação com material existente na coleção do herbário do INPA, onde se encontram depositadas sob o nº 259.231 do herbário (Figura 9B). O restante do material vegetal foi submetido a trituração separadamente em moinho tipo faca e pesados para obter a massa triturada que foi utilizada na obtenção dos óleos essenciais e preparação dos extratos.

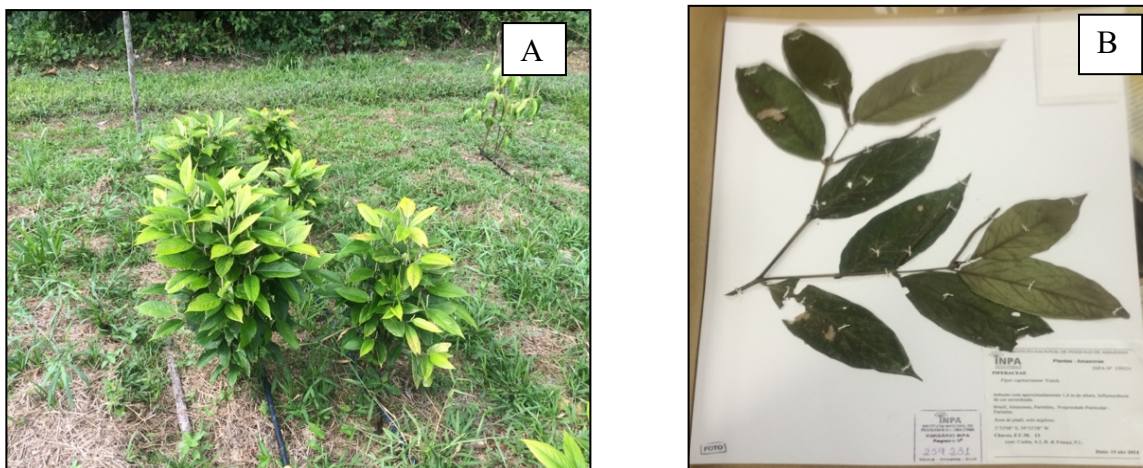


Figura 9. Coleta do material vegetal. A) Exemplar de *Piper capitarianum* cultivada em área experimental da Embrapa. B) Exsicata confeccionada e depositada no herbário do INPA.

4.1.1 Obtenção dos extratos de *Piper capitarianum*

Os extratos foram preparados no Laboratório de Cromatografia (LABCRO) da UFAM. O material vegetal triturado das partes coletadas (folhas, galhos e inflorescência) foi submetido a extração por maceração com solventes orgânicos (hexano, diclorometano e metanol) em ordem crescente de polaridade (Figura 10) e agitada com o auxílio de agitador magnético para obtenção dos extratos. Após extração, os extratos foram filtrados em papel de filtro, e os solventes foram removidos sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Posteriormente, os extratos secos foram acondicionados em recipientes de vidro âmbar nas seguintes quantidades: extratos Hexano (114g), Diclorometano (140g), Metanol (210g) das folhas; extratos Hexano (50g), Diclorometano (60g), Metanol (90g) dos galhos; extratos Hexano (14g), Diclorometano (18g), Metanol (26g) das inflorescência, devidamente fechados e mantidos na geladeira até a aplicação dos ensaios biológicos.

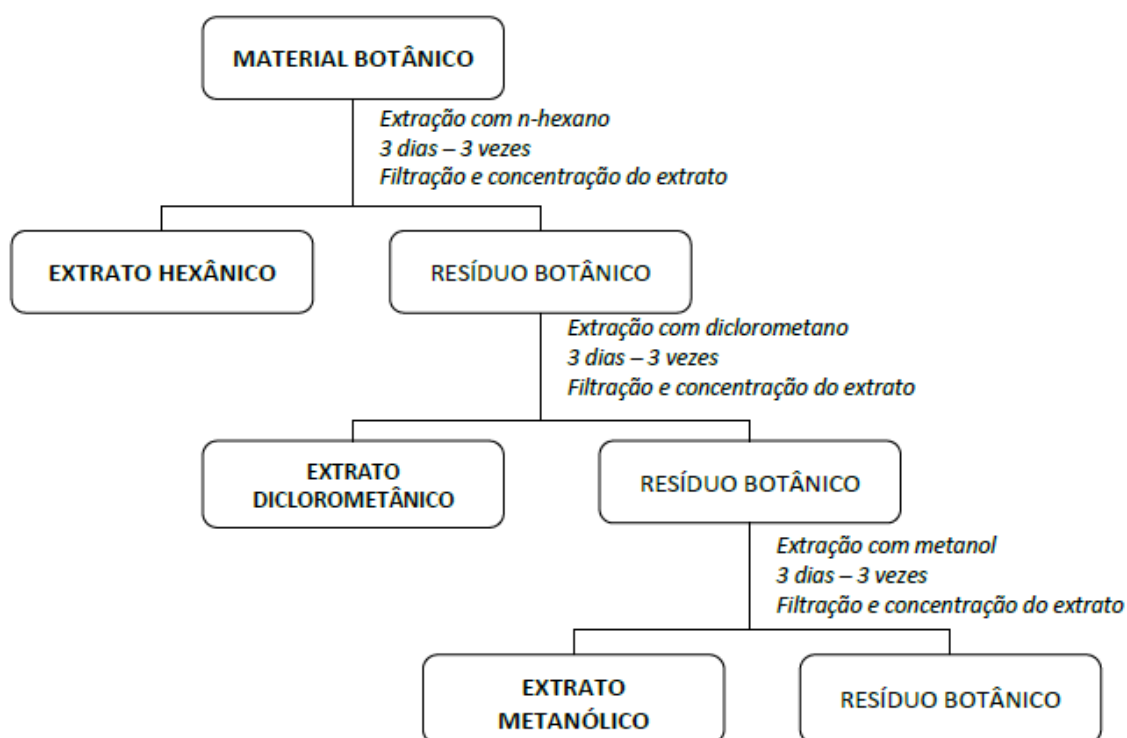


Figura 10. Fluxograma para obtenção de extratos da *Piper capitarianum*.

4.1.2 Extração dos óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais das folhas, galhos e da inflorescência de *Piper capitarianum* (200g triturados de cada uma dessas partes da planta) foi feita pelo método hidrodestilação (Figura 11) utilizando o sistema de Clevenger modificado por período de 4h. Após o processo de extração, o óleo foi coletado e seco em sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro comercial para retirar água residual, acondicionado em frasco de vidro âmbar devidamente fechados e armazenado a -4°C para uso posterior (MAR et al. 2017). Posteriormente foi realizada a determinação do rendimento dos óleos com base no peso do material vegetal utilizado.

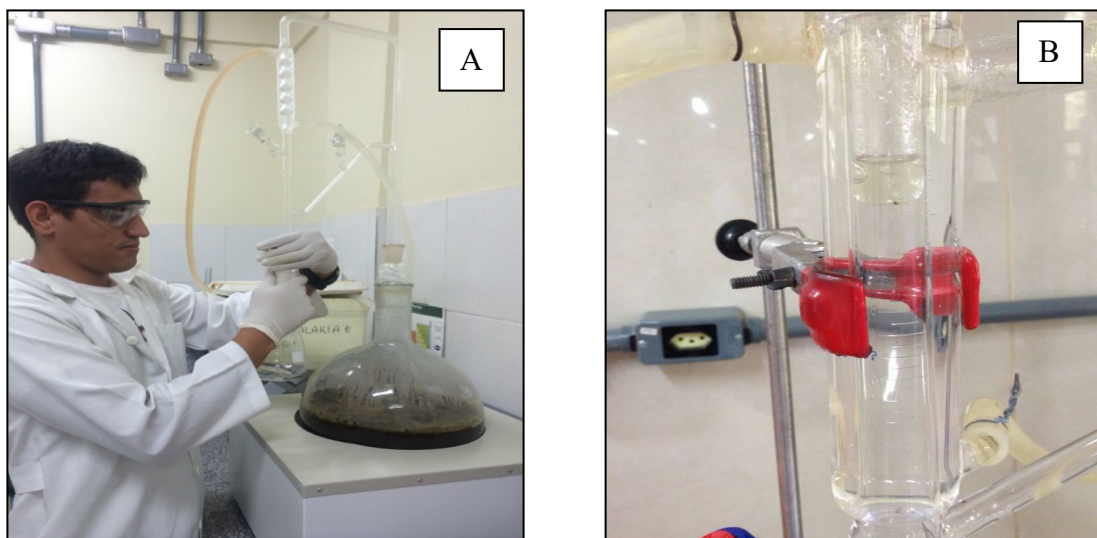


Figura 11. Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação. (A) Sistema hidrodestilacao modificado; (B) Óleos extraídos de *Piper capitarianum* submerso em água destilada.

4.2 Análises Químicas

4.2.1 Cromatografia em coluna e camada delgada – CCD

Os extratos de *P. capitarianum* foram submetidos analise por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatoplasas de sílica gel em fase normal e reversa,

com suporte de alumínio de tamanho 20 x 20 cm e indicador de fluorescência F254 da MERCK.

Para revelar as placas foram utilizados os reveladores universais: anisaldeído (1mL de ácido acético dissolvidos em 10mL de etanol + adição de 5mL de anisaldeído), vanilina sulfúrica (10g de vanilina dissolvidos em 100mL etanol + adição de 1ml de ácido sulfúrico) e reveladores específicos: KOH (1g de hidróxido de potássio dissolvidos em 10mL de etanol), NP/PEG (2g de ester aminoetilico + 10g de polietilenoglicol dissolvidos em 200mL e acetato de etila) e Dragendorff (100mg de nitrato de bismuto dissolvidos + 4g de iodeto de potássio diluídos em 100mL de ácido acético). A revelação das CCD foi realizada por meio da lâmpada ultravioleta (365 e 254 nm).

Além disso, os extratos foram submetidos ao fracionamento cromatográfico por meio de uma coluna de vidro com 150 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, utilizando Sephadex-LH-20 da Pharmacia como fase estacionária, e, diferentes sistemas de eluição (solventes orgânicos) para o isolamento dos constituintes químicos majoritários. As frações obtidas da coluna foram comparadas e reunidas pela cromatografia em camada delgada – CCD utilizando folhas de alumínio com camada fina de gel de sílica.

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear – RMN ^{13}C e ^1H

Os constituintes químicos isolados foram analisados por RMN ^{13}C e ^1H , equipado com aparelho BRUKER, modelo DRX-500, operando de 50 a 500 MHz, utilizando acetona ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) como solvente para diluição das amostras. Os valores dos deslocamentos químicos foram referidos em unidades adimensionais (δ), representando parte por milhão da frequência aplicada para elucidação estrutural dos isolados. As

análises envolvendo este equipamento foi realizado no Laboratório de Química de Produtos de Naturais do INPA.

4.2.3 Análise dos óleos em Cromatografia Gasosa (CG-EM)

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada por comparação de seus índices de retenção e espectros de massas com os relatados na literatura (ADAMS, 2009) ou apresentados na biblioteca de sistemas de dados Wiley do equipamento CG-EM (NIST, 2016). Os índices de retenção foram calculados para todos os constituintes voláteis usando séries homólogas de n-alcano. As análises por CG-EM foram realizadas usando um cromatógrafo a gás HP 6890, em interface com um detector seletivo de massa HP 5973N (tensão de ionização 70 eV), equipado com uma coluna capilar DB-5MS (30 m × 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm), usando hélio como gás portador (1,0 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de 60 ° C a 290 ° C a uma taxa de 3 ° C min⁻¹, depois isotérmica a 290 ° C por 10 min, usando H₂ como gás transportador (1,0 mL min⁻¹). As temperaturas do injetor e do detector foram de 230 ° C e 290 ° C, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 µL no modo sem divisão. A velocidade linear (\bar{u}) foi de 14 cm s⁻¹. Temperatura da interface MS: 280°C; faixa de massa: 40-700 u; velocidade de varredura: 150 u s⁻¹; intervalo: 0,50 s (2 Hz).

4.3 Criação de *Aedes Aegypti* e *Aedes albopictus*

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* foram obtidos de colônias estabelecidas no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. A colônia foi estabelecida a partir de coletas de ovos em armadilhas ovitrampa (SILVA et al. 2018), instaladas em residências localizadas na área urbana de Manaus no ano de 2017. Estes insetos foram mantidos sem exposição a inseticidas, sob

condições controladas à temperatura ambiente (26 ± 2 ° C) e umidade relativa de 70-85%, com fotoperíodo de 12:12 h (claro/escuro). O procedimento de criação foi realizado pela metodologia descrita por TADEI et al. (2010).

Os ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* obtidos de colônias reprodutoras foram colocados em recipientes contendo água para as larvas eclodirem. As larvas foram criadas em uma bandeja plástica contendo água destilada e alimentadas diariamente com uma mistura de comida de gato (Whiskas®) e pó de fígado bovino na proporção de 1:1 (Figura 12 A). As larvas foram mantidas até o terceiro ínstar larval e algumas foram selecionadas para os bioensaios larvicidas. O restante foi deixado nas bacias esmaltadas até atingirem a pupação. As pupas emergidas das larvas foram transferidas para recipientes plásticos redondos (50 mL), contendo água destilada e colocadas em gaiolas de criação (dimensões 30 cm × 30 cm × 30 cm) para o surgimento de adultos (Figura 12 B).

Os adultos foram alimentados com uma solução de sacarose a 10% e refeição de sangue de acordo com o Protocolo CEUA 054/2018 do Comitê de Ética no Uso de Animais - INPA, os hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram anestesiados (cloridrato de xilazina 2%) por 10 minutos para alimentação dos insetos. As fêmeas alimentadas com sangue, com 2 a 5 dias de idade, foram usadas em bioensaios adulticidas.

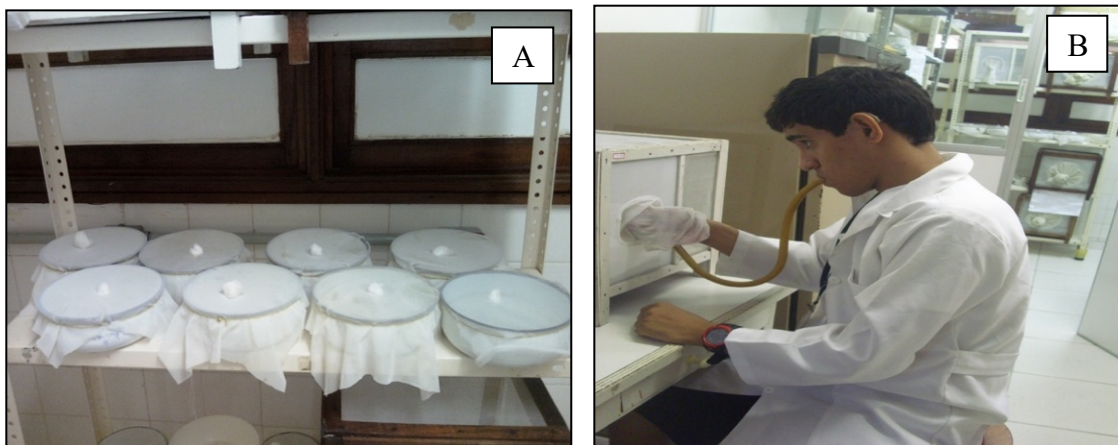


Figura 12. Criação de *A. aegypti* e *A. albopictus* no insetário. (A) Bacias teladas utilizadas na manutenção das larvas no laboratório. (B) Introdução dos mosquitos adultos nas gaiolas.

4.3.1 Bioensaios larvicidas

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue do INPA, utilizando o protocolo da OMS com pequenas modificações (WHO, 2005).

Os extratos, nanoemulsões, óleos essenciais e seus constituintes *trans*-cariofileno e humuleno, foram testados separadamente quanto à sua atividade larvicida contra as larvas de 3º instares de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Figura 13). Todos os bioensaios foram realizados a 26 ± 2 °C e 90% de umidade relativa (UR). Soluções das amostras e dimetilsulfóxido (DMSO) (10 mL) foram preparadas a 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL. Em seguida, 500 larvas de terceiro ínstar foram divididas em cinco grupos para cada concentração testada. O solvente DMSO e o inseticida temefós (0.12µg/mL) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. O bioensaio foi realizado em quintuplicata e a atividade larvicida foi estimada pela mortalidade das larvas após 24 e 48 horas de exposição.

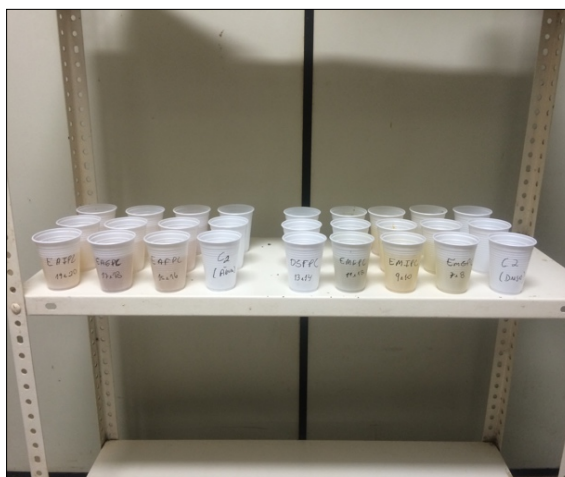


Figura 13. Realização dos bioensaios com extratos, nanoemulsões e óleos de *P. capitarianum*

As larvas eram consideradas mortas se não se movessem quando a água era perturbada (ROBERTSON et al. 2007). Os dados foram analisados em programa estatístico para cálculos do CL₅₀ (concentração letal que mata 50% das larvas expostas), CL₉₀ (concentração letal que mata 90% das larvas expostas), LCL (limite inferior de confiança) e UCL (limite superior de confiança) com limites fiduciais de 95%. A porcentagem de mortalidade foi calculada usando a fórmula (1) e as correções para mortalidade, se necessário, foram feitas usando a fórmula ABBOTT'S (1925) (2).

$$\text{Mortalidade\%} = (\text{larvas mortas} / \text{número total de larvas}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Mortalidade corrigida\%} = \left(\frac{\text{n em T após o tratamento}}{\text{n em C após o tratamento}} \times 100 \right) \quad (2)$$

n em C após o tratamento

onde n é a mortalidade (%) de larvas no grupo controle (C) e no grupo tratado (T).

4.3.2 Bioensaios aduIticida

O ensaio aduIticida foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue - INPA em sala com temperatura controlada em $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12 horas com os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, utilizando o método de teste biológico em garrafa, descrito por DUNFORD et al. (2016) com modificações. As soluções das amostras (extratos e óleos) foram diluídas separadamente em dimetilsulfóxido a 1% (DMSO) e preparadas em concentrações de 500, 250, 150, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, as garrafas de vidro (250 mL) foram impregnadas com 1 ml das soluções das amostras e deixadas secar a uma temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 14A). Posteriormente, um total de 225 fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* com idades entre 2 e 5 dias de idade, foram divididos em 5 grupos de 15 fêmeas para cada concentração testada. Estes foram introduzidos separadamente em garrafas impregnadas usando uma armadilha entomológica (Figura 14B). O solvente DMSO o inseticida deltametrina (0,60 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

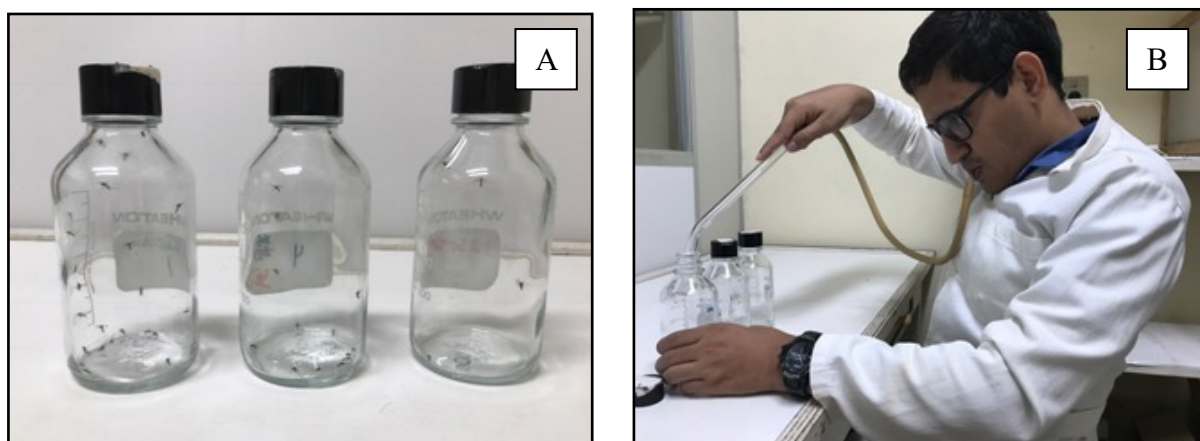


Figura 14. Realização dos bioensaios aduIticida com extratos e óleos de *P. capitarianum*; (A) Garrafas utilizadas nos bioensaios. (B) Introdução de fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* nas garrafas com capturador entomológico.

O bioensaio foi realizado em triplicata e a mortalidade de adultos foi registrada em intervalos de 15 minutos a 90 minutos de exposição (tempo final). Os mosquitos foram considerados mortos se não apresentassem resposta ou sinal de movimento (WHO, 2006; BROGDON & CHAN, 2010). Após os testes, os dados de mortalidade foram submetidos à análise de probit utilizando software estatístico para cálculos do LC_{50} e LC_{90} e o percentual de mortalidade foi calculado pela fórmula (3).

$$\text{Mortalidade\%} = (\text{adultos mortos} / \text{número total de adultos}) \times 100 \quad (3)$$

4.3.3 Estudo morfológico das larvas

Para entender o possível mecanismo de ação dos extratos e óleos de *P. capitarianum* em insetos, foram realizadas análises morfológicas das larvas de 3 instar de *A. aegypti* e *A. albopictus* tratadas a $90\mu\text{g/mL}$ após 24 horas de exposição, utilizando um estereomicroscópio e microscópio eletrônico de varredura (MEV).

O estudo morfológico utilizando o estereomicroscópio foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), de acordo com OLIVEIRA et al. (2017). Para isso, as larvas foram fixadas em etanol a 80% e observadas em um estereomicroscópio Leica EZ4HD (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) juntamente com uma câmera MDCE 5C (50x) (Figura 15).

O estudo no MEV foi realizado no Laboratório Temático de Microscopia Óptica e de Varredura do INPA, segundo FERREIRA et al. (2019) com modificações. As larvas tratadas foram fixadas em solução de glutaraldeído (4%) e o tampão de sódio cacodilato (0.1 M, pH 7.2) a 25 °C por 2 h. Em seguida, foram submetidos à desidratação em álcool e água destilada em uma série crescente (70%, 80%, 90% e

100%), por 10 minutos cada concentração. Ao final dessa etapa, as amostras foram submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico utilizando CO₂ super-seco em aparelho de BALZERS CPD-030 (Balzers, Tuscon, Arizona, EUA). Em seguida, as larvas foram montadas em suporte metálicos e cobertas com uma fina camada de ouro por pulverização catódica em aparelho de BALZERS SCD-050 (por 10 min) para possibilitar a visualização e análise no microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão).

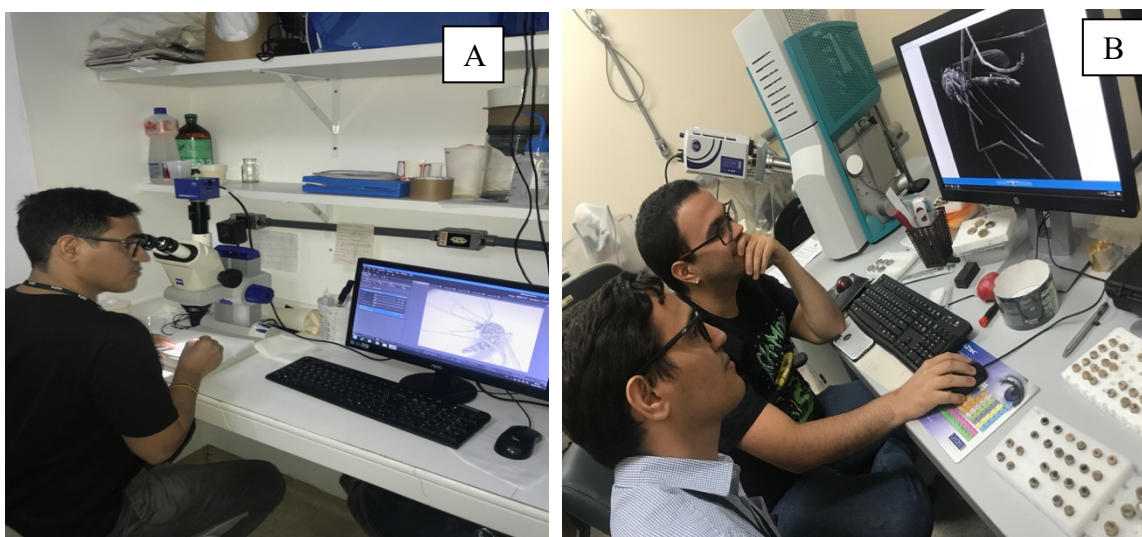


Figura 15. Realização das análises morfológicas das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. (A) Estereomicroscópio. (B) Microscópio eletrônico de varredura (MEV).

4.3.4 Atividade tóxica contra *Artemia salina*

A toxicidade dos óleos essenciais e extratos de *P. capitarianum* sobre larvas de *Artemia salina* foi realizada no Laboratório de Cromatografia (LABCRO) da UFAM, conforme metodologia de MEYER et al. (1982) com modificações.

Ovos de *A. salina* (100mg) foram colocados em um aquário de vidro contendo solução salina a 35% (35g de sal marinho sintético, diluído em 1L de água destilada)

deixados sob iluminação artificial a 28°C (lâmpada incandescente) por 48 horas para incubação das larvas (Figura 16 A). Em seguida, foram adicionados 10 náuplios a cada tubo de ensaio, contendo diferentes concentrações das amostras a serem avaliadas (1000, 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL) e mantidas sob iluminação a 28°C por 24h (Figura 16 B). Os testes foram realizados, em triplicado, para cada concentração. O lapachol foi usado como controle positivo e DMSO 1% como controle negativo. O teste foi avaliado contando as larvas mortas (indivíduos imóveis) após 24 horas de exposição. O CL₅₀ e o CL₉₀ foram obtidos por análise probit.

