

Produção e Controle de Produtos Naturais

Natiéli Piovesan
Vanessa Bordin Viera
(Organizadoras)

some

 **Atena**
Editora

Ano 2018

NATIÉLI PIOVESAN
VANESSA BORDIN VIERA
(Organizadores)

Produção e Controle de Produtos Naturais

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof^a Dr^a Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof^a Dr^a Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natíeli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^a Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

P964 Produção e controle de produtos naturais [recurso eletrônico] /
Organizadoras Natíeli Piovesan, Vanessa Bordin Viera. – Ponta
Grossa (PR): Atena Editora, 2018.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-85107-59-8

DOI 10.22533/at.ed.598181510

1. Biodiversidade. 2. Plantas – Cultivo e manejo. I. Piovesan,
Natíeli. II. Viera, Vanessa Bordin.

CDD 577.27

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

O Brasil possui uma das floras mais ricas e diversificadas do mundo – quase 19% da flora mundial. Nosso conhecimento sobre a diversidade, o cultivo e os benefícios que as plantas, frutos e sementes podem proporcionar ainda são incompletos. Dessa forma ressaltamos a importância de se continuar a explorar e conhecer o potencial que a flora brasileira possui.

Nesse intuito o e –book Produção e Controle de Produtos Naturais é composto por 13 artigos científicos que abordam assuntos de extrema importância relacionados à flora brasileira. O leitor irá encontrar assuntos que abordam temas como a atividade toxicológica de fungos, a composição química, biológica, atividade antioxidante, alelopática, citotóxica, anticitotóxica, teor de fenólicos totais e teor de flavonoides totais de plantas, além de fatores que podem ter influência sobre esses aspectos.

O e-book Produção e Controle de Produtos Naturais também apresenta artigos com intuito de orientação e incentivo ao uso, cultivo e manejo de plantas medicinais, além de temas relacionados à Gestão Ambiental e Sustentabilidade.

Diante da importância de discutir a biodiversidade, os artigos relacionados neste e-book, visam disseminar o conhecimento acerca da constituição da flora brasileira e promover reflexões sobre os temas. Por fim, desejamos a todos uma excelente leitura!

Natiéli Piovesan e Vanessa Bordin Viera

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANIDROCOCHLIOQUINONA A E ATIVIDADE ANTAGONISTA DO FUNGO ENDOFÍTICO <i>BIPOLARIS</i> SP. ASSOCIADO A <i>CYMBOPOGON NARDUS</i>	
<i>Vanessa Mara Chapla</i> <i>Sara Bruna Sousa Dantas</i> <i>Gabriel Leda de Arruda</i> <i>Aloísio Freitas Chagas Junior</i>	
CAPÍTULO 2	12
A PODA DO SISTEMA RADICULAR MELHORA A QUALIDADE DAS PLANTAS DE CACAU (<i>THEOBROMA CACAO</i> L.; MALVACEAE)	
<i>Luana Linhares Negreiro</i> <i>Dheyson Prates da Silva</i> <i>Iselino Nogueira Jardim</i>	
CAPÍTULO 3	15
ATIVIDADE ALELOPÁTICA E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE <i>METRODorea nigra</i> A. ST. HILL	
<i>Rodrigo de Souza Miranda</i> <i>Roberto Carlos Campos Martins</i> <i>Naomi Kato Simas</i> <i>Anne Caroline Candido Gomes</i>	
CAPÍTULO 4	29
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA (<i>COPAIFERA</i> SP.) COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE MARABÁ-PARÁ POR GC-MS	
<i>Danielle Rodrigues Monteiro da Costa</i> <i>Simone Yasue Simote Silva</i> <i>Sebastião da Cruz Silva</i> <i>João Marcos Dichtl Oliveira</i> <i>Ianara Viana Vieira</i> <i>Mayra Ellen dos Santos Neres</i>	
CAPÍTULO 5	42
<i>BAUHINIA</i> SP. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE SAZONALIDADE INDUZ ATIVIDADE ANTICÂNCER EM SARCOMA-180 <i>IN VITRO</i>	
<i>Judá Ben-Hur de Oliveira</i> <i>Jean Carlos Vencioneck Dutra</i> <i>Suiany Vitorino Gervásio</i> <i>Mirieli Bernardes Xavier</i> <i>Paula Roberta Costalonga Pereira</i> <i>Mainã Mantovanelli da Mota</i> <i>Maria do Carmo Pimentel Batitucci</i>	
CAPÍTULO 6	60
CHEMICAL PROFILE OF CRUDE EXTRACTS OF <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> BIOMASSES CULTIVATED IN DIFFERENT CULTURE MEDIA	
<i>Laura Patrício de Almeida Nunes Cavalcanti</i> <i>Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira</i> <i>Roberto Carlos Campos Martins</i>	
CAPÍTULO 7	69
<i>CORIANDRUM SATIVUM</i> EM ESTÁDIO VEGETATIVO E FLORAÇÃO INDUZ ATIVIDADE ANTICÂNCER <i>IN VITRO</i>	
<i>Vanessa Silva dos Santos</i> <i>Jean Carlos Vencioneck Dutra</i>	

Suíany Vitorino Gervásio
Paula Roberta Costalonga Pereira
Mainã Mantovanelli da Mota
Patrícia Carara dos Santos
Maria do Carmo Pimentel Batitucci

CAPÍTULO 8 83

CULTIVO E USO DAS PLANTAS MEDICINAIS TRADICIONAIS NA COMUNIDADE IPAMERINA, GOIÁS

Marcos Vinícios Faleiro
Wesley Costa Silva
Mateus de Sousa Mendes Alves do Nascimento
Alcione da Silva Arruda
Nivaldo Estrela Marques

CAPÍTULO 9 97

FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA: PRODUÇÃO DE EXTRATOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PASSIFLORAE*

Daiane Cristina Sass
Gabrielle Vieira
Jelena Puríc
Vítor Rodrigues Marin

CAPÍTULO 10 106

IRIDOIDES E CUMARINAS DO CAULE DE *TOCOYENA HISPIDULA*

Elcilene Alves de Sousa
Mariana Helena Chaves
Luanda Ferreira Floro da Silva
Gerardo Magela Vieira Júnior
Buana Carvalho de Almeida
Ruth Raquel Soares de Farias

CAPÍTULO 11 120

O GÊNERO *VIROLA* NO BRASIL: NEOLIGNANAS E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Luana Carvalho Batista
Maria Raquel Garcia Vega

CAPÍTULO 12 137

PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO EM N-HEXANO DE FOLHAS DE *PIPER SOLMSIANUM* C.DC. E AVALIAÇÃO CONTRA LARVAS DE *AEDES AEGYPTI*

Arthur Ladeira Macedo
Rodrigo Coutinho Duprat
Larissa Ramos Guimarães da Silva
Davyson de Lima Moreira
Maria Auxiliadora Coelho Kaplan
Thatyana Rocha Alves Vasconcelos
Laine Celestino Pinto
Raquel Carvalho Montenegro
Norman Arthur Ratcliffe
Cícero Brasileiro Mello
Alessandra Leda Valverde

