

**ESCOLA ESTADUAL VICENTE MACEDO
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

**Extração e Avaliação Fitoquímica dos Extratos de *Piper aduncum* L. como Alternativa
Natural de Repelente contra *Aedes aegypti***

FRUTAL, MG

2024



Ana Flávia Leonel Marques Silva

Izadora Ferreira Naves

Gabriela Ferreira Rocha de Paula

Extração e Avaliação Fitoquímica dos Extratos de *Piper aduncum L.* como Alternativa Natural de Repelente contra *Aedes aegypti*

Relatório apresentado à 8ª FEMIC - Feira Mineira de Iniciação Científica.

Orientação da Profa. Dra Taís Arthur Corrêa e coorientação da Profa. Liliane Angelo.

Frutal, MG

2024



RESUMO

As alternativas naturais para o controle de vetores apresentam grande potencial, especialmente diante da resistência crescente dos insetos aos repelentes sintéticos e dos impactos ambientais adversos causados por esses produtos. A Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) destaca-se pelo reconhecido potencial repelente, entretanto é necessário otimizar os métodos de extração para maximizar a obtenção de compostos bioativos e desenvolver produtos mais seguros para o meio ambiente e para a saúde humana. Este estudo propõe investigar o potencial repelente dos extratos das folhas de Pimenta-de-macaco contra mosquitos *Aedes aegypti*, avaliando o rendimento e a composição fitoquímica dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração, além de testar sua eficácia como repelentes. A pesquisa incluiu a coleta das folhas de *P. aduncum* no município de Frutal-MG, seguidas de secagem, moagem e extração a frio por maceração (48 horas) e ultrassom (1 hora), utilizando solução hidroetanólica 70% (v/v) como solvente. Em seguida, foram realizados testes qualitativos para analisar a presença de fitoquímicos como flavonoides, taninos, antraquinonas, saponinas, alcaloides, terpenos e esteroides. Os resultados demonstraram uma diferença significativa na eficiência dos métodos de extração. O rendimento da maceração foi de 0,757g em 48 horas, enquanto o ultrassom resultou em 0,589g em apenas 1 hora. Apesar de a maceração ter gerado uma maior quantidade de extrato em termos absolutos, o ultrassom se mostrou mais eficiente em termos de tempo, com uma taxa de extração de 0,589g/h, em comparação aos 0,01577g/h da maceração. O ultrassom, ao romper mais rapidamente as paredes celulares, facilitou uma extração acelerada dos compostos bioativos, enquanto a maceração, embora mais longa, proporcionou um rendimento final mais elevado. Ambos os métodos de extração foram eficazes na obtenção de alcaloides, saponinas, taninos, esteroides e antraquinonas. Na próxima etapa do estudo, será realizada a avaliação da eficácia repelente dos extratos, o que permitirá uma análise de seu potencial no combate a mosquitos transmissores de doenças. A conclusão do projeto fornecerá dados importantes para a formulação de repelentes naturais, oferecendo uma alternativa viável aos produtos sintéticos, com menor impacto ambiental.

Palavras-chave: Fitoquímica; Bioprospecção; Inseticida Natural; Extratos Vegetais.



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 JUSTIFICATIVA	7
3 OBJETIVO GERAL	8
4 METODOLOGIA	9
5 RESULTADOS OBTIDOS	12
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	13
REFERÊNCIAS.....	14



1 INTRODUÇÃO

As arboviroses, impulsionadas pela modificação do ambiente por ações antrópicas, o crescimento urbano desordenado e as mudanças climáticas, representam crescentes ameaças em regiões tropicais (LIMA-CAMARA, 2016). O *Aedes aegypti*, mosquito vetor de doenças como Dengue, Zika e Chikungunya, destaca-se nesse cenário. A Organização Mundial de Saúde estima que 2,5 bilhões de pessoas, cerca de 2/5 da população mundial, estão sob risco de contrair dengue anualmente (BRASIL, 2022). Em 2023 o Brasil lidera o ranking dos países, com 2,3 milhões de ocorrências da doença, 1,2 mil classificadas como dengue grave e 769 óbitos, dados estes registrados de janeiro a junho deste ano, superando o total de casos do ano de 2022 (ONU, 2023).

Assim, o impacto na morbidade e mortalidade se amplia, ao tornar-se uma epidemia afetando um grande número de pessoas, resultando em casos graves e impondo desafios aos serviços de saúde. Esse cenário é especialmente desafiador na ausência de tratamentos, vacinas eficazes e medidas preventivas e de controle efetivas (DONALISIO, FREITAS, VON ZUBEN, 2017).