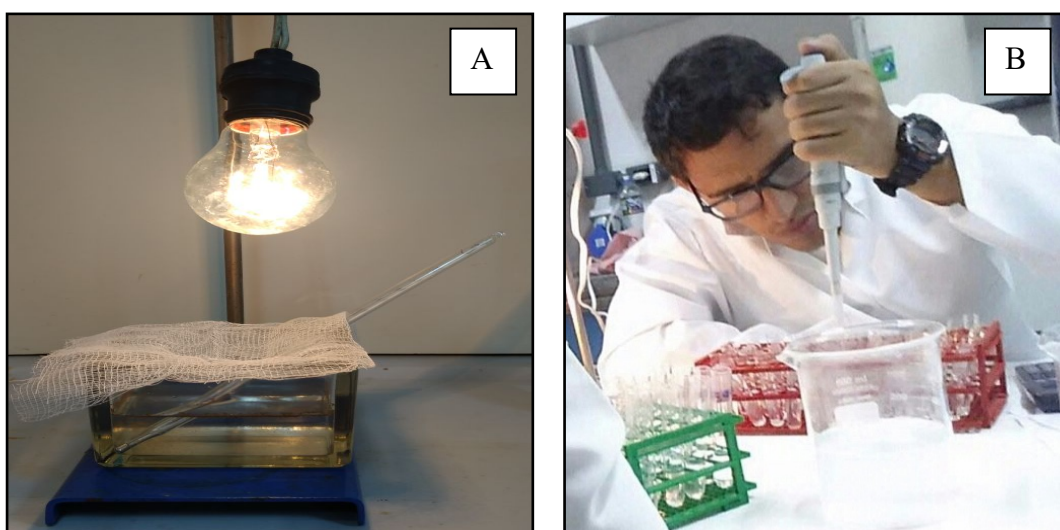


Figura 16. Realização dos bioensaios com óleos e extratos de *P. capitarianum* sobre larvas *Artemia salina*. (A) Eclosão dos ovos em aquário de vidro sob iluminação artificial. (B) Montagem dos bioensaios.

4.3.5 Modelagem molecular

O estudo de modelagem molecular das moléculas (cariofileno e humuleno) sobre a enzima AeSCP-2, foi realizado no Laboratório de Química Teórica e Computacional (LQTC-UFAM). As moléculas presentes nos óleos essenciais foram submetidas a cálculos de otimização geométrica via mecânica quântica molecular e posteriormente à

modelagem de docking molecular para obtenção de afinidade entre ligante e proteína. Os cálculos teóricos da química quântica foram realizados usando o Programa Gaussian 09 (Revisão D.01) (FRISCH et al. 2019) na plataforma Debian LINUX (versão 5.0). A abordagem DFT foi usada para otimizar a geometria usando os conjuntos de base 6-311G + (d, p) e o funcional B3LYP. A estrutura cristalográfica da proteína AeSCP-2 foi obtida do Protein Data Bank (PDB ID: 1PZ4). O software AutoDock 4.2 foi usado para o estudo da proteína-alvo, usando o algoritmo Lamarckiano. As coordenadas da região do sítio de proteína ativa foram validadas por re-docking do ligante cocrystalizado, ácido palmítico, que estava presente no arquivo. Para isso, as dimensões da caixa de grade nos eixos X, Y e Z foram fixadas em $50 \times 50 \times 50$ com espaçamento de $0,375 \text{ \AA}$, centrado no local da proteína AeSCP-2 ($x = 23,381$, $y = 28,256$ e $z = 54,388$) e foram considerados para os cálculos. A validação do re-docking foi feita pelo critério $\text{RMSD} \leq 1,5$. Após a validação, as moléculas otimizadas foram submetidas ao docking utilizando as mesmas dimensões da grade utilizadas no re-docking. As análises das interações proteína-ligante foram realizadas usando o software Discovery Studio.

Para o cálculo da energia livre de solvatação, o servidor oficial de campo da força geral CHARMM (CGenFF) (MACKERELL & VANOMMESLAEGHE, 2020) foi usado para as moléculas de trans-cariofileno e humuleno. Para moléculas de água, foi utilizado o modelo TIP3. Em todos os casos, uma caixa cúbica de 30 nm^3 foi usada para as simulações. Os sistemas formados por trans-cariofileno e humuleno solvatados em água continham 2.279 e 2.274 átomos, respectivamente. As simulações de todos os átomos na dinâmica molecular foram realizadas com o campo de força CHARMM36 (HUANG & MACKERELL, 2013) usando GROMACS, versão 2019 (Gromacs 2019). Para o cálculo de interações iônicas de longo alcance, o método de malha de partículas Ewald (PME) foi usado (ESSMANN et al. 1995). As ligações covalentes nas quais os

átomos de hidrogênio estão presentes foram restringidas pelo LINCS (LINear Constraint Solver) (HESS et al. 1997). Para cada sistema, uma minimização de 50.000 passos foi usada seguida por uma corrida de balanço de 125-ps com um tamanho de passo de 1 fs. Isto foi seguido pela produção de NPT (p / T constante) a 300 K usando 2 fn etapas de tempo para 11 ns, com pressão (1 bar) controlada usando o método de Berendsen (BERENDSEN et al. 1984) com um acoplamento a cada 2 ps. A temperatura foi controlada pelo termostato Berendsen modificado (BUSSI et al. 2007), com acoplamento a cada 0,1 ps. A energia de hidratação das moléculas de humuleno e cariofileno foi calculada usando a metodologia Klimovich (KLIMOVICH et al. 2015). As energias livres de hidratação de cada molécula foram calculadas em simulações explícitas de dinâmica molecular. A taxa de aceitação de Bennett multiestado (MBAR) (Shirts and Chodera 2008) foi usada para calcular as diferenças na energia livre para cada perturbação.

4.4 Análise estatística

Os dados de mortalidade dos ensaios biológicos foram submetidos à análise probit com intervalo de confiança de 95% para determinar o CL₅₀ e CL₉₀ usando o programa POLO PLUS ® (LeOra Software, Berkeley, EUA) (FINNEY, 1971; ROBERTSON, et al. 2007). As diferenças significativas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA bidirecional) seguida pelo teste de Tukey (p <0,01 e p<0,05), utilizando o software BioEstat 5.0 Windows (Califórnia, EUA).

4.5. Avaliação das atividades químicas e biológicas de *P. capitarianum*

4.5.1 Atividade antioxidante (DPPH)

Os ensaios antioxidantes foram realizados no Laboratório de Cromatografia (LABCRO) da UFAM, onde a capacidade inibitória de radicais livres dos óleos essenciais e extratos de *P. capitarianum* foi feita de acordo com método de Silva *et al.* (2014), utilizando o radical estável DPPH (2,2-Difenil-1-Picril-hidrazil).

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços com capacidade de 300 µl, contendo 30 µL de amostras e 270 µL da solução de DPPH, sendo que a quercetina foi utilizada como padrão (controle positivo) e o negativo (metanol sem adição de amostras). As soluções das amostras (30 µL) foram obtidas por diluição em série de 0,1 a 10,0 µg/mL sendo incubada por 30 minutos na ausência de luz. Após a incubação foi realizada a leitura da microplaca no espectrofotômetro de ultravioleta (Biochrom ASYS UVM 340) no comprimento de onda de 515 nm sendo realizados em triplicata. Os valores das absorbâncias obtidos foram convertidos em percentual de inibição calculados através da equação (4). Os valores de IC₅₀ (concentração inibidora de 50%) foram calculados usando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA) (ZHAO *et al.*, 2016).

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}} \quad (4)$$

4.5.2 Atividade antioxidantes (ABTS)

A atividade antioxidante com o radical livre ABTS foi feita com base no método descrito por Silva *et al.* (2011) com modificações. O radical livre ABTS foi preparado numa solução de 10 mL, contendo 2.45mM de persulfato de potássio e 7mM de ABTS utilizando H₂O destilada como solvente, sendo incubados por 16 horas na ausência de luz. Posteriormente, foram realizados os ensaios em microplacas de 96 poços com

capacidade de 300 μL , contendo 30 μL de amostras e 270 μL da solução de ABTS, nas concentrações 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.062; 0.031 e 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de diluições seriadas, controle positivo (Trolox) e o controle negativo (metanol sem adição de amostras), sendo incubada por 30 minutos na ausência de luz.

Após a incubação foi realizada a leitura da microplaca no espectrofotômetro de ultravioleta (Biochrom ASYS UVM 340) no comprimento de 734 nm sendo realizados em triplicata. Os valores das absorbâncias obtidos foram convertidos em percentual de inibição calculados através da equação (5). Os valores de IC_{50} (concentração inibidora de 50%) foram calculados usando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA) (ZHAO et al. 2016).

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}} \quad (5)$$

4.5.3 Atividade enzimática (Acetilconesterase)

A atividade inibitória da AChE dos óleos essenciais de *P. capitarianum* foi realizada no Laboratório de Cromatografia (LABCRO) da UFAM, com base nos métodos descritos na literatura (ELLMAN et al. 1961) com algumas modificações. As soluções de OE diluídas em metanol foram preparadas nas concentrações de 7,81, 15,62, 31,25, 62,50 e 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Os testes foram realizados em uma microplaca de 96 poços, cada poço contendo 20 μL de soluções OE (7,8 – 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 80 μL de tampão fosfato (100mM), 40 μL de ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB, 2.5mM) e 20 μL da enzima acetilcolinesterase (AChE) (1,0 U/mL), sendo incubados a 37°C por 10 min na ausência de luz. Em seguida, 40 mL de acetilcolina iodeto (10 mM) foram adicionados e

incubados novamente nas mesmas condições. A galantamina foi usada como controle positivo (25,0 a 1,0 µg) e o metanol como controle negativo. A absorbância da mistura foi medida a 405 nm no espectrofotômetro UV (Biochrom ASYS UVM 340) e realizada em triplicata. A porcentagem de inibição da atividade da AchE foi calculada de acordo com a seguinte equação (6). Os valores de IC₅₀ (concentração inibidora de 50%) foram calculados usando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA) (ZHAO et al., 2016).

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(A2 - (A1 - A3)) \times 100}{A2} \quad (6)$$

onde A1 é a absorbância das amostras e a enzima, A2 é a absorbância da enzima sem a amostra e A3 é a absorbância da amostra sem a enzima.]

4.5.4 Ensaio antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos dos óleos essenciais e extratos de *P. capitarianum* sobre bactérias patogênicas foram realizadas no do Laboratório de Microbiologia do INPA pelo método de difusão em ágar-discos descrito por Sayout et al. (2019) com modificações. Este método é conhecido pela sua simplicidade, reprodutibilidade e eficácia para testar a sensibilidade das bactérias.

As cepas bacterianas utilizadas para avaliar atividade antimicrobiana foram as Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 12228) e as Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 29245). Todos os isolados padrões bacterianos foram obtidos do Laboratório de Microbiologia e Virologia da FIOCRUZ da Amazônia. As bactérias foram mantidas em tubos contendo ágar Muller-Hinton até atingirem a turbidez correspondente ao tubo 0,5

da escala de Mac-Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ mL) e em seguida inoculadas em placas contendo discos de papel-filtro (6 mm) impregnados com amostras (óleos ou extratos) na concentração de $100\mu\text{g/mL}$, incubadas em estufa a 35°C por 24h. (Figura 17 A e B). O solvente dimetilsufóxido (DMSO) e o antibiótico amoxicilina foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

O ensaio foi realizado em triplicata e a atividade antimicrobiana foi estimada pela medição dos diâmetros dos halos formados ao redor dos discos (ausência de crescimento microbiano) (ALVES et al. 2011; SILVA et al. 2017).

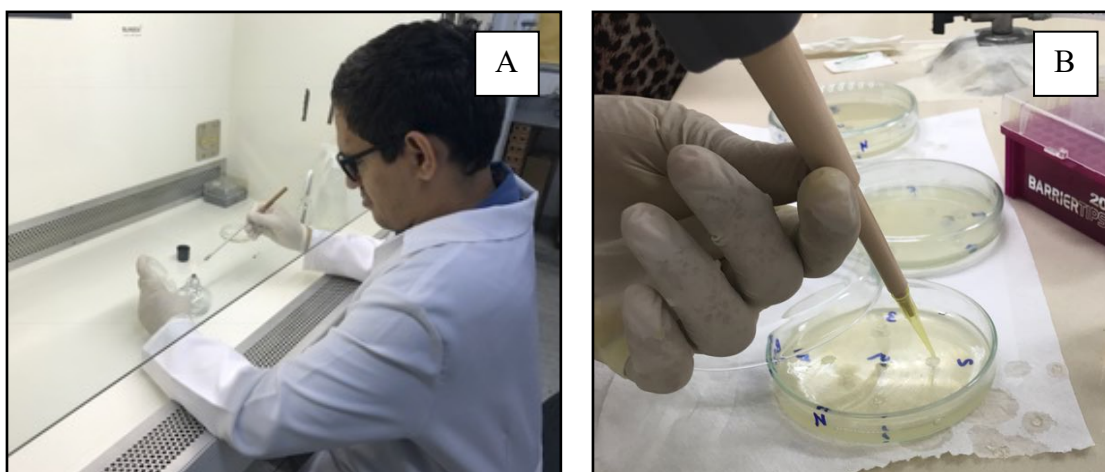


Figura 17. Ensaio antimicrobianos com extratos e óleos de *Piper capitarianum*. (A) Inoculação dos microrganismos em meio de cultivo; B) Aplicação das amostras nos discos.

4.6. Nanoemulsão contendo óleos ativos de *P. capitarianum*

4.6.1 Síntese de nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases onde a fase oleosa foi adicionada a fase aquosa sob agitação ultrassônica em homogeneizador

de alta energia (Omini Sonic Ruptor 250) a 100 rpm por 10 min, sendo posteriormente armazenadas em geladeira (RODRIGUES et al. 2018).

A fase oleosa foi constituída pelo óleo essencial e tensoativo Span 80 (lipofílica; EHL: 4,3) e a fase aquosa com o surfactante Tween 20 (hidrofílica; EHL: 16,7) e água destilada. Ambos os surfactantes são neutros, ou seja, sem cargas elétricas positivas (surfactantes catiônicos) ou negativas (surfactante aniônico).

Quatro nanoemulsões foram desenvolvidas empregando-se como fase oleosa amostras distintas: uma com o óleo essencial obtido da inflorescência de *P. capitarianum* (NanoOEI), e as demais com constituintes principais detectados nos OEs de *P. capitarianum*, especificamente, trans-cariofileno (NanoTC), humuleno (NanoHU) e a uma mistura do trans-cariofileno + humuleno (NanoTH). As nanoemulsões foram preparadas com massa final de 10mg, contendo 80% de água destilada (fase aquosa), 10% da amostra (óleo) e os tensoativos na concentração de 5% (fase oleosa), onde foram submetidas a caracterização físico-químicas.

4.6.2 Caracterização das nanoemulsões

A caracterização das nanoemulsões foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: cor, odor e homogeneidade, pH, tamanho da partícula e determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL).

As nanoemulsões foram analisados por meio da observação visual das formulações ao longo do experimento em relação a estabilidade, variação de cores (opacas ou translúcidas) e homogeneidade (separação de fases e fluidez). A análise do pH, foi feita inserindo o eletrodo do pHmetro (Lutron® modelo PH-221) devidamente calibrado diretamente nas amostras onde as análises foram realizadas em triplicatas após o preparo das formulações. O tamanho das partículas e sua distribuição foram

determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando um Zetasizer® (Nano ZS90, Malvern, UK). As formulações foram diluídas utilizando água ultrapura (Milli-Q) na proporção (1:25), e, analisadas em quintuplicata, onde os resultados foram expressos diâmetro médio \pm desvio padrão.

Os valores (EHL) da mistura dos surfactantes com óleo de acordo com a seguintes equação (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2015):

$$A + B = 100 \quad (7)$$

$$\text{EHL Resultante} = \text{EHLA} \times 0,01A + \text{EHLB} \times 0,01B \quad (8)$$

Onde: A= porcentagem do tensoativo hidrofílico; B=porcentagem do tensoativo lipofílico; EHLA=Equilíbrio Lipofílico de A; EHLB= Equilíbrio Hidrofílico de B;

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 1 – Óleos essenciais de *Piper capitarinaum*

5.1.1 Rendimentos dos óleos essenciais de *Piper capitarianum*

Os óleos essenciais (OEs) obtidos de *P. capitarianum*, apresentaram aspecto claro e aroma agradável.

Os rendimentos dos OEs obtidos das folhas, galhos e inflorescência foram, 1,2%, 0,9% e 0,6% p/p respectivamente (Tabela 1). Estes resultados corroboram com os obtidos por Silva *et al.* (2017), que relataram rendimentos de óleos essenciais obtidos das folhas foram superiores a 1% para espécies da família Piperaceae. Estes rendimentos podem variar de acordo com a região geográfica e fatores ambientais, sendo condicionada principalmente a seus diferentes quimiotipos (SILVA *et al.* 2016). Por outro lado, foram encontrados em espécies como *Piper klotzschianum*, *P. marginatum*, *P.gaudichaudianum* e *P. hostmanianum* os rendimentos de 1.5% dos óleos essenciais obtidos das folhas coletadas na região amazônica (ALMEIDA *et al.* 2009; AUTRAN *et al.* 2009; NASCIMENTO *et al.* 2013).

Dessa forma, os óleos essenciais de alto rendimento são valorizados pelo mercado devido à sua grande importância para as indústrias farmacêutica, de cosméticos e outras aplicações (SILVA *et al.* 2014).

Tabela 1. Massas e rendimentos dos óleos essenciais de *P. capitarianum*.

Partes	Massa	Massa do	Rendimento
Coletadas	Triturada (g)	Óleo (g)	(%) ± DP
Folhas	200	2,42	1.2 ± 0,3
Galhos	200	1,72	0.9 ± 0,4
Inflorescência	200	1,20	0.6 ± 0,4

DP: Desvio padrão de triplicata

5.1.2 Análises dos óleos essenciais por CG-EM.

A composição química dos EOs de *P. capitarianum* esta apresentada na Tabela 2. A análise do cromatograma obtido por GC/MS do OE das folhas permitiu a identificação de 48 constituintes, dos quais 13.3% são monoterpenos, 82.3% são sesquiterpenos e 0.7% são relativos à presença de hidrocarbonetos e uma cetona correspondendo a um total de 96,3% dos constituintes. Os principais constituintes identificados foram o trans-cariofileno (20.0%), α -humulene (10.2%) e β -myrcene (10.5%). Concernente ao OE obtido dos galhos foram identificados 94.7% dos constituintes, sendo 2.2% de monoterpenos, 91.9% de sesquiterpenos e 0.6% relativos à presença de um hidrocarboneto e um éster. As substancias principais identificadas foram o trans-cariofileno (19.7%), α -humulene (9.1%) e α -selinene (7%). Quanto ao OE obtido da inflorescência a identificação dos constituintes foi de 94.1%, sendo 11.9% representados por monoterpenos, 82.1% por sesquiterpenos e 0.1% relativo a presença de um hidrocarboneto. Os constituintes principais identificados no OE obtido da inflorescência foram o trans-cariofileno (15.3%), α -humuleno (12.7%), linalool (6.0%) e nerolidol (4.5%).

Sabe-se que os métodos de extração, fatores ambientais, localização geográfica provavelmente afetam as composições químicas e a produção secundária de metabólitos em *Piper* spp. (SILVA et al. 2014). De maneira geral, a literatura relata que a composição química é bastante variável entre espécies do gênero *Piper* e entre indivíduos da mesma espécie, o que pode influenciar na atividade farmacológica. Os sesquiterpenos predominam nos óleos de *Piper*, e a abundância de trans-cariofileno e α -humuleno é frequentemente relacionada (NAVICKIENE et al. 2006; SIMEONE et al. 2011; PACHECO et al. 2016). A quantidade de trans-cariofileno e α -humuleno em OE

obtida das folhas de *Piper* pode variar de 5% a 25% em espécies coletadas nas regiões Neotropicais (SILVA et al. 2017).

As variações nas composições de óleos essenciais certamente afetam as atividades biológicas e os usos medicinais tradicionais das plantas em seus habitats nativos. Por exemplo, as composições OE das folhas de *P. hispidum* coletadas em Cuba (PINO et al. 2004) eram ricas em trans-cariofileno (6.3%), enquanto em uma amostra do Panamá predominou o dilapiol (16.3%) (SANTANA et al. 2015), e uma amostra da Colômbia teve o α -humuleno (10.2%) como seu principal constituinte (BENITEZ, et al., 2009). Da mesma forma, o OE das folhas de *P. aduncum* coletadas na região amazônica (Brasil) era rico em dilapiol (32.4%) (ALMEIDA et al., 2009), enquanto o OE extraído das folhas *P. aducun* nas montanhas Escambray (Cuba) era rico em trans-cariofileno (15.2%) e safrol (13.3%) (MONZOTE et al., 2017). *P. arboreum* mostrou grande variação na composição do OE, com quimiotipos ricos em sesquiterpenóides como trans-cariofileno (13.5%) e α -humuleno (6.5%) do bioma Amazônia (Brasil) (SILVA, et al. 2016) e amostras coletadas em Monteverde (Costa Rica), com safrol (32.4%), trans-cariofileno (10.5%) e α -humuleno (7.5%) (SETZER et al., 2008).

No presente trabalho, os óleos essenciais obtidos das partes aéreas (folhas, caules e inflorescências) de *P. capitarianum* apresentaram altos teores de trans-cariofileno (15.3-20.0%) e α -humuleno (9.1-10.2%), que diferem da grande maioria dos óleos do gênero *Piper* estudado. Este é o primeiro relato sobre a composição química de óleos essenciais de *P. capitarianum*.

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais da folha, caule e inflorescência de *P. capitarianum*

Componentes	Óleos essenciais (%)			
	I.R	Folhas	Galhos	Inflorescência
α -pineno	932	0.3	-	-
β -mirceno	988	10.5	1.4	5.3
Limoneno	1024	2.3	0.8	0.3
cis-ocimeno	1032	-	-	0.1
Terpinoleno	1086	0.2	-	-
Linalool	1095	-	-	6.0
(E)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrieno	1113	0.3	0.2	0.1
8-Dimethyl-1,3,7-nonatrieno	1123	0.3	-	-
Alloocimeno	1128	-	-	0.2
Bicicloelemeno	1334	0.5	0.3	0.4
δ -elemeno	1335	0.7	0.5	0.1
α -cubebeno	1345	0.4	0.3	0.3
α -ylangeno	1373	0.5	0.7	0.6
α -copaeno	1374	1.1	2.7	1.3
isoledeno	1374	-	-	0.2
β -cubebeno	1387	0.4	-	0.2
β -elemeno	1389	3.6	3.1	0.5
α -gurjuneno	1409	0.2	0.3	0.2
α -bergamoteno	1411	-	0.4	-
trans-cariofileno	1417	20.0	19.7	15.3

β -copaeno	1430	3.3	3.2	1.4
α -guaieno	1437	0.7	0.7	0.2
aromadendreno	1439	0.2	0.9	0.7
6,9-guaiadieno	1442	0.1	-	-
α -humuleno	1452	10.2	9.1	12.7
γ -muuroleno	1479	0.9	0.7	3.6
germacreno D	1480	0.7	0.5	-
β -selineno	1489	4.9	6.3	6.2
α -selineno	1498	5.3	7.0	6.6
trans-muurola-4(14),5-dieno	1493	1.6	2.0	1.0
α -muuroleno	1500	0.3	-	0.4
δ -guaieno	1508	1.6	1.4	0.8
δ -cadineno	1511	-	3.9	0.4
γ -cadineno	1513	2.7	3.3	1.0
cis-calameneno	1528	0.9	1.4	1.4
trans-cadina-1,4-dieno	1533	0.3	0.3	0.3
Espatulanol	1577	0.4	0.4	0.6
óxido de cariofileno	1582	1.8	1.7	1.9
epiglobulol	1590	-	0.4	0.3
guaiol	1600	4.3	-	2.0
epóxido humuleno II	1608	-	-	1.1
1,10-di-epi-cubenol	1618	0.7	0.8	0.5
1-epi-cubenol	1627	0.8	0.7	1.0
epi- α -cadinol	1638	2.6	3.5	3.3

α -muurolol	1644	2.6	2.9	2.0
β -eudesmol	1650	-	0.5	-
α -cadinol	1652	1.4	1.9	2.2
neointermedeol	1658	0.4	0.5	0.8
intermedeol	1665	1.3	1.7	2.1
trans-calamenen-10-ol	1668	0.4	0.8	0.7
epi- β -bisabolol	1670	-	1.2	-
epi- α -bisabolol	1683	-	0.3	0.2
α -bisabolol	1685	0.2	0.7	0.4
2-pentadecanono	1697	0.1	0.2	-
amorfa-4,9-dien-2-ol	1700	0.1	-	-
(E)-nerolidol	1716	2.9	3.5	4.5
acetato guaiol	1725	0.3	0.5	0.5
acetato eudesmol	1794	0.4	0.7	-
cariofila-4(12),8(13)-dien-5- β -ol	1639	0.6	0.5	0.6
Eupatoriochromeno	1761	-	-	1.6
Monoterpenos				
Monoterpenos hidrocarbonetos		13.3	2.2	5.9
Monoterpenos oxigenados		-	-	6.0
Sesquiterpenos				
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		61.1	68.7	55.8
Sesquiterpenos oxigenados		21.2	23.2	26.3
Outros compostos		0.7	0.6	0.1
Total de componentes identificados		96.3	94.7	94.1

IR= Índice de Retenção

5.1.3 Atividade larvicida e aduítica dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Piper* têm sido relatados como pesticidas naturais eficazes contra larvas de mosquitos de terceiro e quarto ínstar (MARQUES & KAPLAN 2015; LUZ et al. 2020). Nosso trabalho mostra que os óleos essenciais de *P. capitarianum* podem ser eficazes agentes de controle alternativo contra as larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Entre os óleos essenciais testados, os resultados mostraram que o OE extraído da inflorescência foi o mais ativo, com CL_{50} (24 h) = 87.56 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{50} (48 h) de 82.43 $\mu\text{g/mL}$ para larvas de *A. aegypti* e CL_{50} (24 h) = 76.13 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{50} (48 h) de 63.65 $\mu\text{g/mL}$ para larvas de *A. albopictus* (Tabela 3).

Os resultados da atividade larvicida dos óleos essenciais (OEs) de galhos e folhas não foram significativamente diferentes. Existem muitos relatos das atividades biológicas dos óleos essenciais contra larvas de *A. aegypti*, mas os mecanismos são suportados por poucos registros da ação tóxica envolvendo mecanismos de desnaturalização de proteínas, inibição enzimática e desintegração de membranas (BENELLI et al. 2018a). Os óleos essenciais podem atuar por absorção através da cutícula, via sistema respiratório ou por ingestão (RATTAN et al. 2010). Além disso, devido à sua lipofilicidade, a OE provoca ruptura e penetra através da matriz lipoproteína da membrana da célula de inseto (DIAS et al. 2014; LUZ et al. 2020).

O uso de óleos essenciais (OEs) como larvicidas encontra vários relatos na literatura, por exemplo, Luz et al. (2020) apresentaram uma revisão com 361 óleos essenciais de 269 espécies de plantas com atividade contra larvas de *A. aegypti*, das quais, mais de 60% destas os óleos essenciais foram considerados ativos (CL_{50} <100 $\mu\text{g/mL}$). Pavela (2015) publicou uma revisão sobre a atividade larvicida de 122 espécies de plantas de 26 famílias, das quais 77 apresentaram CL_{50} inferior a 50 ppm. Nesse universo, apenas sete plantas poderiam ser consideradas significativamente mais

eficientes, com CL_{50} menor que 10 ppm. Na composição desses OEs predominaram substâncias menos comuns do grupo dos sesquiterpenos, ácidos aromáticos e cetonas. Testes larvicidas contra *A. aegypti* mostraram que o óleo essencial de *P. hispidinervum*, rico em linalol, exibiu CL_{50} de 96.25µg/mL após 24h de exposição, semelhante ao encontrado anteriormente por (SILVA et al. 2018). A mesma atividade também foi observada nos óleos essenciais de *P. tuberculatum* e *P. humaytanum*, que possuem propriedades larvicidas contra o vetor da dengue com CL_{50} de 106.3µg/mL e 121.5µg/mL, respectivamente (LAVOR et al. 2012).