CAPÍTULO 13 153

UMA INTER-RELAÇÃO POSSÍVEL: PLANTAS MEDICINAIS, GESTÃO AMBIENTAL, DESENVOLVIMENTO E SUSTENTABILIDADE

Viviane Mallmann
Lucas Wagner Ribeiro Aragão
Roberta Fernanda Ribeiro Aragão

Edineia Messias Martins Bartieres
Valdeci José Pestana
Shaline Séfara Lopes Fernandes
Rogério César de Lara da Silva

SOBRE AS ORGANIZADORAS..... 169

PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO EM N-HEXANO DE FOLHAS DE *PIPER SOLMSIANUM* C.DC. E AVALIAÇÃO CONTRA LARVAS DE *AEDES AEGYPTI*

Arthur Ladeira Macedo

UFF, Instituto de Química
Niterói - RJ

Rodrigo Coutinho Duprat

UFF, Instituto de Biologia
Niterói - RJ

Larissa Ramos Guimarães da Silva

UFF, Instituto de Química
Niterói - RJ

Davyson de Lima Moreira

Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos -
Farmanguinhos
Rio de Janeiro - RJ

Maria Auxiliadora Coelho Kaplan

UFRJ, Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais
Rio de Janeiro - RJ

Thatyana Rocha Alves Vasconcelos

UFF, Instituto de Química
Niterói - RJ

Laine Celestino Pinto

UFPA, Instituto de Biociências
Belém - PA

Raquel Carvalho Montenegro

UFC, Faculdade de Medicina
Fortaleza - CE

Norman Arthur Ratcliffe

Swansea University, Department of Biosciences
Swansea – Glamorgan, Reino Unido

Cícero Brasileiro Mello

UFF, Instituto de Biologia
Niterói - RJ

Alessandra Leda Valverde

UFF, Instituto de Química
Niterói - RJ

RESUMO: O mosquito *Aedes aegypti* é um dos principais vetores de arboviroses e os inseticidas utilizados no seu controle são tóxicos e não são totalmente efetivos. O gênero *Piper* apresenta diversas substâncias ativas contra artrópodes, incluindo as neolignananas. O presente trabalho avaliou o potencial larvicida do extrato bruto *n*-hexânico de folhas de *Piper solmsianum* (PS) e do eupomatenóide-6 contra *Ae. aegypti*. O extrato PS apresentou boa atividade contra larvas de terceiro estágio e eupomatenóide-6 exibiu DL₅₀ de 19,33 µM, sendo a substância mais ativa contra *Ae. aegypti* já isolada de uma espécie de *Piper*. Eupomatenóide-6 foi também analisado quanto à sua toxicidade e apresentou boa seletividade. Foi desenvolvido e validado um método por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de ultravioleta-visível em rede de diodos (CLAE-DAD) para a determinação de eupomatenóide-6 em PS, sendo o extrato padronizado em 23,45 ± 0,58 mg da substância/g. Dessa forma, a DL₅₀ de PS corresponde a uma dose cerca de quatro vezes menor que a DL₅₀ de eupomatenóide-6, indicando a presença de outras substâncias ativas. Foi demonstrado que PS apresenta

grande potencial para uso como inseticida contra *Ae. aegypti*, uma vez que sua substância majoritária apresenta ótima atividade e seletividade. O método analítico desenvolvido apresenta diversas vantagens sobre o descrito anteriormente na literatura.

PALAVRAS-CHAVE: Larvicida, Neolignanas, Padronização, Piperaceae, Toxidez.

ABSTRACT: The *Aedes aegypti* mosquito is one of the major vectors of arboviruses and the insecticides used are toxic and have not been effective. The genus *Piper* has many active compounds against arthropods, including neolignans. The present study evaluated the larvicidal potential of the *n*-hexanic crude extract of leaves of *Piper solmsianum* (PS) and of eupomatenoid-6 against *Ae. aegypti*. PS showed good activity against 3rd instar larvae and eupomatenoid-6 exhibited LD₅₀ of 19.33 µM, being the most active compound against *Ae. aegypti* isolated from *Piper* sp. Eupomatenoid-6 was also assayed to its toxicity and exhibited great selectivity. A High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) method for the determination of eupomatenoid-6 in PS was validated and the extract was standardized in 23.45 ± 0.58 mg of eupomatenoid-6 per gram of extract. Therefore, the LD₅₀ of PS corresponds to a dose of eupomatenoid-6 about 4 times smaller than the isolated compound, indicating the presence of other active substances. In conclusion, we found that PS has a great potential for use as insecticide against *Ae. aegypti* once its major compound is very active and selective. The analytical method developed has many advantages over the previously reported in scientific literature.

KEYWORDS: Larvicidal, Neolignans, Piperaceae, Standardization, Toxicity.

1 | INTRODUÇÃO

O artrópode *Aedes aegypti* (Culicidae) é um inseto adaptado ao ambiente urbano, local onde encontra-se a principal fonte de alimentação das fêmeas, o sangue humano. Esse mosquito é considerado o principal vetor de diversas arboviroses nas regiões tropicais e subtropicais. Dentre as arboviroses transmitidas estão a dengue (DENV) e as febres chikungunya (CHIV) e zika (ZIKV) (MUSSO; GUBLER, 2016).

Nos últimos 40 anos vêm ocorrendo o ressurgimento de várias dessas arboviroses, afetando em grande escala os seres humanos. Além dos transtornos causados por esses vírus, diversas complicações podem ocorrer: a dengue pode evoluir para quadro hemorrágico, podendo levar o paciente a choque hipovolêmico e morte, as infecções por CHIV podem levar a quadros de artralgia incapacitante crônica e, quanto ao ZIKV, existem fortes indícios de que esteja ligado ao surgimento da Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e microcefalia em neonatos (MUSSO; GUBLER, 2016).

Não existe tratamento específico para essas arboviroses, sendo este feito sobre os sintomas. Recentemente foi lançada uma vacina contra DENV (Dengvaxia®), mas ainda não existem vacinas para ZIKV e CHIV. De maneira geral, a melhor forma de

prevenção contra essas arboviroses é o combate ao *Ae. aegypti*. A recente expansão de DENV, CHIV e ZIKV destaca a ineficiência dos métodos atuais de controle deste vetor (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2015).

Um dos motivos complicadores no controle do vetor *Ae. aegypti* é a sua domesticação. O fato de ele estar associado à presença de seres humanos restringe o leque de inseticidas que podem ser utilizados, uma vez que muitos deles apresentam grande toxicidade contra mamíferos (NESHEIM; FISHEL; MOSSLER, 2014). Outro problema é o surgimento de cepas resistentes, como relatado por Chediak et al. (2016). Esses autores reportaram o aumento da resistência com o passar dos anos, onde, desde 2010, o temefós vem apresentando mortalidade de menos de 80% dos mosquitos na maioria das regiões brasileiras, caracterizando sua ineficiência. Assim, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de novos métodos efetivos de controle do vetor *Ae. aegypti*.