Nesse contexto, a prática tradicional de utilizar plantas medicinais na medicina popular ganha destaque no desenvolvimento de repelentes, explorando óleos essenciais e extratos vegetais que, aplicados sobre a pele, roupas, superfícies e até mesmo incorporados em velas, revelam-se eficazes em evitar a aproximação de mosquitos, reduzindo assim o risco de transmissão de doenças (SANTOS et al., 2023).

Repelentes naturais são caracterizados por substâncias com fragrância leve que têm a capacidade de repelir insetos, evitando as picadas (CAMARGO, 2008). Óleos essenciais e extratos vegetais têm sido investigados como alternativas aos repelentes químicos, visando evitar efeitos tóxicos associados a essas substâncias (GILLIJ et al., 2008). Além disso, a produção desses produtos é de baixo custo e não impacta negativamente o meio ambiente (PEREIRA et al., 2020).

O Brasil é reconhecido por abrigar uma das floras mais diversas do mundo, sendo uma vasta fonte de substâncias com potenciais atividades biológicas, ocupando a posição de destaque como o país mais ricamente diversificado do planeta. (LEUZINGER et al., 2019).



Dentre elas temos a *Piper aduncum L.*, popularmente conhecida como Pimenta-de-macaco, respectivamente. A Pimenta-de-macaco é um arbusto que alcança o tamanho de até 8 metros de altura, encontrada tanto no bioma Amazônia como na Mata Atlântica. É uma das espécies de plantas que vem apresentando um crescente interesse da área da química no setor agrícola como alternativa sustentável aos produtos xenobióticos de origem sintética e na prospecção biotecnológica para a agricultura, principalmente quanto à extração do seu óleo essencial, tornando-se um produto de forte potência econômica, utilizado principalmente como inseticida e fungicida (CHAHAL et al., 2011; SANTOS, 2022).

Pesquisas demonstram o potencial do óleo essencial de *P. aduncum* no controle de diferentes pragas e doenças de interesse agropecuário a exemplo do controle da cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*) (KAROLINE SILVA et al., 2023), vaquinha do feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus*) e broca do fruto do abacaxi (*Stymon megarus*), minimizando o uso de fungicidas convencionais (ANGNES, 2005; ESTRELA et al., 2006).

De forma geral, os efeitos benéficos desta planta podem ser atribuído a um ou mais compostos fitoquímicos, presentes em diferentes partes, como: flavonoides, terpenoides, taninos, alcaloides, entre outras substâncias, o que corrobora com a necessidade de serem constantemente investigados, afim de conhecer suas propriedades medicinais e/ou toxicológicas (SUBAPRIYA, NAGINI, 2005).

Entretanto, ressalta-se que apesar dos compostos bioativos serem encontrados em toda a planta, sua concentração e facilidade de extração pode variar de acordo com a parte da planta estudada e o método/solvente de extração empregados (SIMÕES, 2019). Outro fator importante está na variação da composição química de seus metabólitos secundários devido aos efeitos do ecossistema, que envolvem inúmeros aspectos importantes, como a modificações das condições de cultivo, tratamento e diferenças genéticas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; GAMBOA et al. 2018) .



2 JUSTIFICATIVA

A bioprospecção de substâncias de plantas, como os extratos de Pimenta de Macaco (*Piper aduncum*), bem como seus óleos vegetais/essenciais, revela-se uma estratégia promissora no desenvolvimento de repelentes naturais. Em meio à busca por hábitos mais saudáveis e soluções sustentáveis, essa abordagem visa mitigar os impactos das arboviroses. Os óleos essenciais da Pimenta de Macaco, ricos em dilapiol, têm demonstrado eficácia como repelentes naturais contra mosquitos (BERGO, 2010). A incorporação desses extratos em formulações de repelentes oferece uma abordagem não apenas eficaz, mas também amigável ao meio ambiente e à saúde humana. Além da proteção direta contra doenças transmitidas por mosquitos, a produção de cosméticos, como sabonetes e sprays repelentes, a partir de plantas com potencial repelente, emerge como uma alternativa valiosa (AFFONSO et al., 2012). A vantagem dos repelentes naturais reside em sua degradação rápida, seletividade e baixa fitotoxicidade, tornando plantas com constituintes voláteis uma escolha viável e sustentável para o combate aos mosquitos (SANTOS et al., 2023). A interconexão entre as arboviroses, a bioprospecção de plantas e a produção de repelentes naturais evidencia uma abordagem abrangente e inovadora para enfrentar os desafios crescentes na saúde pública. Essa estratégia não apenas almeja a proteção direta contra mosquitos, mas também destaca a importância de práticas sustentáveis e a necessidade contínua de pesquisa e inovação para abordar as complexidades do cenário epidemiológico global.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a composição fitoquímica dos extratos de *Piper aduncum L.* (Pimenta de Macaco), com o propósito de avaliar seu potencial como alternativa natural para repelente contra o *Aedes aegypti*, contribuindo para o desenvolvimento de métodos sustentáveis e eficazes no controle do vetor de doenças como dengue, zika e chikungunya.

