

São Carlos, SP / Maio, 2025

## Isolamento da piperina da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e avaliação da sua inibição na eclosão dos ovos do nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus*

Júlia Francesca da Silva<sup>(1)</sup>, Jeniffer Miho Yoshioka<sup>(1)</sup>, Ana Carolina de Souza Chagas<sup>(2)</sup> e João Oiano Neto<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Bacharelado em Química Tecnológica, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP.

<sup>(2)</sup> Pesquisadores, Embrapa Pecuíria Sudeste, São Carlos, SP.

**Resumo** — O Brasil possui a maior flora inexplorada quanto ao potencial de descoberta de novos compostos que possam ser utilizados na produção de novos antiparasitários com menor impacto ambiental. Os parasitas gastrintestinais são considerados o maior obstáculo para o crescimento do sistema de produção dos pequenos ruminantes nos países tropicais e subtropicais. A parasitose intestinal dos ovinos é uma doença muito prejudicial à pecuária, sendo causada principalmente pelo nematoide *Haemonchus contortus*. Este parasita vem apresentando resistência aos anti-helmínticos de diferentes grupos químicos utilizados atualmente. Além disso, este nematoide possuiu uma alta taxa de reprodução. O gênero *Piper* abrange mais de 700 espécies em todo o mundo, sendo reconhecido por sua importância medicinal e comercial. A pimenta-do-reino, *Piper nigrum* L., possui como composto majoritário a amida piperina, com atividade antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral, analgésica e bactericida. O trabalho avaliou a ação da piperina na eclosão dos ovos do nematoide gastrointestinal *H. contortus*. A piperina foi extraída e isolada de uma amostra comercial de pimenta-do-reino e testada em ensaios in vitro. A maior inibição observada foi 5,73%, para uma solução com concentração de 12 mg/mL. Apesar dos diversos testes de solubilização realizados com a piperina, com diversas misturas de solventes, a concentração máxima obtida para os testes em um solvente inerte aos ovos de *H. contortus* foi de 12 mg/mL. Novos estudos serão realizados com o intuito de aumentar a solubilidade da piperina, uma vez que sua obtenção com altos rendimentos permite explorar o potencial futuro como composto com ação anti-helmíntica.

**Termos para indexação:** *Piper nigrum*, Piperina, Nematoide Gastrintestinal, Atividade Anti-helmíntica, *Haemonchus contortus*.

## Isolation of piperine from black pepper (*Piper nigrum* L.) and evaluation of its inhibitory effect in the egg hatching of the *Haemonchus contortus* gastrointestinal nematode

**Abstract** — Brazil has the largest unexplored flora in terms of potential discovery of new compounds that can be used in the production of new

### Embrapa Pecuíria Sudeste

Rod. Wasghinton Luiz, Km 234  
13560-970, São Carlos, SP  
www.embrapa.br/pecuaria-sudeste  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

#### Comitê Local de Publicações

Presidente

André Luiz Monteiro Novo

Secretário-executivo

Luiz Francisco Zafalon

Membros

Aisten Baldan, Gisele Rosso,

Maria Cristina Campanelli

Brito, Sílvia Helena Picirillo

Sanchez

Revisão de texto

Gisele Rosso

Normalização bibliográfica

Aisten Baldan (CRB-1/2757)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Maria Cristina Campanelli Brito

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

antiparasitics with less environmental impact. Gastrointestinal parasites are considered the main obstacle to the growth of small ruminant production systems in tropical and subtropical countries. Intestinal parasitosis of sheep is a disease very harmful to livestock, being mainly caused by the nematode *Haemonchus contortus*. This parasite has been showing resistance to anthelmintic products of different chemical groups currently used. In addition, this nematode has a high reproduction rate. The genus *Piper* covers more than 700 species worldwide, being recognized for its medicinal and commercial importance. The pepper, *Piper nigrum* L., has as a major compound the amide piperine, with antioxidant activity, anti-inflammatory, antifungal, antitumor, analgesic and bactericidal. This work evaluated the action of piperine in the hatching of eggs of the gastrointestinal nematode *H. contortus*. Piperine was extracted and isolated from a commercial black pepper sample and tested in in vitro assays. The highest inhibition was 5.73% for a solution with a concentration of 12 mg/mL. Despite the several solubilization tests performed with piperine, with various mixtures of solvents, the maximum concentration obtained for the tests in an inert solvent to *H. contortus* eggs was 12 mg/mL. New studies will be carried out in order to increase the solubility of piperine, since its obtaining with high yields allows to explore its future potential as a compound with anthelmintic action.

**Index terms:** *Piper nigrum*, Piperine, Gastrointestinal Nematode, Anthelmintic Activity, *Haemonchus contortus*

## Introdução

As plantas e seus efeitos terapêuticos têm sido usados desde o início da nossa história e o Brasil possui uma imensa biodiversidade a ser estudada. Além disso, os metabólitos secundários oriundos das plantas podem servir como modelo para a síntese de novos compostos menos nocivos ao meio ambiente, como agrotóxicos e pesticidas, utilizados em larga escala na agricultura brasileira atualmente.

A Fitoquímica estuda tanto a estrutura molecular quanto as propriedades biológicas dos vegetais, objetivando a busca por princípios ativos com potencial uso comercial. As plantas necessitam de mecanismos de defesa naturais que as protegem de agentes externos, como outras plantas, herbívoros, fungos e bactérias.

Estas defesas são de natureza química e, normalmente, envolvem substâncias do

metabolismo secundário. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Os metabólitos secundários aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta. Os metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio (Vizzotto et al., 2010).

As endoparasitoses gastrintestinais constituem o maior obstáculo para a ovinocultura e caprinocultura no mundo. No Brasil, a dificuldade é ainda maior devido aos prejuízos econômicos acentuados e fatores climáticos.

Os nematoides tricostrongilídeos são muito frequentes em animais de pastoreio, habitando geralmente o abomaso e o intestino delgado. No abomaso, um dos principais parasitas encontrados é o *Haemonchus contortus*, pertencente ao filo *Nemathelminthes*, classe *Nematoda*, ordem *Strongylida*, superfamília *Trichostrongyloidea*, família *Trichostrongylidae* e gênero *Haemonchus*, que causa a hemoncose, doença parasitária importante para a pecuária (Endo et al., 2014; Melo et al., 2003).

Possui hábito hematófago e animais infectados por esse nematoide, na fase aguda da parasitose, apresentam como sinais clínicos anemia hemorrágica aguda e perda progressiva de peso (Melo, 2005). Estudos realizados concluíram que, dependendo da região e do clima, mais de 80% da carga parasitária de caprinos e ovinos é composta por *H. contortus* (Vieira, 2006).

O uso de anti-helmínticos sintéticos pode levar ao aparecimento de populações resistentes, causando um aumento de custo e baixa eficiência do tratamento, além do risco de contaminação ambiental, do leite e da carne por resíduos (Melo et al., 2003; Costa et al., 2011; George et al., 2021; Bassetto et al., 2024).

Diante destas desvantagens, as pesquisas que buscam tornar os sistemas de produção mais sustentáveis ganham grande destaque, pois buscam alternativas com menor custo e geram produtos livres de compostos químicos nocivos, menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente.

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae e possui mais de 700 espécies nos dois hemisférios e grande importância comercial, econômica e medicinal. O fruto maduro da *Piper nigrum* é a fonte da pimenta branca, enquanto o fruto não maduro origina a pimenta-do-reino. As espécies de *Piper* são quimicamente estudadas mundialmente, devido ao isolamento de inúmeros compostos fisiologicamente

ativos como alcaloides, amidas, terpenos, esteroides, piperolidas, flavonas, flavononas, etc. (Parmar et al., 1997).

A pimenta preta (*Piper nigrum* L.), popularmente conhecida como pimenta-do-reino, possui como principal composto a amida piperina. A piperina ainda sofre uma biotransformação desdobrando-se em ácido pipérico e piperidina. Estudos confirmam que a piperina possui atividade citotóxica, anti-inflamatória, antipirética, analgésica, antioxidante, antitumoral, antifúngica e bactericida (Carnevalli; Araújo, 2013).

### **Haemonchus contortus**

*Haemonchus contortus* é um nematoide de grande relevância para a pecuária de pequenos ruminantes. Apresenta alto potencial biótico, elevado nível de infecção e possui a mais alta taxa de reprodução e deposição de ovos, sendo assim a espécie dominante.

Estima-se que uma fêmea adulta pode produzir de cinco mil a 15 mil ovos por dia a uma taxa de infecção de 60%, sendo o controle da população um árduo obstáculo (Dineen et al., 1965). Por ser hematófago, causa anemia intensa nos animais infectados, acarretando prejuízos consideráveis. Além dos casos fatais, a infecção também afeta o crescimento, fertilidade, produção de leite e carne, entre outros fatores (Vieira, 2006).

A infestação se dá pela ingestão das larvas infectantes presentes nas pastagens e liberação dos ovos através das fezes do animal, que eclodem e se desenvolvem até chegarem novamente ao estágio infectante. O clima tropical quente e úmido é propício a este desenvolvimento (Onyiah; Arslan, 2005). Os sintomas da infecção são anemia, perda de peso, baixo consumo de alimento, redução da produção de leite e, nos casos mais severos, óbito (Chagas et. al., 2022).

### **Resistência do parasita aos anti-helmínticos**

O comércio de anti-helmínticos representa 42% do volume de vendas de 700 milhões de dólares anuais, ou seja, 294 milhões de dólares. Do total de 15 bilhões de dólares anuais referentes à venda de produtos veterinários, os parasiticidas são responsáveis por 27%, aproximadamente quatro bilhões de dólares (Molento et al., 2004).

Entre os três maiores produtores mundiais de ovinos (Austrália, África do Sul e Uruguai), as perdas causadas pelas infecções por nematoides gastrintestinais são da ordem de U\$ 222, U\$ 45 e

U\$ 42 milhões, respectivamente (Chagas et. al., 2022).

No Brasil, somente no estado do Rio Grande do Sul, 42,7% dos ovinos apresentam infecções causadas por nematoides gastrintestinais, resultando na perda de cerca de 17 mil cabeças de animais por ano e prejuízos da ordem de U\$ 400 mil (Chagas et. al., 2022).

Sendo assim, é de vital importância a elaboração de medidas de controle ou eliminação destes parasitas, tanto dos animais quanto das pastagens, diminuindo os prejuízos econômicos e tornando a produção de caprinos e ovinos economicamente viável.

É importante ressaltar que nenhuma dessas alternativas deve contaminar o meio ambiente e, portanto, os meios naturais que não utilizam insumos químicos ganham grande visibilidade. Além da prevenção da contaminação do solo, estas substâncias não causam aumento da resistência parasitária a agentes anti-helmínticos, e ainda resultam na produção de alimentos com menos resíduos químicos (Vieira, 2006).

A forma de prevenção mais utilizada é a vermifugação periódica, que varia de acordo com a região e condições climáticas, mas sempre focando o tratamento com anti-helmíntico nos períodos secos, visto que, em período chuvoso, as larvas habitam as pastagens devido às condições favoráveis, enquanto nos períodos de seca, permanecem no sistema gastrintestinal do animal (Vieira, et al., 1997).