Para suprir essa necessidade, pesquisas por novas alternativas naturais de controle que tenham menor impacto na saúde humana e de outros animais têm sido realizadas (BENELLI, 2015). Nesse contexto, as plantas do gênero *Piper* produzem um arsenal de substâncias ativas contra artrópodes. As neolignananas se destacam nesse cenário, especialmente contra mosquitos (MACEDO; DOS SANTOS; et al., 2017).

As neolignananas isoladas de espécies de *Piper* apresentam diversas atividades biológicas, sendo as benzofurânicas as mais exploradas (MACEDO; DOS SANTOS; et al., 2017). No que concerne a atividade larvicida, eupomatenoide-5 (**1**), eupomatenoide-6 (**2**), conocarpano (**3**) e decurrenal (**4**) foram testados contra larvas de *Aedes atropalpus* e apenas **4** não apresentou toxicidade significativa (CHAURET et al., 1996). Burchelina (**5**) foi tóxica para larvas de *Ae. aegypti*, causando desorganização e destruição celular, ruptura do tecido muscular e vacuolização de células epiteliais do intestino (Figura 1) (NARCISO et al., 2014).

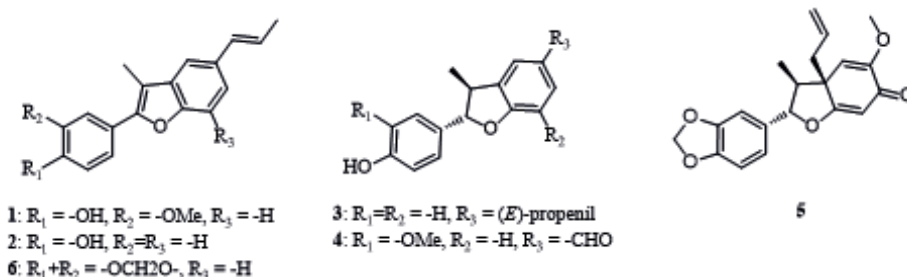


Figura 1 – Algumas neolignananas com núcleo benzofurânico isoladas de espécies de *Piper*.

Piper solmsianum C.DC. é um arbusto nativo e endêmico do Brasil, conhecido popularmente como caapeba ou jaguarandi (Figura 2). A partir de extratos dessa espécie já foram obtidas as neolignananas benzofurânicas **1**, **2**, **3**, eupomatenoides-3 (**6**), além de outras substâncias como neolignananas tetraidrofurânicas, flavonoides e o arilpropenoide apiol (MARTINS et al., 2000; MOREIRA; KAPLAN; GUIMARAES, 1995; SILVA et al., 2010).

O objetivo deste trabalho consistiu no isolamento bioguiado para avaliação do potencial citotóxico e larvicida do extrato em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum* e do eupomatenóide-6, bem como no desenvolvimento e validação de um método para quantificação desta neolignana.

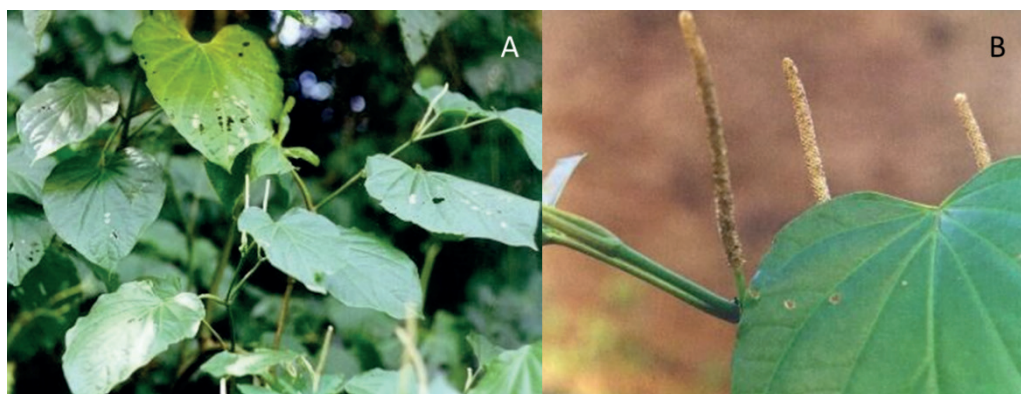


Figura 2 – *Piper solmsianum* C.DC.: (A) arbusto, (B) detalhe das inflorescências.

Fonte: Davyson de Lima Moreira

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato

Folhas de *Piper solmsianum* C.DC. foram coletadas em propriedade privada, próxima ao Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Guapimirim/RJ (GPS 22.480502 °S 42.996839 °O), em agosto de 2009. A espécie foi identificada pela especialista em Piperaceae Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) e uma exsiccata foi depositada no Herbário do JBRJ sob o número RB306112.

As folhas foram secas a 40 °C em estufa ventilada até atingirem peso constante (600 g). O material vegetal seco foi triturado, extraído por maceração estática com *n*-hexano e o solvente foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida, rendendo 20,1 g de extrato seco (PS).

2.2 Isolamento de substâncias do extrato de *Piper solmsianum*

Uma alíquota de 20 g do extrato de PS foi submetida à cromatografia líquida a vácuo (CLV - partícula 5-25 µm) em funil sinterizado, onde foram obtidas 18 frações. As frações PS-2 a 5 foram reunidas (5,07 g) e submetidas à cromatografia em coluna de gel de sílica, com auxílio de uma bomba Waters 510 (partícula 5-25 µm), eluída com gradiente de polaridade, rendendo 27 frações. Dessas frações, reuniu-se de 8-11 (711 mg) que foram novamente cromatografadas em cromatografia *Flash* (partícula 40-63 µm), sendo obtidas 10 frações. Dessas frações juntou-se de 5-7 (131 mg) que foram posteriormente separadas em CLAE-DAD (equipamento Waters® constituído de duas bombas modelo 510; detector de arranjo de fotodiodos (DAD) modelo 996 e injetor

manual) preparativo utilizando coluna Supelcosil C-8 (250 x 21,2 mm, 12 µm) com fase móvel composta por 80% de metanol e 20% de água ultra pura acidificada com 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA), vazão de 3 mL/min. Foram recolhidas duas frações **A** (13 mg) e **B** (51 mg).

2.3 Elucidação estrutural

As análises por cromatografia com fase gasosa (CG) foram realizadas em equipamento Hewlett-Packard 6890 acoplado ao espectrômetro de massas (EM) Hewlett-Packard 5972, utilizando-se coluna DP-5MS (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano) capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura da camada), tendo Hélio como gás de arraste, com vazão de 0,5 mL/min, por 60 min. A temperatura inicial foi de 70 °C com taxa de aquecimento de 5 °C/min até atingir 315 °C, mantendo essa temperatura até o final da análise. A temperatura do injetor foi 270 °C e a do forno 300 °C. Os parâmetros de operação do EM foram: 70 eV, fonte de íons a 250 °C, com o quadrupolo configurado para selecionar íons com m/z de 40 a 700.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro Varian VNMRS 500 MHz, operando a 500 MHz para frequência de ^1H e 125 MHz para ^{13}C , tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS), para ^1H e ^{13}C (0 ppm).