As duas principais substâncias presentes nos óleos essenciais de *P. capitarianum*, trans-cariofileno e humuleno, foram avaliadas quanto à sua atividade larvicida. As duas substâncias testadas juntas, na mesma proporção presente nos óleos essenciais (2:1), apresentaram valores de CL_{50} de 90.50µg/mL e 85.24µg/mL contra *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente. Esses resultados sugerem que esses dois sesquiterpenos são substâncias ativas presentes nos óleos essenciais de *P. capitarianum*. No entanto, a maior atividade larvicida do óleo essencial de inflorescência não pôde ser explicada apenas com base nos principais constituintes (trans-cariofileno e humuleno), mas também pela presença de compostos oxigenados como linalool (6.0%) e nerolidol (4.5%) , cujo conteúdo difere em óleos essenciais das folhas e galhos.

Tabela 3. Atividade larvicida dos óleos essenciais de *Piper capitarianum* contra larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* após 24 e 48 horas de aplicação.

Amostras	Mosquitos testados	Leituras	CL ₅₀ ± DP	IC 95% (LCL – UCL)	CL ₉₀ ± DP	IC 95% (LCL – UCL)	Slope ± DP	X ²
OEF	<i>A. aegypti</i>	24h	163.76 ± 0.6 ^d	123.40 – 226.08	326.16 ± 0.6 ^f	295.13 – 436.20	3.08 ± 0.2	1.90
		48h	139.50 ± 0.6 ^c	114.09 – 157.28	293.95 ± 0.6 ^e	270.37 – 321.85	2.84 ± 0.1	1.88
	<i>A. albopictus</i>	24h	161.81 ± 0.5 ^d	114.67 – 182.47	234.19 ± 0.5 ^e	228.27 – 329.60	2.99 ± 0.1	1.71
		48h	133.83 ± 0.6 ^c	92.43 – 144.93	203.69 ± 0.6 ^e	157.46 – 236.53	2.67 ± 0.1	1.80
OEG	<i>A. aegypti</i>	24h	140.92 ± 0.4 ^c	106.77 – 189.98	213.05 ± 0.4 ^e	181.64 – 249.08	2.75 ± 0.1	1.88
		48h	118.82 ± 0.4 ^c	90.72 – 154.73	270.39 ± 0.4 ^e	259.48 – 296.72	2.59 ± 0.1	1.81
	<i>A. albopictus</i>	24h	134.08 ± 0.6 ^c	122.16 – 176.60	206.36 ± 0.6 ^e	181.72 – 279.63	3.57 ± 0.2	1.58
		48h	105.01 ± 0.6 ^b	90.83 – 147.19	262.89 ± 0.6 ^e	209.60 – 286.53	3.21 ± 0.2	1.60
OEI *	<i>A. aegypti</i>	24h	87.56 ± 0.3 ^b	60.09 – 89.78	131.98 ± 0.3 ^c	80.61 – 134.93	3.43 ± 0.2	1.01
		48h	82.43 ± 0.4 ^b	42.26 – 78.54	113.85 ± 0.4 ^c	76.98 – 193.57	3.26 ± 0.2	1.20
	<i>A. albopictus</i>	24h	76.13 ± 0.3 ^b	69.80 – 96.96	115.68 ± 0.3 ^c	107.82 – 130.81	2.49 ± 0.1	1.06
		48h	63.65 ± 0.3 ^a	51.39 – 88.53	83.35 ± 0.3 ^b	71.63 – 126.75	2.46 ± 0.1	1.04
TC *	<i>A. aegypti</i>	24h	68.90 ± 0.6 ^a	65.45 – 90.54	112.52 ± 0.6 ^c	107.82 – 150.56	2.32 ± 0.1	1.01
		48h	66.09 ± 0.5 ^a	64.24 – 86.34	104.15 ± 0.5 ^b	102.52 – 130.81	2.33 ± 0.2	0.99
	<i>A. albopictus</i>	24h	60.36 ± 0.4 ^a	59.20 – 85.43	105.08 ± 0.4 ^b	98.50 – 140.43	2.46 ± 0.1	1.06
		48h	58.25 ± 0.4 ^a	57.10 – 83.54	100.05 ± 0.4 ^b	97.10 – 128.65	2.48 ± 0.1	1.01
HU	<i>A. aegypti</i>	24h	90.50 ± 0.5 ^b	88.45 – 139.82	140.34 ± 0.5 ^c	131.56 – 229.35	2.44 ± 0.1	1.18
		48h	88.49 ± 0.5 ^b	84.23 – 120.67	124.65 ± 0.5 ^c	121.59 – 218.57	2.46 ± 0.2	1.16
	<i>A. albopictus</i>	24h	85.24 ± 0.4 ^b	83.20 – 95.43	123.56 ± 0.4 ^c	116.20 – 145.43	2.45 ± 0.2	1.15
		48h	83.68 ± 0.4 ^b	80.50 – 90.46	103.37 ± 0.4 ^c	101.50 – 135.72	2.42 ± 0.2	1.12
TH	<i>A. aegypti</i>	24h	125.35 ± 0.4 ^c	120.45 – 164.82	150.45 ± 0.4 ^c	131.56 – 219.35	2.82 ± 0.1	2.21
		48h	122.09 ± 0.4 ^c	134.23 – 220.67	224.65 ± 0.4 ^c	221.59 – 318.57	2.86 ± 0.1	2.20
	<i>A. albopictus</i>	24h	108.20 ± 0.3 ^b	104.13 – 120.67	137.34 ± 0.3 ^b	115.23 – 220.67	3.25 ± 0.2	1.13
		48h	106.60 ± 0.3 ^b	101.93 – 118.37	135.44 ± 0.3 ^b	113.53 – 215.53	3.23 ± 0.2	1.10

CL₅₀: concentração letal para 50% das larvas; CL₉₀: concentração letal para 90% das larvas; DP: desvio padrão (triplicados); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05); IC 95%: intervalo de confiança de 95%; LCL: limite inferior de confiança; UCL: limite superior de confiança; X²: valor do qui-quadrado; Controle= Temefos, 0,12 µg/mL. *Amostra com o efeito larvicida mais forte.

OEF- Óleo essencial de folhas; **OEG**- Óleo essencial dos galhos; **OEI**- Óleo essencial de inflorescências; **TC**-trans-cariofileno; **HU**-Humuleno; **TH**-Trans-cariofileno+ Humuleno.

A literatura relata as atividades biológicas devidas ao trans-cariofileno e humuleno. Por exemplo, o óleo essencial de *Syzygium zeylanicum*, com altos níveis de humuleno, tem atividade com CL_{50} de 61.2 μ g/mL e 41.6 μ g/mL, respectivamente para as larvas de *A. subpictus* e *A. albopictus* (BENELLI et al. 2017a). *Piper hispidinervum* da região amazônica revelou altos níveis de nerolidol (32,45%) e trans-cariofileno (21,95%) e mostrou atividade com CL_{50} de 84.8 μ g/mL contra larvas de *A. aegypti* (SILVA et al. 2018). *Plectranthus barbatus*, que possui o β -cariofileno como o principal constituinte do óleo essencial, apresentou atividade com CL_{50} de 72.5 μ g/mL, 84.9 μ g/mL contra as larvas de *A. subpictus* e *A. aegypti*, respectivamente (GOVINDARAJAN et al. 2016). O óleo essencial de *Capraria biflora* mostrou que a mistura β -cariofileno e humuleno (constituintes principais) têm efeito neurotóxico (inibição da AChE) com CL_{50} de 73.5 μ g/mL nas larvas de *Aedes aegypti*. Embora os sesquiterpenos pareçam estar relacionados à atividade larvicida, estudos recentes indicam que substâncias minoritárias ou que não causam mortalidade isoladamente podem ter um efeito significativo em suas misturas (DIAS, et al. 2014; BENELLI et al 2017c). Por esse motivo, nossos resultados podem ser atribuídos ao efeito antagonista de muitos ou alguns dos constituintes dos óleos essenciais, devido baixa atividade sobre larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*.

Com relação à atividade adulticida, os resultados também mostraram que o óleo essencial da inflorescência foi o CL_{50} mais ativo = 126.25 μ g/mL e 124.51 μ g/mL e CL_{90} = 207.04 μ g/mL e 205.60 μ g/mL contra adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente (Tabela 4). De acordo com esses resultados, há uma maior tolerância

dos adultos de *A. aegypti* ao óleo essencial de *P. capitarianum* se comparado aos adultos de *A. albopictus*. Com bases nos resultados, há uma maior toxicidade do OE de *P. capitarianum* sobre larvas de *A. albopictus* quando comparado a larvas de *A. aegypti*. Todavia, não houve diferença estatística significativa quando comparada as estimativas das CL_{50} e os respectivos intervalos de confiança, entre os períodos de observação ($p>0,05$).

Tabela 4. Atividade adulticida dos óleos essenciais contra as fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* após 90 minutos de exposição.

Óleos	Mosquitos Testados	$CL_{50} \pm DP$	IC 95% (LCL – UCL)	$CL_{90} \pm DP$	IC 95% (LCL – UCL)	Slope $\pm DP$	X^2
Folhas	<i>A. aegypti</i>	135.76 \pm 0.5 ^a	129.45 – 239.82	243.76 \pm 0.5 ^c	211.56 – 319.35	2.61 \pm 0.1	0.21
	<i>A. albopictus</i>	139.09 \pm 0.6 ^a	134.23 – 220.67	224.65 \pm 0.6 ^d	210.59 – 318.57	2.67 \pm 0.1	0.13
Galhos	<i>A. aegypti</i>	140.36 \pm 0.4 ^a	128.64 – 215.39	212.85 \pm 0.4 ^f	209.19 – 289.65	2.62 \pm 0.1	1.30
	<i>A. albopictus</i>	138.97 \pm 0.3 ^a	132.88 – 232.95	210.70 \pm 0.3 ^f	203.88 – 311.68	2.58 \pm 0.1	0.43
Infloresc.*	<i>A. aegypti</i>	126.25 \pm 0.5 ^b	119.18 – 182.53	207.04 \pm 0.5 ^f	249.19 – 310.17	2.45 \pm 0.1	1.31
	<i>A. albopictus</i>	124.51 \pm 0.5 ^b	110.99 – 203.67	205.60 \pm 0.5 ^f	203.67 – 302.47	2.41 \pm 0.1	0.45

CL_{50} : concentração letal para 50% dos adultos; CL_{90} : concentração letal para 90% dos adultos:

DP : desvio padrão (triplicados); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); **IC 95%**: intervalo de confiança de 95%; **LCL**: limite inferior de confiança; **UCL**: limite superior de confiança; X^2 : valor do qui-quadrado; **Controle** = α -cipermetrina: 0,4 μ g/mL; *Óleo com o efeito adulticida mais forte.

Os óleos essenciais obtidos de várias espécies possuem potencial adúlticida amplamente descritos na literatura, por exemplo, o OE de *Piper betle* mostrou efeito adúlticida com $LC_{50} = 95.5\mu\text{g/mL}$ e $LC_{90} = 148.5\mu\text{g/mL}$ para o mosquito *A. aegypti* (RIESNA & HAMID, 2019). Por outro lado, OE obtido das folhas de *Sphaeranthus indicus* mostrou potencial adúlticida com $CL_{50} = 200\mu\text{g/mL}$ e $300\mu\text{g/mL}$ contra *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, respectivamente (CHELLAPPANDIAN et al. 2018b). Em OEs obtidos das folhas de outras espécies como *Piper aduncum*, *Lippia origanoides* e *Croton argyrophyllus*, revelaram como principais compostos dilapiol (32%), carvacrol (50.6%) e trans-cariofileno (22.88%) mostrando ativos contra adultos de *A. aegypti* com $CL_{50} = 136.5\mu\text{g/mL}$, $190.5\mu\text{g/mL}$, $90.4\mu\text{g/mL}$ respectivamente (PINTO et al. 2012; CASTILLO et al. 2017; CRUZ et al. 2017). Embora muitos OEs possuam forte atividade larvicida ou adúlticida a mosquitos, ainda existem um potencial inexplorado para o desenvolvimento de produtos mosquitocidas eficazes (CHAIYASIT et al. 2006; SOONWERA & PHASOMKUSOLSIL 2017; SILVA et al. 2018).

Os óleos essenciais de *P. capitarianum* demonstraram ser promissores para a produção de inseticidas naturais devido a baixa toxicidade aos insetos não alvos podendo ser usados em associação com inseticidas sintéticos e subprodutos das indústrias agrícolas. Por todos esses motivos, eles podem ser usados em programas de controle de vetores de insetos, em vez de usar inseticidas sintéticos.

5.1.4 Observações morfológicas das larvas

As alterações morfológicas observadas nas larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* visam compreender o possível modo de ação do óleo essencial de *P. capitarianum* em insetos. As micrografias de luz obtidas mostram que no grupo controle as larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Figura 18A e B) apresentaram aparência normal, sem alterações

morfológicas na cabeça (h), segmentos abdominais (a), papilas anais (p) e sifão (s). As larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* submetidas ao tratamento com OE da inflorescência apresentaram aspectos morfológicos, isto é, cabeça, papilas anais e sifão, semelhantes ao do controle, porém, foi observado em todos os segmentos abdominais, pigmentação escura, além da eliminação do conteúdo intestinal coberto pela matriz peritrófica conforme evidenciado na figura (18C e D) e (19F e H).

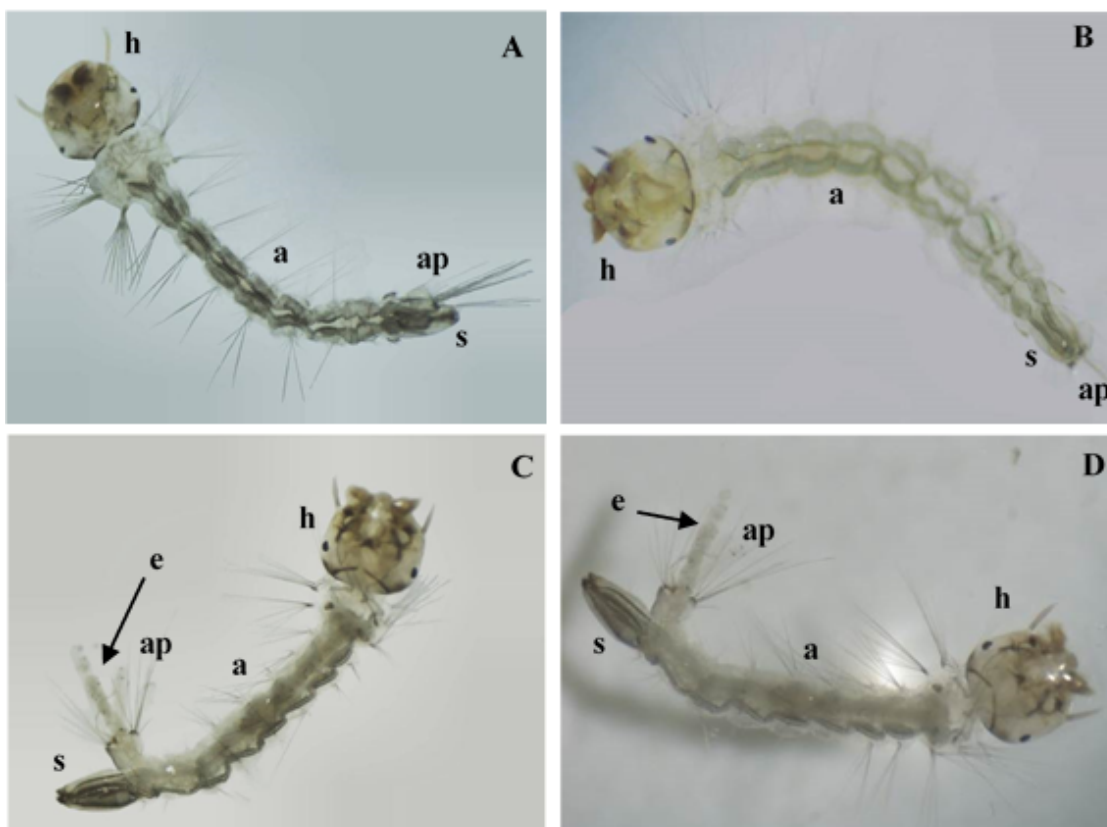


Figura 18. Micrografias de luz das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Larvas de controle de *A. aegypti* (A) e *A. albopictus* (B) sem alterações na cabeça (h), segmentos do abdômen (a), sifão (s) e papila anal (ap). Larvas de *A. aegypti* (C) e *A. albopictus* (D) tratadas com OE de *P. capitarianum* mostrando alterações (pigmentação escura) nos segmentos do abdome (a) e extrusão da matriz peritrófica (e) (seta).

De acordo com a literatura, o monoterpeneo linalol presente no óleo das inflorescências *P. capitarianum* pode ser um dos responsáveis pelas alterações morfológicas observadas nas larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Outros estudos demonstraram que após tratamento das larvas de *A. aegypti* com linalol, cinamato de metila, e, a mistura de ambos, houve eliminação parcial ou total do conteúdo intestinal pela extrusão da matriz peritrófica resultando em bloqueio da digestão (escurecimento do intestino médio) e absorção de nutrientes (FUJIWARA et al. 2017).

Nesse contexto, a extrusão do conteúdo do intestino da matriz peritrófica sugere um mecanismo de defesa das larvas, inclusive de *Aedes*, as quais eliminam todo o alimento contaminado com substâncias tóxicas ao inseto (ALVES et al. 2010; NUNES et al. 2015, BOTAS et al. 2017). De fato, esse tipo de reação a um agente tóxico é uma evidencia importante relacionada a mortalidade dos insetos vetores, visto que por vezes, nem toda substância tóxica é eliminada do corpo da larva (PROCÓPIO et al. 2015). Adicionalmente, outros fatores são considerados potencialmente responsáveis pela atividade larvicida em mosquitos, como danos ao sifão, que está associado à interrupção respiratória das larvas de mosquitos (SUTININGSIH et al. 2018).

As imagens obtidas por MEV, demonstraram o dano na estrutura dos espiráculos no ápice do sifão (s) nas larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* tratadas com OE das inflorescências de *P. capitarianaum* (Figura 19G e H).

Essa alteração morfológica causa danos a motilidade e sugerem uma contribuição a atividade larvicida observada (OLIVEIRA et al. 2016). Com relação à atividade de OE sobre formas imaturas de mosquitos, estudos anteriores revelaram alterações morfológicas semelhantes ao encontrado no presente trabalho, incluindo danos no sifão respiratório, mas não a extrusão da matriz peritrófica (YU et al. 2015; LEE et al. 2018). O trans-cariofileno é o principal constituinte do OEs de *P. capitarianaum*. Ele é capaz de

exercer diversos efeitos sobre insetos, devido à sua lipofilia que permite a penetração em toda a cutícula, causando irritações e sérios danos às diversas estruturas (RATTAN et al. 2010). O presente estudo, apresenta o primeiro registro dos efeitos larvicida do OE de *P. capitarianum* sobre a morfologia externa das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*.

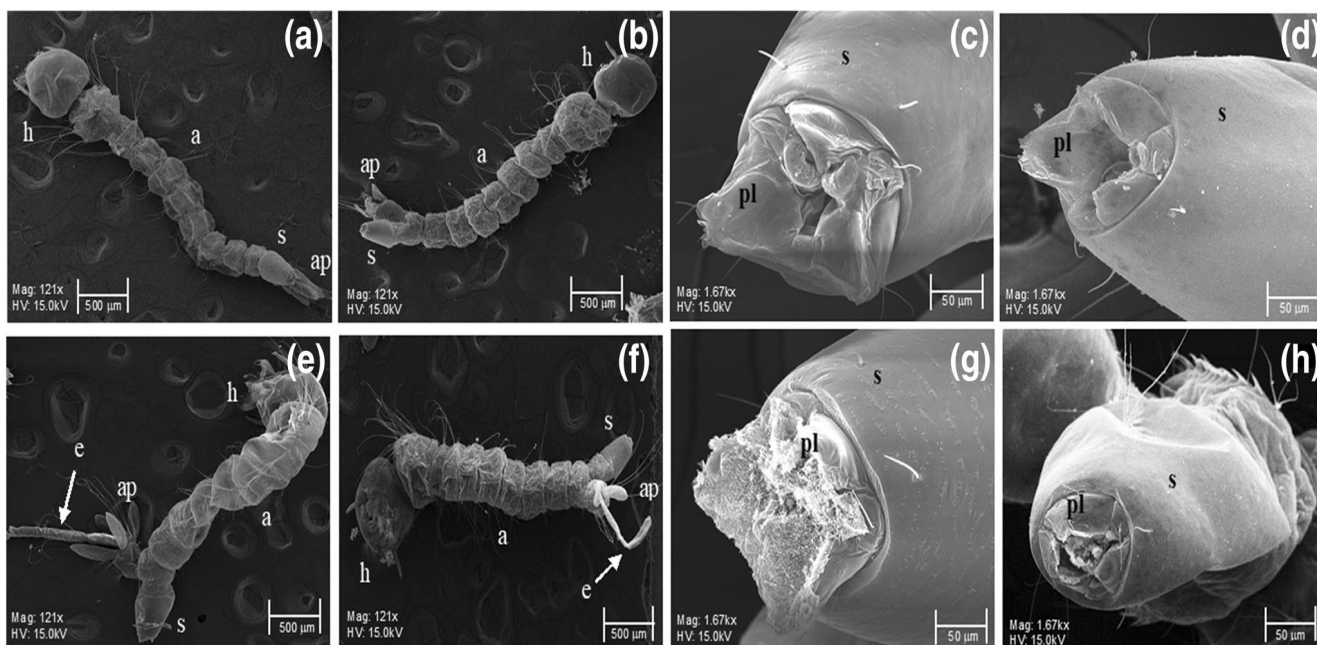


Figura 19. Micrografia eletrônica de varredura das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Larvas de controle de *A. aegypti* (a) e *A. albopictus* (b) sem alterações na cabeça (h), segmentos de abdômen (a) e papilas anais (ap). Larvas de controle de *A. aegypti* (c) e *A. albopictus* (d) mostrando um lobo perispiracular intacto (pl) e sifão (s). Larvas de *A. aegypti* (e) e *A. albopictus* (f) tratadas com OE das inflorescências de *P. capitarianum* apresentando alterações na extrusão da matriz peritrófica (e) (seta). Larvas de *A. aegypti* (g) e *A. albopictus* (h) tratadas com OE das inflorescências de *P. capitarianum* mostrando estruturas danificadas no lobo perispiracular (pl).

5.1.5 Toxicidade dos óleos essenciais sobre *Artemia salina*

Os testes de letalidade com *Artemia salina* são usados como evidência confiável sobre a toxicidade de uma amostra em organismos não-alvo (MAHIAN, et al. 2016). Além disso, este teste serve como monitoramento de substâncias bioativas devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo, o que favorece seu uso em diversos estudos. Segundo Santos e colaboradores (2017), amostras com baixa toxicidade apresentam CL_{50} superior a $500\mu\text{g/mL}$; amostras com toxicidade moderada têm um CL_{50} de 100 a $500\mu\text{g/mL}$, enquanto que aquelas consideradas muito tóxicas têm um CL_{50} abaixo de $100\mu\text{g/mL}$. Nesse contexto, todos os óleos essenciais testados demonstraram baixa toxicidade contra as larvas de *A. salina* (Tabela 5). O OE da inflorescência foi o mais ativo testado no presente trabalho, com CL_{50} de $465.30\mu\text{g/mL}$ contra larvas de *A. salina* após 24 horas de exposição comparados os demais óleos testados. O óleo essencial das folhas exibiu CL_{50} de $583.26\mu\text{g/mL}$ e o óleo essencial de galhos apresentou CL_{50} de $542.23\mu\text{g/mL}$.

Tabela 5. Atividade tóxica dos óleos essenciais de *Piper capitarianum* em *Artemia salina* após 24 h de exposição.

Óleos essenciais	$CL_{50} \pm DP$	IC 95% (LCL – UCL)	Slope $\pm DP$	X^2
Folhas	583.26 ± 0.3^a	435.78 – 680.77	0.22 ± 0.1	1.31
Galhos	542.23 ± 0.4^a	415.01 – 668.53	0.34 ± 0.1	1.35
Inflores.*	465.30 ± 0.6^b	380.56 – 574.51	0.52 ± 0.1	1.49
Lapachol	30.45 ± 0.4^c	26.98 – 48.97	1.51 ± 0.1	1.12

CL_{50} : concentração letal para 50% das larvas; DP : desvio padrão (triplicados); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); $IC\ 95\%$: intervalo de confiança de 95%; LCL :

limite inferior de confiança; **UCL**: limite superior de confiança; **X²**: valor do qui-quadrado; **Controle** = Lapachol; * Óleo com o efeito tóxico mais forte

O ensaio de toxicidade com *A. salina* mostra uma boa correlação com outras atividades biológicas como antitumoral, antibacteriano, antifúngico e inseticida (MEYER et al. 1982; OLIVEIRA et al. 2010; NASCIMENTO et al. 2012). Por outro lado, estudos indicam que os inseticidas naturais são considerados valiosos somente quando são mais letais para o inseto alvo do que para uma espécie não-alvo ou benéfica (SILVA et al. 2017). Até onde sabemos, foram feitas tentativas limitadas para testar a OE em organismos não-alvo de interesse para programas de biocontrole. No entanto, um número crescente de OE e metabólitos relacionados foram relatados como tóxicos para organismos não-alvo apenas em altas concentrações (PAVELA et al. 2015). Por exemplo, um estudo recente mostrou baixa toxicidade de *Bryopsis pennata* em larvas de *A. salina*, com CL₅₀ de 591,82 µg/mL, demonstrando similaridade com nossos resultados (YU et al. 2015). O OE de *Blumea eriantha* também foi considerado não tóxico para os agentes de biocontrole do mosquito, como os predadores naturais *Diplonychus indicus* (CL₅₀ de 628.50µg/mL) e *Anisops bouvieri* (CL₅₀ de 413.97µg/mL) (BENELLI et al. 2017b). Em nosso estudo, o OE da inflorescência de *P. capitarianum* induziu um forte efeito larvicida nos insetos *A. aegypti* e *A. albopictus*, mas com baixo efeito tóxico nos microcrustáceos *A. salina* (como organismo não-alvo).

Os dados atuais suportam o potencial para o desenvolvimento de inseticidas com OE de *P. capitarianum*. Com base em nossos resultados, sugere que o OE de *P. capitarianum* poderia ser considerado uma fonte natural promissora de agentes larvicidas de mosquitos que podem auxiliar os esforços para reduzir as doenças de

insetosvetores . Além disso, pode ser indicado como um potencial biotecnológico para o desenvolvimento de inseticidas acessíveis, renováveis e ecológicos.