Porém, devido ao alto custo dos medicamentos anti-helmínticos e ao desconhecimento da epidemiologia dos parasitas gastrintestinais, a maioria dos produtores não realiza o controle estratégico e não alterna os grupos de drogas utilizadas, fazendo com que os nematoides adquiram resistência à estas drogas, podendo transmiti-la para as próximas gerações.

Algumas alternativas sugeridas para a redução da dependência química aos anti-helmínticos são o uso de fungos nematófagos (Larsen, 1999), cobre (Gonçalves; Echevarria, 2004), zinco (Mena et al., 2023), seleção de animais geneticamente resistentes aos parasitas gastrintestinais (Parker, 1991), aumento da nutrição proteica do animal, aumentando assim a imunidade e diminuindo a população parasita; além da utilização do método Famacha®, no qual observa-se a coloração da mucosa ocular como parâmetro, permitindo a realização de um tratamento profilático mais seletivo (Molento et al., 2004).

Segundo Padilha (1996) um fármaco ideal que visa ao combate de nematoides deve possuir amplo espectro de ação, ter baixo custo, não causar efeitos secundários negativos aos animais, ser facilmente administrado, possuir flexibilidade na formulação e resultar em baixos níveis de resíduos a fim de possibilitar o consumo da carne e do leite após pequeno período de tempo.

Os anti-helmínticos mais utilizados são o albendazol, pertencente ao grupo dos benzimidazóis, doramectina, eprinomectina, ivermectina, pertencentes ao grupo das avermectinas e levamisol, pertencente ao grupo dos imidotiazóis (Padilha, 1996). Também existem fármacos dos grupos tetraidroirimidinas e salicilanidas.

### Gênero Piper

O gênero *Piper* é o maior dos cinco gêneros pertencentes à família Piperaceae, englobando mais de mil das aproximadamente três mil espécies diferentes conhecidas na família.

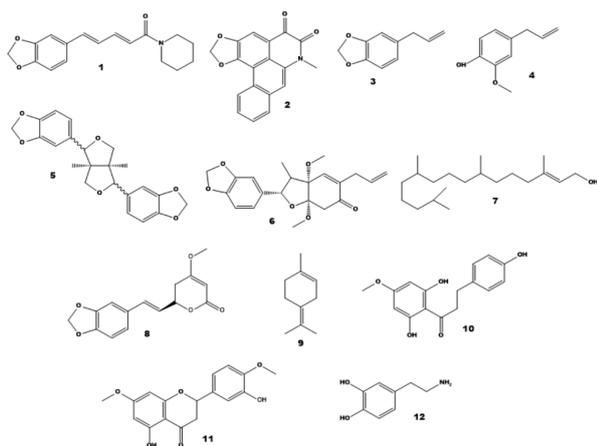
A maioria das espécies de *Piper* possui amidas como compostos principais, também podendo ser classificadas como alcaloides. A literatura atribui diversas atividades a este gênero, tais como inseticida, fungicida, nematocida, herbicida, antioxidante, antiinflamatória, anticâncer, antiofídica, antidepressiva, ansiolítica, antidiabética, hepatoprotetora, entre outras.

Alguns usos medicinais no Brasil são descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Indicações de uso medicinal popular de algumas espécies do gênero Piper no Brasil (Pissinate, 2006).

Espécies	Propriedades medicinais
<i>Piper marginatum</i> Jacq	Frutos substitutos da pimenta-do-reino como condimento, antiespasmódica para afecções do fígado e baço; índios utilizam amassadas para alívio de picadas de insetos.
<i>Piper amalago</i> (Jacq.) Yunck	Folhas usadas sob a forma de cataplasmas ou, através do cozimento, em banhos ou chás devido suas propriedades sudoríferas acentuadas. São úteis para os males do estômago e os frutos são usados no tratamento das cardialgias, no tratamento de reumatismos.
<i>Piper cernuum</i> Vell	O suco das espigas em aguardente e o bagaço misturado com raízes são usados contra mordida de cobra. A raiz é considerada um medicamento sialagogo e diurético. O pó resultante das espigas secas é útil para tratamento de gonorreia crônica e leucorreia.
<i>Piper tuberculatum</i> Jacq	No Ceará, é conhecida como pimenta-de-macaco ou pimenta-longa, considerada planta medicinal estimulante e carminativa
<i>Piper arboreum</i> Yunck	Usada contra reumatismos, bronquites, resfriados e gripes fortes, sendo ainda carminativa e emoliente. As folhas têm óleo de sabor picante, com aroma semelhante ao do hortelã-pimenta. Também usadas para dores de garganta e dente.
<i>Piper divaricatum</i> G. Mey	A raiz é aromática, de sabor forte, semelhante ao do gengibre. As folhas e as raízes servem contra dores reumáticas e cólicas
<i>Piper mollicomum</i> Kunth, <i>Linnaea</i>	Os frutos são úteis para problemas estomacais, sendo também muito usados em doenças venéreas. Suas raízes são mastigadas como anestésico para dor de dente.
<i>Piper aduncum</i> L.	As folhas são utilizadas contra apatia intestinal e males estomacais. São adstringentes e diuréticos, sendo um hemostático poderoso usado em feridas, úlceras e leucorréias. A infusão das folhas é utilizada como estomáquica, balsâmica e desobstruente do fígado.
<i>Piper hispidum</i> Sw.	As folhas, as raízes e os frutos são adstringentes, diuréticos e estimulantes, empregados como desobstruente do fígado. Também é utilizada para deter hemorragias traumáticas. As folhas são utilizadas contra as hemorróidas, reumatismos e desinterias, sendo ainda consideradas hemostáticas. Os frutos são antiblenorrágicos.
<i>Piper carciconectivum</i> L.	Usado na medicina popular como bioprodutor de óleo essencial.

O gênero *Piper* produz cerca de 667 metabólitos diferentes, caracterizados através das investigações fitoquímicas de apenas 112 espécies estudadas (10% das espécies conhecidas). Estes metabólitos se distribuem em classes tais como lignanas, neolignanas, lactonas, terpenos, fenilalcaloides e benzenoides, hidroquinonas, alcaloides e amidas, esteroides, chalconas e diidrochalconas, cromonas, ácidos graxos, ceramidas e flavonoides (Figura 1). As amidas isoladas do gênero *Piper* possuem alta diversidade, sendo conhecidas atualmente 277 amidas (Nascimento et al., 2012; Pissinate, 2006).



**Figura 1.** Classes de metabólitos secundários no gênero *Piper*: amidas: piperina (1) e cefaradiona A (2); fenilpropanóis: safrol (3) e eugenol (4); lignanas: sesamina (5); neolignanas: kadsurina A (6); terpenos: transfitol (7) e terpinoleno (9); kavapironas: metisticina (8); diidrochalconas: asebogenina (10); flavona: 7,4'-dimetoxi-5,3'-diidroxiflavona (11); outros: dopamina (12) (Pissinate, 2006).

### ***Piper nigrum* L.**

A pimenta preta ou pimenta-do-reino (Figura 2) é um dos condimentos mais importantes, sendo usada há séculos não só na alimentação, mas medicinalmente e até em cosméticos.



**Figura 2.** Representação de um indivíduo da pimenta-do-reino *Piper nigrum* L.

A pimenta-do-reino é a única especiaria cujos frutos podem ser comercializados em quatro diferentes versões: preta - grãos em sua maioria maduros, debulhados das espigas e secos ao sol ou em secadoras; branca - grãos debulhados, secos e descascados; verde - grãos debulhados ainda imaturos e vermelha - grãos amadurecidos e debulhados. Embora a sua forma mais comum de comercialização seja a preta (Manual..., 2004; Pissinate, 2006).

É originária da Índia e de países asiáticos, mas também é cultivada no Brasil desde o século XVII. O país é o terceiro maior produtor mundial e o estado do Pará responde por 90% da produção nacional.

A produção de pimenta-do-reino possui notável importância socioeconômica, visto que gera renda para as famílias rurais, chegando a empregar cerca de 50 mil pessoas no período da safra. Nas exportações representa um faturamento em torno de US\$ 50 milhões anuais (Manual..., 2004; Luz et al., 2017).

Os principais tipos de pimenta-do-reino cultivados no Brasil são a Bragantina e Cingapura. A Bragantina é um híbrido obtido no sul da Índia (Panniyur) e possui folhas largas e longos espinhos de 14 centímetros de comprimento. A Cingapura (Kutching) tem folhas pequenas e estreitas e espinhos de 7 centímetros.

A produção média de pimenta-do-reino por planta oscila entre 2,5 a três quilos. A quantidade da amida piperina, responsável pelo princípio pungente da pimenta-do-reino, é maior na Cingapura (69,1%) do que na Bragantina (41,6%) (Luz et al., 2017).

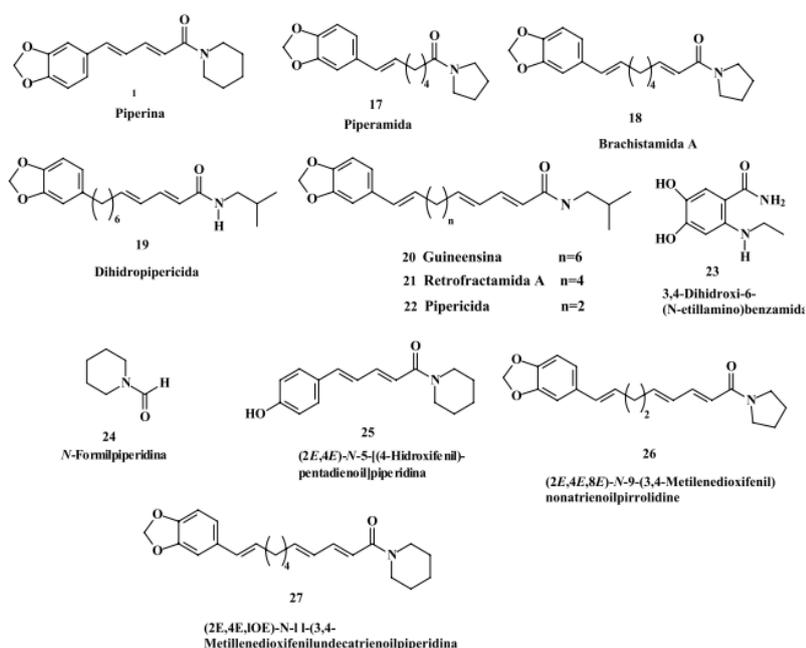
Algumas amidas encontradas em *Piper nigrum* e suas atividades biológicas estão descritas na Tabela 2 e Figura 3 (Nascimento et al., 2012).

O extrato metanólico dos frutos de *Piper longum* foi ativo contra larvas do mosquito *Culex pipiens pallens* a 10 µg/mL. O alcaloide piperidínico piperonalina foi o responsável pela atividade, com um valor de dose letal média de 0,21 mg/L. Esse valor de dose letal média para a piperonalina não foi muito maior do que os valores obtidos para os inseticidas organofosforados malation, metil-clorpirifós e metil-pirimifós (Lee, 2000).