3.2 Objetivos específicos

- Coleta, identificação e secagem das folhas de Pimenta-de-macaco;
- Obtenção de extratos hidroalcoólicos a partir das folhas secas e trituradas de Pimenta-de-macaco pelas técnicas de extração por maceração e ultrassom;
- Análise da ocorrência de grupos dos metabólitos secundários: saponinas, taninos, flavonoides, antraquinonas, terpenos e alcaloides, presentes nos extratos das folhas por triagem fitoquímica;
- Avaliar a atividade repelente dos extratos, comparando sua eficácia com um repelente comercial a base de DEET (N,N-Diethyl-3-methylbenzamide)



4 METODOLOGIA

As folhas de *Piper aduncum L.* (Figura 1) foram coletados em área rural, localizadas no município de Frutal, Minas Gerais. Após a coleta foram higienizados com água corrente, seguida da solução de hipoclorito de sódio e água destilada. Em seguida foram pesados e submetidos a secagem em estufa com ventilação de ar forçada, a temperatura de 50°C, por um período de 48 a 72h. Em seguida foram novamente pesados, triturados em moinho de facas e armazenados em dessecador.



Figura 1. Arvore de *Piper aduncumL.* empregada na pesquisa.

As porções trituradas das folhas (10g) foram submetidas a dois processos de extração:

- Processo 1: folhas de Pimenta-de-macaco foram submetidas a extração à frio (maceração) com 150 mL de solução hidroalcoolica de etanol (70%) por 48h, acondicionadas em frascos de vidro de âmbar ou envolvidos por papel alumínio (OLIVEIRA, 2013);



• Processo 2: folhas de Pimenta-de-macaco foram transferidas para cartuchos de celulose e submetidas à extração por banho ultrassom de solução hidroalcolica de etanol (70%), pelo período de 60min, sendo as extrações realizadas em temperatura ambiente. Ambos processos de extração foram realizados em duplicata. Posteriormente os produtos foram filtrados em papel de filtro qualitativo. Em seguida o solvente foi evaporado em evaporador rotativo com temperatura de 60°C. Os extratos brutos secos foram pesados para cálculo de rendimento (teor de extrato bruto) e armazenados em dessecador.

Para caracterização dos principais grupos de metabólitos secundários dos extratos, como: alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, antraquinonas e triterpenos/esteroides, foram realizadas reações químicas específicas, observando desenvolvimento de coloração e/ou formação de precipitado característico, conforme métodos adaptados de Costa (2001) e Simões (2019).

Os alcaloides foram avaliados empregando o reagente de Mayer. Para isso, foi adicionado a um béquer, uma pequena porção do extrato bruto seco e 3 ml de ácido clorídrico diluído. A mistura foi aquecida até fervura. Em seguida, o extrato obtido foi filtrado e transferido para um tubo de ensaio, no qual foi adicionado três gotas do reagente de Mayer. A presença de alcaloides foi verificada através da turvação da solução.

Para avaliação da presença de saponinas, foi adicionado em um tubo de ensaio 1 mL do extrato vegetal e 3 mL de água destilada, fervendo-as por 5 minutos. Em seguida, as soluções foram agitadas vigorosamente por 15 segundos. A ocorrência de espuma e sua permanência durante 15 minutos foi considerado como resultado positivo.

A presença de taninos hidrolisáveis e condensados foi avaliada através do teste com cloreto férrico (FeCl_3), no qual a 1 mL do extrato (e/ou fração), diluído em 2 mL de água destilada, foi adicionada de 2 a 4 gotas de FeCl_3 (1%). O resultado foi observado a partir da mudança de coloração, em que precipitado na tonalidade azul-preto indica taninos hidrolisáveis, e na cor verde-marrom, indica a presença de taninos condensados.