2.4 Teste larvicida

Os ovos de *Ae. aegypti*, cepa Rockefeller, foram fornecidos pelo Dr. José Bento Pereira Lima, do Instituto de Biologia do Exército Brasileiro e Fundação Oswaldo Cruz. A eclosão foi feita em água de criação por aproximadamente 60 min. Em seguida, as larvas foram colocadas em recipientes plásticos (25 x 15 x 7 cm) contendo 1 mL de água desclorada e 1 mg de ração em pó para peixe por larva. As larvas foram mantidas em estufas BOD a 26 ± 1 °C por 72 a 78 h.

As unidades experimentais foram formadas por grupos de 10 larvas de terceiro estágio acondicionadas em copos plásticos de 50 mL contendo 10 mL de água desclorada cada. Os copos foram então organizados em grupos de maneira aleatória, com auxílio do programa PASS 11.0.10 para Windows, pela implementação do algoritmo “random sorting” (HINTZE, 2011).

Para avaliar o extrato de *P. solmsianum*, dois grupos formados por seis replicatas foram submetidos a doses de 50 e 100 µg/mL. Subsequentemente foi realizado um experimento de dose x resposta utilizando **B** para o cálculo da dose letal de 50 (DL_{50}), 90 (DL_{90}) e 99 (DL_{99}), variando-se a concentração entre 11,35 e 30,27 µM (3 e 8 µg/mL). Grupos com diferentes concentrações de **B** foram formados com quatro replicatas cada. Este estudo foi realizado em duplicata para o cálculo dos valores de DL (MACEDO; DUPRAT; et al., 2017).

2.5 Análise dos dados

Os resultados são mostrados como média aritmética da porcentagem de cada replicata de acordo com os grupos experimentais ao longo dos dias. As barras de erro representam o erro padrão da média.

A comparação das curvas de desenvolvimento das larvas a adultos foi feita pelo teste estatístico de Gehan-Breslow-Wilcoxon ($p \leq 0,05$) no *software* GraphPad Prism 6,05 para Windows. Os valores de p gerados foram validados no *software* PAST, versão 3,14 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Os valores de DL foram calculados por análise de probit (RAYMOND, 1985).

2.6 Ensaio de citotoxicidez

A atividade metabólica (viabilidade) das células MRS5 foi analisada utilizando o método de MTT (MOSMANN, 1983). As células foram semeadas em placas de 96 poços em concentração de 5×10^4 células/poço e deixadas em estufa por 24 h. O meio de cultura foi então aspirado e substituído por um fresco. As células retornaram para a estufa incubadora na presença dos diferentes extratos e partições e foram incubadas por 48 h. Após esse período, o reagente de MTT foi adicionado e as placas foram incubadas por mais 3,5 h. O sobrenadante foi novamente retirado, os cristais de formazan foram dissolvidos em solução a base de isopropanol (4 mM de HCl e 0,1% de Nondet P-40) e a absorbância medida a 560 nm em espectrofotômetro de microplaca EPOCH. A substância **B** foi testada entre 7,8 e 500 $\mu\text{g/mL}$ e em triplicata.

2.7 Validação do método de CLAE-DAD e padronização do extrato em *n*-hexano

A padronização foi feita por CLAE-DAD utilizando sistema Flexar SQ 300 equipado com coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm x 4,6 mm i.d., 3,5 μm , tamanho de partícula), fase móvel composta por 65% de acetonitrila e 35% de água acidificada com 0,05% de TFA, com vazão de 0,8 mL/min e temperatura de forno de 30 °C. O volume de injeção foi de 10 μL e a análise foi acompanhada em 254 nm por 4,5 min.

A substância **B** foi utilizada para a construção da curva analítica de oito pontos (10 a 140 ng/mL). O método foi validado de acordo com o manual do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, sendo avaliados o intervalo de trabalho e linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), efeito de matriz, precisão e robustez (INMETRO, 2016).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do extrato obtido com *n*-hexano de *P. solmsianum* (PS), foi feita uma série de cromatografias para o isolamento das substâncias **A** e **B**.

Em análise por CG-EM da fração **A**, foi encontrado um sinal único com tempo de retenção (tR) de 37,28 min e íon molecular de m/z 266, sugerindo fórmula molecular

de $C_{18}H_{18}O_2$. Já na análise da fração **B** foi encontrado um sinal único com tR de 40,05 min e íon molecular de m/z 264, sugerindo fórmula molecular de $C_{18}H_{16}O_2$.

Os dados de RMN 1H e ^{13}C permitiram identificar as substâncias **A** e **B** como as neolignan conocarpano (**3**) e eupomatenoide-6 (**2**) (Tabela 1) respectivamente, quando comparados com dados da literatura (PESSINI et al., 2005). Os espectros de correlação homonuclear 1H - 1H COSY e heteronucleares 1H - ^{13}C HSQC e HMBC confirmaram as estruturas propostas.

#C/H	1H (m, J em Hz, nH) (B)	1H (nH, m, J em Hz) (A)	^{13}C (m)* (B)	^{13}C (m) (A)
1	-	-	124,2 (C)	133,16 (C)
2/6	7,68 (d, J = 8,7, 2H)	7,29 (d, J = 8,5, 2H)	128,3 (CH)	128,06 (CH)
3/5	6,94 (d, J = 8,6, 2H)	6,83 (d, J = 8,6, 2H)	115,4 (CH)	115,65 (CH)
4	-	-	155,4 (C)	155,79 (C)
7	-	5,08 (d, J = 8,7, 1H)	151,1 (C)	92,80 (CH)
8	-	3,39 (m, 1H)	109,9 (C)	45,44 (CH)
9	2,42 (s, 3H)	1,39 (d, J = 6,6, 3H)	9,3 (CH ₃)	18,06 (CH ₃)
1'	-	-	132,6 (C)	131,48 (C)
2'	7,43 (d, J = 1,4, 1H)	7,13 (s, 1H)	116,1 (CH)	120,93 (CH)
3'	-	-	131,7 (C)	132,55 (C)
4'	-	-	153,0 (C)	158,49 (C)
5'	7,36 (d, J = 8,7, 1H)	6,76 (d, J = 8,1, 1H)	110,6 (CH)	109,48 (CH)
6'	7,28 (dd, J = 8,7 e 1,5, 1H)	7,12 (d, J = 8,2, 1H)	122,1 (CH)	126,51 (CH)
7'	6,52 (dd, J = 15,6 e 1,5, 1H)	6,36 (dd, J = 15,6, 1,5, 1H)	131,2 (CH)	130,96 (CH)
8'	6,23 (dq, J = 15,6 e 6,6, 1H)	6,09 (dq, J = 15,6, 6,5, 1H)	124,2 (CH)	123,24 (CH)
9'	1,91 (dd, J = 6,6 e 1,5, 3H)	1,86 (dd, J = 6,6, 1,5, 3H)	18,4 (CH ₃)	18,60 (CH ₃)
OH	4,99 (sl, 1H)	4,90 (sl, 1H)	-	-

Tabela 1 – Dados de deslocamentos químicos (em ppm) das substâncias **A** e **B**.