Dados demonstraram a importância biológica e medicinal da piplartina, isolada das raízes da *P. chaba*, indicando que o composto (E)-piplartina pode ser um aspirante propício ao uso em tratamentos combinatórios no combate ao câncer (Nascimento et al., 2012).

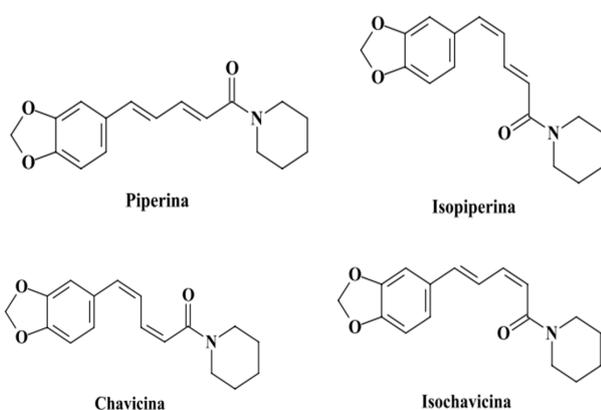
**Tabela 2.** Atividades biológicas de amidas isoladas da espécie *Piper nigrum* L.

Composto	Atividade biológica
3',4'-diidroxi-6'-(N-etilamina)-benzamida	Antioxidante
<i>N-trans</i> -(3',4'-metilenedioxicinnamoil)-isobutilamina	Antifúngica
<i>N-trans</i> -feruloiltiramina	Anticancerígena, inibição da biossíntese da melanina
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- <i>N</i> -[5-(3',4'-metilenedioxifenil)-penta-2,4-dienoil]-pirrolidina / piperilina	Antifúngica
(2 <i>E</i> )- <i>N</i> -[5-(3',4'-metilenedioxifenil)-penta-2-enoil]-pirrolidina	Antifúngica
(8 <i>E</i> )- <i>N</i> -isobutil-9-(3',4'-metilenedioxifenil)-non-8-enamida / diidroretrofractamida C	Enzimática (ACAT)
(8 <i>E</i> )- <i>N</i> -[9-(3',4'-metilenedioxifenil)-non-8-enoil]-pirrolidina	Larvicida, anticancerígena
Piperoleína B	Larvicida, inibição da adesão celular, hepatoprotetora
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>E</i> )- <i>N</i> -[9-(3',4'-metilenedioxifenil)-non-2,4,8-trienoil]-piperidina	Inibição da adesão celular e gastroprotetora
(2 <i>E</i> ,8 <i>E</i> )- <i>N</i> -[9-(3',4'-metilenedioxifenil)non-2,8-dienoil]-piperidina	Inseticida, gastroprotetora e hepatoprotetora
Retrofractamida B / pipericida	Inseticida, gastroprotetora, hepatoprotetora, adipogênica
Guineensina	Antituberculose, inseticida, gastroprotetora e hepatoprotetora
Piperchabamida D	Inibição da adesão celular e hepatoprotetora
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,10 <i>E</i> )- <i>N</i> -[11-(3',4'-metilenedioxifenil)-undeca-2,4,10-trienoil]-piperidina	Hepatoprotetora
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- <i>N</i> -isobutildeca-2,4-dienamida / pelitorina	Antifúngica, antituberculose, inibição da adesão celular, inseticida e antiagregação de plaquetas
Pipinoohina	Larvicida

**Figura 3.** Estrutura química de algumas amidas isoladas de *Piper nigrum*.

## Piperina

A piperina é a amida majoritária encontrada na pimenta-do-reino, sendo responsável por seu sabor pungente e apresenta como derivados o ácido pipérico e a piperidina (Cardoso et al. 2005). Foi uma das primeiras amidas isoladas em 1819 por Oerstedt e sua estrutura foi determinada em 1894 por Landenburg e Scholtz (Epstein et al., 1993). A piperina é o isômero 2E,4E da estrutura 5-(benzo[1,3]-dioxol-5-il)-1-(piperidinil)-2,4-pentadien-1-ona e possui três formas isoméricas minoritárias em algumas espécies: isopiperina (2Z,4E), chavicina (2Z,4Z) e isochavicina (2E,4Z) (Figura 4) (Pissinate, 2006).



**Figura 4.** Piperina e seus isômeros conformacionais minoritários.

Estudos indicam que a piperina inibe diferentes vias citocrômicas, possui potencial antiparasitário, atua como imunomoduladora e pode reduzir as citocinas pró-inflamatórias, sendo usada na prevenção de metástases (Cardoso et al., 2005; Carnevalli e Araújo, 2013; Pissinate, 2006).

Uma propriedade marcante da piperina é o seu potencial de aumento da biodisponibilidade de alguns medicamentos quando combinados, aumentando sua eficiência devido à sua maior concentração plasmática (Ferreira et al., 2012).

A piperina é encontrada majoritariamente nos frutos da espécie *P. nigrum*, mas também está presente nas folhas e no caule (Semler; Gross, 1988).

Alguns trabalhos têm sido essenciais para determinação das propriedades antioxidantes da piperina, que auxilia inibindo ou retardando as reações de oxidação causadas por radicais livres, diminuindo os danos causados às células e aos tecidos, protegendo contra certos tipos de câncer.

O carcinógeno benzo[a]pireno induz grande número de radicais livres, enquanto a piperina é capaz de suprimir esses efeitos, reduzindo a concentração de radicais livres formados e o crescimento de células cancerígenas (Pissinate, 2006).

## Gênero Piper x *Haemonchus contortus*

Um estudo publicado por Gaínza et al. (2016) avaliou a atividade do óleo essencial da espécie *Piper aduncum* L. contra o nematoide *Haemonchus contortus*. Esta espécie de pimenta produz um óleo essencial biodegradável de alto valor comercial devido à sua atividade fungicida, bactericida, larvicida, inseticida, entre outras.

O óleo, obtido da destilação por arraste de vapor, foi testado em doze concentrações de 0,02 a 12,5 mg/mL, com adição de 2% de Tween 80 para formação de uma emulsão estável, no teste de eclodibilidade dos ovos. A maior concentração inibiu 55,8% dos ovos sensíveis ( $IC_{50}$  de 5,72 mg/mL) e 14,68% dos ovos resistentes (Gaínza et al., 2016).

Em estudo semelhante, Oliveira et al. (2014) obtiveram valores de  $LC_{50}$  e  $LC_{90}$  de 2,4 e 8,9 mg/mL, respectivamente, para inibição da eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* utilizando óleo essencial das folhas de *P. aduncum* L. O óleo essencial foi diluído em 1% de Tween 80 em água destilada em quatro concentrações de 3,6 a 50 mg/mL. O óleo essencial mostrou 95% de inibição dos ovos de *H. contortus* a uma concentração de 12 mg/mL.

## Metodologia

Neste estudo foram utilizados os equipamentos e insumos (reagentes e solventes) descritos abaixo nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 3.** Equipamentos utilizados.

Equipamentos	Marca e modelo
Banho-maria de aquecimento	Fisatom® 550
Banhos ultrassônicos	Quimis® Q335D2 e Thornton® modelo T50
Agitador magnético	Marconi® MA 085
Agitador vórtex	Warmnest® VX – 28
Evaporador rotativo	Fisatom® 802
Bomba de vácuo	Marconi® MA 2057
Balança analítica	Shimadzu® AUJ 220
Liofilizador de bancada	Liobrás® modelo Liotop® L108
Pipetadores automáticos	Eppendorf® Research (100-1000µL e 500-5000µL)
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear - RMN	Bruker® 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio)

**Tabela 4.** Insumos utilizados.

Insumos	Fabricante	Lote
Ácido clorídrico	Synth®	194046
Sílica gel 60 70-230 mesh	Macherey-Nagel®	072833110
Cromatoplasmas de sílica gel Alugram® Xtra Sil G/UV254	Macherey-Nagel®	206170
Hidróxido de sódio	Proquímios®	12/0209
Crodamol®	Croda® do Brasil	M1403021
Dimetilsulfóxido	Synth®	168659
Tween 80	Synth®	167761
Piridina	LSChemicals®	73517
Diclorometano	Araguaya®	A-65990
Metanol	Synth®	219200
Etanol	Synth®	212332
Acetato de etila	Synth®	196805

### Extração e recristalização da piperina

Para a obtenção da piperina utilizou-se uma amostra comercial de grãos desidratados de pimenta-do-reino de cultivo orgânico. Algumas informações do fabricante para esta amostra estão descritas nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5.** Especificações da pimenta-do-reino utilizada neste estudo.

Matriz vegetal	Grãos desidratados de pimenta-do-reino
Data de compra	07/07/2017
Lote	1114
Validade	12/2017
Local da compra	Empório Brigante – Mercado Municipal de São Carlos, SP.
Fornecedor	Companhia das Ervas – Ervas e especiarias
Produtor	Cury e Cury LTDA – CNPJ: 00.023.224/0001-19
Distribuidor	Fernandes Cury Ind. e Comércio de Alimentos LTDA, CNPJ: 10.606.398/0001-68

**Tabela 6.** Valores nutricionais informados pelo fabricante (cada 100g).

Valor energético	334 kcal/ 1414kJ	17% VD*
Carboidratos	65g	22% VD*
Proteínas	11g	15% VD*
Gorduras Totais	3,3g	6,0% VD*
Gorduras Saturadas	1,0g	5,0% VD*
Fibra Alimentar	27g	108% VD*
Sódio	0,0044g	12% VD*

\*(%VD): Valores diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ.  
 Não contém quantidade significativa de gordura trans.

Inicialmente, 1006 gramas de grãos desidratados da pimenta-do-reino foram moídos em moinho de facas com peneira de 1,0 mm de diâmetro de furos. Foram realizadas extrações por maceração estática a frio com intervalo de 72 horas entre as extrações. No processo de extração utilizou-se uma razão de 1:4 Kg/L massa de amostra: volume de solução extratora.

Ao início de cada extração, a mistura foi submetida ao banho ultrassônico por 30 minutos. As extrações foram feitas utilizando uma sequência de diferentes solventes e diferentes polaridades (Tabela 7). Ao final de cada extração, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e a amostra foi submetida a uma nova extração.

**Tabela 7.** Parâmetros de extração dos frutos da pimenta-do-reino.

Fase móvel extratora	Repetições
9:1 (v/v) acetona: água deionizada <sup>(1)</sup>	4
Metanol	4
Diclorometano	3

Massa de grãos moídos: 1006g

<sup>(1)</sup>Razão amostra: fase extratora: 1:4 kg/L

Os extratos provenientes das extrações com metanol e diclorometano foram reunidos e submetidos à partição líquido-líquido com acetato de etila e água. As frações dessa partição foram reunidas às respectivas frações acetato de etila e água obtidas da partição líquido-líquido do extrato proveniente da extração com acetona: água deionizada (9:1) após evaporação da acetona em rotaevaporador (Figura 5).