5.1.6 Modelagem molecular

Algumas proteínas do vetor do vírus da dengue podem ser utilizadas como alvo para substâncias com atividade inseticida em estudos teóricos. Proteínas não estruturais (NSPs) têm sido utilizadas como alvo promissor em estudos de docking, uma vez que são importantes na replicação viral do vírus da dengue (BALASUBRAMANI et al. 2018). Tradicionalmente, a proteína transportadora de esterol (SCP) tem sido usada como um alvo na modelagem de docking sendo um alvo de inibição reconhecido em várias espécies de mosquitos (LARSON et al. 2008; KUMAR et al. 2010; RADEK et al. 2010; PENG et al. 2012; PERERA & WIJERATHNA 2019). Por esse motivo, neste estudo, optamos por trabalhar com a proteína AeSCP-2 (*Aedes aegypti* esterol carreadora proteína-2), obtida no Protein Data Bank (DYER et al. 2003). Esta proteína é responsável pela transporte intracelular de colesterol em insetos, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

Os insetos dependem de fontes exógenas de colesterol para atuar na biossíntese de esteroides e na manutenção de suas reservas de energia e metabolismo (ATELA et al. 2012). A proteína alvo, junto com o ligante de ácido palmítico, está incluída na estrutura original em estudo. O valor RMSD obtido para a sobreposição das estruturas foi 1,04 RMSD. Valores até 2 são aceitáveis para um protocolo de docking e, portanto, geram confiabilidade nas coordenadas da caixa de grade (KIRCHMAIR et al. 2008). Vale ressaltar que o ácido palmítico, o ligante original, não atua como inibidor da proteína AeSCP-2, mas serve para avaliar moléculas que competem pelo sítio de ligação da proteína (ZDOBNOV et al. 2002). A análise da proteína com o ligante original revelou

uma energia de ligação de re-docking (do ácido palmítico no local ativo da proteína) de -8,05 kcal / mol. O protocolo de validação obteve 1,04 RMSD para re-docking, que valida as dimensões utilizadas na caixa de grade utilizada neste trabalho, caracteriza o sítio de ligação da proteína AeSCP-2 com alto grau de confiabilidade (Figura 20).

O trans-cariofileno e o humuleno apresentaram bons resultados para a energia de ligação livre quando comparados ao ácido palmítico e apresentaram boa afinidade com o sítio da proteína; entretanto, é mais baixo do que o original. Humuleno, com $\Delta G_{\text{bind}} = -6,28$ kcal / mol, tem um valor de afinidade menor do que o trans-cariofileno, indicando menor interação com a enzima. Essas duas moléculas apresentaram valores de energia de ligação (ΔG_{bind}) inferiores a -6 kcal / mol, o que sugere que os óleos que contêm uma alta concentração desses constituintes têm boa atividade. A Figura 20 ilustra as interações de cada uma das moléculas com a proteína AeSCP-2. A análise da possibilidade de ligação mostrou que o trans-cariofileno tem mais interações com a proteína AeSCP-2 (Figura 20a, b) do que o humuleno. Isso é esperado, uma vez que a energia de interação da proteína com este ligante foi menor (-7,7 kcal / mol). O cariofileno mostrou duas vezes mais interações com aminoácidos do que o humuleno, três das quais são comuns a ambos (Leu109, Ile12 e Leu102). Nenhuma das interações observadas em qualquer estrutura é característica de uma ligação de hidrogênio. As interações são predominantemente do tipo alquil-alquil, com exceção da interação Phe105, que apresenta uma interação do tipo π -alquil razoável e sugere que este resíduo de aminoácido é o principal responsável pela diferença na afinidade inibitória.

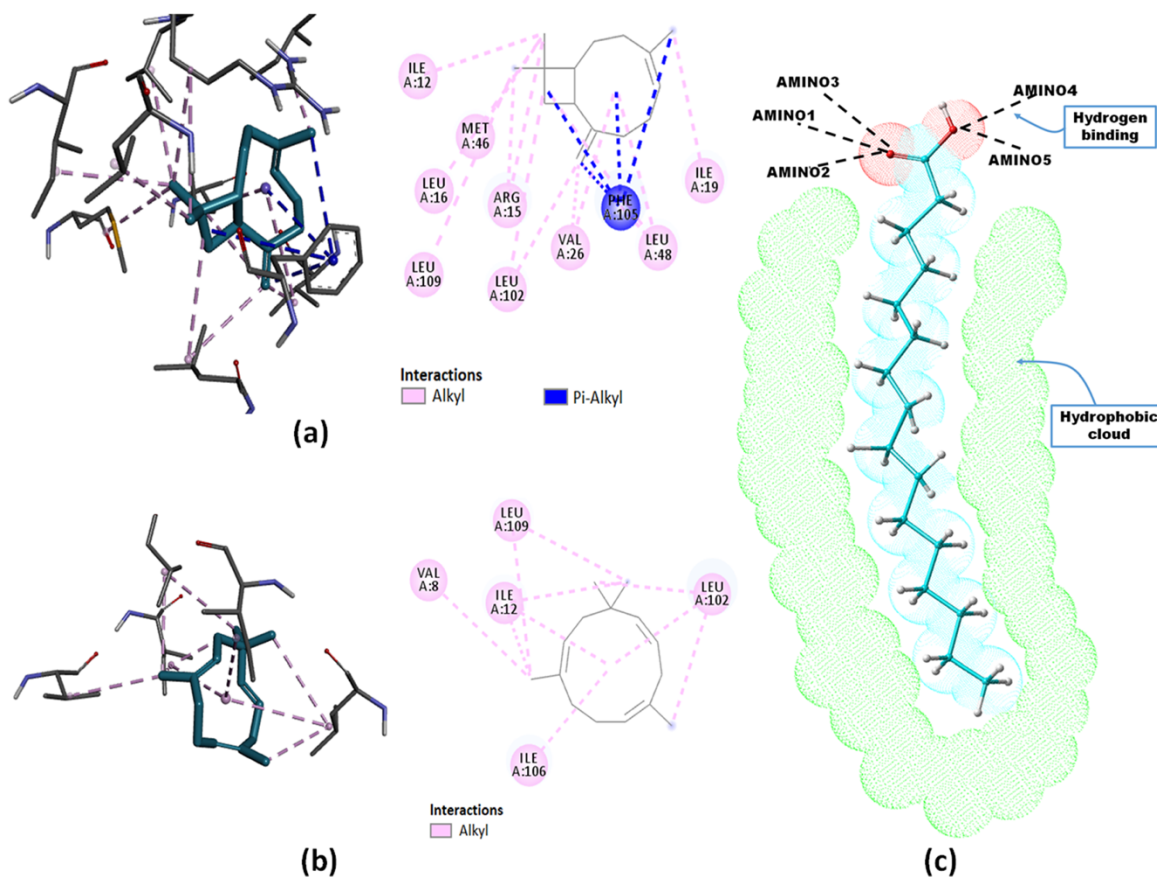


Figura 20. Interações entre as moléculas e AeSPC-2. (a) Cariofileno. (b) Humuleno. (c) Diagrama da interação do ácido palmítico com a proteína AeSPC-2 (adaptado de DYER et al. 2003)

Andrade Ochoa et al. (2018) encontraram um resultado semelhante ao modelar a sequência de AeSCP-2 de *Culex quinquefasciatus* com monoterpenos e monoterpenóides, e concluíram que atividades larvicidas maiores são aquelas capazes de interagir com o resíduo Phe105. Quando essas duas estruturas são comparadas com o ligante original, observa-se que a interação π -alquil com o resíduo Phe105 também está presente no ácido palmítico, além da presença de ligações de hidrogênio, o que parece ter um papel importante na ancoragem do molécula para o sítio ativo.

Nesse contexto, Dyer et al. (2003) mostraram que a cadeia de ácido graxo acil se estende da superfície da proteína até o fundo da bolsa do sítio de ligação (Figura 20c), que é cercada por resíduos hidrofóbicos, via interação de Van der Waals, como Leu16, Val26, Ser108, Leu48, Phe105, Met46, Ile106, Leu102, Ile12, Ile99, Met71, Leu64, Phe32, Met90, Ile74 e Met66. Essas interações estabilizam o ligante no local da enzima ativa de uma maneira forte. Assim, óleos essenciais contendo constituintes com uma grande cadeia acila podem apresentar atividade quando comparados com estruturas com cadeias curtas. Os resíduos de aminoácidos 4 e 5 (Figura 20c) mostraram boa interação por meio da ligação de hidrogênio com Arg24 e Gln25, enquanto os resíduos 1, 2 e 3 mostraram fracas interações de Van der Waals com resíduos Arg15 e Asp20, que estão ausentes em ambos os cariofileno e humuleno. O cariofileno mostra 10 interações com terminações de aminoácidos, enquanto o ácido palmítico mostra 16 interações. Sete interações de cariofileno são iguais às do ácido palmítico, com exceção dos resíduos Arg15, Iso19 e Leu109, o que pode indicar a diferença na afinidade inibitória entre as duas estruturas. As duas moléculas estudadas não apresentam interações por meio da ligação de hidrogênio, o que enfraquece a ideia de que as ligações de hidrogênio são responsáveis pela atividade enzimática. Como o cariofileno e o humuleno não competem exatamente pelos mesmos resíduos de aminoácidos (apenas dois resíduos de aminoácidos interagem com o humuleno e o cariofileno), eles podem ter um efeito sinérgico se formulados juntos, com o cariofileno em uma proporção mais alta na mistura. Isso não seria possível se ambas as substâncias interagissem com os mesmos resíduos.

A interação do cariofileno e humuleno com a água também foi estudada, com o objetivo de analisar a capacidade de solvatação e estabilidade em meio aquoso. O conhecimento da energia livre de solvatação (ou energia livre de hidratação, se o

solvente considerado for água), ΔG_{hyd} , é necessário para determinar a constante de equilíbrio para a associação proteína-ligante (ZOU et al. 1999; LIPINSKI et al. 1997), Em termos concretos, ΔG_{hyd} indica, por meio de seu sinal e magnitude, quão solúvel será a molécula de interesse (uma vez inserida em um meio aquoso na presença de outras moléculas) (negativo) ou se terá potencial para se ligar a outras moléculas (sinal positivo) (Figura 21).

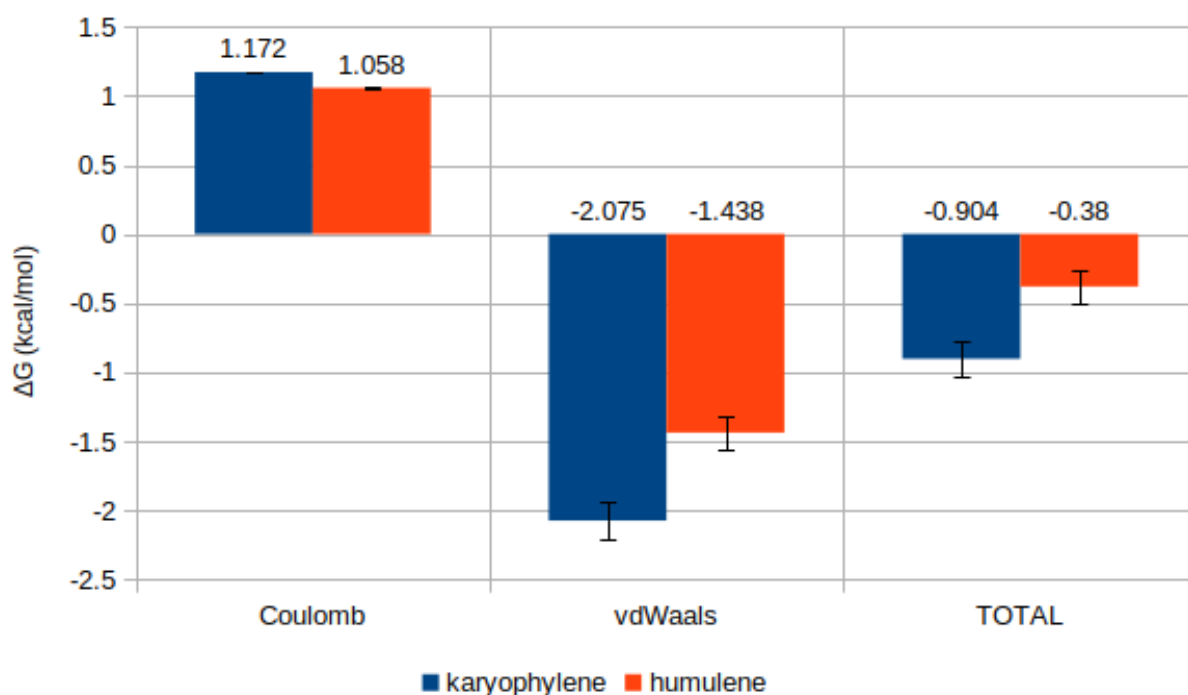


Figura 21. Energia livre de hidratação total (ΔG_{hyd}) das moléculas cariofileno e humuleno (em kcal/mol), com as respectivas contribuições das interações de Coulomb e van der Waals.

Pode-se observar que os solutos, cariofileno e humuleno, apresentaram valores totais negativos de ΔG_{hyd} , ou seja, são solúveis em água, principalmente cariofileno, com valor de - 0,904 kcal/mol em contraste com -0,38kcal do humuleno. As contribuições parciais de ΔG_{hyd} para a solvatação mostram que são devidas principalmente às forças de Van der Waals, que têm maior magnitude na molécula de

trans-cariofileno, com - 2.075 kcal/mol contra -1.438 kcal/mol de humuleno. Por outro lado, as contribuições coulômbicas foram positivas para ambas as estruturas, ou seja, a interação com o meio aquoso não ocorre por meio de interações mais fortes, como ligações iônicas ou ligações de hidrogênio. Esses resultados estão de acordo com as interações entre as moléculas e o sítio ativo da enzima, que não apresentaram interações via pontes de hidrogênio, apenas ligações hidrofóbicas fracas, como a de Van der Waals

5.1.7 Atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e enzimática (AChE)

Os resultados das atividades antioxidantes dos OE de *P. capitarianum* sobre radicais DPPH e ABTS estão descritos na Tabela 6. Os óleos essenciais de *P. capitarianum* apresentaram baixa atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH e ABTS devido aos valores de IC₅₀ serem distantes dos valores obtidos pelos padrões antioxidantes Quercetina (20.89µg/mL) e Trolox (12.95µg/mL). Segundo Silva et al, (2017) relataram que os óleos essenciais das espécies são considerados como bons agentes antioxidantes os que apresentam valores de IC₅₀ inferiores a 100µg/mL.

Dessa forma, foi observado no OE da inflorescência a maior atividade com IC₅₀ de 189.56µg/mL e 159.50µg/mL respectivamente para o teste de DPPH e ABTS comparados aos demais óleos testados. Estes resultados podem ser atribuídos as composições químicas presente nos óleos os quais predominam hidrocarbonetos sesquiterpênicos, classe de compostos que exibem baixa a capacidade sequestradora de radicais livres (SILVA et al. 2018).

Em outras espécies, tais como *P. aleyreanum* *P. anonifolium* *P. hispidum*, foram identificados os compostos E-cariofileno, selineno e mirceno como constituintes majoritários dos óleos e mostram baixa atividade antioxidante, demonstrando similaridade com os resultados encontrados em nosso trabalho (SILVA et al. 2014). A

mesma ação também foi observada no trabalho realizado por Silva *et al.* (2017), mostrando que atividade antioxidante tem baixa relação com os hidrocarbonetos sesquiterpênicos presentes nos óleos de espécies do gênero *Piper* coletadas na região neotropical. Por outro lado, outros autores relatam que os compostos fenólicos possuem habilidade de sequestrar radicais livres tornando prejudiciais à saúde humana, o que explica a baixa atividade antioxidante apresentada em nossos resultados (MAR *et al.* 2018).

O papel na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) é descrito para um número considerável de inseticidas, como organofosforados e carbamatos (GUPTA *et al.* 2019), além de vários óleos essenciais. Por esse motivo, o ensaio enzimático para inibição da AChE foi utilizado para avaliar o mecanismo de ação dos OEs de *P. capitaranum* para justificar sua atividade inseticida em vetores de insetos do ambiente amazônico.

Os resultados (Tabela 6) indicam que os óleos essenciais testados têm uma alta atividade inibitória da AChE, sendo o OE da inflorescência a mais ativa com um valor de IC₅₀ de 14.25µg/mL. Nas mesmas condições, a galantamina (controle positivo) apresentou atividade inibitória da AChE com um IC₅₀ de 10.25µg/mL. Xiang e colaboradores (2017) avaliaram 16 espécies de *Piper* e observaram importante atividade de inativação da AChE nos óleos essenciais de quatro espécies: *P. austrosinense*, *P. puberulum*, *P. flaviflorum*, *P. betle* e *P. hispidinervium*, que apresentaram forte atividade inibitória da AChE, com valores de IC₅₀ na faixa de 1.51 a 13.9µg/mL. Os óleos essenciais de *P. hispidum* e *P. anonifolium*, compostos principalmente de sesquiterpenos (selineno, trans-cariofileno e α-humuleno), inibiram a enzima acetilcolinesterase com IC₅₀ de 0.012 µg/mL, eram cerca de 100 vezes mais ativos que o fisostigmina de controle positivo (IC₅₀ = 1.0µg/mL) (SILVA, *et al.* 2018). Silva *et al.*

(2016) também demonstraram na bioautografia a atividade do óleo essencial de *P. hispidimervium* ($IC_{50} = 1.51 \pm 0.05\mu\text{g/mL}$) e por seu principal constituinte ativo, asaricina ($IC_{50} = 0.44 \pm 0.02\mu\text{g/mL}$). A asaricina havia sido previamente isolada e identificada a partir do extrato de hexano das raízes de *P. sarmentosum* e investigada quanto à atividade de inibição da AChE, que exibia um valor de IC_{50} de $0.73\mu\text{g/mL}$ (HEMATPOOR et al. 2017). Além disso, a afinidade de ligação da asaricina às três bolsas de ligação da AChE foi explorada e comparada, mostrando alta afinidade de ligação na bolsa aniônica e, assim, contribuindo para explicar o mecanismo de ação dos fármacos que agem dessa maneira

A literatura mostra alguns resultados da atividade da AChE de óleos essenciais de outras espécies de *Piper*, por exemplo, a análise bioautográfica de óleos essenciais de *P. anonifolium*, *P. hispidum* e *P. aleyreanum* apresentou resultados com o valor limite de detecção de $0.01 \mu\text{g/mL}$ (SILVA, et al. 2014). Os estudos realizados por Karak et al. (2015), indicaram uma atividade anti-AChE promissora para o óleo essencial de *P. betle* de diferentes locais de coleta, com valores de IC_{50} de 0.10 a $0.47\mu\text{g/mL}$. A propriedade inibidora da AChE também foi relatada para vários sesquiterpenos testados isoladamente, como trans-cariofileno ($IC_{50} = 20\mu\text{g/mL}$) e α -humuleno ($IC_{50} = 24\mu\text{g/mL}$) (BORRERO et al. 2019). Para o monoterpene oxigenado linalol, foi encontrada uma atividade inibidora forte da AChE, com $IC_{50} = 28\mu\text{g/mL}$ e sugeriu que a posição do grupo hidroxila em sua estrutura molecular teve um papel importante no efeito inibitório da AChE (GNANKINÉ et al. 2017).

Tabela 6. Atividade antioxidante e de inibição da AChE observada para os óleos essenciais obtidos de *P. capitarianum*.

Óleos essenciais	DPPH	ABTS	AChE
	IC ₅₀ ± DP	IC ₅₀ ± DP	IC ₅₀ ± DP
Folhas	293.73 ± 0.5 ^a	243.25 ± 0.4 ^b	18.10 ± 0.3 ^d
Galhos	272.78 ± 0.4 ^a	247.74 ± 0.3 ^b	16.53 ± 0.3 ^d
* Inflorescência	189.56 ± 0.5 ^c	159.50 ± 0.4 ^c	14.25 ± 0.3 ^d
Quercetina	20.89 ± 0.3	-	-
Trolox	-	12.95 ± 0.1	-
Galantamina	-	-	10.25 ± 0.1

IC₅₀: Concentração inibitória 50%; **DP:** Desvio padrão (médias de triplicata); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); **Controles:** Quercetina, Trolox e Galantamina
*Óleo com o efeito antioxidante e enzimático mais forte

Neste contexto, este é o primeiro relato sobre a atividade inibidora da AChE dos OEs de *P. capitarianum*. Com esses resultados, podemos sugerir que a mortalidade de vetores de insetos ocorre pelo mesmo mecanismo de toxicidade de inseticidas, como os compostos organofosfato e carbamato, que se baseia na inibição da acetilcolinesterase (GNANKINÉ et al. 2017). Nos insetos, a AChE hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina para finalizar a excitação neuronal na membrana pós-sináptica, causando paralisia e morte do invertebrado (HEMATPOOR et al. 2017). Outros autores relatam que a atividade também pode ocorrer devido ao modo de ação neurotóxico, que afeta o transporte de íons e AChE, e a interrupção da octopamina, que desempenha um papel

fundamental como neurotransmissor, neurohormônio e neuromodulador em sistemas de invertebrados (BENELLI et al. 2018d).

5.1.8 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *P. capitarianum*

A atividade antimicrobiana dos OEs de *P. capitarianum* sobre bactérias patogênicas constam na Tabela 7. Os resultados mostram que os óleos testados apresentaram atividade antimicrobiana com halo de inibição torno de 2 á 5 mm diâmetro sobre as bactérias patogênicas. A literatura relata que os OEs são considerados como bons agentes antimicrobianos os que apresentam halos de inibição superiores 3 mm diâmetro (PRAKASH et al. 2018). No entanto, nossos resultados mostraram que o maior nível de inibição foi observado no OE da inflorescência com halo em torno de 3 á 5 para as bactérias *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli* respectivamente. A bactéria *P. aeruginosa* mostrou resistência devido à ausência de halo para todos os OEs testados. No controle negativo (DMSO) não houve formação de halo e no controle positivo (amoxicilina) mostrou a presença de halo em torno de 8 a 6mm para as cepas microbianas. Este é o primeiro trabalho na literatura que evidencia a atividade antimicrobiana dos óleos de *Piper capitarianum*.

Em relação aos componentes majoritário trans-cariofileno e humuleno, presentes nos OEs de *P. capitarianum* foram avaliados quanto sua atividade antimicrobiano. Os resultados mostram que o trans-cariofileno testado isoladamente foi mais ativo com halo de inibição de 5mm e 6mm para as bactérias gram positivas, de 4mm e 1mm para as gram negativas. As duas substancias testadas em conjunto, na mesma proporção detectada nos OEs, mostraram halo de 1mm para as cepas microbianas testadas, que evidenciam que não houve qualquer efeito.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana dos óleos de *P. capitarianum* sobre bactérias patogênicas.

Amostras	Halo de inibição (mm)			
	Microrganismos			
	Gram Positiva		Gram negativa	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
OEF	2 ± 0.3 ^a	3 ± 0.2 ^a	1 ± 0.1 ^a	-
OEG	2 ± 0.3 ^a	3 ± 0.2 ^a	2 ± 0.1 ^a	-
OEI	3 ± 0.3 ^a	5 ± 0.2 ^a	4 ± 0.1 ^a	-
* TC	5 ± 0.3 ^a	6 ± 0.2 ^a	4 ± 0.1 ^a	1 ± 0.1 ^a
HU	2 ± 0.3 ^a	3 ± 0.2 ^a	1 ± 0.1 ^a	-
TH	1 ± 0.3 ^a	1 ± 0.2 ^a	-	-
DMSO	-	-	-	-
Amoxicilina	8 ± 0.3 ^b	6 ± 0.3 ^a	5 ± 0.2 ^a	-

DP: Desvio padrão (médias de triplicata); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); **Controle** = DMSO e Amoxicilina; (-) Ausência de halo. *Amostra com o efeito antimicrobiano mais forte

OEF- Óleo essencial das folhas; **OEG-** Óleo essencial dos galhos; **OEI-** Óleo essencial das inflorescência; **TC-** Trans-cariofileno; **HU-** Humuleno; **TH-** Trans-cariofileno + Humuleno

A possível razão para o efeito antibacteriano dos OEs de *P. capitarianum* pode ser atribuída a presença de compostos bioativos (trans-cariofileno, humuleno, linalol e nerolidol) que são descritos na literatura por possuírem atividade antimicrobiana (MAJOLO et al. 2019). Estes são encontrados em outras espécies do gênero *Piper* da

região amazônica e capazes de romper a parede celular, inibir a capacidade respiratória e perturbar a homeostase de micróbios, portanto, a chance de desenvolvimento de resistência é reduzida (DANIEL et al. 2019).

5.2 Nanoemulsões contendo óleos essenciais de *P. capitarianum*

As análises macroscópicas, tamanho, polidispersão (PDI), pH e equilíbrio hidrofílico e lipofílico (EHL) das nanoemulsões desenvolvidas com misturas dos tensoativos Tween e Span constam na Tabela 8. Os resultados mostraram que em todas as nanoemulsões apresentaram aspecto leitoso, homogêneo, sem precipitação (Figura 22) e com pH em torno de 5-6 (moderadamente ácido). Por outro lado, as nanoemulsões apresentaram tamanho de 13-28 nm de diâmetro com baixa polidispersão (0.3-0.5) e o equilíbrio EHL de 10.5. Assim, todas as nanoemulsões caracterizadas apresentaram uma boa estabilidade (48 horas) em relação aos parâmetros analisados, de acordo com pesquisas anteriores, as nanoemulsões com menor tamanho de partícula apresentam melhores atividades inseticidas como ovicida, larvicida e adulticida (SILVA et al. 2017; OSANLOO et al. 2018). Além disso, valores PDI menores são frequentemente preferidos para melhorar a estabilidade físico-química (OSANLOO et al. 2017) e a capacidade de carga (SILVA et al. 2018).

Tabela 8. Caracterização das nanoemulsões.

Amostras	Surfactantes	Tamanho (nM) \pm DP	PDI	pH	EHL
Nano OEI	Tween/Span	18.42 \pm 0.5	0.38	5	10.5
Nano TC	Tween/Span	13.40 \pm 0.4	0.20	6	10.5
Nano HU	Tween/Span	14.30 \pm 0.4	0.18	6	10.5
Nano T+H	Tween/Span	28.26 \pm 0.5	0.53	5	10.5

NanoOEI- Nanoemulsão do óleo da inflorescência ; **NanoTC**- Nanoemulsão do trans-cariofileno;

NanoHU- Nanoemulsão do humuleno; **NanoTH**- Nanoemulsão do trans-cariofileno + humuleno;

EHL- Equilíbrio hidrófilo-lipófilo



Figura 22. Nanoemulsão contendo óleo formulado com os tensoativos Tween80 e Span

A literatura afirma que os sistemas estáveis possuem aparência leitosa com ausência de precipitação e homogêneo (OLIVEIRA et al. 2017). Isto é devido aos surfactantes desenvolvem um papel principal na formação de nanoemulsão, uma vez que reduzem a tensão interfacial e possibilitam a formação de um filme em torno de gotículas, permitindo a estabilidade física do sistema (OLIVEIRA et al. 2017). Eles podem ser classificados de acordo com a escala EHL (balanço hidrofílico-lipofílico), na

qual surfactantes mais hidrofílicos (EHL= 8-16) têm valores mais altos quando comparados aos surfactantes lipofílicos (EHL= 2-6), que possuem valores mais baixos. No entanto, os valores mais altos de HLB permitem a formação de gotículas de óleo dispersas em meios aquosos (emulsões de óleo em água) que são especialmente importantes para agentes larvicidas contra vetores que se desenvolvem em meios aquáticos (OLIVEIRA et al. 2017).

Dessa forma, os aspectos macroscópicos observados são importantes, pois pode influenciar nas propriedades físico-químicas das nanoemulsão, além das atividades biológicas dos ativos, sendo assim necessários avaliações microscópicas como potencial zeta confirmar a estabilidade das nanoemulsões (RODRIGUES et al. 2018). Nesse contexto, o presente trabalho fornece pela primeira vez informações sobre a formação e avaliação biológica de nanoemulsão a base do óleo essencial de *P. capitarianum*.