Para observação da presença de flavonoides, a Reação de Taubouk, que consistiu na transferência de 2 mL do extrato a uma cápsula de porcelana que, em seguida, seca em uma chapa aquecedora para eliminação do solvente, seguida da adição de 1 mL de acetona e pequenas porções de cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Essa mistura foi aquecida



novamente em chapa aquecedora até completa eliminação do solvente que, após resfriamento, foi solubilizada em 3 mL de éter etílico e transferida para um tubo de ensaio. A presença de flavonoides foi observada através do desenvolvimento de fluorescência de coloração amarelo-esverdeada, quando colocado sob a luz ultravioleta.

A presença de antraquinonas foi observada através da reação de Bornträger. Para este teste, em um tubo de ensaio foi adicionado 3 ml de solução de hidróxido de amônio diluído a 1 mL do extrato (e/ou fração). O aparecimento de coloração vermelha ou rósea sugere a presença de antraquinonas.

Para detecção de triterpenoides e esteroides foi utilizado o teste de Libermann Burchard, uma pequena porção do extrato foi solubilizado em 5mL de clorofórmio, em seguida procedemos a filtração em sulfato de sódio anidro e a adição de 1mL de anidrido acético com agitação suave. Por fim, foi adicionado 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado e a solução foi agitada levemente. A visualização de uma coloração azul evanescente e depois verde, indica a presença de esteroides livres, porém se o produto apresentar uma cor parda à vermelha, indicará a presença de triterpenoides livres.

O ensaio de repelência seguirá a metodologia de Guerra et al (2012), com modificações. Serão utilizadas placas de Petri com discos de papel filtro número 2 com 90 mm de diâmetro, divididos ao meio para a aplicação dos extratos hidroalcolicos. Em uma das metades será aplicado a dose de extrato e na outra apenas água destilada como controle. Após a secagem, os discos serão colocados em placas de Petri com tampa. Em seguida, será liberado 1 mosquito não sexado no centro de cada placa, registrando após 10s, 1h e 4h à distribuição desses insetos.

Os testes serão realizados em uma temperatura de 27 ± 2 °C. Serão testadas a dose de 50 e 100 μ L do extrato hidroalcolico, bem como do repelente comercial, em cada unidade experimental., num delineamento inteiramente casualizado. De início os mosquitos seriam coletados na área urbana de Frutal- MG, em amostragem por conveniência, atraídos pela luz, porém, não obtivemos o resultado esperado, então, iniciamos a criação dos mesmo. Então, para dar inicio a criação dos mosquitos adquirimos uma caixa em acrílico adaptada para a criação dos mesmos, em seguida conseguimos os “ovinhos” e assim iniciamos a criação conforme o ciclo de vida do mosquito.



5 RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados obtidos evidenciaram uma diferença significativa na eficiência dos métodos de extração avaliados. O processo de maceração apresentou um rendimento de 0,757g de extrato em um período de 48 horas, enquanto o método de extração por ultrassom resultou em 0,589g de extrato em apenas 1 hora. Embora a maceração tenha proporcionado uma quantidade maior de extrato em termos absolutos, o ultrassom demonstrou-se mais eficiente no que se refere ao tempo, com uma taxa de extração de 0,589g/h, significativamente superior à da maceração, que foi de 0,01577g/h.

O mecanismo do ultrassom, que rompe mais rapidamente as paredes celulares, facilitou a liberação acelerada dos compostos bioativos, tornando o processo mais ágil e eficiente. Por outro lado, a maceração, embora mais demorada, apresentou um rendimento final mais elevado, o que pode ser vantajoso dependendo do objetivo do estudo. Ambos os métodos, contudo, mostraram-se eficazes na extração de classes importantes de compostos bioativos, como alcaloides, saponinas, taninos, esteroides e antraquinonas, ressaltando sua relevância no processo de extração de substâncias com potencial bioativo (Figura 2).



Figura 2. Resultados das avaliações fitoquímicas realizadas.



Esses resultados sugerem que, para aplicações que exijam uma maior rapidez no processo de extração, o ultrassom pode ser preferível. Contudo, se o objetivo for maximizar a quantidade de extrato obtido, a maceração pode ser a técnica mais indicada. A escolha do método de extração, portanto, dependerá das especificidades e metas do estudo em questão.

Na próxima etapa deste projeto, será realizada a avaliação da eficácia repelente dos extratos obtidos, o que permitirá uma análise mais aprofundada de seu potencial no combate a mosquitos vetores de doenças, como dengue, Zika e Chikungunya. Essa fase será crucial para confirmar a aplicabilidade dos extratos de Pimenta-de-macaco em produtos repelentes naturais e acessíveis à população.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados confirmam o potencial das folhas da Pimenta-de-macaco como uma fonte de compostos bioativos. A utilização de diferentes métodos de extração permitiu identificar abordagens mais eficientes e rápidas, como o ultrassom, que se destaca pela sua capacidade de acelerar o processo de obtenção de extratos, sem comprometer a qualidade.