Foto: João Olano Neto

**Figura 5.** Partição líquido-líquido com acetato de etila e água dos extratos obtidos dos grãos da pimenta-do-reino *Piper nigrum*.

Por último, o material foi submetido a 30 minutos em banho ultrassônico e extraído uma única vez com 2,5 litros de água deionizada por maceração estática a frio por 72 horas. O extrato aquoso gerado nesta etapa foi reunido diretamente à fração aquosa das partições líquido-líquido anteriores e submetido à liofilização em duas etapas (Tabela 8).

A fração aquosa obtida após evaporação da acetona foi armazenada em geladeira e houve a formação de uma significativa quantidade de precipitado (aproximadamente 21g). Esse precipitado foi filtrado a vácuo, lavado com água deionizada gelada e armazenado em freezer.

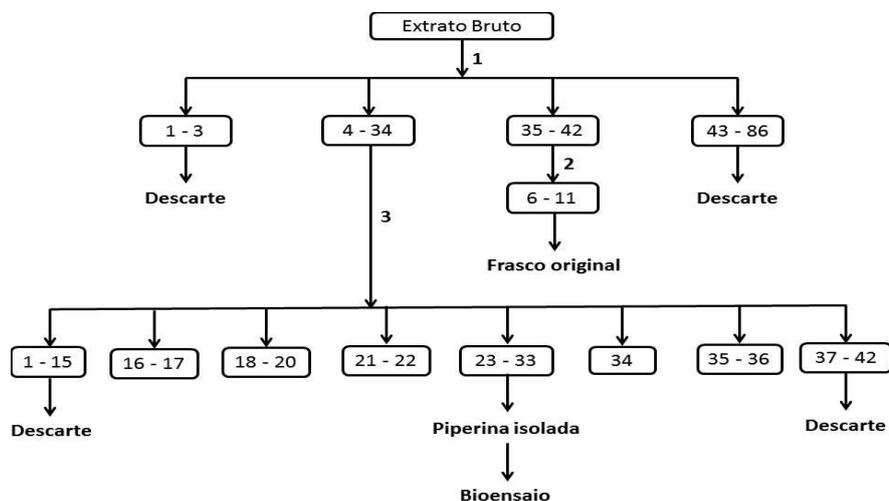
### Separação cromatográfica e purificação da piperina recristalizada

O extrato bruto recristalizado foi submetido à separação cromatográfica em coluna aberta. Os parâmetros de cada etapa de separação estão descritos na Tabela 9.

Foram obtidas 86 frações de aproximadamente 20 mL. Essas frações foram cromatografadas em placas de cromatografia em camada delgada (CCD), reveladas com luz ultravioleta ( $\lambda=254\text{nm}$ ) e solução de vanilina: ácido sulfúrico: ácido acético e em seguida reunidas de acordo com a similaridade dos perfis observados (Figura 6).

**Tabela 8.** Parâmetros da liofilização.

	Início	Fim	Pressão ( $\mu\text{Hg}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Duração (h)
Etapa 1	26/09/17	30/09/17	96	- 65	98
Etapa 2	02/10/17	09/10/17	144	- 67	163



**Figura 6.** Etapas envolvidas nas separações por cromatografia em coluna para purificação da piperina de *Piper nigrum* e suas respectivas frações.

**Tabela 9.** Parâmetros utilizados nas separações por cromatografia em coluna aberta.

Coluna 1	Massa de amostra aplicada (g)	8,0
	Fase estacionária	Sílica gel 70 a 230 mesh
	Massa de fase estacionária (g) <sup>(1)</sup>	320,0
	Diâmetro da coluna (Ø cm)	6,0
	Comprimento da coluna (L cm)	25,0
	Modo de eluição	Isocrático
Composição da fase móvel (v/v)		diclorometano:acetato de etila 9:1
Coluna 2	Massa de amostra aplicada (g)	0,8
	Fase estacionária	Sílica gel 70 a 230 mesh
	Massa de fase estacionária (g) <sup>(1)</sup>	100,0
	Diâmetro da coluna (Ø cm)	3,0
	Comprimento da coluna (L cm)	37,5
	Modo de eluição	Isocrático
Composição da fase móvel (v/v)		diclorometano:acetato de etila 9:1
Coluna 3	Massa de amostra aplicada (g)	5, 17g
	Fase estacionária	Sílica gel 70 a 230 mesh
	Massa de fase estacionária (g) <sup>(1)</sup>	128g
	Diâmetro da coluna (Ø cm)	3
	Comprimento da coluna (L cm)	46
	Modo de eluição	Isocrática
Composição da fase móvel (v/v)		hexano:acetona 7,5:2,5

<sup>(1)</sup> A proporção entre sílica gel: amostra foi de 40:1 m/m.

A segunda cromatografia líquida em coluna foi feita com a reunião das frações 35 a 42 obtidas da primeira coluna, totalizando 0,812g, com rendimento de 10,2%. A terceira coluna foi feita com a reunião das frações 4 a 34 da primeira coluna, da qual se obteve 5,171g da piperina pura, equivalente a um rendimento de 64,6%.

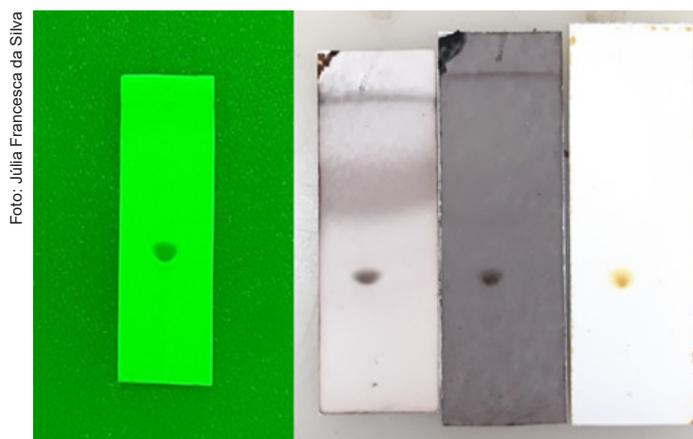
As frações 23 a 33 da terceira coluna apresentaram cristais amarelos pálidos, totalizando 4,837 g e rendimento de 94% (Figura 7).

Foi realizada cromatografia em camada delgada, utilizando como eluente hexano e acetona na proporção de 7,5:2,5 (v/v). O composto se mostrou puro quando revelado em UV 250 nm, vanilina, anisaldeído e iodo, segundo a Figura 8. Este composto foi caracterizado como piperina.



Foto: Júlia Francesca da Silva

**Figura 7.** Piperina obtida a partir do extrato recristalizado (precipitado) de *Piper nigrum* e cristais de piperina pura.



**Figura 8.** Cromatografia em camada delgada (CCD) da piperina pura. Cromatoplaças reveladas com luz UV 254 nm, vanilina, anisaldeído e iodo, respectivamente.

### Caracterização espectroscópica da piperina

A piperina pura foi caracterizada por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ).

Utilizou-se um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker® de 9,4 Tesla, frequência de ressonância do hidrogênio de 400 MHz, equipado com sonda reversa, disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

Para a obtenção dos espectros, 100 mg do composto puro foram solubilizados em 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ , Sigma-Aldrich®, pureza mínima 99,8%) contendo tetrametilsilano

como padrão interno. A solução foi filtrada e transferida para um tubo de quartzo de 5,0 mm de diâmetro.

### Testes de solubilidade da piperina

A solubilidade da piperina foi testada com diferentes misturas de solventes para posterior realização do teste de eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* (Tabela 10), respeitando-se a concentração limite para cada solvente orgânico de forma que a inibição da eclosão dos ovos não seja superior a 10% (Tabela 11) de acordo com o que foi descrito por Migliato et al. (2007).

**Tabela 10.** Testes de solubilidade da piperina.

Mistura de solventes	Concentração (mg/mL)	Solubilidade
8:2 (v/v) água:Tween 80	25	Insolúvel
9:1 (v/v) água:acetona	25	Insolúvel
9,5:0,5 (v/v) água:DMSO	25	Parcialmente solúvel
9:1 (v/v) água:acetona	10	Insolúvel
9,5:0,5 (v/v) água:metanol	10	Insolúvel
9,5:0,5 (v/v) água:acetonitrila	10	Insolúvel
9,5:0,5 (v/v) água:piridina	10	Insolúvel
9,5:0,5 (v/v) água:DMSO	5,0	Parcialmente solúvel
7,5:2,0:0,5 5% água:Tween 80:DMSO	5,0	Insolúvel
9,5:0,5 (v/v) água:etanol	5,0	Insolúvel
9,5:0,5 (v/v) Crodamol®:DMSO	5,0	Parcialmente solúvel
9:1 (v/v) Crodamol®:acetona	5,0	Insolúvel

**Tabela 11.** Toxicidade dos solventes e surfactantes em mistura com água na eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* (Migliato et al., 2007).

Solventes e Surfactantes**	Concentração avaliada em mistura com água*				
	1%	3%	5%	10%	20%
Acetato de etila	7,4	8,2	23,6	20,2	100
Acetona	3,8	0,9	3,4	8,0	28,9
Etanol	0,0	5,1	5,1	11,2	100
Metanol	0,0	0,0	8,1	36,3	100
Dimetilsulfóxido	1,0	0,0	0,7	61,8	100
Detergente Neutro	100	100	100	100	100
Triton X-100	74,5	98,1	94,2	93,7	96,2
Tween 80	0,1	0,0	2,5	1,2	1,5

\* A água não apresenta inibição da eclosão dos ovos, sendo utilizada como solvente referência.

\*\*Destacadas em cinza estão as concentrações máximas dos solventes orgânicos que podem ser utilizadas na solubilização dos compostos.

### Teste de eclodibilidade dos ovos (EHT - *Egg Hatch Test*)

No teste da eclodibilidade dos ovos (EHT), os ovos dos nematoides gastrintestinais foram coletados diretamente da ampola retal dos animais, que possuíam um valor superior de dois mil ovos por grama de fezes (OPG).

As fezes foram homogeneizadas em água e filtradas. Os ovos foram retidos em peneiras de 25µm, lavados com água destilada e centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o material remanescente ressuspendido em solução salina.

Após centrifugação, os ovos coletados foram colocados para sedimentação. Foi realizada então contagem dos ovos em cinco alíquotas de 10µL, totalizando 50 µL, e preparadas amostras com aproximadamente 100 ovos/250 µL (Chagas, 2008).

O teste de eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* foi realizado seguindo metodologia de Coles et al. (1992) adaptado por Chagas (2008). Foi utilizada a cepa Echevarria 91, susceptível ao levamisol e albendazol (Echevarria et al., 1991), mantida em hospedeiros ovinos monitorados semanalmente quanto à infecção monoespecífica.

Em placa de 24 poços foram adicionados 250 µL de água deionizada contendo aproximadamente 100 ovos e 250 µL da solução teste. Neste processo, a concentração inicial de cada amostra foi diluída pela metade, resultando em uma concentração final de 50 mg/mL.

As placas foram mantidas em estufa (27°C ± 80% UR) por 24 horas e ao final desse período foi

feita a contagem do número de larvas e ovos não eclodidos presentes em cada poço.