5.2.1 Atividade larvicida das nanoemulsões

A atividade larvicida das 4 nanoemulsões (Twen/Span) preparadas com óleo da inflorescência de *P. capitarianum* (NanoOEI), trans-cariofileno (NanoTCA), humuleno (NanoHM) e trans-cariofileno e humuleno (NanoT+H) sobre as espécies testadas constam na Tabela 9. Os resultados mostram que as nanoemulsões foram capazes de aumentar significativamente ($p < 0,05$) a atividade larvicida dessas substâncias em todos os sistemas testados quando comparados aos OEs.

A nanoemulsão contendo trans-cariofileno (NanoTCA), apresentou a melhor atividade com CL₅₀ (47.32µg/mL e 40.56µg/mL) e CL₉₀ (88.54µg/mL e 76.20µg/mL), seguido da nanoemulsão (NanoHM) com CL₅₀ (55.45µg/mL e 46.86µg/mL) e da CL₉₀ (90.43µg/mL e 84.43µg/mL) para as larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* após 24 horas exposição.

Em relação a nanoemulsão (NanoT+H) nenhum efeito sinérgico foi observado quando testados juntos, resultando em um efeito antagonista o que explica sua baixa atividade devido dos valores de CL_{50} e CL_{90} serem significativamente ($p < 0,05$) maiores que os demais testados. A nanoemulsão também melhorou a atividade do óleo da inflorescência (NanoOEI), em relação aos resultados dos óleos essenciais de *P. capitarianum*, onde exibiu a CL_{50} de (56.15 μ g/mL e 52.74 μ g/mL) e CL_{90} (104.31 μ g/mL e 100.33 μ g/mL) respectivamente, sobre espécies de mosquito testados. Essa melhoria deve ser atribuída ao tamanho partícula reduzida e sua natureza hidrofílica e lipofílica que favorece a uma elevada superfície de contato e penetração dos ativos á células alvos (DUARTE et al. 2015). A literaturarelata a relevância de nanomulsões à base de óleo essencial como agentes larvicidas promissores contra vetores de doenças tropicais (BENELLI et al. 2018e; CAMPOS et al. 2020). Por exemplo, nanoemulsão preparada com OE de frutos de *P. emarginatus* na formulação polissorbato 80, induziu atividade com CL_{50} de 43.3 μ g/mL e 36.6 μ g/mL, nas larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* após 24h (OLIVEIRA et al. 2017). Em outra nanoemulsão contendo OE das folhas de *Ocimum sanctum* mostrou potencial larvicida com CL_{50} de 50 μ g/mL e 65 μ g/mL para *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (RAMAR et al. 2017). Por outro lado, nanoemulsão na formulação tween 80, preparada com OE das folhas de *Vitex negundo*, mostrou atividade com CL_{50} de 70.3 μ g/mL sobre as larvas de *Aedes aegypti* (BALASUBRAMAN et al. 2017).

Nesse contexto, as nanoemulsões baseadas em produtos naturais preparadas com surfactantes biodegradáveis aparecem como uma alternativa promissora devido as vantagens dos sistemas coloidais como aprimoramento da estabilidade químico-física de compostos que podem ser facilmente volatilizados ou degradados em condições

ambientais, melhor disponibilidade de água de compostos lipofílicos, baixo custo e pode ser liberado de forma controlada (PINTO et al. 2017; SILVA et al. 2018).

Dessa forma, nosso trabalho mostra que o óleo essencial da inflorescência foi promissor e uso da nanotecnologia melhorou significativamente sua atividade, demonstrando potencial para ser utilizado como método alternativo no controle destes vetores da dengue, chikungunya e zika no ambiente amazônico.

Tabela 9. Atividade larvicida das nanoemulsões do óleo da inflorescência (OEI), transcariofileno (TCA), humuleno (HM) contra *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em laboratório.

Amostras	Mosquitos Testados	CL ₅₀ ± DP	IC 95% (LCL – UCL)	CL ₉₀ ± DP	IC 95% (LCL – UCL)	X ²
NanoOEI	<i>A. aegypti</i>	56.15± 0.9 ^a	45.45 – 63.32	104.31± 0.9 ^d	96.56 – 152.35	0.57
	<i>A. albopictus</i>	52.74 ± 0.8 ^a	44.23 – 72.27	100.33 ± 0.8 ^d	91.39 – 138.67	0.60
* NanoTC	<i>A. aegypti</i>	47.32± 0.3 ^b	38.54 – 61.33	88.54± 0.3 ^d	74.19 – 100.35	0.50
	<i>A. albopictus</i>	40.56± 0.6 ^b	32.88 – 62.25	76.20± 0.6 ^c	55.88 – 91.48	0.53
NanoHU	<i>A. aegypti</i>	55.45± 0.4 ^a	37.18 – 78.53	90.43± 0.4 ^d	81.19 – 120.17	0.55
	<i>A. albopictus</i>	46.86± 0.5 ^b	30.19 – 63.67	84.43± 0.5 ^c	63.67– 102.17	0.51
NanoTH	<i>A. aegypti</i>	80.73± 0.3 ^c	71.22 – 100.27	101.34± 0.3 ^d	95.54 – 123.67	0.54
	<i>A. albopictus</i>	77.53± 0.5 ^c	40.33 – 81.45	90.32± 0.5 ^d	80.23 – 112.31	0.58

CL₅₀: concentração letal para 50% das larvas; CL₉₀: concentração letal para 90% das larvas; DP: desvio padrão (triplicados); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (P <0,05);

IC 95%: intervalo de confiança de 95%; LCL: limite inferior de confiança; UCL: limite superior de confiança;

X²: valor do qui-quadrado; Controle= Temefos, 0,12 µg/mL. * Nanoemulsão com o efeito larvicida mais forte.

NanoOEI- Nanoemulsão de Tween80/Span do óleo da inflorescência ; **NanoTCA**- Nanoemulsão de Tween80/Span do trans-cariofileno; **NanoHM**- Nanoemulsão de Tween80/Span do humuleno; **NanoT+H**- Nanoemulsão de Tween80/Span do trans-cariofileno + humuleno.

5.2.2 Atividade antimicrobiana das nanoemulsões

A atividade antimicrobiana das nanoemulsões preparadas com OE da inflorescência de *P. capitarianum* (NanoOEI), com compostos trans-cariofileno (NanoTC), humuleno (NanoHU) e a mistura de trans-cariofileno + humuleno (NanoTH) sobre bactérias patogênicas constam Tabela 10.

Como esperado, todas as nanoemulsões foram capazes de aumentar o halo de inibição, demonstrando elevada atividade antimicrobiana dessas substâncias devido os valores de halos inibição serem semelhantes aos obtidos pela amoxicilina (controle positivo) em todos os sistemas testados. No entanto, o maior nível de inibição foi observado na nanoemulsão (NanoTC) com os seguintes halos 11mm, 12mm, 9mm e 3mm para as bactérias *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* respectivamente, seguido da na nanoemulsão (NanoOEI) que mostrou halos em torno de 5 a 9mm. Os menores níveis de inibição foram encontrados na nanoemulsão (NanoHU) que atingiu halos em torno de 3 a 5mm, seguido da nanoemulsão (NanoTH) que exibiu halos de em torno 1 a 3mm respectivamente, sobre cepas microbianas testados. No controle da nanoemulsão sem adição da amostra (NanoCtr) não houve formação de halo de inibição.

Tabela 10. Atividade antimicrobiana das nanoemulsões sobre bactérias patogênicas

Amostras	Halo de inibição (mm)			
	Microrganismos			
	Gram Positiva		Gram negativa	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
NanoOEI	7 ± 0.3 ^a	9 ± 0.3 ^a	5 ± 0.3 ^a	1 ± 0.1 ^a
* NanoTA	11 ± 0.4 ^b	12 ± 0.4 ^b	9 ± 0.4 ^b	3 ± 0.2 ^a
NanoHU	5 ± 0.3 ^a	5 ± 0.3 ^a	3 ± 0.1 ^a	1 ± 0.1 ^a
NanoTH	3 ± 0.3 ^a	3 ± 0.3 ^a	1 ± 0.1 ^a	1 ± 0.1 ^a
NanoCtr	-	-	-	-
Amoxicilina	8 ± 0.3 ^b	6 ± 0.3 ^a	5 ± 0.2 ^a	-
DMSO	-	-	-	-

DP: Desvio padrão (médias de triplicata); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$). **Controle** = NanoCtr, Amoxicilina DMSO (dimetilsulfóxido); (-) Ausência de halo.

*Amostra com o efeito antimicrobiano mais forte.

NanoOEI- Nanoemulsão do óleo da inflorescência ; **NanoTC-** Nanoemulsão do trans-cariofileno;

NanoHU- Nanoemulsão do humuleno; **NanoTH-** Nanoemulsão do trans-cariofileno + humuleno;

NanoCtr- Nanoemulsão branco (sem adição de amostra).

Estes resultados revelam que a eficácia antimicrobiana da nanoemulsão é influenciada pelo agente emulsionante, pois antes de seu uso como agente transportador, os OEs e seus compostos bioativos (trans-cariofileno e humuleno) mostraram moderada atividade antimicrobiana. Essa melhoria na atividade das nanoemulsões, podem ser explicada quanto tamanho pequeno da partícula (<100nm), pois aumenta superfície de

contato e assim interagem mais eficientemente com a membrana celular devido fusão das gotículas emulsificantes com a bicamada fosfolipídica que promove a morte celular em doses menores (LU et al., 2018). Além disso, os agentes emulsionantes (surfactantes) fazem o escudo entre os óleos essenciais (OEs) e a matriz superficial, e os distribuem em locais específicos como fases ricas em água onde os microrganismos preferencialmente proliferam com maior estabilidade e dispersabilidade (PRAKASH et al. 2018).

Dessa forma, nosso trabalho mostrou que a nanoemulsão contendo os OE da inflorescência de *P. capitarianum* exibiu forte atividade antimicrobiana.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 2 – Extratos de *Piper capitarinaum*

5.3.1 Rendimentos dos extratos de *Piper capitarianum*

O material vegetal das partes coletadas (folhas, galhos e inflorescência) foi selecionado para a investigação fitoquímica e atividade biológica, sendo que suas massas com seus respectivos pesos estão descritas na Tabela 11. Durante o processamento das partes coletadas, observou-se que nas folhas (1,210g), obteve-se maior quantidade de material triturado, seguido dos galhos (730g) e da inflorescência (280g), material suficiente para preparação dos extratos deste trabalho.

Tabela 11. Descrição e quantificação das partes coletadas de *Piper capitarianum*

Partes Coletadas	Massa Verde (g)	Massa Seca (g)	Massa Perdida (%)	Massa Triturada (g)
Folhas	4.720	1.280	54	1.210
Galhos	3.310	846	49	730
Inflorescência	1.507	400	50	280

Após o processo de extração com material triturado e retirado do solvente sob vácuo, foi feita a determinação dos rendimentos dos extratos que estão descritos na Tabela 12. Os extratos metanol apresentaram maiores rendimentos das partes coletadas (folhas, galhos e inflorescência) seguidos dos extratos diclorometano e hexano. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Souza *et al.* (2007), que obtiveram o mesmo rendimento nos extratos metanol das folhas (17%) com mesma quantidade de material vegetal (1.200g) dos espécimes de *Piper aduncum* coletadas em várias localidades da região amazônica. Outros autores como Choochote *et al.* (2006), também encontraram valores aproximados de rendimentos nos extratos etanólicos (10,5%) e metanólicos das

folhas (11%) e galhos (13,5%) das espécies *Piper longum*, *Piper ribesoides* e *Piper sarmentosum* coletadas em duas localidades na Tailândia.

Tabela 12. Rendimentos dos extratos obtidos das partes coletadas de *P. capitarianum*

Partes Coletadas	Rendimento (%)		
	HEX	DCM	MEOH
Folhas	9,5	11,6	17,5
Galhos	6,8	8,1	12,5
Inflorescência	5,0	6,5	9,5

HEX: Extrato hexano; **DCM:** Extrato diclorometano; **MEOH:** Extrato metanol.

5.3.2 Análise dos extratos por cromatográfica em camada delgada -CCD

Os extratos de *P. capitarianum* foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatoplasmas de sílica normal (SiO₂) com suporte de alumínio como fase estacionária e na fase móvel a mistura dos eluentes hexano e acetato de etila na proporção 7:2 (Figura 23). Os reveladores químicos utilizados nas placas de CCD para a revelação das classes de substâncias presentes nos extratos de acordo com sua coloração sendo visualizadas na luz normal e UV (365 e 254 nm) estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Reveladores químicos e classes de químicas identificadas nos extratos de *Piper capitarianum* em placas de CCD.

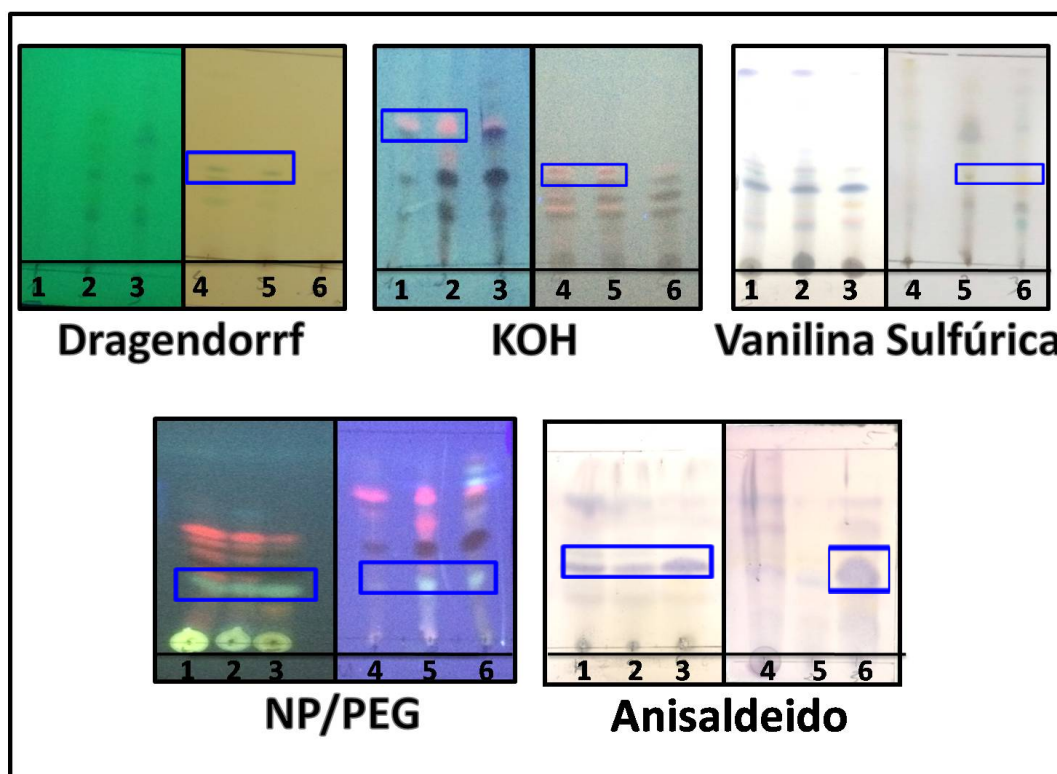
Reagente revelador	Classes Químicas	Coloração
Dragendorff	Alcaloides	Laranja ou Marron
KOH	Antraquinonas	Vermelho
	Cumarinas	Azul (UV - 365 mn)
Vanilina Sulfúrica	Saponinas	Vermelho ou Roxo
	Esteróides	Amarela
NP/ PEG	Flavonóides	Verde ou Laranja
Anisaldeido	Terpenos	Lilás ou Rosa

Os resultados mostraram que na placa revelada com Dragendorff, é possível notar que nos extratos EMF (4) e EMG (5), existem uma intensa banda marrom, com o mesmo RF, indicando a presença de alcaloides, sendo que o revelador é para essa classe química, que reage quimicamente com o grupo amina presente na sua constituição. Portanto, os demais extratos avaliados não apresentaram compostos alcaloídicos em sua constituição química.

Analisando as placas reveladas com KOH, observam-se uma banda de coloração avermelhada intensa nos extratos EHF (1), EHG (2), EMF (3) e EMG (4), devido a presença de grupos cromóforos (ligações duplas), possivelmente da classe antraquinonas, onde os demais não apresentam essa característica em sua constituição. Já nas placas reveladas com vanilina sulfúrica, foi possível identificar a classe química esteróides nos extratos EMG (5) e EMI (6), devido à presença da coloração amarela.

As placas reveladas com NP/PEG têm a função de identificar compostos da classe de flavonoides, que apresentaram bandas de coloração esverdeadas com o mesmo RF em todos os extratos EHF (1), EHG (2), EHI (3), EMF (4) EMG (5) e EMI (6), que foram visualizadas sobre a luz UV (365 nm), que possivelmente são anéis aromáticos, indicando a presença da classe de flavonoides.

O anisaldeído é um revelador universal, sendo que nas placas foi possível observar a presença da classe terpenos para os extratos EHF (1), EHG (2), EHI (3) e EMI (6), devido a intensa banda de coloração rosa, característica de hidrocarbonetos com ligações duplas presente em sua constituição (AGATONOVIC et al. 2020)



EHF- Extrato hexano das folhas; (2)EHG- Extrato hexano dos galhos; (3)EHI- Extrato hexano das inflorescências; (4)EMF- Extrato metanol das folhas; (5)EMG- Extrato metanol dos galhos; (6)EMI- Extrato metanol das inflorescências;

Figura 23. Perfil cromatográfico dos extratos de *Piper capitarianum* por cromatografia em camada delgada -CDD.

Dentre as classes de substâncias identificadas nos extratos, encontram-se os terpenos, alcalóides e flavonóides considerados os principais grupos de metabólitos da planta, associados pela atividade inseticida em vários insetos (PARMAR et al. 1997; MARQUES & KAPLAN 2015; PAVELA et al. 2019). Os terpenos, encontrados nos óleos essenciais de espécies do gênero *Piper*, como o limoneno, α -felandreno, mirceno, humuleno entre outros, apresentam atividade inseticida contra larvas de *A. aegypti* (SCOTT et al. 2008; BENELLI et al. 2018d). Aparentemente sua ação inseticida seria decorrente da inibição dos receptores específicos da acetilcolinesterase nos insetos, provocando paralisia e morte (GNANKINÉ et al. 2017).

Os alcaloides naturais encontrados no gênero *Piper*, foram isolados de espécies como: *Piper longum*, *P. nigrum*, *P. chaba*, *P. retrofractum* e *P. officinarum*, resultando no isolamento de 145 alcalóides que apresentam diversas atividades biológicas como ; antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antimalárico e inseticida (PARMAR et al. 1997; BENELLI et al. 2018c). Os flavonoides representam uma grande classe de metabólitos secundários de plantas derivados de duas vias metabólicas distintas, como o ácido chiquímico e acetil-coenzima A. Eles consistem em um sistema tricíclico formado por um anel aromático apresentando um ou dois grupos hidroxílicos, um anel pirânico central e um segundo anel aromático, substituído de várias maneiras, ligado ao primeiro na posição do carbono (2). Estes por sua vez, desempenham um papel importante como mediadores ecológicos, dando uma contribuição importante também na defesa das plantas contra microrganismos e insetos (MUTHU et al. 2015). Em trabalho de revisão química do gênero *Piper*, verificou que já foram isoladas 7 flavononas e 17 flavonas (PARMAR et al. 1997; MARQUES & KAPLAN 2015). Entre as flavonas, um dos compostos mais promissores é a pectolinarigenina (5,7-di-hidroxi-4', 6-dimetoxi-flavona) obtida dos frutos de *Piper nigrum* que exibiu toxicidade sobre as larvas dos

mosquitos *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes. aegypti* (MUTHU et al. 2012). Portanto poucos flavonoides têm sido isolados de espécies de *Piper*.

Dessa forma a prospecção fitoquímica tem grande importância para o conhecimento preliminar da constituição química de uma espécie em estudo

5.3.3 Atividade larvicida e aduicida dos extratos

Com o surgimento de novas formas de mosquitos resistentes aos inseticidas convencionais, aumentou a demanda por substâncias naturais tóxicas, que são eficazes contra mosquitos adultos ou larvas (ACHEE et al. 2019). Nosso trabalho mostra que os extratos de *P. capitarianum* podem ser eficazes agentes de controle alternativo contra as larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Entre os extratos testados, os resultados mostraram que o extrato metanol da inflorescência (EMI) foi o mais ativo, com CL_{50} (24 h) = 103.85 μ g/mL e CL_{50} (48 h) de 101.16 μ g/mL para larvas de *A. aegypti* e CL_{50} (24 h) = 91.15 μ g/mL e CL_{50} (48 h) de 90.96 μ g/mL para larvas de *A. albopictus* (Tabela 14). Os resultados dos extratos dos caules e folhas não foram significativamente diferentes.

Tabela 14. Atividade larvicida dos extratos de *Piper capitarianum* contra larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* após 24 e 48 horas de aplicação.

<i>Aedes aegypti</i>								
Partes coletadas	Extratos	Leituras	CL ₅₀ ± DP	IC 95% (LCL -UCL)	CL ₉₀ ± DP	IC 95% (LCL -UCL)	Slope ± DP	X ²
Folhas	HEX	24	178.36 ± 0.6 ^c	129.02 – 195.35	295.30 ± 0.6 ^e	211.54 – 337.21	2.66 ± 0.1	1.62
		48	176.27 ± 0.6 ^c	101.65 -182.23	293.91 ± 0.6 ^e	263.90 305.23	2.63± 0.1	1.60
	DCM	24	162.52 ± 0.6 ^e	129.02 – 195.35	273.40 ± 0.6 ^e	211.54 – 337.21	2.65 ± 0.1	1.59
		48	160.23 ± 0.6 ^c	101.65 – 182.23	271.58 ± 0.6 ^e	263.90 – 305.23	2.64± 0.1	1.58
	MEOH	24	155.35 ± 0.5 ^b	118.63 – 154.85	256.37 ± 0.5 ^e	207.07 – 267.24	2.71 ± 0.1	1.70
		48	154.38 ± 0.5 ^b	107.67 – 147.91	254.38 ± 0.5 ^e	140.73 – 268.40	2.68 ± 0.1	1.68
Galhos	HEX	24	144.26 ± 0.6 ^b	129.02 – 175.91	274.30 ± 0.6 ^e	201.59 – 297.12	2.65 ± 0.1	1.38
		48	140.45 ± 0.6 ^b	101.65 – 162.81	270.32 ± 0.6 ^e	163.90 – 291.03	2.63± 0.1	1.35
	DCM	24	136.19 ± 0.6 ^b	94.37 – 153.89	267.20 ± 0.6 ^e	184.96 – 288.48	2.39 ± 0.1	1.39
		48	130.62 ± 0.6 ^a	86.11– 127.31	228.34 ± 0.6 ^d	157.08 – 240.13	2.23 ± 0.1	1.35
	MEOH	24	124.18 ± 0.7 ^b	79.43 – 141.44	223.68 ± 0.7 ^d	183.12 – 243.14	2.12 ± 0.1	1.38
		48	120.14 ± 0.7 ^a	71.19 – 132.14	220.08 ± 0.7 ^d	170.21 – 239.45	2.25 ± 0.1	1.34
Inflorescência *	HEX	24	112.03 ± 0.6 ^a	72.60 – 131.26	217.28 ± 0.6 ^d	164.11 – 244.34	2.33 ± 0.1	1.82
		48	109.32 ± 0.6 ^a	68.03 – 119.07	215.37 ± 0.6 ^d	141.34 – 245.13	2.29 ± 0.1	1.78
	DCM	24	107.45 ± 0.5 ^a	84.17 – 138.05	196.85 ± 0.5 ^d	106.55 – 248.29	2.78 ± 0.1	1.34
		48	104.64 ± 0.5 ^a	89.76 – 135.45	194.30 ± 0.5 ^d	104.29 – 234.74	2.75 ± 0.1	1.30
	MEOH *	24	103.85 ± 0.8 ^a	84.10 – 107.98	190.50 ± 0.8 ^d	149.70 – 226.30	2.82 ± 0.1	1.38
		48	101.16 ± 0.8 ^a	78.70 – 99.89	188.60 ± 0.8 ^c	115.15 – 198.10	2.78 ± 0.1	1.32
<i>Aedes albopictus</i>								
Folhas	HEX	24	175.28 ± 0.6 ^c	129.02 – 195.35	292.50 ± 0.6 ^e	211.54 – 337.21	2.62 ± 0.1	1.65
		48	172.56 ± 0.6 ^c	101.65 – 182.23	290.34 ± 0.6 ^e	263.90 – 305.23	2.60± 0.1	1.62
	DCM	24	157.32 ± 0.6 ^b	129.02 – 195.35	265.64 ± 0.6 ^e	211.54 – 337.21	2.65 ± 0.1	1.70
		48	155.34 ± 0.6 ^b	101.65 – 182.23	263.45 ± 0.6 ^e	263.90 – 305.23	2.67± 0.1	1.71
	MEOH	24	142.95 ± 0.8 ^b	118.63 – 154.85	242.97 ± 0.8 ^d	207.07 – 257.21	2.71 ± 0.1	1.73
		48	137.26 ± 0.8 ^b	107.67 – 147.91	240.88 ± 0.8 ^d	140.73 – 258.20	2.68 ± 0.1	1.70
Galhos	HEX	24	140.90 ± 0.6 ^b	129.02 – 175.91	223.20 ± 0.6 ^d	201.59 – 297.12	2.72 ± 0.1	1.75
		48	137.86 ± 0.6 ^b	101.65 – 162.81	220.58 ± 0.6 ^d	163.90 – 291.03	2.69± 0.1	1.73
	DCM	24	134.26 ± 0.6 ^b	129.02 – 145.91	208.20 ± 0.6 ^d	201.59 – 237.12	2.66 ± 0.1	1.62
		48	126.27 ± 0.6 ^b	101.65 – 132.81	188.41 ± 0.6 ^c	163.90 – 201.03	2.63± 0.1	1.58
	MEOH	24	121.81± 0.6 ^b	114.67 – 242.47	234.19 ± 0.6 ^d	178.27 – 259.60	2.87 ± 0.1	1.58
		48	113.83 ± 0.6 ^a	92.43 – 194.93	213.69 ± 0.6 ^d	157.46 – 236.53	2.84 ± 0.1	1.45
Inflorescência *	HEX	24	105.15 ± 0.7 ^a	81.49 – 123.01	209.29 ± 0.7 ^d	173.74 – 237.79	2.51 ± 0.1	1.91
		48	95.45 ± 0.7 ^a	87.58 – 107.45	197.57 ± 0.7 ^d	166.02 – 217.20	2.36 ± 0.1	1.86
	DCM	24	94.48 ± 0.6 ^a	84.17 – 98.05	126.85 ± 0.6 ^b	106.55 – 218.29	2.65 ± 0.1	1.73
		48	93.02 ± 0.6 ^a	89.76 – 101.45	116.90 ± 0.6 ^a	104.29 – 164.74	2.60 ± 0.1	1.69
	MEOH *	24	91.15 ± 0.6 ^a	88.79 – 109.54	119.77 ± 0.6 ^a	118.55 – 149.82	2.75 ± 0.1	1.78
		48	90.96 ± 0.6 ^a	71.54 – 102.94	116.49 ± 0.6 ^a	104.37 – 136.73	2.72 ± 0.1	1.75

HEX: Extrato hexano; **DCM:** Extrato diclorometano; **MEOH:** Extrato metanol;

CL₅₀: concentração letal para 50% das larvas; **CL₉₀:** concentração letal para 90% das larvas; **DP:** desvio padrão (triplicados); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$);

IC 95%: intervalo de confiança de 95%; **LCL:** limite inferior de confiança; **UCL:** limite superior de confiança; **X²:** valor do qui-quadrado; **Controle** = Temefos, 0,12 µg/mL. *Extrato com o efeito larvicida mais forte.