A partir dessas descobertas, abre-se caminho para o desenvolvimento de produtos naturais, acessíveis e de baixo custo que possam ser utilizados no combate a doenças como dengue, Zika e Chikungunya. O projeto não apenas contribui com a ciência ao fornecer novos dados sobre essa planta nativa, mas também oferece uma aplicação prática, direcionada para as necessidades da sociedade. O desenvolvimento de repelentes naturais é uma alternativa promissora para substituir produtos químicos, preservando o meio ambiente e beneficiando comunidades mais vulneráveis.

O projeto demonstra a relevância de continuar investindo em pesquisas que aliem biodiversidade, tecnologia e impacto social, promovendo soluções criativas para problemas globais.



REFERÊNCIAS

- ANGNES, S.I.A. *Isolamento, caracterização química e avaliação da propriedade inseticida do óleo essencial de Piper amplum kunth*. 88p. Dissertação (Mestrado em química) – Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005
- BENCHIMOL, R.L.; SILVA, C.M. da; VERZIGNASSI, J.R. *Utilização de substâncias naturais para o controle de doenças de plantas na região amazônica*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 27p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 346).
- BERGO, C. L. *Estudos agronômicos e fitoquímicos de Piper hispidinervum C.DC. e Piper aduncum L. para produção de safrol e dilapiol*. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, 2010.
- BRASIL. *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue*, 2022. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf. Acesso em: 28 nov 2023.
- CAMARGO, A. X. *Uso de repelentes no meio militar como prevenção de doenças causadas por vetores: os benefícios vencendo os riscos*. Rio de Janeiro: Essex, 2008.
- DONALISIO M. R, FREITAS A. R R, VON ZUBEN A. P B. *Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública*. Rev Saude Publica.;51:30, 2017
- ESTRELA, J.L.V. et al. *Toxicidade de óleos essenciais de Piper aduncum e Piper hispidinervum em Sitophilus zeamais*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.41, p.217-222, 2006.
- GAMBOA, F. et al. *Antimicrobial Activity of Piper marginatum Jacq and Ilex guayusa Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease*. *International Journal of Microbiology*, 2018.



- GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. *Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. Biores. Technol.*, v.99, n.7, p.2507-2515, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.066>
- GOBBO, N. L.; LOPES, N. P. *Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. Química Nova*, v. 30, n. 2, 2007.
- GUERRA, A. M. N. de M. et al. Teste de repelência de óleos essenciais sobre KAROLLYNE SILVA, A., HORING JUNIOR, C., URZÊDO LEÃO, E., DA SILVA, R. Z. *Bioproduto à base de extratos vegetais para o controle da cigarrinha do milho Dalbulus maidis. AGRI-ENVIRONMENTAL SCIENCES*, v.9, n.2, p.1-5, 2023.
<https://doi.org/10.36725/agries.v9i2.8640>
- LEUZINGER, M. D. et al. *Governance for megadiversity: Brazil/Australia*. Brasília: Centro Universitario de Brasília, 2019.
- LIMA-CAMARA TN. *Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. Rev Saude Publica*. 50:36, 2016.
- OLIVEIRA, D. A. B. *Uso do Neem e seus componentes moleculares no controle do mosquito Aedes aegypti. Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, v.8, n.2, Pub.2, Agosto 2015.
- OLIVEIRA, D. A. B. *Uso do neem e seus componentes moleculares no controle do mosquito Aedes aegypti. Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, v. 8, n. 2, Pub.2, p. 1-5, 201
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). ONU News. *Perspectiva global – reportagens humanas, 2023*. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2023/07/1817882>.
- PEREIRA, K.P. et al. *Repelente natural: composto de plantas brasileiras. Ciência Viva*, 2020
- SANTOS, W. I. et al. *Devolvimento de Produtos Naturais com Potencial Repelente para a Prevenção à Dengue. Ensaios e Ciências*, v.27, n.2, p.136-145, 2023. DOI: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2023v27n2p136-145>
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora, 2019.



SUBAPRIYA, R.; NAGINI, S. *Medicinal properties of neem leaves: a review. Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, v. 5, n. 2, p. 149-156, 2005.

SUTTHANONT, W. et al. *Chemical composition and larvicidal activity of edible plantderived essential oils against the pyrethroid-susceptible and -resistant strains of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. *Journal of Vector Ecology*, v. 35, n.1, p.106-115, 2010.