No bioensaio a mistura de solventes utilizada para solubilizar as amostras foi considerada como controle positivo e 100% de água deionizada como controle negativo. Todas as concentrações dos extratos e controles foram avaliadas em seis repetições (n=6).

A inibição da eclodibilidade foi expressa como média simples das repetições e calculada segundo a equação abaixo:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ ovos não eclodidos}}{\text{N}^\circ \text{ ovos não eclodidos} + \text{N}^\circ \text{ de larvas}} \times 100$$

Neste estudo foram realizados quatro testes distintos. O primeiro foi realizado utilizando soluções de diferentes pH (3 a 11), sem adição da piperina, com o intuito de avaliar o efeito do pH do meio de incubação na eclosão dos ovos.

Para o segundo teste, foi preparada uma emulsão da piperina em água: DMSO 9,5:0,5 (v/v) nas concentrações de 12; 6,0 e 3,0 mg/mL e avaliado o efeito dessa emulsão no teste de eclodibilidade.

No terceiro, preparou-se uma solução estoque de 100 mg/mL de piperina em uma mistura de solventes contendo 8,5:1,0:0,5 Crodamol®: acetona: etanol. Esta solução foi diluída nas concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL e 6,25 mg/mL.

O quarto teste foi realizado preparando-se uma emulsão de piperina com concentração de 10mg/mL em 9,5:0,5 água: DMSO. Esta solução foi filtrada em membrana filtrante PTFE de 45 µm e diluída

para as concentrações de 5,0; 2,5 e 1,25 mg/mL. Também foi feito um teste com uma solução de 10 mg/mL em 9,5:0,5 Crodamol®: DMSO, no qual não houve formação de precipitado, sendo necessária apenas agitação em vórtex.

## Resultados e Discussões

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 9 a 12) indicaram a presença de dois hidrogênios ( $-\text{CH}_2$ ) a  $\delta$  5,89 ppm (s), característicos de um grupo metilenodióxi ( $-\text{OCH}_2\text{O}$ ).

O sinal a  $\delta$  6,90 ppm (*d*; 1,6 Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-2' do grupo piperonila, sendo possível observar seu acoplamento a  $J^4$  com hidrogênio H-6'a  $\delta$  6,81 ppm (*dd*; 8,0 e 1,6 Hz), que por sua vez apresentou um acoplamento a  $J^3$  com o hidrogênio H-5' a  $\delta$  6,69 ppm (*d*; 8,0 Hz).

Os sinais dos hidrogênios H-2'' e H-6'' foram observados como dois singletos largos a  $\delta$  3,56 ppm (*s*) e a  $\delta$  3,45 ppm (*s*), respectivamente. Esses hidrogênios apresentam uma maior desproteção em relação aos demais hidrogênios do grupamento piperidínico (H-3''  $\delta$  1,57 ppm (*m*), H-4''  $\delta$  1,61 ppm (*m*) e H-5''  $\delta$  1,57 ppm (*m*)) por estarem em uma posição vicinal ao heteroátomo de nitrogênio.

O sinal a  $\delta$  6,36 ppm (*d*; 14,8 Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-2 da dupla ligação  $\text{C}_2\text{-C}_3$  do dieno conjugado, o qual apresentou acoplamento com o hidrogênio H-3 a  $\delta$  7,33 ppm (*ddd*; 14,0; 7,6 e 2,8 Hz).

As constantes de acoplamento de 14,8 Hz e 14,0 Hz observados para os hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente, permite atribuir para esses hidrogênios da dupla ligação  $\text{C}_2=\text{C}_3$  a configuração de uma dupla ligação com isomeria *trans*. Os sinais dos hidrogênios H-4 e H-5 foram observados como um multipletto a  $\delta$  6,66 ppm (Tabela 12).

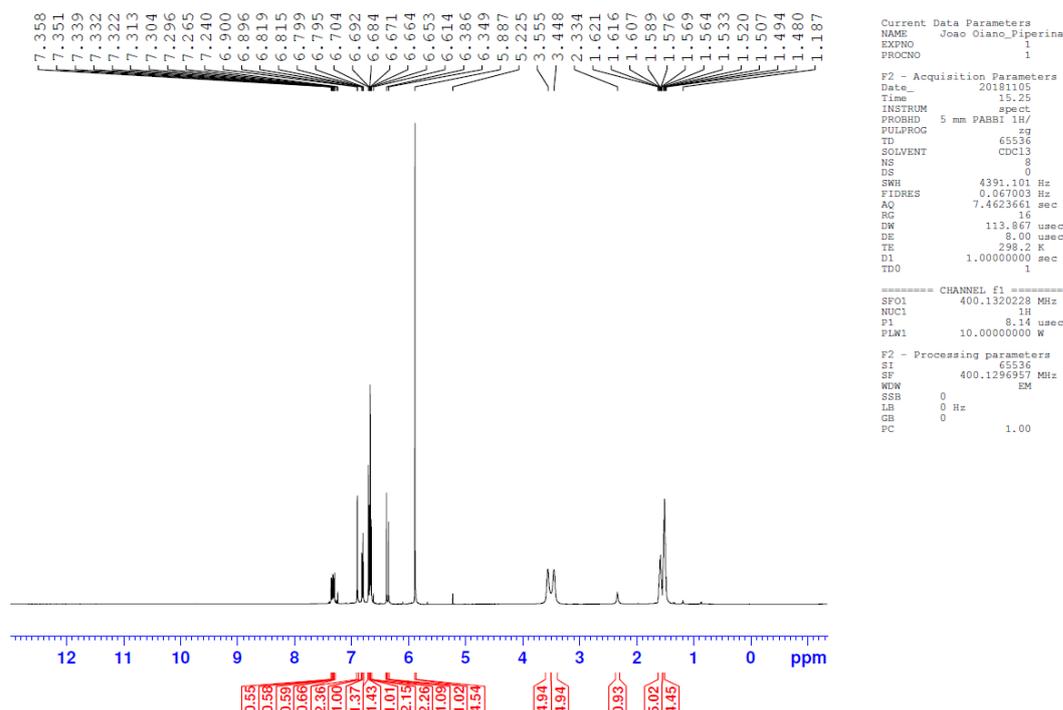


Figura 9. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da piperina (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

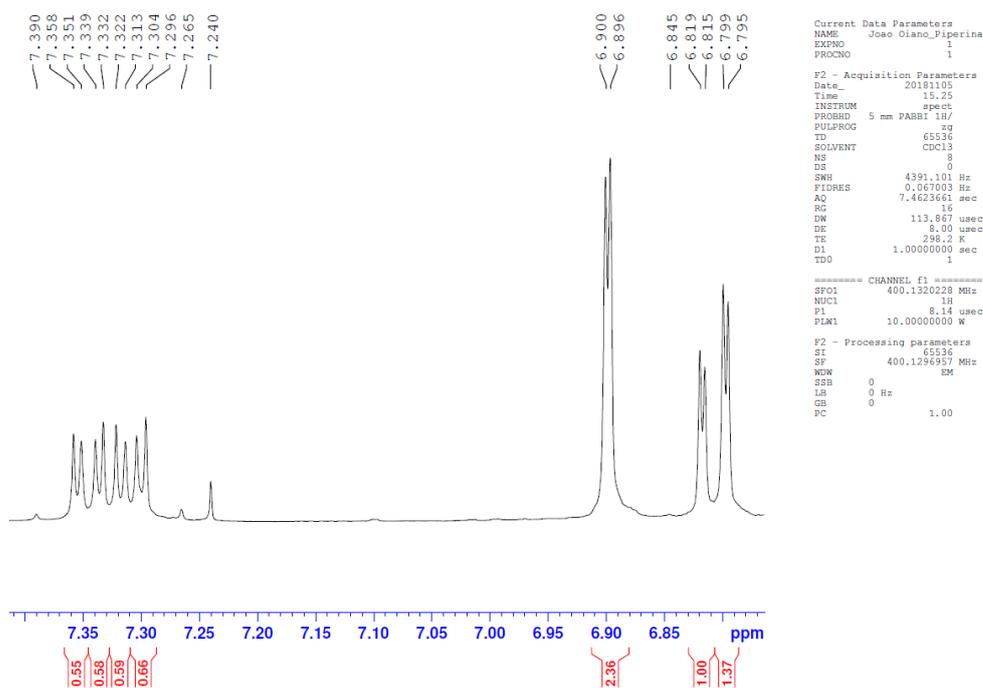


Figura 10. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H da piperina na região de 7,4 a 6,8ppm (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

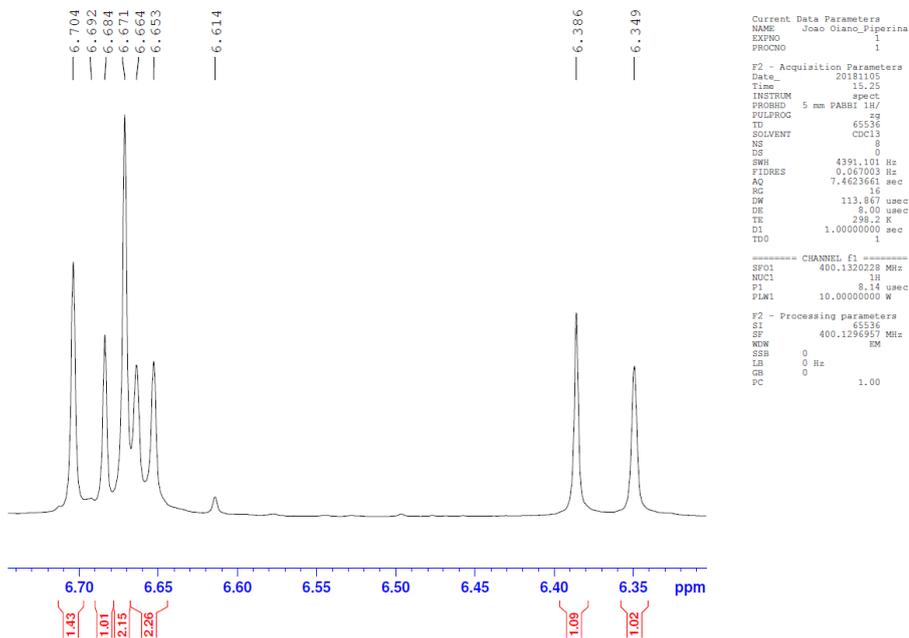


Figura 11. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H da piperina na região de 6,8 a 6,3ppm (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

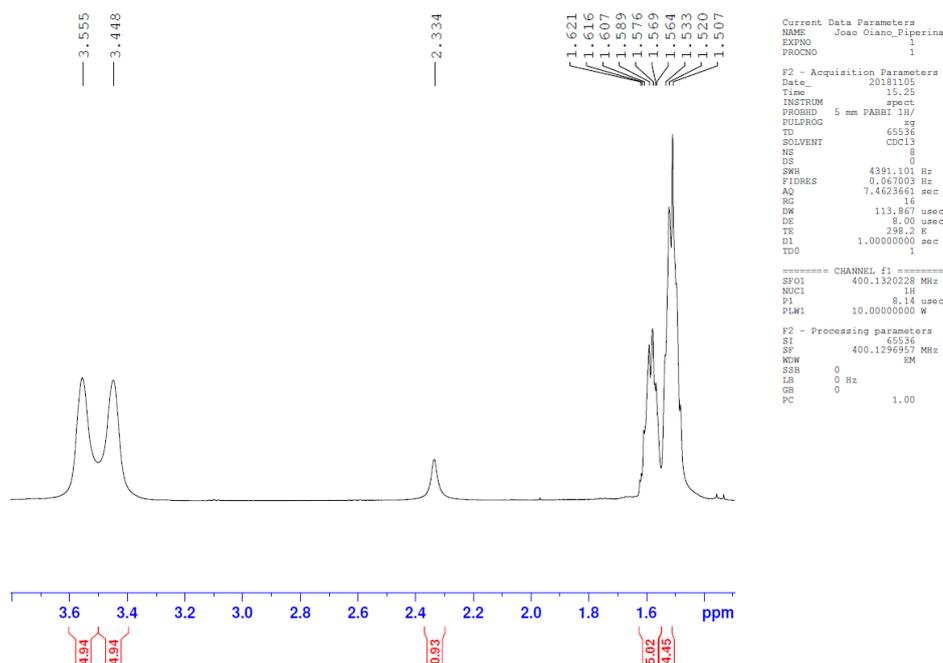


Figura 12. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da piperina na região de 3,7 a 1,5ppm (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Tabela 12. Dados experimentais de RMN  $^1\text{H}$  da piperina comparados aos dados descritos na literatura.