1H 500 MHz, $CDCl_3$; ^{13}C 125 MHz $CDCl_3$. * valores obtidos a partir dos espectros de HMBC e HSQC.

Uma vez que as neolignanas têm demonstrado boa atividade contra insetos, decidiu-se testar o extrato de *P. solmsianum* contra larvas de *Ae. aegypti* (MACEDO; DOS SANTOS; et al., 2017).

A Figura 3 apresenta o efeito do tratamento das larvas de *Ae. aegypti* com o extrato em *n*-hexano de PS nas concentrações de 100 $\mu g/mL$ e 50 $\mu g/mL$. A dose mais alta causou a morte de 80% das larvas no primeiro dia e 98,3% no terceiro, restando apenas uma larva viva. Essa larva passou para o estágio de pupa com 5 dias de atraso, morrendo após essa evolução. A concentração de 50 $\mu g/mL$, por outro lado, não causou nenhuma morte após o primeiro dia e 50% dos insetos morreram ao final do experimento, sendo a maioria na forma de pupa. Não houve uma quantidade

significativa de mortes em nenhum dos grupos controle (Figura 3A). Dessa forma, não foi feita curva de dose x resposta e assumiu-se 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como DL_{50} para o extrato de PS. Foi possível observar também o atraso de 1 dia no desenvolvimento das larvas sobreviventes a pupa e 1 dia de pupa para adultos (Figura 3B-D).

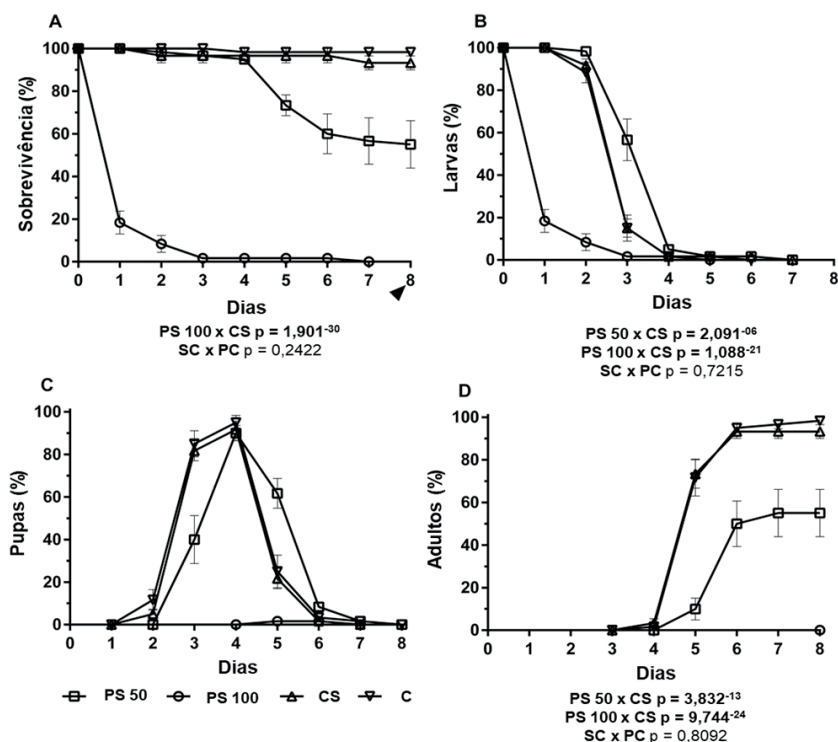


Figura 3 – Efeito do extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum* na sobrevivência (A) e desenvolvimento de larvas (B), pupa (C) e adultos (D) de *Ae. aegypti* a partir de larvas de terceiro estágio em diferentes dias após tratamento experimental com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PS 100) ou 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PS 50) comparados com o controle de solvente (CS) e controle físico (CF). Adaptado de Macedo et al. (2017)

O extrato foi então fracionado, as frações testadas e, da mais ativa, foi obtido **2**, substância que Chauret et al. (1996) demonstraram apresentar boa atividade contra larvas de segundo estágio de *Ae. atropalpus*. Essa substância foi testada em diferentes concentrações contra as larvas de *Ae. aegypti* para a obtenção dos valores de DL_{50} (19,33 $\mu\text{M} = 5,11 \mu\text{g}/\text{mL}$), DL_{90} (28,68 $\mu\text{M} = 7,58 \mu\text{g}/\text{mL}$) e DL_{99} (36,28 $\mu\text{M} = 9,59 \mu\text{g}/\text{mL}$) como mostrado na Figura 4 e na Tabela 2. A atividade contra *Ae. aegypti* exibida por **2** é maior do que as já descritas para outras substâncias isoladas de espécies de *Piper* (CABRAL et al., 2009; LEITE et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2013).

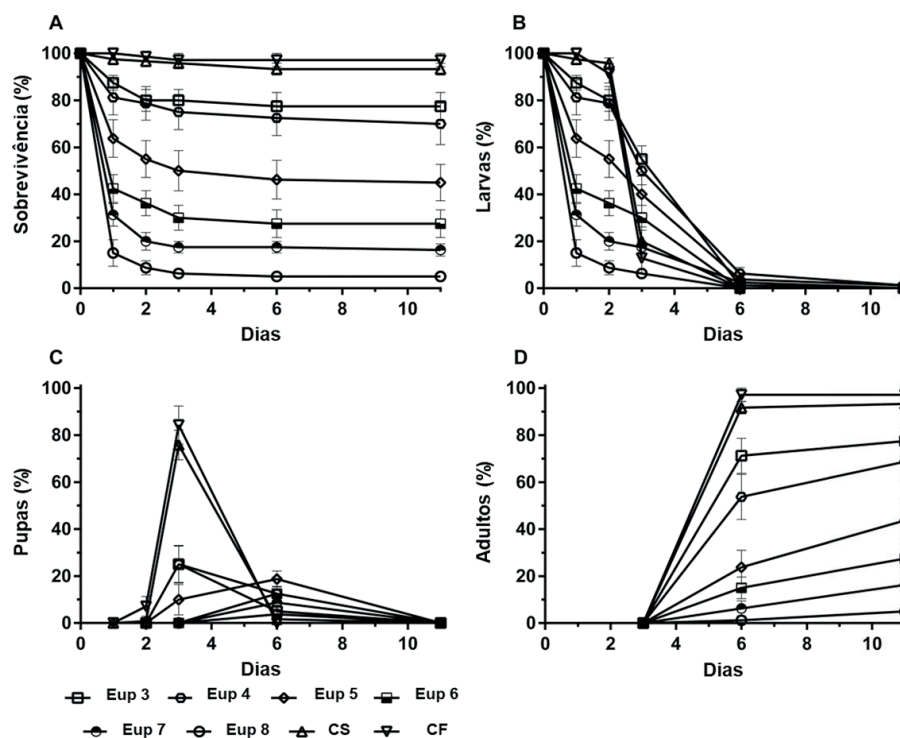


Figura 4 – Efeito do eupomatenoide-6 (**2**) obtido do extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum* na sobrevivência (A) e desenvolvimento de larvas (B), pupa (C) e adultos (D) de *Ae. aegypti* a partir de larvas de terceiro estágio em diferentes dias após tratamento experimental com 3,0 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$ (EUP 3 a 8) comparados com o controle de solvente (CS) e controle físico (CF). Adaptado de Macedo et al. (2017)

DL	$[\mu\text{M}]$ (IC 95%)	$[\mu\text{g/mL}]$ (IC 95%)
2	4,39 (0,61-7,04)	1,16 (0,16-1,86)
50	19,33 (18,24-20,35)	5,11 (4,82-5,38)
90	28,68 (27,09-30,76)	7,58 (7,16-8,13)
99	36,28 (33,67-39,91)	9,59 (8,90-10,55)

Tabela 2 – Valores de Dose Letal (DL) do eupomatenoide-6 (**2**), obtido do extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum*, contra larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller.