Com relação à atividade adulticida, os resultados também mostraram que o extrato metanol da inflorescência (EMI) foi o mais ativo com $CL_{50} = 180.85 \mu\text{g/mL}$ e $177.16 \mu\text{g/mL}$ e $CL_{90} = 312.50 \mu\text{g/mL}$ e $309.60 \mu\text{g/mL}$ contra adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente (Tabela 15). Com bases nos resultados, há uma maior toxicidade do extrato EMI de *P. capitarianum* sobre larvas de *A. albopictus* quando comparado a larvas de *A. aegypti*. Todavia, não houve diferença estatística significativa quando comparada as estimativas das CL_{50} e os respectivos intervalos de confiança, entre os períodos de observação ($p > 0,05$).

A literatura relata que os extratos de plantas oferecem uma diversidade extraordinária de metabólitos secundários com eficácia comprovada contra espécies de mosquitos de importância médica e veterinária, bem como contra outras pragas (ISMAN & GRIENEISEN 2014; BENELLI & PAVELA 2018). Por exemplo, o extrato metanol obtido das folhas de *Piper aduncum* exibiu atividade com $CL_{50} = 57 \mu\text{g/mL}$ e $100 \mu\text{g/mL}$ contra larvas e adultos de *A. aegypti*, respectivamente (POHLIT et al. 2004; PINTO et al. 2012). Em outras espécies como *P. variabile*, *P. peltata*, *P. retrofractum* e *P. sarmentosum*, mostraram ativos contra larvas de *A. aegypti* com $CL_{50} = 76 \mu\text{g/mL}$, $39 \mu\text{g/mL}$, $81 \mu\text{g/mL}$, $15 \mu\text{g/mL}$ respectivamente (CRUZ et al. 2011; CHANSANG et al. 2005; CHOOCHOTE et al. 2006). Por outro lado, trabalhos realizados por Tennyson et

al. (2012) com extrato metanol das folhas de *Piper betle*, foi ativos contra *A. aegypti*, com valores de $CL_{50} = 116.73\mu\text{g/mL}$ e $98.45\mu\text{g/mL}$, respectivamente nas leituras de 24 e 48 horas, demonstrando similaridade com os resultados deste trabalho. Além disso, foi observados em outros estudos, que os extratos metanol obtidos folhas, caules e frutos de *Piper nigrum* conhecida como pimenta de macaco, foram eficazes contra *A. aegypti*, com $CL_{50} = 40\mu\text{g/mL}$, $100\mu\text{g/mL}$ $79\mu\text{g/mL}$ respectivamente após 24 horas de exposição, podendo ser usado como alternativa de controle no ambiente (SARITA et al. 2012; LEE et al. 2005; CHAITHONG et al. 2006).Embora as revisões atualmente publicadas até o momento se concentrem principalmente em óleos essenciais, deve-se ressaltar que há poucos estudos na literatura sobre a eficácia de extratos de plantas, incluindo a planta *Piper capitarianum* abundante na região amazônica que mostram potencial para o desenvolvimento de inseticida natural.

Por esta razão o nosso trabalho mostra que o extrato EMI foi o mais promissor, mostrando potencial para ser utilizado como método alternativo no controle destes vetores em áreas urbanizadas devido aos baixos valores de CL_{50} e a presença de classes químicas que apresentam essa ação inseticida (GARCEZ et al. 2013). Nesta ótica, será necessário o fracionamento deste extrato para a identificação dos princípios ativo presentes objetivando ações direcionadas para um controle mais efetivo.

Tabela 15. Atividade aduictida dos extratos de *Piper capitarianum* contra as fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* após 90 minutos de exposição

Partes coletadas	Extratos	Mosquitos testados	CL ₅₀ ± DP	IC 95% (LCL -UCL)	CL ₉₀ ± DP	IC 95% (LCL -UCL)	Slope ± DP	X ²
Folhas	HEX	<i>A. aegypti</i>	246.76 ± 0.6 ^b	182.50 – 296.95	403.69 ± 0.6 ^d	311.49 – 427.18	1.86 ± 0.2	1.53
		<i>A. albopictus</i>	239.82 ± 0.6 ^b	165.56 – 282.12	389.50 ± 0.6 ^d	243.03 – 418.57	1.82 ± 0.2	1.50
	DCM	<i>A. aegypti</i>	232.52 ± 0.6 ^c	129.02 – 295.35	373.40 ± 0.6 ^d	211.54 – 397.21	1.65 ± 0.2	1.59
		<i>A. albopictus</i>	229.23 ± 0.6 ^b	101.65 – 282.23	371.58 ± 0.6 ^d	263.90 – 395.23	1.64 ± 0.2	1.58
	MEOH	<i>A. aegypti</i>	218.66 ± 0.3 ^b	142.02 – 227.55	381.81 ± 0.3 ^d	211.83 – 392.80	1.76 ± 0.2	1.73
		<i>A. albopictus</i>	215.45 ± 0.3 ^b	104.29 – 291.80	376.69 ± 0.3 ^d	260.11 – 399.19	1.78 ± 0.2	1.63
Galhos	HEX	<i>A. aegypti</i>	235.39 ± 0.4 ^b	184.42 – 297.66	374.10 ± 0.4 ^d	299.97 – 420.80	1.90 ± 0.2	1.55
		<i>A. albopictus</i>	232.99 ± 0.4 ^b	167.18 – 278.37	371.73 ± 0.4 ^d	324.54 – 418.59	1.72 ± 0.2	1.43
	DCM	<i>A. aegypti</i>	227.19 ± 0.6 ^b	94.37 – 253.89	357.20 ± 0.6 ^d	184.96 – 388.48	1.39 ± 0.2	1.39
		<i>A. albopictus</i>	221.62 ± 0.6 ^a	186.11 – 237.31	352.34 ± 0.6 ^d	157.08 – 370.13	1.35 ± 0.2	1.35
	MEOH	<i>A. aegypti</i>	218.18 ± 0.7 ^b	179.43 – 241.44	343.68 ± 0.7 ^d	183.12 – 373.14	1.42 ± 0.2	1.38
		<i>A. albopictus</i>	215.14 ± 0.7 ^b	171.19 – 232.14	340.08 ± 0.7 ^c	170.21 – 359.45	1.45 ± 0.2	1.34
Inflorescência *	HEX	<i>A. aegypti</i>	192.84 ± 0.4 ^a	136.05 – 229.09	328.32 ± 0.4 ^c	184.81 – 357.49	1.57 ± 0.2	1.68
		<i>A. albopictus</i>	190.95 ± 0.4 ^a	127.93 – 215.05	322.47 ± 0.4 ^c	167.42 – 350.70	1.54 ± 0.2	1.42
	DCM	<i>A. aegypti</i>	186.45 ± 0.5 ^a	84.17 – 138.05	320.85 ± 0.5 ^c	106.55 – 348.29	1.78 ± 0.2	1.34
		<i>A. albopictus</i>	184.64 ± 0.5 ^a	89.76 – 135.45	318.30 ± 0.5 ^c	104.29 – 334.74	1.75 ± 0.2	1.30
	MEOH*	<i>A. aegypti</i>	180.85 ± 0.8 ^a	84.10 – 197.98	312.50 ± 0.8 ^c	149.70 – 326.30	1.82 ± 0.2	1.38
		<i>A. albopictus</i>	177.16 ± 0.8 ^a	78.70 – 199.89	309.60 ± 0.8 ^c	115.15 – 318.10	1.78 ± 0.2	1.32

HEX: Extrato hexano; **DCM:** Extrato diclorometano; **MEOH:** Extrato metanol;

CL₅₀: concentração letal para 50% dos adultos; **CL₉₀:** concentração letal para 90% dos adultos;

DP: desvio padrão (triplicados); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (P <0,05); **IC 95%:** intervalo de confiança de 95%; **LCL:** limite inferior de confiança; **UCL:** limite superior de confiança; **X²:** valor do qui-quadrado; **Controle** = α -cipermetrina: 0,4 μ g/mL; *Extrato com o efeito aduictida mais forte.

5.3.4 Fracionamento cromatográfico do extrato EMI de *P. capitarianum*

No presente estudo, o material vegetal (280g) da inflorescência de *Piper capitarianum* foi submetido extração para obter o extrato EMI com um rendimento de 9.5%. O extrato metanol da inflorescência (EMI) apresentou atividade larvicida sobre larvas de *Aedes aegypti* ($CL_{50} = 103.85\mu\text{g/mL}$) e *Aedes albopictus* ($CL_{50} = 101.16\mu\text{g/mL}$), demonstrando a apresentar a melhor atividade em relação os demais extratos testados.

O extrato metanol da inflorescência (EMI), foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna, utilizando Sephadex-LH-20 como fase estacionária e na fase móvel a mistura dos eluentes (Clorofórmio/Etanol (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), seguido da etanol 100% e no final Etanol/água (8:2), (7:3), (6:4), (1:1) respectivamente. Neste procedimento cromatográfico foi utilizado 2,60g do extrato, resultando em apenas 7 frações (F1-F7) (Figura 24).

Nas frações F4 e F7, ocorreu a formação de cristais amarelados, sendo recristalizadas em clorofórmio (CHCl_3), e submetidas a análise por métodos espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H para identificação e elucidação estrutural das moléculas isoladas.

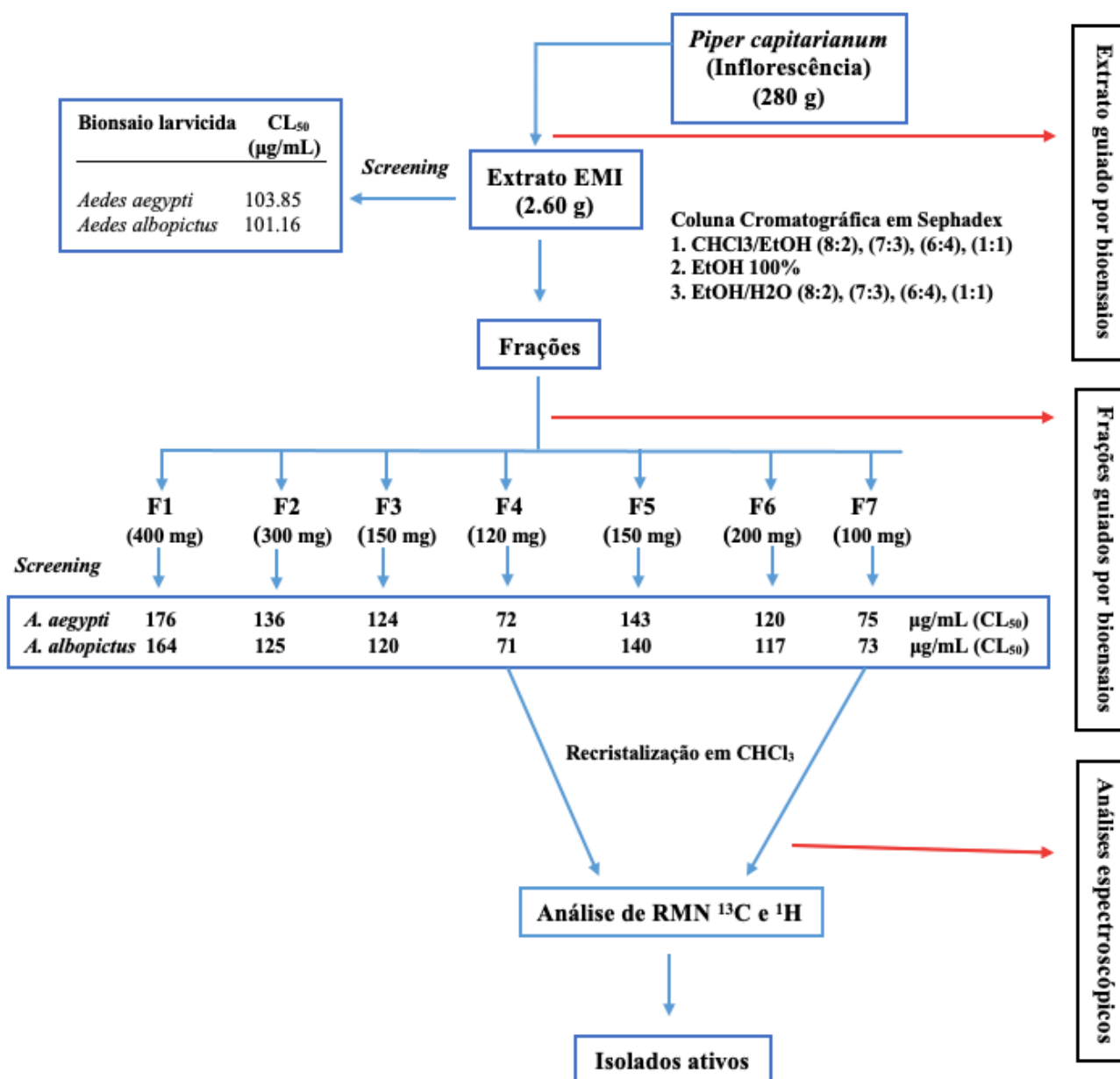


Figura 24. Fracionamento cromatográfico do extrato metanol da inflorescência (EMI) de *Piper capitarinum*.

As frações geradas após o fracionamento foram avaliadas por cromatografia em camada delgada-CCD conforme pode ser observado na Figura 25.

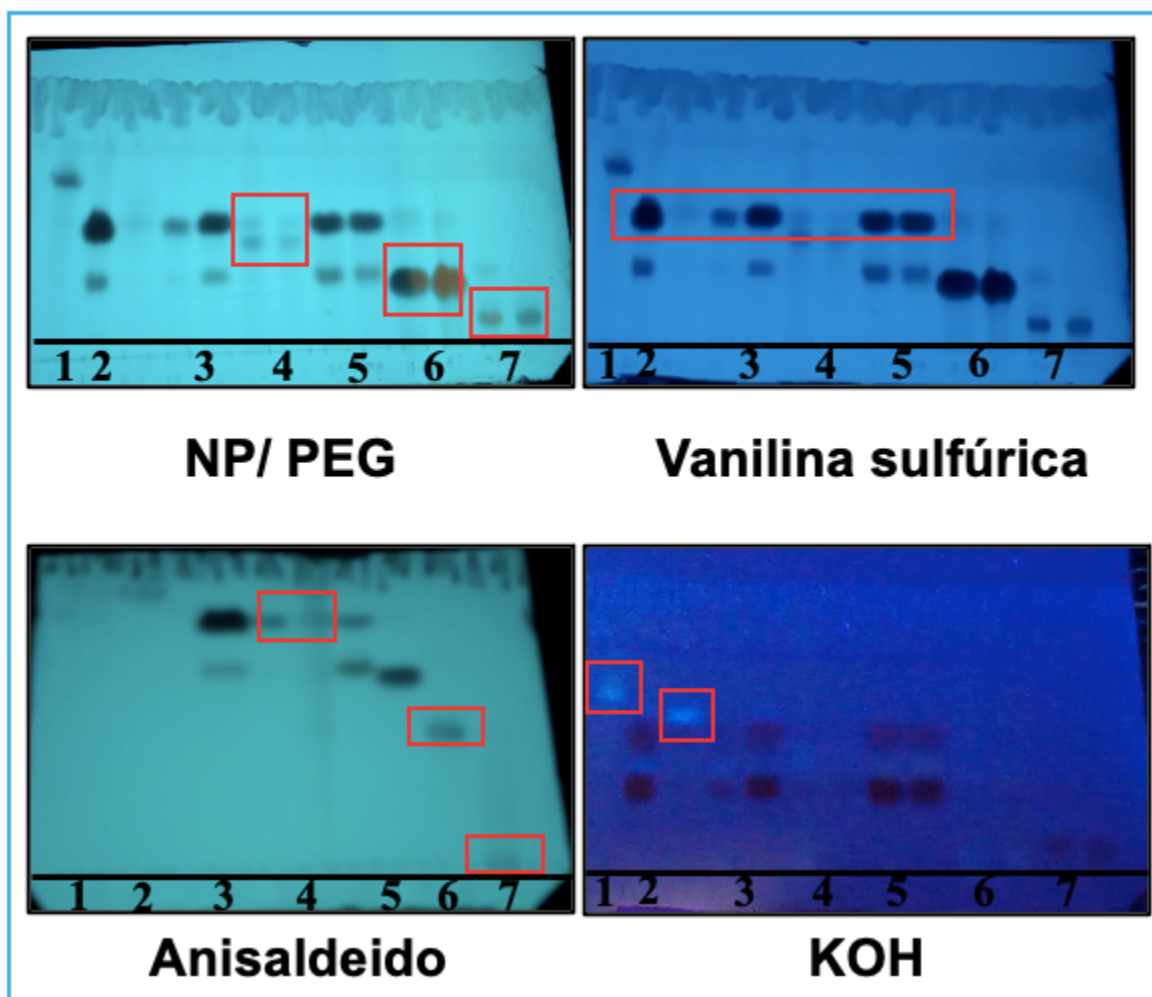


Figura 25. Perfil cromatográfico das frações do extrato (EMI) por CDD.

Quando reveladas com vanilina sulfúrica, as frações 2, 3 e 5 apresentam bandas de coloração roxas, indicando a presença de saponinas e compostos aromáticos.

A revelação da CCD com KOH, apresentou bandas de coloração azul nas frações 1 e 2, que indica a presença de cumarina. As CCD reveladas com NP/PEG, apresentaram intensa bandas alaranjadas e verdes nas frações 4, 6 e 7 com mesmo RF, indicando a presença de flavonóides (Tabela 16).

Tabela 16. Classes químicas identificadas nas frações em placas de CCD.

Numeração	Frações	Classes químicas
1	F1	Cumarinas
2	F2	Saponinas, Cumarinas
3	F3	Saponinas
4	F4	Flavonóides, Terpenos
5	F5	Saponinas
6	F6	Flavonóides, Terpenos
7	F7	Flavonóides, Terpenos

Entre todas as amostras, F4 e F7 apresentaram atividade mais potentes contra larvas de *A. aegypti* ($CL_{50} = 72.23\mu\text{g/mL}$ e $75.25\mu\text{g/mL}$) e *A. albopictus* ($CL_{50} = 71.64\mu\text{g/mL}$ e $73.13\mu\text{g/mL}$) respectivamente, demonstrando que houve diferença estatística significativa quando comparada as estimativas das CL_{50} e CL_{90} das demais frações (Tabela 17)

Tabela 17. Atividade larvicida das frações do extrato metanol da inflorescência (EMI) de *P. capitarianum* contra larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* após 24 de aplicação.

Mosquitos	Frações	CL ₅₀ ± DP	IC 95% (LCL -UCL)	CL ₉₀ ± DP	IC 95% (LCL -UCL)	Slope ± DP	X ²
<i>Aedes aegypti</i>	F1	176.36 ± 0.3 ^b	152.25 – 195.09	255.32 ± 0.3 ^c	214.81 – 293.59	2.55 ± 0.1	1.88
	F2	136.53 ± 0.4 ^b	116.26 – 192.42	200.10 ± 0.4 ^c	193.03 – 251.27	2.30 ± 0.1	1.84
	F3	124.35 ± 0.3 ^a	97.32 – 152.45	155.40 ± 0.3 ^b	131.54 – 197.20	1.90 ± 0.2	1.68
	*F4	72.23 ± 0.4 ^a	61.55 – 112.23	131.38 ± 0.4 ^b	103.90 – 175.25	1.60 ± 0.2	1.47
	F5	143.36 ± 0.4 ^b	122.43 – 190.25	226.85 ± 0.4 ^c	213.33 – 270.80	2.31 ± 0.2	1.83
	F6	120.27 ± 0.5 ^b	106.10 – 183.16	225.70 ± 0.5 ^c	213.15 – 263.80	1.70 ± 0.2	1.66
	*F7	75.25 ± 0.3 ^a	66.25 – 100.12	128.95 ± 0.3 ^a	89.35 – 150.25	1.58 ± 0.2	1.45
<i>Aedes albopictus</i>	F1	164.25 ± 0.3 ^b	138.30 – 198.95	246.65 ± 0.5 ^c	228.39 – 277.58	2.53 ± 0.1	1.84
	F2	125.35 ± 0.4 ^b	112.26 – 190.45	198.30 ± 0.4 ^c	176.23 – 273.70	2.28 ± 0.1	1.83
	F3	120.55 ± 0.3 ^a	94.61 – 132.35	147.25 ± 0.3 ^b	130.65 – 178.39	1.88 ± 0.2	1.66
	*F4	71.64 ± 0.4 ^a	69.36 – 125.45	130.50 ± 0.4 ^b	115.49 – 175.74	1.59 ± 0.2	1.46
	F5	140.85 ± 0.4 ^b	114.20 – 187.36	222.80 ± 0.4 ^c	209.20 – 264.30	2.30 ± 0.2	1.82
	F6	117.26 ± 0.5 ^b	113.60 – 181.97	221.10 ± 0.5 ^c	205.15 – 251.20	1.68 ± 0.2	1.65
	*F7	73.13 ± 0.3 ^a	62.75 – 99.82	125.15 ± 0.3 ^b	86.85 – 148.85	1.57 ± 0.2	1.44

CL₅₀: concentração letal para 50% das larvas; CL₉₀: concentração letal para 90% das larvas; DP: desvio padrão (triplicados); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05);

IC 95%: intervalo de confiança de 95%; LCL: limite inferior de confiança; UCL: limite superior de confiança; X²: valor do qui-quadrado. Controle = Temefos, 0,12µg/mL. *Fração com o efeito larvicida mais forte.

A partir do conjunto de informações obtidos por métodos espectroscópicos (RMN ¹³C e ¹H), e, comparação com os dados obtidos na literatura as substâncias com maior atividade, F4 e F7, foram identificadas como uma flavonona e uma chalcona.

A amostra F4 foi identificada como (S)-8-formil-3',5-dihidroxi-7-metoxi-6-metil-flavanona, uma substância isolada anteriormente de *Piper montealegreanum*, enquanto F7 foi identificada como 3'-formil-3,4',6'-trihidroxi-2'-metoxi-5'-metilchalcona, substância isolada também de *P. montealegreanum* (ALVES et al 2011) (Figura 27).

Este é o primeiro relato da atividade biológica contra larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* atribuída a essas duas substâncias.

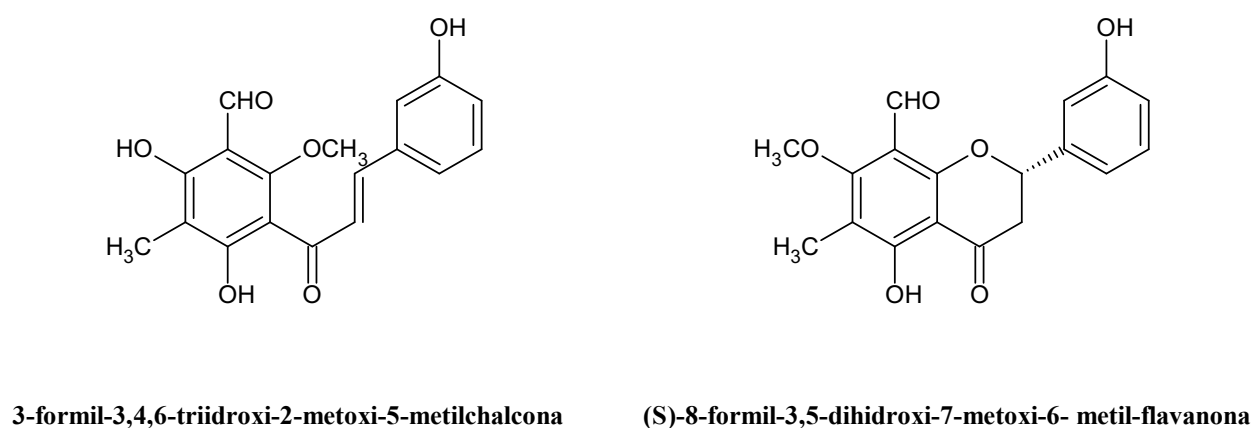


Figura 26. Estruturas químicas das amostras F4 e F7

5.3.5 Atividade antioxidante sobre os radicais (DPPH) e (ABTS)

Os resultados das atividades antioxidantes dos extratos de *P. capitarianum* sobre radicais DPPH e ABTS estão descritos na Tabela 18 e foram expressos em valores de IC₅₀ (Concentração capaz de sequestrar 50% dos radicais livres DPPH e ABTS). Os extratos que apresentarem a maior atividade antioxidante, ou seja, a maior capacidade de sequestrar os radicais livres, terão menores valores de IC₅₀ sendo posteriormente comparados com os padrões antioxidantes Quercetina (20.89µg/mL) e Trolox (12.95µg/mL) (CRAFT et al. 2012).

Os resultados dos ensaios antioxidante mostram que os extratos metanol dos galhos (EMG) e inflorescências (EMI) apresentaram as melhores atividades antioxidante com $IC_{50} = 78.34\mu\text{g/mL}$, $82.32\mu\text{g/mL}$ e $85.95\mu\text{g/mL}$, $93.52\mu\text{g/mL}$, respectivamente para os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}. Todavia, não houve diferença estatística significativa quando comparada as estimativas das IC_{50} ($p > 0,05$). Este resultados são semelhantes aos obtidos por Silva et al. (2017) que avaliaram a atividade antioxidante dos extratos de *P. arboreum*, *P. dilatatum* e *P. divaricatum* coletados na região amazônica, e encontraram IC_{50} de $83\mu\text{g/mL}$ e $123\mu\text{g/mL}$ para os radicais livres (DPPH e ABTS), o que sugerem um forte potencial antioxidante ao extratos EMG e EMI presente neste trabalho.

Segundo Pavela et al. (2015), os valores abaixo de $100\mu\text{g/mL}$ são considerados de alto potencial antioxidante. Nesse sentido, nossos resultados mostraram alta atividade antioxidante, o que pode ser explicado pelas diferentes composições dos metabolitos secundários presentes nos extratos de *P. capitarianum*, como monoterpenos e terpenos fenólicos, que são capazes de atuar em substratos oxidáveis inibindo ou retardando significativamente os processos oxidativos e protegendo os sistemas biológicos dos danos produzidos por doenças degenerativas e câncer (MAR et al. 2018). Outros autores relataram importantes propriedades antioxidantes desses compostos atestadas por diversos métodos antioxidantes (BENELLI et al. 2016a; AZEVEDO et al. 2018).

Tabela 18. Os valores de IC₅₀ das atividades antioxidante dos extratos de *Piper capitarianum*.