Hidrogênio	Deslocamento químico ( $\delta$ , ppm) Multiplicidade Constante de acoplamento (J, Hz) <sup>(1)</sup>	Deslocamento químico ( $\delta$ , ppm) Multiplicidade Constante de acoplamento (J, Hz) <sup>(2)</sup>
2	6,36; <i>d</i> ; 14,8 Hz	6,42; <i>d</i> ; 14,8 Hz
3	7,33; <i>ddd</i> ; 14,0; 7,6 e 2,8 Hz	7,38; <i>ddd</i> ; 14,3; 8,4 e 1,8 Hz
4	6,66; <i>m</i>	6,74; <i>m</i>
5	6,66; <i>m</i>	6,74; <i>m</i>
2'	6,90; <i>d</i> ; 1,6 Hz	6,96; <i>s</i>
5'	6,69; <i>d</i> ; 8,0 Hz	6,76; <i>d</i> ; 8,0 Hz
6'	6,81; <i>dd</i> ; 8,0 e 1,6 Hz	6,88; <i>d</i> ; 8,0 Hz
2''	3,56; <i>sl</i>	3,62; <i>m</i>
3''	1,57; <i>m</i>	1,58; <i>m</i>
4''	1,61; <i>m</i>	1,65; <i>m</i>
5''	1,57; <i>m</i>	1,58; <i>m</i>
6''	3,45; <i>sl</i>	3,51; <i>m</i>
-OCH <sub>2</sub> O-	5,89; <i>s</i>	5,96; <i>s</i>

<sup>(1)</sup>Dados experimentais (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

<sup>(2)</sup>Dados da literatura (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Khan et. al, 2017.

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C (Figuras 13 a 17) indicaram a presença de uma carbonila a δ 165,2 ppm atribuída ao carbono C-1 (grupamento amida). O sinal característico do carbono de um grupo metilenodióxi (-OCH<sub>2</sub>O-) foi observado a δ 101,1 ppm.

O espectro de DEPT 135 (Figura 18) indicou a presença de seis carbonos metilênicos (-CH<sub>2</sub>, sinal negativo) com deslocamentos químicos de δ 101,1 ppm (metilenodióxi) e cinco carbonos a δ 43,0 ppm (C-2''), δ 26,5 ppm (C-3''), δ 24,4 ppm (C-4''), δ 25,4 ppm (C-5'') e δ 46,7 ppm (C-6'') referentes ao grupamento piperidínico.

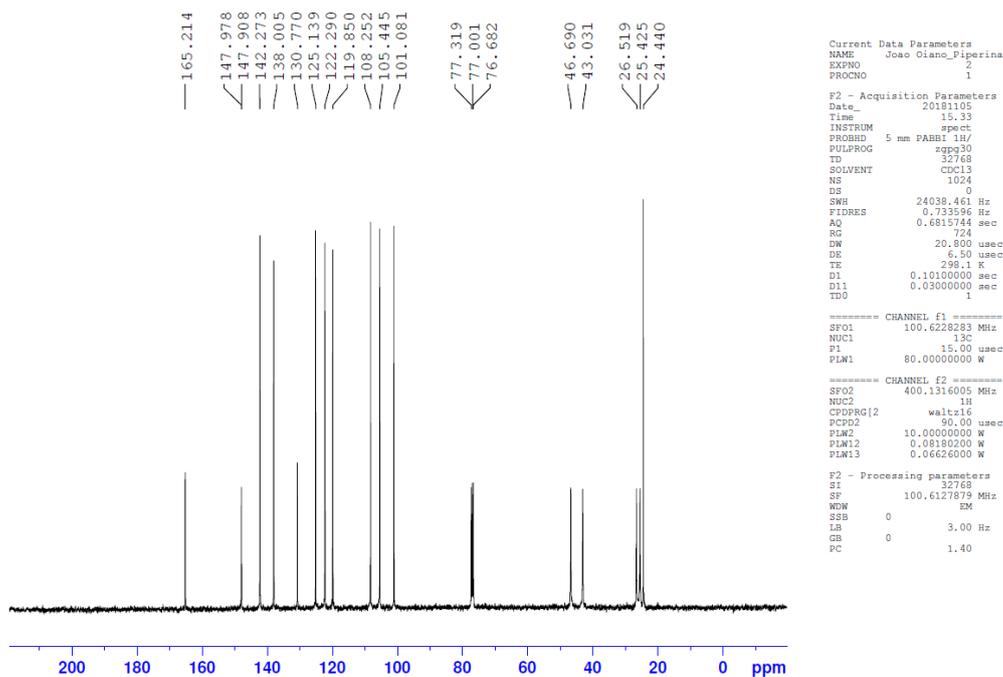


Figura 13. Espectro de RMN <sup>13</sup>C da piperina (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

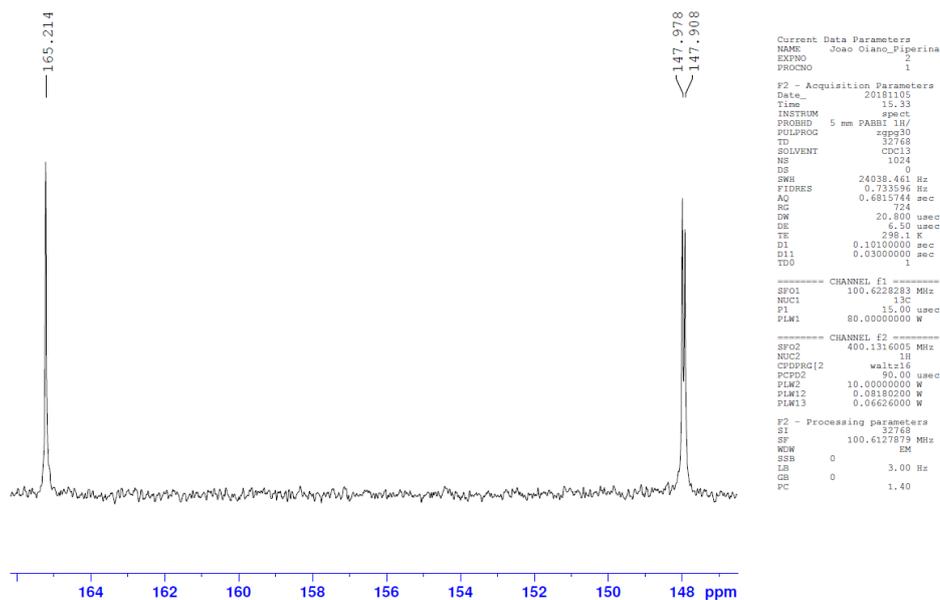


Figura 14. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C da piperina na região de 166 a 147ppm (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

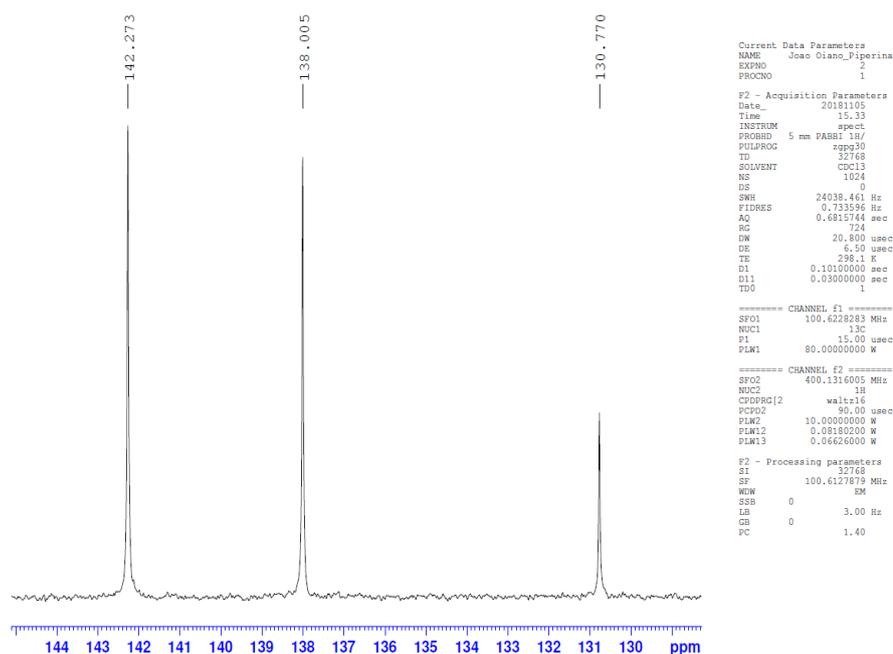


Figura 15. Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da piperina na região de 144 a 130ppm (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

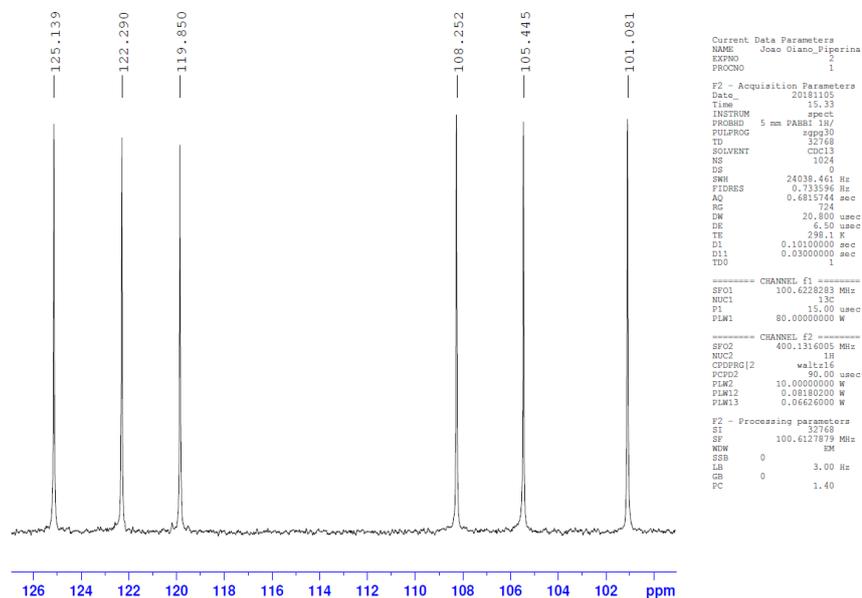


Figura 16. Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da piperina na região de 126 a 100ppm (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Os carbonos metínicos (-CH), referentes ao grupamento dieno conjugado à carbonila, apresentaram sinal positivo no espectro de DEPT 135 e foram observados a  $\delta$  119,9 ppm (C-2),  $\delta$  142,3 ppm (C-3),  $\delta$  125,1 ppm (C-4) e  $\delta$  138,0 ppm (C-5) (Tabela 13).