Outras substâncias ativas isoladas de espécies de *Piper* e testadas contra *Ae. aegypti* são os alcaloides piplartina, isolado de *Piper tuberculatum* e piperlonguminina, purificado de *P. scutifolium*. A piplartina foi efetiva em concentrações acima de 378,33 μM (100 $\mu\text{g/mL}$), enquanto piperlonguminina apresentou DL_{50} de 37,81 μM (12 $\mu\text{g/mL}$), matando 100% das larvas a 94,54 μM (30 $\mu\text{g/mL}$) (MALECK et al., 2014). A neolignana (-)-grandisina, isolada das inflorescências de *P. solmsianum* apresentou DL_{50} igual a 5,48 μM (2,37 $\mu\text{g/mL}$), porém esse estudo foi realizado com larvas de primeiro estágio, sendo mais susceptíveis a tratamentos químicos (CABRAL et al., 2009). Quando testada em larvas de terceiro estágio, como no presente trabalho, o valor de DL_{50} da (-)-grandisina foi 346,81 μM (150 $\mu\text{g/mL}$). A avaliação histológica das larvas mostrou alterações no intestino médio, com intensa destruição tecidual e desorganização celular (LEITE et al., 2012). Outra neolignana ativa é a burchelina

(5), que apresentou DL_{50} de $45,54 \mu\text{M}$ ($15,5 \mu\text{g/mL}$) e DL_{90} de $79,33 \mu\text{M}$ ($27 \mu\text{g/mL}$) (NARCISO et al., 2014).

A boa atividade encontrada para **2** sugeriu que esta pode ser a principal substância ativa do extrato obtido em *n*-hexano de PS, dessa forma foi desenvolvido um método para a quantificação de **2** neste extrato (seção 3.1). Assim, o extrato foi padronizado em $23,45 \pm 0,58$ mg de eupomatenóide-6 (**2**) por grama de PS. Em vista disso, a DL_{50} de PS sobre as larvas ($50 \mu\text{g/mL}$) corresponde a uma dose de $4,44 \pm 0,11 \mu\text{M}$ ($1,17 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$), uma quantidade cerca de 4 vezes menor que a substância isolada, o que sugere a presença de outras substâncias ativas. Como também foi isolado **3** no presente trabalho e esta neolignana já apresentou atividade contra larvas de *Ae. atropalpus* é esperado que essa substância contribua em possível efeito de interação, como sinérgico ou aditivo (CHAURET et al., 1996). Embora não seja ideal, utilizando a abordagem de Felipe et al. (2006) para doseamento de neolignanas totais, estima-se uma concentração de $1,15 \pm 0,52$ mg de **3** para cada grama de PS, tendo assim a dose correspondente de $2,14 \pm 0,11 \mu\text{M}$ ($0,57 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$) na DL_{50} de PS.

Existem três tipos de interação entre substâncias em alvos biológicos: efeitos aditivo, sinérgico e antagônico. O efeito aditivo ocorre quando a ação de duas substâncias utilizadas em conjunto é igual à soma das atividades isoladas, enquanto o efeito sinérgico é o fenômeno onde duas ou mais substâncias agem em conjunto para produzir um efeito maior do que o esperado para essas substâncias isoladamente. Já o antagonismo é definido pelo efeito de interação ser menor que o esperado para a soma dos efeitos individuais (LEE, 2010).

O sinérgismo geralmente assume papel importante nas atividades descritas para produtos naturais. Devido a presença de sinérgismo e de outros fatores como menor custo de produção e, geralmente, menor toxicidade associada a extratos brutos, grande parte do mercado de produtos naturais visa o desenvolvimento de produtos a partir desses extratos ao invés de substâncias isoladas (CALIXTO, 2000; DUTRA et al., 2016; WAGNER, 2011). Alguns exemplos de inseticidas comercializados no Brasil na forma de extratos são *Derris* sp. e *Lonchocarpus* sp. (devido à presença de rotenona), neem (*Azadirachta indica* A.Juss.) e alho (*Allium sativum* L.) (ISMÁN, 2006).

Outro fator importante na busca de extratos ou substâncias ativas é a verificação de sua toxicidade. Dessa forma, além do teste larvicida de **2**, foi realizado um ensaio de citotoxicidade em uma linhagem de fibroblastos humanos saudáveis (MRC5), onde foi encontrada uma concentração inibitória de 50% (CI_{50}) de $39,30 \mu\text{M}$ ($10,39 \mu\text{g/mL}$). Essa concentração foi 2,03 vezes maior que o valor de DL_{50} encontrado para a atividade larvicida. Embora a realização de ensaios de citotoxicidade não sejam comuns nos trabalhos que buscam novas substâncias com atividade larvicida, essa é uma etapa crucial para que possa ser predita a toxicidade aguda em mamíferos, uma vez que a maioria dos inseticidas utilizados hoje apresentam alta toxicidade (COS et al., 2006). Nesse sentido, utilizando o método proposto por Vieira et al. (2011), foi calculado o valor predito de DL_{50} para toxicidade aguda em roedores de **2**, obtendo uma dose de 42,26

mmol/kg (11.147,01 mg/kg), sendo um valor considerado seguro (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2009). Segundo o manual da ONU, substâncias que possuem DL_{50} predita entre 2.000 e 5.000 mg/kg (maior DL_{50} abordada neste documento) apresentam toxidez aguda relativamente baixa e o teste em animais é desnecessário. A partir desse valor pode-se calcular ainda o índice de seletividade ($IS = DL_{50}$ predita para camundongo/ DL_{50} do alvo) que mostra que **2** é aproximadamente 283.893 vezes mais seletivo para mosquitos do que para camundongo.

3.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

Na validação deste método foram construídas três curvas pelo método dos mínimos quadrados utilizando as áreas dos sinais cromatográficos obtidos a partir de soluções de **2** em acetonitrila. As medições de cada curva foram realizadas em triplicatas para cada nível de concentração. Comportamento linear na faixa de concentração de 10,0 a 140,0 ng/L de **2** foi observado em todas as curvas analíticas. A equação representativa da curva está descrita na Figura 5A.