Partes coletadas	Extratos	DPPH	ABTS
		IC ₅₀ ± DP	IC ₅₀ ± DP
Folhas	HEX	137.60 ± 0.5 ^c	151.30 ± 0.5 ^c
	DCM	123.72 ± 0.5 ^c	147.22 ± 0.5 ^c
	MEOH	118.23 ± 0.5 ^c	134.61 ± 0.5 ^c
Galhos*	HEX	107.52 ± 0.3 ^b	125.27 ± 0.3 ^c
	DCM	93.66 ± 0.3 ^b	112.34 ± 0.3 ^c
	MEOH*	78.34 ± 0.3 ^b	92.76 ± 0.3 ^b
Inflorescência	HEX	116.66 ± 0.4 ^a	138.36 ± 0.4 ^c
	DCM	101.37 ± 0.4 ^a	118.87 ± 0.4 ^c
	MEOH	85.95 ± 0.4 ^b	93.52 ± 0.4 ^b
Quercetina	Ctr	20.89 ± 0.3 ^a	-
Trolox	Ctr	-	12.95 ± 0.1 ^a

HEX: Extrato hexano; **DCM:** Extrato diclorometano; **MEOH:** Extrato metanol;

IC₅₀: Concentração inibitória 50%; **DP:** Desvio padrão (médias de triplicata); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (P <0,05); **Ctr** = Controle positivo (Quercetina e Trolox).

* Extrato com o efeito antioxidante mais forte.

5.3.6 Atividade tóxica dos extratos sobre *Artemia salina*

A atividade tóxica dos extratos de *P. capitarianum* sobre larvas de *Artemia salina* como um organismo não-alvo consta na Tabela 19, onde foram expressos os valores da concentração letal (CL_{50}) considerando o intervalo de confiança no nível de significância de 95%. Em todos os extratos testados, apresentaram baixa toxicidade sobre as larvas de *A. salina*, sendo que o extrato metanol da inflorescência (EMI) mostrou a melhor atividade com CL_{50} de 659.20 μ g/mL após 24 horas de exposição. O lepachol utilizado como controle positivo mostrou-se altamente tóxico com CL_{50} de 30.40 μ g/mL.

A literatura relata que extratos de plantas são consideradas muito tóxicas com valores de CL_{50} abaixo de 100 μ g/mL e considerada de baixa toxicidade com CL_{50} (500–1000 μ g/mL) (SILVA et al. 2017). Além disso, alguns trabalhos relatam como indicador de toxicidade em bioensaios como parâmetro de avaliação das atividades biológicas e mostram boa relação com outras atividades farmacológicas tais como: antitumoral, antibacteriano, antifúngica e inseticida (SILVA et al. 2014; 2016; 2017). Por esta razão, nosso trabalho mostra o extrato metanol da inflorescência (EMI), poderia ser considerada uma fonte natural promissora de agentes larvicidas e adulticidas para serem utilizados no controle de vetores como uma ferramenta alternativa aos inseticidas sintéticos existentes no mercado, pois mostrou-se eficaz, além de ser menos danoso à saúde e ao meio ambiente.

Tabela 19. Atividade tóxica dos extratos de *Piper capitarianum* em larvas de *Artemia salina* após 24 h de exposição.

Partes coletadas	Extratos	CL ₅₀ ± DP	IC 95% (LCL – UCL)	Slope ±DP	X ²
Folhas	HEX	696.60 ± 0.6 ^b	398.22 – 725.45	1.92 ± 0.1	1.05
	DCM	693.72 ± 0.6 ^b	389.02 – 728.65	1.90 ± 0.1	1.04
	MEOH	690.23 ± 0.5 ^b	356.20 – 725.90	1.77 ± 0.1	1.07
Galhos	HEX	687.52 ± 0.6 ^b	365.34 – 695.91	1.75 ± 0.1	1.38
	DCM	683.66 ± 0.8 ^b	353.01 – 698.53	1.70 ± 0.1	1.03
	MEOH	678.44 ± 0.6 ^a	341.58 – 697.46	1.44 ± 0.1	0.53
Inflorescência *	HEX	666.66 ± 0.6 ^a	346.98 – 690.97	1.85 ± 0.1	0.70
	DCM	662.37 ± 0.5 ^a	340.16 – 695.61	1.89 ± 0.1	0.58
	MEOH*	659.20 ± 0.6 ^a	350.90 – 697.46	1.82 ± 0.1	0.67
Lapachol	Ctr	30.45 ± 0.4 ^c	26.98 – 48.97	1.51 ± 0.1	1.12

HEX: Extrato hexano; **DCM:** Extrato diclorometano; **MEOH:** Extrato metanol;

CL₅₀: concentração letal para 50% das larvas; **DP:** desvio padrão (triplicados); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (P <0,05); **IC 95%:** intervalo de confiança de 95%; **LCL:** limite inferior de confiança; **UCL:** limite superior de confiança; **X²:** valor do qui-quadrado; **Ctr** = Controle positivo (Lapachol). * Extrato com o efeito tóxico mais forte.

5.3.7 Atividade antimicrobiana dos extratos de *P. capitarianum*

O uso indiscriminado de antimicrobianos comerciais tem causado resistência múltipla em microrganismos patogênicos humanos, tornaram-se uma causa de grandes problemas de saúde, e novos agentes antimicrobiano são necessários para lidar com esse problema (MAAJIDA & THANGAVELU 2019). Os produtos naturais têm grande demanda por suas extensas propriedades biológicas e componentes bioativos, que se

provaram úteis contra um grande número de agentes causadores de doenças (SOYER & TUNALI 2019). Este é o primeiro estudo que investigou a atividade antimicrobiana dos extratos de *Piper capitarianum* sobre bactérias patogênicas. De acordo com nossos resultados, todos os extratos testados apresentaram atividade antimicrobiana com halo de inibição torno de 3 á 7 mm diâmetro sobre as bactérias patogênicas (Tabela 20). No entanto, o extrato metanol da inflorescência (EMI) mostrou a melhor atividade antimicrobiana com halo de inibição em torno de 4 á 7 para cepas microbianas. No controle negativo (DMSO) não houve formação de halo e no controle positivo (amoxicilina) mostrou a presença de halo em torno de 8 a 6mm para as cepas microbianas.

A literatura relata que produtos naturais como extratos são considerados como bons agentes antimicrobianos os possuem halos de inibição superiores 3 mm diâmetro (ZAZHARSKYI et al. 2019). No entanto, alguns trabalhos mostram a atividade da antimicrobiano dos extratos de outras espécies de Piper. Por exemplo, o extrato metanol extraído das folhas de *Piper retrofractum* mostrou atividade antimicrobiano com inibição de em torno de 5 a 8 mm sobre patógenos bacterianos e fúngicos (PANPHUT et al. 2020). Em outras espécies como *Piper betle* e *Piper nigrum*, foram obtidos das folhas, os extratos metanol que mostram atividades com inibição em 7 e 10 mm respectivamente para o fungo *Candida albicans* (MAKKAR et al. 2017; TAKOOREE et al. 2019). Com base em nossos resultados, sugere-se o extrato EMI, possui grande potencial para o estudo e desenvolvimento de medicamentos para tratamento de infecções bacterianas.

Tabela 20. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Piper capitarianum* sobre bactérias patogênicas.

Amostras	Extratos	Halo de inibição (mm)			
		Microrganismos			
		Gram Positiva		Gram negativa	
		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Folhas	HEX	3 ± 0.3 ^a	2 ± 0.2 ^a	1 ± 0.1 ^a	-
	DCM	5 ± 0.3 ^b	4 ± 0.2 ^a	2 ± 0.1 ^a	-
	MEOH	7 ± 0.3 ^b	5 ± 0.2 ^b	3 ± 0.1 ^a	1 ± 0.1 ^a
Galhos	HEX	3 ± 0.3 ^a	3 ± 0.2 ^a	2 ± 0.1 ^a	-
	DCM	5 ± 0.3 ^a	4 ± 0.2 ^a	3 ± 0.1 ^a	1 ± 0.1 ^a
	MEOH	7 ± 0.3 ^b	5 ± 0.2 ^b	3 ± 0.2 ^a	1 ± 0.1 ^a
Inflorescência*	HEX	4 ± 0.3 ^a	3 ± 0.2 ^a	2 ± 0.1 ^a	-
	DCM	6 ± 0.3 ^b	5 ± 0.2 ^b	4 ± 0.1 ^a	1 ± 0.1 ^a
	MEOH*	7 ± 0.3 ^b	7 ± 0.2 ^b	5 ± 0.2 ^b	1 ± 0.1 ^a
DMSO	Ctr	-	-	-	-
Amoxicilina	Ctr	8 ± 0.3 ^b	6 ± 0.3 ^b	5 ± 0.2 ^a	-

HEX: Extrato hexano; **DCM:** Extrato diclorometano; **MEOH:** Extrato metanol;

DP: Desvio padrão (médias de triplicata); Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (P <0,05); **Controle** = DMSO e Amoxicilina; (-) Ausência de halo. *Extrato com o efeito antimicrobiano mais forte

5.3.8 Observações morfológicas das larvas

Como o extrato metanol da inflorescência (EMI) de *P. capitarianum* exibiu a melhor atividade larvicida sobre as larvas de mosquitos, foi investigado não apenas por seu potencial inseticida, bem como seu modo de ação e local alvo, que até o momento não foi totalmente elucidado em comparação com outros compostos inseticidas derivados de plantas. Em nossos resultados, as larvas tratadas com extrato EMI, mostraram sinais de intoxicação no intestino médio das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Figura 27C e D) que expeliram o conteúdo intestinal, pela extrusão da matriz peritrófica resultando em bloqueio da digestão e absorção de nutrientes que podem fazer parte do mecanismo que causa a morte de larvas de mosquitos. Além disso, foram observados nas imagens obtidas por microscopia eletrônica, danos ao sifão que prejudicam o sistema respiratório das larvas favorecendo sua morte (Figura 28C e D).

A literatura relata que a sobrevivência das larvas de mosquitos depende de sua capacidade respiratória sob a água e absorção de nutrientes pelas células epiteliais do intestino médio (FUJIWARA et al. 2017; SUTININGSIH et al. 2018). No entanto estudos relatam que a região intestinal das larvas é um dos locais-alvo comuns dos compostos inseticidas. Isto pode ocorrer devido a sua natureza lipofílica dos compostos presente nos extratos que consegue penetrar com facilidade nas células intestinal causando danos graves ao intestino médio interrompendo a integridade e função (BOTAS et al. 2017). Por outro lado, estudos demonstram que compostos químicos presentes nos extratos alteram a tensão superficial da água, contribuindo significativamente para a abertura e o fechamento do sifão mosquitos resultando na morte das larvas certas espécies de mosquitos (LEE et al. 2017). Além disso, impede que oxigênio atmosférico se dissolva na água, bloqueando a respiração cutânea e sifonal, diminuindo assim seu tempo de sobrevivência (LEE et al. 2018). Como esses

estudos corroboram com nossos resultados, podemos sugerir que esses achados (danos no intestino e sifão) podem indicar que existam outras vias de ação desse extrato EMI.

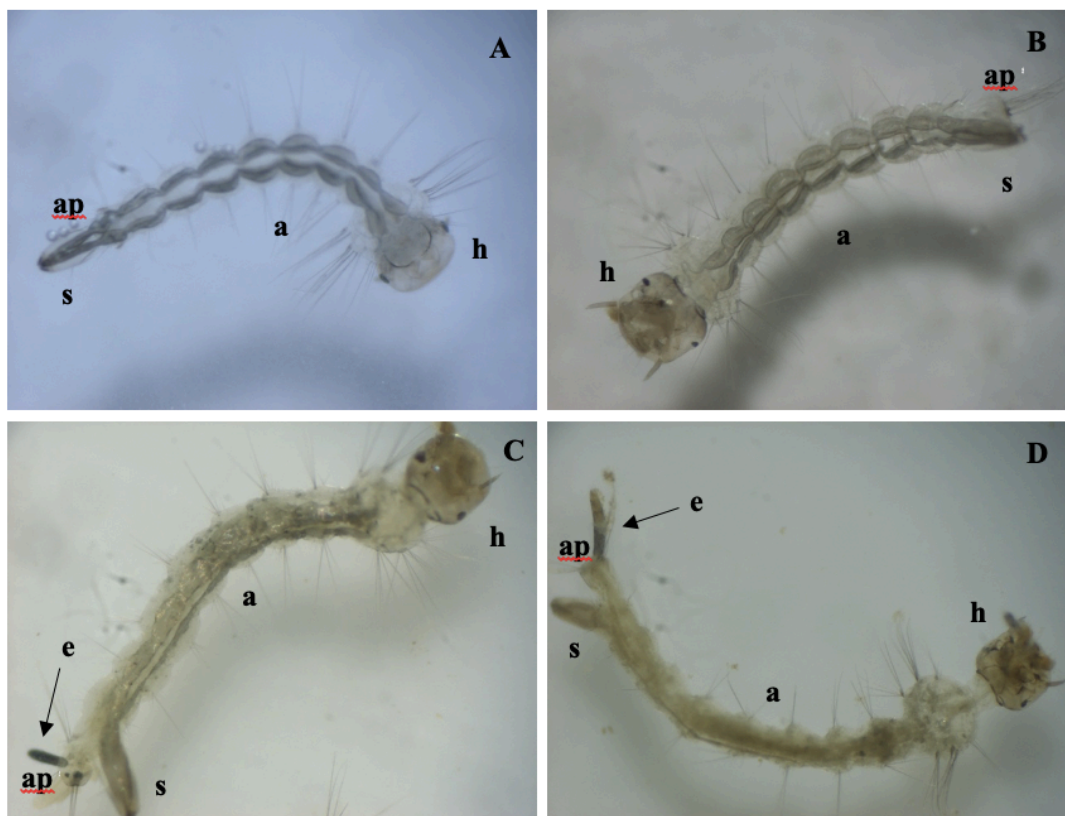


Figura 27. Micrografias de luz das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Larvas de controle de *A. aegypti* (A) e *A. albopictus* (B) sem alterações na cabeça (h), segmentos do abdômen (a), sifão (s) e papila anal (ap). Larvas de *A. aegypti* (C) e *A. albopictus* (D) tratadas com extrato EMI de *P. capitarianum* mostrando alterações (pigmentação escura) nos segmentos do abdome (a) e extrusão da matriz peritrófica (e) (seta).

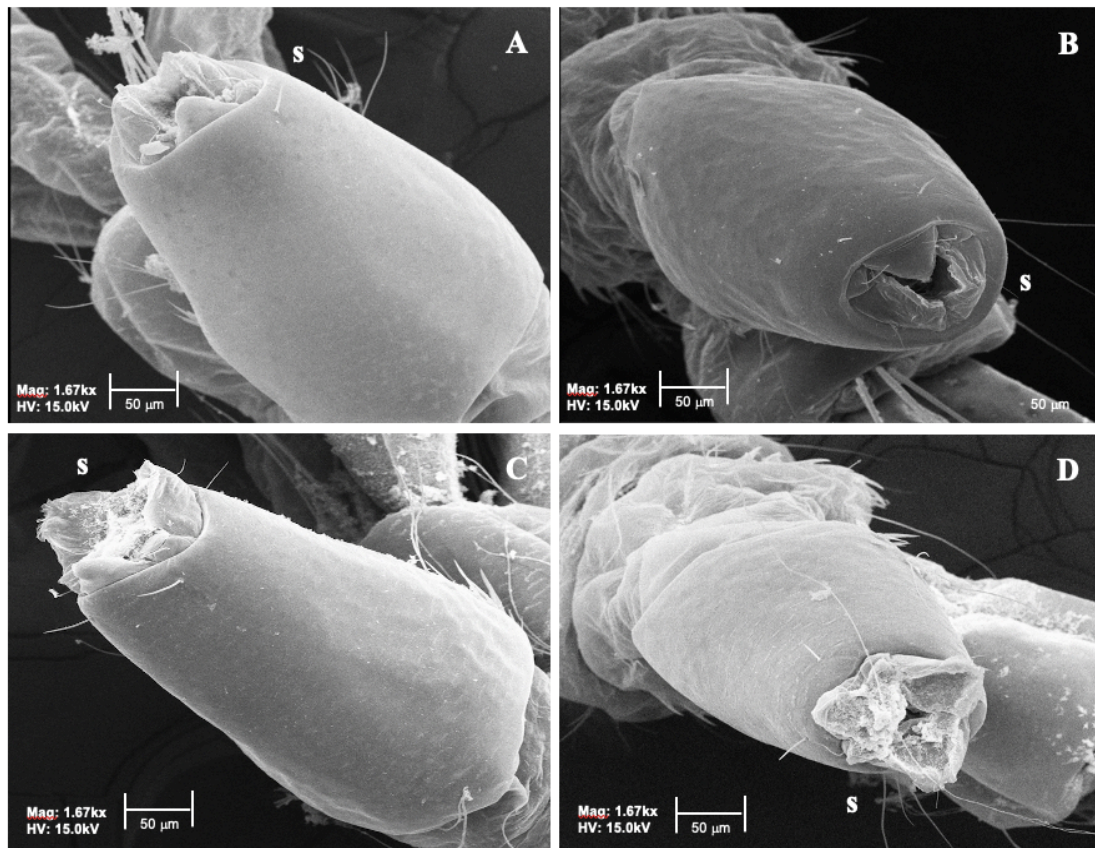


Figura 28. Micrografia eletrônica de varredura das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Larvas de controle de *A. aegypti* (A) e *A. albopictus* (B) mostrando um espiráculo do sifão (s) aberto e intacto. Larvas de *A. aegypti* (C) e *A. albopictus* (D) tratadas com extrato EMI mostrando estruturas danificadas no espiráculo do sifão (s).

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo evidenciaram a atividade larvicida e adulticida dos óleos essenciais, e, substâncias isoladas de *P. capitarianum*. A análise morfológica das larvas apresentou alterações que sugerem o possível mecanismo de ação larvicida deste óleo essencial em insetos. A modelagem molecular sugere que o trans-cariofileno e humuleno têm afinidade com o sítio ativo da enzima AeSCP-2, que é responsável pelo transporte intracelular em insetos. No entanto, mais estudos serão necessários para uma avaliação mais completa deste óleo essencial, incluindo a caracterização e avaliação da estabilidade das nanoformulações obtidas no presente estudo, além da validação em campo, com o objetivo de desenvolver produtos mais seletivos, e, com maior eficácia na área de inseticidas comerciais. Nesse contexto, alguns resultados merecem destaque conforme descrição a seguir:

- O óleo, extrato e a nanoemulsão das inflorescências apresentaram a melhor atividade inseticida, (larvas e adultos), antimicrobiana (bactérias patogênicas) e tóxica (larvas).
- O fracionamento cromatográfico do extrato EMI, resultou no isolamento de flavona e chalcona que exibiram atividade sobre as larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*.
- As análises morfológicas das larvas revelaram danos no intestino médio e sifão (sinais de intoxicações) que indicam outras vias de ação desses óleos.

- A modelagem molecular dos compostos voláteis (trans-cariofileno e humuleno) possibilitaram a desativação da uma enzima AeSCP-2, responsável pelo transporte de colesterol em insetos.
- Os óleos e extratos apresentaram baixa atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e forte atividade as enzimas acetilcolinesterase (AChE) que indicar uma via de ação sobre os insetos.

Diante essas premissas, as nossas descobertas podem ser consideradas uma contribuição para o arsenal disponível de larvicidas e de inseticidas, uma vez que o óleo essencial contém ingredientes ativos promissores que podem ser incluídos em formulações de novos produtos com possibilidade de substituir produtos sintéticos. Adicionalmente, os produtos obtidos desta espécie vegetal abundante na região amazônica, terão, provavelmente mais impacto comercial, podendo, inclusive, serem elaborados com menor custo, além de terem menos impacto para o meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, Seixas G, Pinto J, Ching-Ng L, David JP (2019) Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *Plos Neglect Trop D* 131:1935–2727.

Adams PR (2009) Identification of essential oil components by Gas chromatography/mass spectrometry. Allured Books, South Carol, USA

Almeida RR, Souto RN, Bastos CN, Silva MH, Maia JG (2009) Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *ChemBioChem* 6:1427–1434.

Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, Dobson SL (2010) Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10:295–311.

Alves SN, Serrao JE, Melo AL (2010) Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron* 41:592–597.

Alves HS, Souza MFV, Chaves MC (2011) Three new compounds from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). *J of the Brazilian Chem Society* 8: 1610–1615.

Andrade Ochoa S, Correa Basurto J, Rodríguez Valdez LM, Sánchez Torres LE, Noguera Torres B, Nevárez Moorillón GV (2018) In vitro and in silico studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Chem Cent J* 53:12–53.

Autran ES, Neves IA, Silva CSB, Santos GKN, Câmara CAG, Navarro DMAF (2009) Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresour Technol* 100:2284–2288.

Agatonovic KS, Doyle E, Gegechkori V, Morton DW (2020) High-performance thin-layer chromatography linked with (bio)assays and FTIR-ATR spectroscopy as a method for discovery and quantification of bioactive components in native Australian plants. *J of Pharm and Biomed Analysis*, 184: 113-208.

Azevedo SG, Mar JM, da Silva LS, França LP, Machado MB, Tadei WP (2018) Bioactivity of *Licaria puchury-major* essential oil against *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Rec Nat Prod* 12:229–238.

Badolo A, Sombié A, Pignatelli PM, Sanon A, Yaméogo F, Wangrawa DW, Weetman D (2019) Insecticide resistance levels and mechanisms in *Aedes aegypti* populations in and around Ouagadougou, Burkina Faso. *PLOS Negl Trop Dis* 13:5.

Braga IA, Valle D. (2007) *Aedes Aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16:279-93.

Balasubramani S, Sabapathi G, Moola AK, Solomon RV, Venuvanalingam P, Diana RKB (2018) Evaluation of the leaf essential oil from *Artemisia vulgaris* and its larvicidal and repellent activity against dengue fever vector *Aedes aegypt* - an experimental and molecular docking investigation. *A C S Omega* 3:15657– 15665.

Benelli G, Iacono AL, Canale A, Mehlhorn H (2016a) Mosquito vectors and the spread of cancer: an overlooked connection? *Parasitol Res* 115:2131–2137.

Benelli G, Jeffries CL, Walker T (2016b) Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. *Insects* 7:1–18.

Benelli G, Beier JC (2017a) Current vector control challenges in the fight against malaria. *Acta Trop* 174:91–96.

Benelli G, Govindarajan M, Rajeswar M, Senthilmurugan S, Vijayan P, Alharbi NS, Khaled JM (2017b) Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including Zika virus vectors: the promising potential of (4E, 6Z)-allo-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate. *Parasitol Res* 116:1175–1188.

Benelli G, Pavela R, Canale A, Cianfaglione K, Ciaschetti G, Conti F, Maggi F (2017c) Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. *Parasitol Int* 66:166–171.

Benelli G, Rajeswary M, Govindarajan M (2018a) Towards green oviposition deterrents? Effectiveness of *Syzygium lanceolatum* (Myrtaceae) essential oil against six mosquito vectors and impact on four aquatic biological control agents. *Environ Sci Pollut Res* 25: 10218–10227.

Benelli G (2018b) Mode of action of nanoparticles against insects. *Environ Sci Poll Res*. 10:1356- 1362.

Benelli G, Duggan MF (2018c) Management of arthropod vector data social and ecological dynamics facing the one health perspective. *Acta Trop* 182:80-91.

Benelli G, Pavela R (2018d) Beyond mosquitoes – extracts plant toxicity and repellency against bloodsucking insects. *Ind Crops Prod* 117:382–392.

Benelli G, Maggi F, Pavela R, Murugan K, Govindarajan M, Vaseeharan B, Petrelli R, Cappellacci L, Kumar S, Hofer A, Youssefi MR, Alarfaj AA, Hwang JS, Higuchi A (2018e) Mosquito control with green nanopesticides: towards the one health approach? a review of non-target effects. *Environ Sci Poll Res* 10:13-56.

Benitez NP, León EMM, Stashenko EE (2009) Essential oil composition from two species of Piperaceae family grown in Colombia. *J Chromatogr Sci* 47:804–807.

Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81:3684–3690.

Borrero MA, Jonny E, Duque SC, Mendez S (2019) Insecticide design using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets in *Aedes aegypti*. *Comp Biochem Phys A* 229:108–664.

Botas G, Cruz R, Almeida F, Duarte J, Araújo R, Souto R, Fernandes C (2017) *Baccharis reticularia* DC. and limonene nanoemulsions: promising larvicidal agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control. *Molecules* 22:1990.

Brogdon W, Chan A (2010) Guideline for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay, 2nd edn. Center for Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Atlanta, p 30
https://www.fda.gov/content/download/71564/file/CDC_Bioassay.pdf. Accessed 21 September 2020

Bussi G, Donadio D, Parrinello M (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126:014–101.

Campos EVR, Oliveira JL, Abrantes DE, Rogério CB, Bueno E, Miranda VR, Fraceto LF (2020) Recent developments in nanotechnology for detection and control of *Aedes aegypti*-borne diseases. *Fron in Bioeng and Biotec* 8:22-29.

Carvalho D, McKemey A, Garziera L, Lacroix R, Donnelly CA, Alphey L, Capurro ML (2015) Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *Plos Neglect Trop D* 9:3864.

Castillo RM, Stashenko E, Duque JE (2017) Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes aegypti*. *J Am Mosquito Contr* 33:25–35.

Chaithong U, Choochote W, Kamsuk K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Chaiyasit D, Pitasawat B (2006) Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 31:138– 144.

Chansang U, Zahiri NS, Bansiddhi J, Boonruad T, Thongsrirak P, Mulla MS (2005) mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum* Vahl) from thailand. *J of vector ecol* 30:195-200.

Chaiyasit D, Choochote W, Rattanachanpichai E, Chaithong U, Chaiwong P, Jitpakdi A, Pitasawat B (2006) Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai Province, northern Thail. *Parasitol Res* 99:715.

Chellappandian M, Thanigaivel A, Vasantha-Srinivasan P, Edwin ES, Ponsankar A, Selin-Rani S, Benelli G (2018a) Toxicological effects of *Sphaeranthus indicus* Linn.(Asteraceae) leaf essential oil against human disease vectors, *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* Linn., and impacts on a beneficial mosquito predator. Environ Sci Pollut Res 25:10294–10306.

Chellappandian M, Vasantha-Srinivasan P, Senthil-Nathan S, Karthi S, Thanigaivel A, Ponsankar A, Hunter WB (2018b) Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. Environ Int 113:214–230.

Consoli RAGB, Lourenço O R (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil Fiocruz Rio de Janeiro 2:28.

Choochote W, Chaithong U, Kamsuk K, Rattanachanpichai E, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Tuetun B, Pitasawat B (2006) Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of three *Piper* spp. Rev do Inst de Med Trop 48:33-37.

Cruz SM, Caceres A, Alvarez L, Morales J, Apel MA, Henriques AT, Salamanca E, Gimenez A, Vasquez Y, Gupta MP (2011) Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variable* from Guatemala and bioactivity of the methanol extracts. Rev Bras de Farm 21:4-12.

Cruz RCD, Silva SLCE, Souza IA, Gualberto SA, Carvalho KS, Santos FR, Carvalho MG (2017) Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). J Med Entomol 54:985–993.

Daniel N, Ahmad FB, Assim Z, Chua HP (2019) Chemical constituents, antioxidant, and cytotoxicity of essential oils of *Piper arborescens* and *Piper caninum*. Malaysian J of Fund and Applied Sci 15: 825-830.

Dias CN, Moraes DFC (2014) Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides. Parasitol Res 113: 565–592.