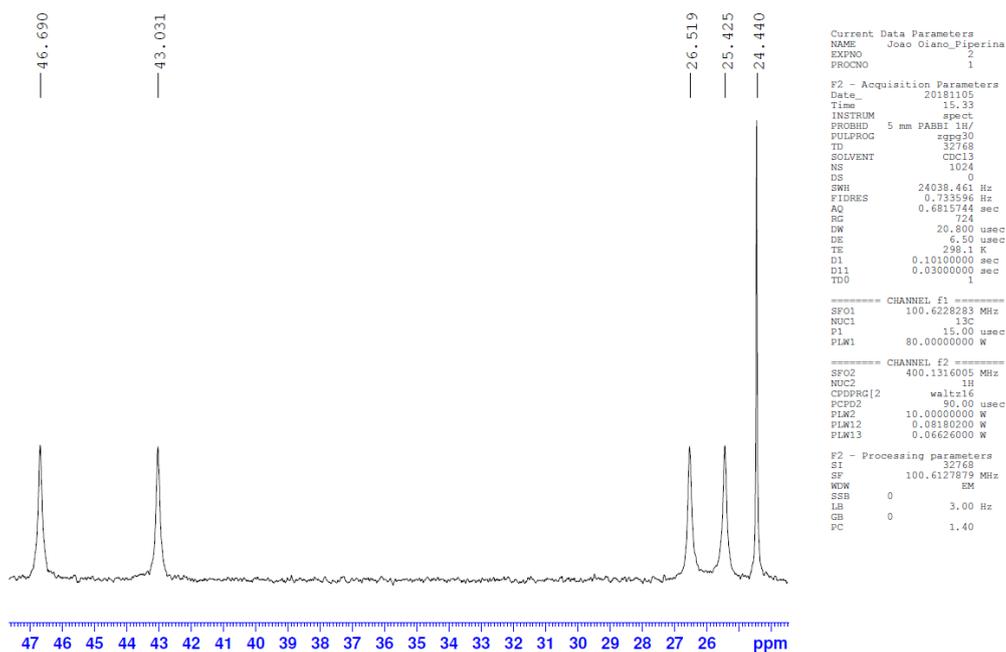


Figura 17. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C da piperina na região de 47 a 24ppm (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

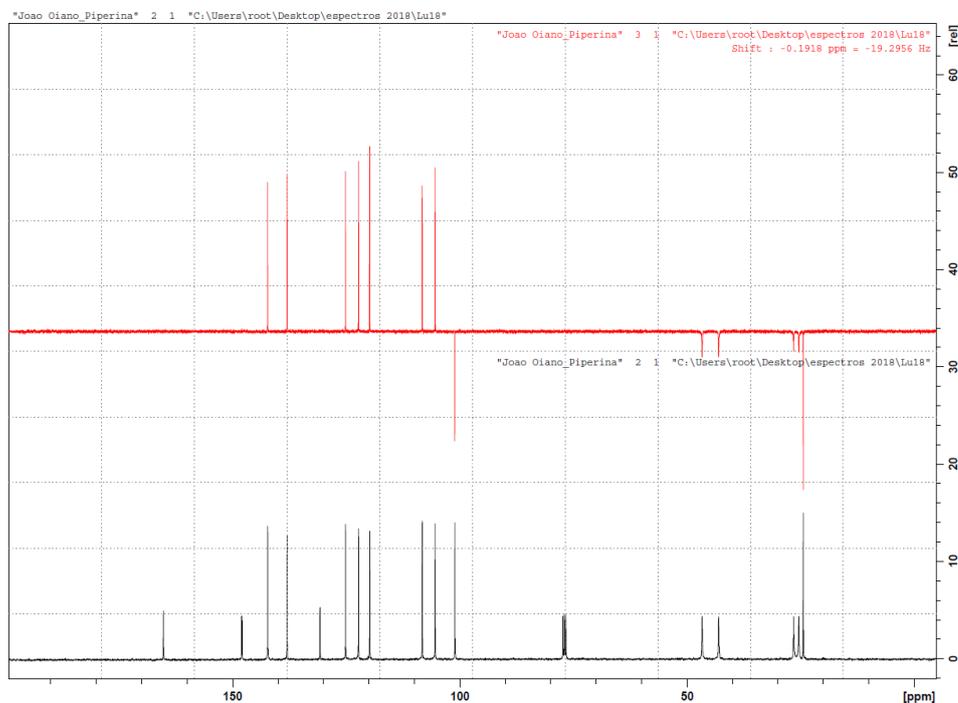


Figura 18. Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135 da piperina (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

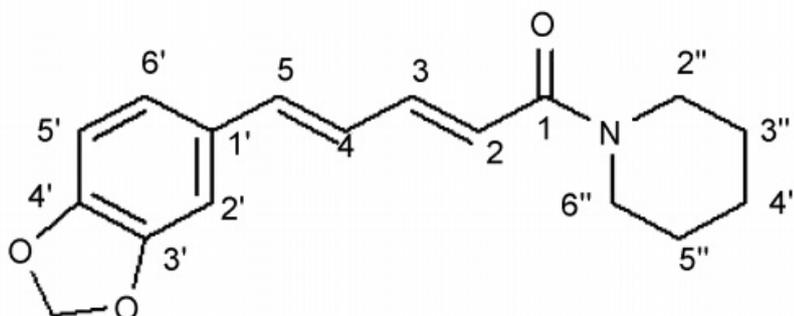
**Tabela 13.** Dados experimentais de RMN  $^{13}\text{C}$  da piperina comparados aos dados descritos na literatura.

Carbono	Deslocamento químico ( $\delta$ , ppm) <sup>(1)</sup>	Deslocamento químico ( $\delta$ , ppm) <sup>(2)</sup>
1	165,2	165,5
2	119,9	120,1
3	142,3	142,5
4	125,1	125,4
5	138,0	138,2
1'	130,8	131,1
2'	105,4	105,7
3'	148,0	148,2
4'	147,9	148,1
5'	108,2	108,5
6'	122,3	122,5
2''	43,0	43,3
3''	26,5	26,8
4''	24,4	24,7
5''	25,4	25,7
6''	46,7	46,9
-OCH <sub>2</sub> O-	101,1	101,3

<sup>(1)</sup>Dados experimentais (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

<sup>(2)</sup>Dados da literatura (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Khan et. al, 2017; Nascimento et al., 2012.

Todos os dados experimentais de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , quando comparados aos dados da literatura (Tabelas 12 e 13), permitiram identificar o composto isolado como sendo da amida piperina (Figura 19).



**Figura 19.** Estrutura química da piperina.

Os resultados do teste de avaliação do efeito do pH do meio de incubação na eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* estão descritos na Tabela 14.

Como pode ser observado, para os valores de pH variando de 3,5 a 4,8 (meio ácido) houve 100% de inibição da eclosão dos ovos. Para pH de 5,7 a inibição da eclosão foi apenas 2,21%. No intervalo de pH de 6,3 a 7,1 (meio neutro) a inibição da eclosão foi nula. Surpreendente foi observado que para valores de pH de 8,3 a 10,3 (meio alcalino) a inibição da eclosão dos ovos também foi nula.

No caso de bioensaios *in vivo*, vale ressaltar que as variações de pH do abomaso e do trato gastrointestinal dos animais são dependentes, principalmente, das condições fisiológicas do animal e do tipo de alimentação ao qual está submetido,

portanto podem ser diferentes daqueles observadas para o meio *in vitro*.

Para os bioensaios *in vitro*, variações do pH do meio de incubação podem permitir uma maior solubilidade de substâncias com caráter ácido ou básico, permitindo que os compostos se encontrem na forma ionizada e, conseqüentemente, estejam solúveis no meio aquoso tornando-se mais biodisponíveis.

Os resultados da inibição da eclosão dos ovos para as emulsões da piperina na mistura contendo 5% de DMSO em água, estão descritos na Tabela 15.

Com essa mistura de solventes, a quantidade máxima de piperina solubilizada foi de 12 mg/mL. Nesta concentração, a piperina apresentou uma taxa de inibição da eclosão dos ovos de apenas 5,73%.

**Tabela 14.** Efeito do pH do meio de incubação na eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*.

pH da solução teste <sup>(1)</sup>	pH final do meio de incubação <sup>(2)</sup>	Inibição da eclosão (%) <sup>(3)</sup>
3.0	3,5	100
4.0	4,8	100
5.0	5,7	2,21
6.0	6,3	0,00
7.0	6,8	0,00
8.0	6,9	0,00
9.0	7,1	0,00
10.0	8,3	0,00
11.0	10,3	0,00
Branco 100% água deionizada	5,0	0,19

<sup>(1)</sup> Partindo-se de água deionizada (pH 5.0), as soluções com diferentes valores de pH foram preparadas pela adição de solução de HCl 1M e solução de NaOH 1M sob agitação magnética em pHmetro com eletrodo de Ag/AgCl.

<sup>(2)</sup> O pH final do meio de incubação é resultado da mistura de água deionizada contendo os ovos e as soluções com diferentes valores de pH na razão de 1:1 (v/v). A mistura foi feita sob agitação magnética e o pH final medido em pHmetro com eletrodo de Ag/AgCl.

<sup>(3)</sup> O valor da inibição da eclosão dos ovos corresponde à média simples de seis repetições.

**Tabela 15.** Atividade da emulsão de piperina (água: DMSO 9,5:0,5) na eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*

Concentração da emulsão teste (mg/mL)	Concentração final da emulsão no meio de incubação (mg/mL)	Inibição da eclosão (%) <sup>(1)</sup>
12	6,0	5,73
6	3,0	3,53
3	1,5	3,14
Controle positivo	6,3	0,00
água:DMSO 9,5:0,5 v/v	-	0,36

<sup>(1)</sup> O valor final da inibição da eclosão dos ovos corresponde à média das seis repetições.