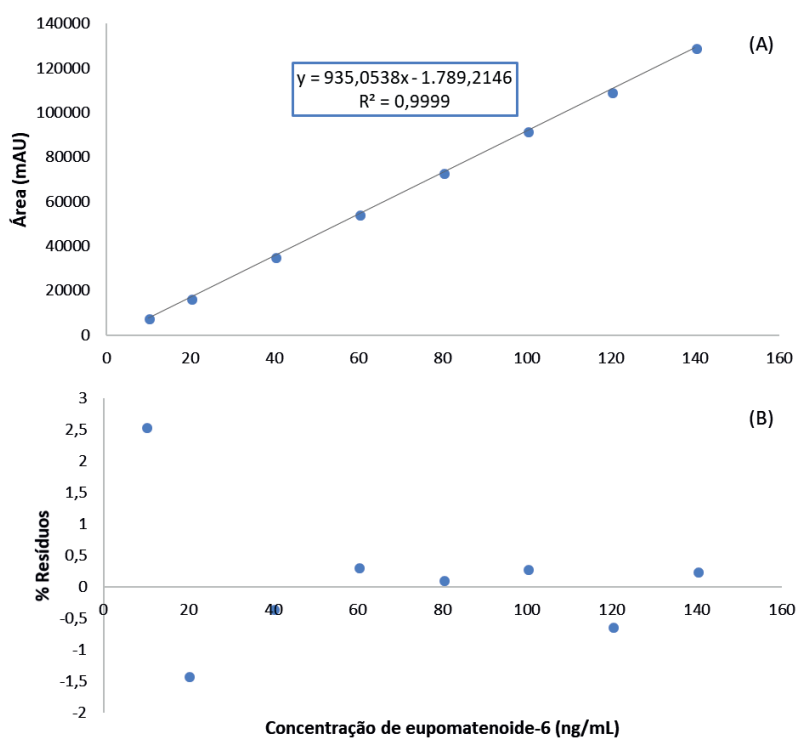


Figura 5 – (A) Curva analítica representativa para determinação de eupomatenoide-6 (**2**) em extrato em *n*-hexano de *P. solmsianum* por CLAE-DAD; (B) gráfico de resíduos.

O teste de Grubbs apontou a ausência de valores discrepantes (*outliers*) e o teste de Shapiro-Wilk confirmou a distribuição normal dos resíduos [$W_{\text{calculado}} = 0,875 > W_{\text{tabelado}} (n = 8) = 0,818$] (Figura 5B). A adequação do modelo linear foi avaliada pelo teste F de *Snedecor-Fisher* [$F_{\text{calculado}} = 372.647,7 > F_{\text{tabelado}} (1; 23) = 5,8$] e pelo teste de falta de ajuste e erro puro [$F_{\text{calculado}} = 0,10 < F_{\text{tabelado}} (6; 16) = 3,34$]. Todos os testes consideraram $p = 0,05$. A partir dos resultados destes testes estatísticos, pode-

se concluir que o modelo linear é adequado para a determinação de eupomatenoide-6 (2) no extrato em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum*.

Para a medição do efeito de matriz foram feitas três curvas de adição padrão independentes (Figura 6). A adição padrão se deu nas mesmas concentrações e condições da curva analítica proposta. O valor de *t* calculado (0,009) foi menor que o valor tabelado (2,692) utilizando *p* = 0,01, mostrando que as inclinações das curvas são estatisticamente iguais e, dessa forma, a matriz não interfere na análise.

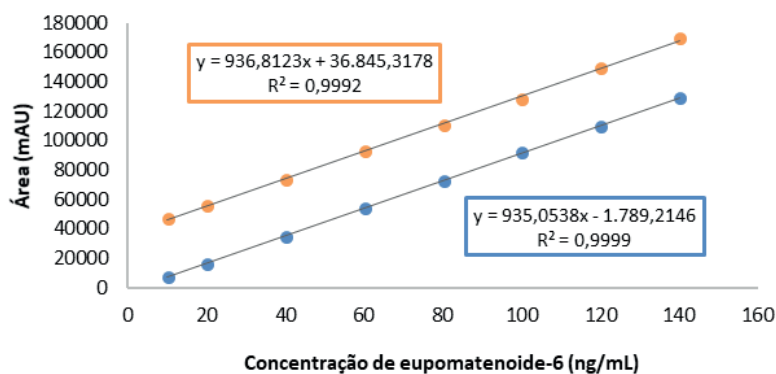


Figura 6 – Curva analítica (azul) e curva de adição padrão (laranja) para avaliação do efeito da matriz sobre a determinação de eupomatenoide-6 (2) em extrato em *n*-hexano de *P. solmsianum* por CLAE-DAD.

O limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) foram calculados utilizando sete injeções do primeiro nível de concentração da curva analítica (10,0 ng/L), sendo LD = 0,97 ng/L e LQ = 3,35 ng/L.

Para o método desenvolvido, a repetibilidade foi estimada utilizando o coeficiente de variação (CV) com base em três medidas consecutivas de três níveis de concentração (10,0, 80,0 e 140,0 ng/L), no mesmo dia (precisão intra-dia). Valores de CV foram inferiores a 15% para cada nível estudado, 3,07, 0,26 e 1,51 respectivamente, evidenciaram a boa repetibilidade do método (INMETRO, 2016).

Neste trabalho a precisão intermediária foi avaliada variando o dia das medidas e foi calculada por meio do coeficiente de variação, em triplicatas autênticas, de soluções de eupomatenoide-6 (2) em acetonitrila, para os níveis mais baixos, intermediário e mais alto (10,0, 80,0 e 140,0 ng/L, respectivamente), em três dias diferentes (precisão inter-dia). Valores de CV menores que 15%, 1,77, 2,66 e 1,36 respectivamente, demonstram a boa precisão intermediária do método (INMETRO, 2016).

A robustez do método foi avaliada considerando a influência da temperatura e variação da fase móvel. A avaliação consistiu nos dados de CV (Tabela 3), cujo valor médio foi inferior a 1 %. Além disso, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de um fator por vez, sendo que os valores de F calculados, tanto para temperatura (0,681) quanto para fase móvel (0,400), foram inferiores ao valor crítico tabelado (5,143), para *p* = 0,05. Tais fatos evidenciaram que o método é robusto nas condições investigadas.

Condição	Área média do sinal (mAU)	Desvio Padrão	CV (%)
MeCN:H ₂ O (65:35), 30 °C	64.319,61	1.758,96	2,73
MeCN:H ₂ O (63:37), 30 °C	65.132,90	768,72	1,18
MeCN:H ₂ O (67:33), 30 °C	64.811,49	293,55	0,45
MeCN:H ₂ O (65:35), 25 °C	64.777,44	172,23	0,27
MeCN:H ₂ O (65:35), 35 °C	65.366,32	726,80	1,11
Geral	64.881,55	396,77	0,61

Tabela 3 – Robustez do método desenvolvido para determinação de **2** em extrato em *n*-hexano de *P. solmsianum* por CLAE-DAD. Este procedimento foi realizado com uma solução de extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum*.