Ding F, Fu J, Jiang D, Hao M, Lin G (2018) Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Acta Trop 178:155– 162.

Duarte JL, Amado JR, Oliveira AE, Cruz RA, Ferreira AM, Souto RN (2015) Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. J Rev Bras Farm 25:189–192.

Dunford CJ, Falconer A, Leite NL, Robert AW, Brogdon WA (2016) Determination of insecticidal effect (LC50 and LC90) of organic fatty acids mixture (C89101Silicone) against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 53:699–702.

Dyer DH, Lovell S, Thoden JB, Holden HM, Rayment I, Lan Q (2003) The structural determination of an insect sterol carrier protein-2 with a ligand-bound C16 fatty acid at 1.35-Å resolution. J Biol Chem 278:39085–39091.

Ellman KD, Courtney V, Andres JR, Featrstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharm 7:88–95.

Essmann U, Perera L, Berkowitz ML (1995) A smooth particle mesh Ewald method. J Chem Phys 103:8577–8593.

Ferreira SAF, Simões RC, Ferreira RL, Alencar J, Scarpassa VM, Tadei WP (2019) Scanning electron microscopy and geometric contour morphometry for identifying eggs of three amazonian species of *Mansonia* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 10:1–10.

Finney DJ (1971) Probit analysis. Cambridge University, London, pp 68–78.

Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H (2019) *Gaussian* 09:512.

Fujiwara GM, Annies V, Oliveira CF, Lara RA, Gabriel MM, Betim FCM, Zanin SMW (2017) Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/ linalool in combination against *Aedes aegypti*. *Ecotox Environ Safe* 139:238–244.

Garcez WS, Garcez FR, Silva LMG, Sarmiento UC (2013) Naturally occurring plant compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Rev virtual de Quím* 5:363–393.

Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, Lamballerie X (2017) Emerging arboviruses: why today? *One Health* 4:1–13.

GROMACS (2019) Groningen University. Available online: <http://www.gromacs.org>. Accessed 26 March 2020

Gupta R.C, Miller I.R, Malik J.K, Doss R.B, Dettbarn W.D & Milatovic D (2019) *Insect. Biom in Toxic* 26:455–475.

Harbach RE (2019) Mosquito Taxonomic Inventory (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>). Acesso em 21/ 01/ 2019.

Hematpoor A, Liew SY, Azirun MS, Awang K (2017) Insecticidal activity and the mechanism of action of three phenylpropanoids isolated from the roots of *Piper sarmentosum*. *Sci Rep* 7:1–13.

Hess B, Bekker H, Berendsen HJ, Fraaije JG (1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* 18: 1463–1472.

Huang J, MacKerell AD (2013) CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem* 34:2135–2145.

Huang YJ, Higgs S, Vanlandingham D (2017) Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. *Insect* 8:21.

Joly CA, Haddad CFB, Verdade LM, Oliveira MC, Bolzani VS, Berlinck RGS (2011) Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista USP* 89:27-39.

Kamal, M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM (2018) Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* under changing climate. *Plos one* 13:21-32.

Karunaratne P, Silva P, Weeraratne T, Surendran N. 2018. Insecticide resistance in mosquitoes: Development, mechanisms and monitoring. *Jour of Sci* 47: 299-309.

Komaiko J, McClements DJ (2015). Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *J Food Eng* 146:122–128.

Kirchmair J, Markt P, Distinto S, Wolber G, Langer T (2008) Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment

assessments, and decoy selection—what can we learn from earlier mistakes? *J Comput Aided Mol Des* 22:213–228.

Klimovich PV, Shirts MR, Mobley DL (2015) Guidelines for the analysis of free energy calculations. *J Comput Aided Mol Des* 29:397–411.

Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, Hendrickx G (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *eLife* 4:08–347.

Kumar R, Shanmugapriya B, Thiyagesan K, Kumar S, Xavier S (2010) A search for mosquito larvicidal compounds by blocking the sterol carrying protein, AeSCP-2, through computational screening and docking strategies. *Pharm Res* 2:247.

Larson RT, Wessely V, Jiang Z (2008) Larvicidal activity of sterol carrier Protein-2 in four species of mosquitoes. *J Med Entomol* 45:439–444.

Lavor PL, Santiago GMP, Gois RWS, Sousa LM, Bezerra GP, Romero NR, Arriaga AMC, Lemos TLG, Alves PB, Gomes PCS (2012) Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from north-east Brazil. *Nat Prod Commun* 7:10.

Lawler SP (2017) Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. *Ecotoxicology and environmental safety* 139:335-343.

Lee SJ, Kim JH, Lee SC (2018) Effects of oil-film layer and surfactant on the siphonal respiration and survivorship in the fourth instar larvae of *Aedes togoi* mosquito in laboratory conditions. *Sci Rep* 8:56–94.

Lee HS (2005) Pesticidal constituents derived from Piperaceae fruits. *Agric Chem and biotec* 48:65-74.

Leta S, Beyene TJ, De Clercq EM, Amenu K, Kraemer MU, Revie CW (2018) Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis* 67:25–35.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 23:3–25.

Lourenço OR, Pimenta DN, Cunha RV and Valle, D (2015) *Biologia e comportamento do vetor: Dengue teorias e práticas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1:76-92.

Luz TRS, Mesquita LSS, Amaral FMM & Coutinho DF (2020) Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae. *Acta Tropica* 212:105-705.

MacKerell AD, Vanommeslaeghe K (2020). University of Maryland. <https://cgenff.umaryland.edu/>. Accessed 30 March 2020

Makkar N, Prasanna SB, Singla H (2017) Comparative evaluation of antifungal activity of *Piper betel* leaf oil, *Origanum vulgare* essential oil and fluconazole suspension on *Candida albicans* an *in vitro* study. *J Indian Assoc Public Health Dent* 15:89-93.

Maajida A, Freen M & Thangavelu L (2019) Evaluation of anti- inflammatory action of *Laurus nobilis*-an *in vitro* studyf anti-inflammatory action of *Laurus nobilis*-an *in vitro* study. *J of Res in Pharm Sci* 10:1209–1213.

Majolo C, Monteiro P.C, Nascimento A.V.P, Chaves F.C.M, Gama E.P, Bizzo H, Chagas E. C (2019). Essential oils from five brazilian Piper species as antimicrobials against strains of *Aeromonas hydrophila*. J of essent oil bearing plants 16:746-761.

Mar M, Silva L, Azevedo S, França L, Goes A, Santos A (2018) *Lippia origanoides* essential oil: an efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. Ind Crops Prod 111:292–297.

Marques AC, Kaplan MA (2015) Active metabolites of the genus *Piper* against *Aedes aegypti*: natural alternative sources for dengue vector control. Univ Sci 20:1-61.

Mahian RA, Sani AM (2016) Essential oils in food systems: A systemic review. Int J of PharmTech Res 6:409–416.

Meyer BN, Ferrigini N, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med 45:31–34.

Monzote L, Scull R, Cos P, Setzer WN (2017) Essential oil from *Piper aduncum*: chemical analysis, antimicrobial assessment and literature review. Med 4:49.

Morais SM, Facundo VA, Bertini LM, Cavalcanti ESB, Anjos JF, Ferreira SA, Souza Neto MA (2007) Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. Biochem Syst Ecol 35:670–675.

Mossa ATH, Mohafrash SM, Chandrasekaran N (2018) Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals BioMed Res Int 2:17-28.

Monteiro HR, Pestana JL, Novais SC, Soares AM, Lemos MF (2019) Toxicity of the

insecticides spinosad and indoxacarb to the non-target aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci of The Total Env* 666:1283-1291.

Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, N LC, Koou SY, Dusfour I, Weetman D (2017) Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes vectors* of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis* 11:56-65.

Muthu C, Baskar K, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, Al-dhabi N.A (2015) Bioefficacy of pectolinarigenin from *Piper nigrum* Linn. against *Anopheles stephensi* and bhendi fruit borer, *Earias vittella* Fab. *Braz Arch Biol Technol* 58:358-366.

Muthu C, Reegan AD, Kingsley S, Ignacimuthu S (2012) Larvicidal activity of pectolinarigenin from *Piper nigrum* L. against *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* Say and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 111:1059-1065.

Ministério de Saúde – MS (2019) Notificação dos casos de Dengue no Brasil Boletim Eletrônico Epidemiológico Brasília 8:1-15.

Nagori K, Singh MK, Alexander A, Kumar T, Dewangan D, Badwaik H, Tripathi DK (2011) *Piper betle* L.: a review on its ethnobotany, phytochemistry, pharmacological profile and profiling by new hyphenated technique DART-MS (Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry). *J Pharm Res* 4:2991–2997.

Nascimento JCD, Paula VFD, David JM, David JP (2012) Occurrence, biological activities and ¹³C NMR data of amides from Piper (Piperaceae). *Quim Nova* 35:2288–2311.

Nascimento JCD, David JM, Barbosa LC, Paula VF, Demuner AJ, David JP, Guimarães EF (2013) Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC.(Piperaceae). *Pest Manag Sci* 69:1267–1271.

Navickiene HM, Morandim AD, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo DC, Telascrea M, Cavalheiro AJ, Lopes MN, Bolzani VD, Furlan M (2006) Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Quim Nova* 29:467–470.

Nawaz R, Rathor HR, Bilal H, Hassan SA, Khan IA (2011) Adulticidal activity of *Olea vera*, *Linum usitatissimum* and *Piper nigrum* against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* under laboratory conditions. *Iran J Arthropod Borne Dis* 5:2–9

NIST (2016) Standard reference data. Available online: <http://webbook.nist.gov/chemistry>. Accessed 12 April 2020

Nunes FC, Leite JA, Oliveira LHG, Sousa PAPS, Menezes MC, Moraes JPS, Braga VA (2015) The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. *Parasitol Res* 114:543–549.

Oliveira PV, Ferreira JC, Moura FS, Lima GS, Oliveira FM, Oliveira PES, Lemos RPL (2010) Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 107:403–407.

Oliveira A.E, Bezerra, D.C, Duarte J.L, Cruz R.A.S, Souto R.N.P, Ferreira R.M.A, Nogueira, J, Conceição E.C, Leitão S, Bizzo H.R (2016) Essential oil from *Pterodon*

emarginatus as a promising natural raw material for larvicidal nanoemulsions against a tropical disease vector. Chem Pharm 6:1–9.

Oliveira AEMFM, Duarte JL, Cruz RAS, Souto RNP, Ferreira MAF, Peniche T, Conceição EC, Oliveira LAR, Faustino SMM, Florentino AC, Carvalho JCT, Fernandes CP (2017) *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. J Nanobiotechnol 15:9–11.

Osanloo M, Sereshti H, Sedaghat MM & Amani A (2018) Nanoemulsion of Dill essential oil as a green and potent larvicide against *Anopheles stephensi*. Environ Sci and Pollut Res 25:6466–6473.

Osanloo M Amani A, Sereshti H, Abai MR, Esmaceli F, Sedaghat MM (2017) Preparation and optimization nanoemulsion of Tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil as effective herbal larvicide against *Anopheles stephensi* Ind Crop Prod 109:214–219.

Pacheco FV, Paula AR, Alvarenga IC, Bertolucci SK, Alvarenga AA, Pinto JE (2016) Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. Ind Crop Prod 85: 251–257.

Panphut W, Budsabun T & Sangsuriya P (2020) In vitro antimicrobial activity of *Piper retrofractum* fruit extracts against microbial pathogens causing infections in human and animals. J of Microbiol 1:1–6.

Parmar V.S, Jain S.C, Bisht K.S, Jain R, Taneja P, Jha A, Boll P.M (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochem 4:597–673.

Pavela R (2015) Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Ind Crop Prod* 76:174–187.

Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G (2019) Plant extracts for developing mosquito larvicides: from laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta Trop* 193:236–271.

Prakash B. (2018) Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control* 89:1–11.

Peng R, Fu Q, Hong H, Schwaegler T, Lan Q (2012) THAP and ATF-2 regulated sterol carrier Protein-2 promoter activities in the larval midgut of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One* 7: e46948

Perera H, Wijerathna T (2019) Sterol carrier protein inhibition-based control of mosquito vectors: current knowledge and future perspectives. *Can J Infect Dis Med Microbiol*:10:1–10:6.

Pino JA, Marbot R, Bello A, Urquiola A (2004) Composition of the essential oil of *Piper hispidum* Sw. from Cuba. *J Essent Oil Res* 16:459–460.

Pinto ACS, Nogueira KL, Chaves FCM, Silva LVS, Tadei WP, Pohlit AM (2012) Adulticidal activity of dillapiol and semi-synthetic derivatives of dillapiol against adults of *Aedes aegypti* (L.) (Culicidae). *Int J Mosq Res* 2:1–7.

Pinto I.C, Cerqueira, C.S, Santos E.P, Carmo F.A, and Ricci J.E (2017) Development and characterization of repellent formulations based on nanostructured hydrogels. *Drug Dev Ind Pharm* 43:67–73.

Pohlit AM, Quinard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto ACS, Alecrim AM (2004) Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amaz* 34:97–105.

Pohlit AM, Quinard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Hidalgo AF, Pinto ACS, Alecrim AM (2011) Patent Literature on Mosquito Repellent Inventions which Contain Plant Essential Oils – A Review *Planta Medica* 6:598-617.

Procópio TF, Fernandes KM, Pontual EV, Ximenes RM, Oliveira ARC, Souza CS, Melo AMMA, Navarro DMAF, Paiva PMG, Martins GF, Napoleão TH (2015) *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS One* 10:52-61.

Powell JR, Gloria SA, Kotsakiozi P (2018) Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. *BioSci* 68:854-860.

Radek JT, Dyer DH, Lah Q (2010) Effects of mutations in *Aedes aegypti* sterol carrier Protein-2 on the biological function of the protein. *BioChem* 49:7532–7541.

Rattan RS (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *J Crop Prot* 29:913–920.

Ramar M, Manonmani P, Arumugam P, Kannan S.K, Erusan R.R and Murugan K (2017) Nano-insecticidal formulations from essential oil (*Ocimum sanctum*) and fabricated in filter paper on adult of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *J Entomol Zool Stud* 5:1769–1774.

Riesna M, Hamid PH (2019) Larvicidal, adulticidal, and oviposition deterrent activity of Piper betle L. essential oil to *Aedes aegypti*. *Vet World* 12:367–371.

Robertson JL, Savin NE, Preisler HK (2007) Bioassays with arthropods, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, p 224

Roiz D, Wilson AL, Scott TW, Fonseca DM, Jourdain F, Müller P, Corbel V (2018) Integrated *Aedes* management for the control of Aedes-borne diseases. PLoS Neglect Trop D 12:45–68.

Rodrigues, I. A (2018) Development of nanoemulsions to enhance the antileishmanial activity of *Copaifera paupera* oleoresins. BioMed Res Inter2:8-18.

Salinas JL, Walteros DM Styczynski A, Garzón F, Quijada H, Bravo E, Chaparro P, Madero J, Reyes JA, Ledermann J, Arteta Z, Borland E, Burns P, Gonzalez M, Powers AM, Mercado M, solan A, Sejvar JJ, Ospina ML (2017) Zika virus disease-associated Guillain-Barré syndrome Barranquilla, Colombia 2015–2016. J Neurol Sci 381:272–277.

Santana H, Trindade F, Stabeli R, Silva A, Militão J, Facundo V (2015) Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Bras Planta Med 17:105–111.

Santos R, Marisco G (2017) Avaliação da atividade genotóxica, citotóxica e antimicrobiana da infusão das folhas de *Spondias purpurea* L. Sci Plena 3:1–9.

Sarita K, Radhika W, Naim W (2012) Larvicidal potential of methanol extracts of dried fruits of three species of Piper against different instars of an indian strain of dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Parasit Res 107: 901-907.

Sarwar M (2020) Experimental induction of insect growth regulators in controls of insect vectors as well as crops and stored products pests Specialty. J Agric Sci 6:

32–41.

Sayout A, Ouarhach A, Dilagui I, Soraa N & Romane A (2019) Antibacterial activity and chemical composition of essential oil from *Lavandula tenuisecta* Coss.ex Ball. an endemic species from Morocco. *European J of Int Med* 10:10-17.

Setzer WN, Park G, Agius BR, Stokes SL, Walker TM, Haber WA (2008) Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of twelve species of *Piper* from Monteverde, Costa Rica. *Nat Prod Commun* 3:1367–1374.

Shirts MR, Chodera JD (2008) Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. *Int J Chem Phys* 129:24–105.

Silva JKR (2011) Antioxidant capacity and larvicidal and antifungal activities of essential oils and extracts from *Piper krukoffii*. *Nat Prod Commun* 6:1361–1366.

Silva JKR (2014) Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Ind Crops Prod* 58:55–60.

Silva JK, Silva NN, Santana JF, Andrade EH, Maia JG, Setzer WN (2016) Phenylpropanoid-rich essential oils of *Piper* species from the Amazon and their antifungal and anti-cholinesterase activities. *Nat Prod Commun* 11:1907–1911.

Silva J, Trindade R, Alves N, Figueiredo P, Maia J, Setzer W (2017) Essential oils from Neotropical *Piper* species and their biological activities. *Int J Mol Sci* 18:25–71.

Silva LS, Mar JM, Azevedo SG, Rabelo MS, Bezerra JA, Campelo PH, Machado MB, Trovati G, Santos AL, Fonseca Filho HD, Souza T, Sanches EA (2018) Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatin nanoparticles: a

possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. J Sci Food Agric 12:1–11.

Silva WRD, Soares SJ, Ferreira FADS, Rodrigues IB, Tadei WP, Zequi, JAC (2018) Oviposition of *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 and *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) under laboratory and field conditions using ovitraps associated to different control agents, Manaus, Brazil. Rev Bras de Entomol 62:304-310.

Silvério MRS, Espindola LS, Lopes NP, Vieira PC (2020) Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. Molecules 25:34-84.

Simeone MLF, Mikich SB, Côcco LC, Hansel FA, Bianconi GV (2011) Chemical composition of essential oils from ripe and unripe fruits of *Piper amalago* L. Yunck and *Piper hispidum* Sw. J Essent Oil Res 23:54–58.

Simma EA, Dermauw W, Balabanidou V, Snoeck S, Bryon A, Clark RM, Van Leeuwen T (2018) Genome-wide gene expression profiling reveals that cuticle alterations and P450 detoxification are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles arabiensis* populations from Ethiopia. BioRxiv 45:13-36.

Souza TJT, Apel MA, Bordignon S, Matzenbacher NI, Zuanazzi JAS, Henrique AT (2007) Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. Revista Brasileira de Farmacognosia 3:368-372.

Soonwera M, Phasomkusolsil S (2017) Adulticidal, larvicidal, pupicidal and oviposition deterrent activities of essential oil from *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae)

against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Asian Pac J Trop Biomed 7:967–978.

Soyer P & Tunali Y (2019) Determination of antimicrobial and biological activities of *Salvia sclarea* L. (Lamiaceae) extracts. J of the Chem Society 6:15–20.

Sutiningsih D, Mustofa M, Satoto TBT, Martono E (2018) Morphological and histological effects of bruceine A on the larvae of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). Asian J Pharm Clin Res 11:422–427.

Scott I.M, Jensen H.R, Philogène B.J.R, Arnason J.T (2008) A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. Phytochem Rev 7: 65-75.

Takooree H, Aumeeruddy M.Z, Rengasamy K.R.R, Venugopala K.N, Jeewon R, Zengin G & Mahoomodally M.F (2019) A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. In Food Sci and nutrition 1:1-34.

Takeara R, Gonçalves R, Ayres VFS, Guimarães AC (2017) Biological properties of essential oils from the *Piper* species of Brazil: a review. Arom Med Pl B Nat 2:81–93.

Tadei WP, Santos JMM, Rodrigues IB, Rafael MS (2010) Pesquisa Científica e Tecnológica em saúde: Laboratório de vetores Malaria e Dengue. Ministério da Ciência e Tecnologia 2:3-8.

Tennyson S, Arivoli S, Raveen R, Bobby M, Dhinamala K (2012) Larvicidal activity of *Areca catechu*, *Nicotiana tabacum* and *Piper betle* leaf extracts against the dengue vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J of Res in Biol Sci 2:157-160.

Thomas MB (2018) Biological control of human disease vectors: a perspective on challenges and opportunities. *BioControl* 63:61–69.

Valbon WR, Haddi K, Souza RA, Carvalho GA, Guedes RNC, Martins GF, Oliveira EE (2019) “Armed to the teeth”: The multiple ways to survive insecticidal and predatory challenges in *Aedes aegypti* larvae. *Pest Bioch and Phys* 156: 87-95.

Vasanth-Srinivasan P, Senthil-Nathan S, Ponsankar A, Thanigaivel A, Edwin E, Selin-rani S, Chellappandian M, Pradeepa V, Lija-Escaline J, Kalaivani K (2017) Comparative analysis of mosquito (Diptera: Culicidae: *Aedes aegypti* liston) responses to the insecticide temephos and plant derived essential oil derived from *Piper betle* L. *Ecotoxicol Environ Saf* 139:439–446.

Walter Reed Biosystematics Unit W.R.B.U (2019) Mosquito identification resources. Disponível em: <http://www.wrbu.org/VecID_MQ.html. Acesso em: 21 de janeiro de 2019.

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. 5a. edition, Geneva 1:25 WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/ 2005.13. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>. Accessed 10 February 2019

World Health Organization - WHO (2006) Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. 6a. edition, Geneva 1:114 WHO/CDS/NTD/WHOPES/ GCDPP/2006. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69296>. Accessed 10 February 2019

World Health Organization - WHO (2019a) Chikungunya. Disease outbreak News. <https://www.who.int/chikungunya/epidemiology>. Accessed 10 Feb 2019

World Health Organization - WHO (2019b) Countries and territories with current or previous Zika virus transmission. Disease outbreak News <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika>. Accessed 10 Feb 2019

World Health Organization - WHO (2019c) Dengue control: epidemiology. Disease outbreak News. <https://www.who.int/denguecontrol/epidemiology>. Accessed 10 Feb 2019

World Health Organization - WHO (2019d) Yellow fever—Brazil. Disease outbreak News. <https://www.who.int/yellowfever/epidemiology>. Accessed 15 February 2019

Xiang CP, Han JX, Li XC, Li YH, Zhang Y, Chen L, Xu M (2017) Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils from Piper Species. *J Sci Food Agric* 65:3702–3710.

Yu KX, Wong CL, Ahmad R, Jantan I (2015) Mosquitocidal and oviposition repellent activities of the extracts of seaweed *Bryopsis pennata* on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Molecules* 20: 14082–14102.

Yuncker TG (1973) The Piperaceae of Brazil. I. *Piper*-Group I, II, III, IV. *Hoehnea* 2: 19- 366.

Zahid K, Shakoor S, Sajid HA, Afzal S, Ali L, Amin I, Idrees M (2020) Advancements in developing an effective and preventive dengue vaccine. *Futur Virol* 15:127–138.

Zhao H (2016) An in vitro AChE inhibition assay combined with UF-HPLC-ESIQ-TOF/MS approach for screening and characterizing of AChE inhibitors from roots of *Coptis chinensis* Franch. J of Pharm and Bio Anal 120: 235–240.

Zappi DC, Filardi FLR, Leitman P, Souza VC, Walter BMT, Pirani JR, Mansano VF (2015) Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. Rodriguésia 66:1085–1113.

Zdobnov EM, von Mering C, Letunic I, Torrents D, Suyama M, Copley RR, Christophides GK, Thomasova D, Holt RA, Subramanian GM, Mueller HM, Dimopoulos G, Law JH, Wells MA, Birney E, Charlab R, Halpern AL, Kokoza E, Kraft CL, Lai Z, Lewis S, Louis C, Barillas-Mury C, Nusskern D, Rubin GM, Salzberg SL, Sutton GG, Topalis P, Wides R, Wincker P, Yandell M, Collins FH, Ribeiro J, Gelbart WM, Kafatos FC, Bork P (2002) Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. Science 298:149–159.

Zou X, Sun Y, Kuntz ID (1999) Inclusion of solvation in ligand binding free energy calculations using generalized-Born model. J Am Chem Soc 121:8033–8043.

8. ANEXO

ARTIGO PUBLICADO



Piper capitarium essential oil: a promising insecticidal agent for the management of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*

Leandro P. França¹ · Ana Claudia F. Amaral² · Aline de S. Ramos² · José Luiz P. Ferreira² · Ana Clara B. Maria² · Kelson Mota T. Oliveira³ · Earle S. Araujo Jr³ · Adjane Dalvana S. Branches³ · Jonathas N. Silva³ · Noam G. Silva³ · Gabriel de A. Barros³ · Francisco Célio M. Chaves⁴ · Wanderli P. Tadei⁵ · Jefferson Rocha de A. Silva¹

Received: 6 August 2020 / Accepted: 5 October 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Mosquitoes are responsible for serious public health problems worldwide, and as such, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are important vectors in the transmission of dengue, chikungunya, and Zika in Brazil and other countries of the world. Due to growing resistance to chemical insecticides among populations of vectors, environmentally friendly strategies for vector management are receiving ever more attention. Essential oils (EOs) extracted from plants have activities against insects with multiple mechanisms of action. These mechanisms hinder the development of resistance, and have the advantages of being less toxicity and biodegradable. Thus, the present study aimed to evaluate the chemical composition of the EOs obtained from *Piper capitarium* Yunck, as well as evaluating their insecticidal potential against *Aedes aegypti* and *A. albopictus*, and their toxicity in relation to *Artemia salina*. The yields of the EOs extracted from the leaves, stems, and inflorescences of *P. capitarium* were 1.2%, 0.9%, and 0.6%, respectively, and their main constituents were trans-caryophyllene (20.0%), α -humulene (10.2%), β -myrcene (10.5%), α -selinene (7.2%), and linalool (6.0%). The EO from the inflorescences was the most active against *A. aegypti* and *A. albopictus*, and exhibited the respective larvicidal ($LC_{50} = 87.6 \mu\text{g/mL}$ and $76.1 \mu\text{g/mL}$) and adulticide activities ($LC_{50} = 126.2 \mu\text{g/mL}$ and $124.5 \mu\text{g/mL}$). This EO was also the most active in the inhibition of AChE, since it presented an IC_{50} value of $14.2 \mu\text{g/mL}$. Its larvicidal effect was observed under optical and scanning electron microscopy. Additionally, non-toxic effects against *A. salina* were observed. Docking modeling of trans-caryophyllene and α -humulene on sterol carrier protein-2 (SCP-2) suggests that both molecules have affinity with the active site of the enzyme, which indicates a possible mechanism of action. Therefore, the essential oil of *P. capitarium* may be used in the development of new insecticide targets for the control of *A. aegypti* and *A. albopictus* in the Amazonian environment.

Keywords Piperaceae · Natural insecticide · Terpenoids · Dengue · Larvicidal · Morphology · Neglected diseases

Responsible Editor: Giovanni Benelli

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11148-6>.

✉ Jefferson Rocha de A. Silva
jrocha_01@yahoo.com.br

¹ Chromatography Laboratory, Chemistry Department, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil

² Laboratory of Medicinal Plants and Derivatives, Department of Chemistry of Natural Products, Famanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Laboratory of Theoretical and Computational Chemistry, Chemistry Department, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil

⁴ Western Amazon Embrapa, Rodovia AM 10, s/n, Km 29, Manaus, AM, Brazil

⁵ Laboratory of Malaria and Dengue, Institute for Research in the Amazon, Manaus, AM, Brazil

Published online: 06 November 2020

Springer