MeCN = acetonitrila; H₂O = água ultrapura + 0,05% de ácido trifluoroacético; CV: Coeficiente de variação

O presente trabalho é o primeiro a propor a quantificação de eupomatenoide-6 (**2**) em extrato de *P. solmsianum*. O único trabalho descrito na literatura que também visava a quantificação de **2** foi o de Felipe et al. (2006), porém em extratos de *P. regnellii* var. *pallenscens* e apresentava algumas peculiaridades. Os autores propuseram um método para a quantificação de neolignanas [eupomatenoide-5 (**1**), **2** e conocarpano (**3**)] por CLAE-DAD utilizando apenas **3** como padrão. As condições utilizadas para quantificação de **2** e por Felipe et al. (2006) são apresentadas na Tabela 4.

Os autores utilizaram **3** como padrão para quantificar três substâncias diferentes e comprimento de onda máximo no ultravioleta (λ) igual a 280 nm, por considerarem como ponto comum de máximo das três neolignanas (FELIPE et al., 2006). No presente trabalho foi encontrado como máximo de absorção de **2** em λ 254 nm. O ajuste de λ possibilitou trabalhar em concentrações na ordem de ng/mL ao invés de μ g/mL, levando a um LD e LQ mais de mil vezes menor. A utilização de uma coluna de 50 mm com tamanho de partícula menor (3,5 x 5,0 mm), permitiu analisar **2** com um tempo total relativamente curto (4,5 min), reduzindo muito o gasto de solvente.

Parâmetro	Proposto	Felipe et al. (2006)
Coluna	Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m)	Metadesil ODS (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μ m)
Fase móvel	65% de MeCN e 35% de H ₂ O + 0,05% de TFA	60% de MeCN e 40% de H ₂ O + 2% de ácido acético
Vazão	0,8 mL/min	1,0 mL/min
Temperatura de forno	30 °C	30 °C
Comprimento de onda	254 nm	280 nm
Tempo de análise	4,5 min	25 min
Padrão	Eupomatenoide-6 (2)	Conocarpano (3)
Intervalo da curva	10 a 140 ng/mL	32,25 a 125 μ g/mL
Limite de detecção	0,97 ng/mL	1,68 μ g/mL
Limite de quantificação	3,35 ng/L	5,6 μ g/mL

Tabela 4 – Comparação do método proposto com método da literatura para doseamento de **2**.

4 | CONCLUSÃO

O extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum* apresentou boa atividade contra larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*. Foi isolada a neolignana eupomatenóide-6, substância com maior atividade larvicida isolada de *Piper* spp. até o momento. Foi possível também o isolamento e identificação de conocarpano que não foi testado por não haver quantidade suficiente. O eupomatenóide-6 apresentou alta seletividade de ação, tendo a toxidez estimada em roedores em mais de 200 mil vezes menor que para as larvas.

Um método analítico foi validado para a quantificação do eupomatenóide-6 no extrato. Esse método apresentou vantagens quando comparado ao da literatura, como menores LD e LQ, correção do comprimento de onda utilizado, menor tempo total de análise e menor gasto de solvente. O extrato foi, então, padronizado quanto a quantidade de eupomatenóide-6 e a proporção dessa neolignana nesse extrato em relação à atividade larvicida sugere a presença de outras substâncias ativas.

5 | ASPECTOS LEGAIS

A coleta do material vegetal foi autorizada pelo ICMBio no processo de número 45566-1. O acesso ao patrimônio genético foi autorizado pelo CGEN no processo de número 010771/2014-0.

6 | AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (processos 310474/2015-9 e 159779/2013-8) e à FAPERJ (processo E-26/102.258/2013).

REFERÊNCIAS

BENELLI, G. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3201-3212, 2015.

CABRAL, M.M.O.; ALENCAR, J.A.; GUIMARÃES, A.E. et al. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 1, p. 103-105, 2009.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CHAURET, D.C.; BERNARD, C.B.; ARNASON, J.T. et al. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 152-155, 1996.

CHEDIAK, M.; PIMENTA, F.G., JR.; COELHO, G.E. et al. Spatial and temporal country-wide survey

of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 311-321, 2016.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FELIPE, D.F.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V. et al. Analysis of neolignans compounds of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1371-1375, 2006.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: paleontological statistics software package for Education and data analysis. **Palaeontol Electron**, v. 4, n. 2, p. 4-9, 2001.

HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 231-240, 2015.

HINTZE, J. **PASS 11**. Kaysville, Utah, USA: NCSS, LLC 2011.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008: 1-31 p. 2016.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. In: (Ed.). **Annual Review of Entomology**, v.51, 2006. p.45-66. (Annual Review of Entomology). ISBN 978-0-8243-0151-4.

LEE, S.I. Drug interaction: focusing on response surface models. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 58, n. 5, p. 421-34, 2010.

LEITE, A.C.C.F.; KATO, M.J.; SOARES, R.O.A. et al. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 517-521, 2012.

MACEDO, A.L.; DOS SANTOS, T.C.C.; VALVERDE, A.L. et al. An overview of neolignans of the genus *Piper* L.: Isolation methods and biological activities. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 693-720, 2017.

MACEDO, A.L.; DUPRAT, R.C.; MOREIRA, D.D.L. et al. Isolation of a larvicidal compound from *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). **Natural Product Research**, 2017.

MALECK, M.; FERREIRA, B.; MALLETT, J. et al. Cytotoxicity of piperamides towards *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 2, p. 458-463, 2014.

MARTINS, R.C.C.; LATORRE, L.R.; SARTORELLI, P. et al. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 843-846, 2000.

MOREIRA, L.D.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARAES, E.F. Chemical constituents from *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 76, n. 4, p. 106-109, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUSSO, D.; GUBLER, D.J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.

NARCISO, J.O.; SOARES, R.O.; REIS DOS SANTOS MALLETT, J. et al. Burchellin: study of bioactivity against *Aedes aegypti*. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 172, 2014.

NASCIMENTO, J.C.D.; DAVID, J.M.; BARBOSA, L.C.A. et al. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1267-1271, 2013.

NESHEIM, O.N.; FISHEL, F.M.; MOSSLER, M. **Toxicity of Pesticides**. AGRICULTURE, U. S. D. O.: UF/IFAS Extension Service. PI-13: 6 p. 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Part 3 - Health Hazards. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**, Nova York e Genebra, 2009. Disponível em: < http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/English/03e_part3.pdf >. Acesso em: 23 de junho de 2017.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. et al. Neolignan e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 199-204, 2005.

RAYMOND, M. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur cahiers Orstrom. **Sér Ent Med Parasitol**, v. 22, p. 117-121, 1985.

SILVA, R.Z.; YUNES, R.A.; DE SOUZA, M.M. et al. Antinociceptive properties of conocarpan and orientin obtained from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 402-408, 2010.

VIEIRA, M.D.S.; DE OLIVEIRA, V.; LIMA, E.M. et al. *In vitro* basal cytotoxicity assay applied to estimate acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 5, p. 505-510, 2011.

WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34-37, 2011.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-85107-59-8