Quando a piperina foi dissolvida na mistura de solventes contendo 8,5:1,0:0,5 (v/v/v) de Crodamol®: acetona: etanol, a solubilidade da

mesma foi muito maior, possibilitando a elaboração de uma solução com alta concentração (100 mg/mL) e suas diluições seriadas subsequentes (Tabela 16).

**Tabela 16.** Atividade da emulsão de piperina (8,5:1,0:0,5 Crodamol®: acetona: etanol) na eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*

Concentração da emulsão teste (mg/mL)	Concentração final da emulsão no meio de incubação (mg/mL)	Inibição da eclosão (%) <sup>(1)</sup>
100	50	100
50	25	100
25	12,5	100
12,5	6,25	100
6,25	3,125	100
Controle positivo 8,5:1,0:0,5 Crodamol®:acetona:etanol	-	100
Controle negativo 100% água deionizada	-	0,56

<sup>(1)</sup> O valor final da inibição da eclosão dos ovos corresponde à média das seis repetições.

Entretanto, mesmo tendo possibilitado a solubilização de maiores quantidades de piperina, sem a formação de uma emulsão, a mistura de solventes utilizada (controle positivo) acarretou 100% de inibição da eclosão dos ovos, invalidando os resultados observados para as soluções de piperina que foram testadas.

O quarto teste foi realizado preparando-se 2 mL de uma emulsão de piperina 10 mg/mL com

5% DMSO em água. Esta emulsão foi filtrada em membrana de PTFE de 45 µm de diâmetro de poro e diluída sucessivamente para 5,0, 2,5 e 1,25 mg/mL.

Também se testou uma solução de 10 mg/mL contendo 5% DMSO em Crodamol®, na qual não houve formação de precipitado, apenas sendo necessária agitação (Tabela 17).

**Tabela 17.** Atividade da emulsão de piperina (9,5:0,5 água: DMSO e 9,5:0,5 Crodamol®: DMSO) na eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*

Concentração da emulsão teste (mg/mL)	Concentração final da emulsão no meio de incubação (mg/mL)	Inibição da eclosão (%) <sup>(1)</sup>
10,0	5,0	0,00
5,0	2,5	0,19
2,5	1,25	0,00
1,25	0,625	0,00
Controle positivo 1 9,5:0,5 água:DMSO	-	0,00
Controle positivo 2 9,5:0,5 Crodamol®:DMSO	-	100,0
Branco 100% água deionizada	-	0,17

<sup>(1)</sup> O valor final da inibição da eclosão dos ovos corresponde à média das seis repetições.

A solução de piperina em água e 5% de DMSO não apresentou atividade nas diferentes concentrações avaliadas. Além disso, quando as mesmas concentrações foram avaliadas utilizando-se 5% de DMSO em Crodamol®, o próprio solvente utilizado inibiu 100% da eclosão dos ovos.

## Conclusões

- 1) Em ambos os testes, a inibição da eclosão dos ovos apresentada pela piperina, nas concentrações avaliadas, não foi relevante. Vale ressaltar a importância de se avaliar o efeito deletério dos solventes utilizados no preparo das soluções.
- 2) Como pode ser observado, a troca da água (controle positivo 1) pelo Crodamol® (controle positivo 2), mantendo-se a mesma proporção de 5% de DMSO, fez com que a inibição da eclosão dos ovos pelo solvente utilizado aumentasse de 0 para 100%. O mesmo ocorreu quando o Crodamol® foi utilizado em mistura com a acetona e o etanol
- 3) Crodamol® é um agente surfactante utilizado na elaboração de diferentes formulações cosméticas. Entretanto, quando utilizado como substituto de outros surfactantes como DMSO e Tween, mostrou-se altamente tóxico, inibindo totalmente a eclosão dos ovos de *H. contortus*.

## Referências

- BASSETTO, C. C.; ALBUQUERQUE, A. C. A.; LINS, J. G. G.; SILVA, N. M. M.; CHOCOBAR, M. L. E.; BELLO, H. J. S.; MENA, M. O.; NICIURA, S. C. M.; AMARANTE, A. F. T.; CHAGAS, A. C. de S. Revisiting anthelmintic resistance in sheep flocks from São Paulo State, Brazil. **International Journal for Parasitology: drugs and drug resistance**, v. 24, apr. 2024, 100527. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1162620/1/RevisitingAnthelminticResistance.pdf>. Acesso em: 8 maio 2025.
- CARDOSO, J. F. R.; WARDINI, A. B.; EVANGELISTA, D. W.; VIANA, E. B.; LIMA, M. E. F. de; SOARES, B. A.; BARRETO JUNIOR, C. B.; BRITO, M. de F.; MAZUR, C.; DANELLI, M. das G. M. Avaliação do efeito tóxico da piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) em camundongos. **Revista Universidade Rural: série ciências da vida**, v. 25, n. 1, p. 85-91, 2005.
- CARNEVALLI, D. B.; ARAÚJO, A. P. S. Atividade biológica da pimenta preta (*Piper nigrum* L.): revisão de literatura. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 41-46, 2013. Disponível em: <https://uniciencias.pgsscogna.com.br/uniciencias/article/view/513>. Acesso em: 8 maio 2025.
- CHAGAS, A. C. de S. Metodologias “in vitro” para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15.; SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCUSUL, 2., 2008, Curitiba. **Palestras...** Curitiba: CBPV, 2008. p. 8-12. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48559/1/AACMetodologiasinvitro.pdf>. Acesso em: 8 maio 2025.
- CHAGAS, A. C. de S.; TUPY, O.; SANTOS, I. B. DOS; ESTEVES, S. N. Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 3, e008722, 2022. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1145712/1/EconomicImpactGastrointestinal.pdf>. Acesso em: 8 maio 2025.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U). Acesso em: 12 maio 2025.
- COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Gastrointestinal nematodes control in goats and sheep in the semiarid region northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65-71, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000100010>. Acesso em: 8 maio 2025.
- DINEEN, J. K.; DONALD, A. D.; WAGLAND, B. M.; OFFNER, J. The dynamics of the host-parasite relationship: III the response of sheep to primary infection with *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 55, n. 3, p. 515-525, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182000069213>. Acesso em: 8 maio 2025.
- ECHEVARRIA, F. A. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 39, n. 3-4, p. 279-284, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90044-V](https://doi.org/10.1016/0304-4017(91)90044-V). Acesso em: 12 maio 2025.
- ENDO, V. T.; OLIVEIRA, T. C. de; CABRAL, A. P. M.; SAKAMOTO, C. A. M.; FERRARO, G. C.; PEREIRA, V.; LOPES, W. D. Z.; MAZZUCATTO, B. C. Prevalência dos helmintos *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum columbianum* em pequenos ruminantes atendidos no setor de anatomia patológica – UEM. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 112-118, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/revcivet.v1i2.25397>. Acesso em: 05 maio 2025.
- EPSTEIN, W. W.; NETZ, D. F.; SEIDEL, J. L. Isolation of piperine from black pepper. **Journal of Chemical Education**, v. 70, n. 7, p. 598-599, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ed070p598>. Acesso em: 12 maio 2025.

- FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; LIMA, M. E. F. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208-224, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120018>. Acesso em: 12 maio 2025.
- GAÍNZA, Y. A.; FANTATTO, R. R.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. de S. Piper aduncum against *Haemonchus contortus* isolates : cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 383-393, 2016. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1058802/1/01rbpvAO03016.pdf>. Acesso em: 12 maio 2025.
- GEORGE, M. M.; VATTA, A. F.; HOWELL, S. B.; STOREY, B. E.; MCCOY, C. J.; WOLSTENHOLME, A. J.; REDMAN, E. M.; GILLEARD, J. S.; KAPLAN, R. M. Evaluation of changes in drugs susceptibility and population genetic structure in *Haemonchus contortus* following worm replacement as a means to reverse the impact of multiple-anthelmintic resistance on a sheep farm. **International Journal for Parasitology: drugs and drug resistance**, v. 15, p. 134-143, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.02.004>. Acesso em: 8 maio 2025.
- GONÇALVES, I. G. de; ECHEVARRIA, F. A. M. Cobre no controle da verminose gastrintestinal em ovinos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 183-188, 2004. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1093691/1/a28v34n1.pdf>. Acesso em: 9 maio 2025.
- KHAN Z. R.; MONI, F.; SHARMIN, S.; AL-MANSUR, M. A.; ABDUL, G.; RAHMAN, O.; AFROZ, F. Isolation of bulk amount of piperine as active pharmaceutical ingredient (API) from black pepper and white pepper (*Piper nigrum* L.). **Pharmacology & Pharmacy**, v. 8, n. 7, p. 253-262, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/pp.2017.87018>. Acesso em: 12 maio 2025.
- LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 139-146, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00185-4](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00185-4). Acesso em: 9 maio 2025.
- LEE, S. E. Mosquitol larvicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper *Piper longum*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 16, n. 3, p. 245-247, 2000.
- LUZ, S. F. M. da; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; LEMOS, O. F. de; XAVIER, L. P.; MAIA, J. G. S.; RAMOS, A. de R.; SETZER, W. N.; SILVA, J. K. do R. da. Secondary metabolic profiles of two cultivars of *Piper nigrum* (Black Pepper) resulting from infection by *Fusarium solani* f. sp. piperis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2434, 2017. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1084204/1/Publicacaoijms1802434.pdf>. Acesso em: 12 maio 2025.
- MANUAL de segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: CampoPAS, 2004.
- MELO, A. C. F. L. **Caracterização do nematoide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazois, no estado do Ceará**, Brasil. 2005. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.
- MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. da S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/529261/1/APINematodeosresistentes.pdf>. Acesso em: 05 maio 2025.
- MENA, M. O.; MOELLMANN, V. M.; BASSETTO, C. C.; SILVA, N. M. M.; LINS, J. G. G.; LOUVANDINI, H.; ALBUQUERQUE, A. C. A. de; SOUTELLO, R. V. G. de; AMARANTE, A. F. T. do. Ação da nanopartícula de óxido de zinco como suplemento dietético no desempenho e resposta imunológica contra as infecções por nematódeos gastrintestinais em ovinos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE PARASITOLOGIA, 10., 2023, Jaboticabal. **Parasitologia e saúde única: anais...** Jaboticabal: Funep, 2023.
- MIGLIATO, M. A. T.; CHAGAS, A. C. de S.; CARVALHO, C. O.; OLIVEIRA, M. C. de S. Avaliação da toxicidade de solventes e emulsificantes utilizados em experimentos com fitoterapicos sobre ovos de nematóides gastrintestinais de ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRA DE VETERINÁRIA, 34., 2007, Santos. **Anais...** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 2007. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48062/1/PROCIACSC2007.00132.pdf>. Acesso em: 12 maio 2025.
- MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1139-1145, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000400027>. Acesso em: 8 maio 2025.
- NASCIMENTO, J. C. do; PAULA, V. F. de; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Occurrence, biological activities and <sup>13</sup>C NMR data of amides from piper (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2288-2311, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100037>. Acesso em: 9 maio 2025.

OLIVEIRA, G. L.; VIEIRA, T. M.; NUNES, V. F.; RUAS, M. de O.; DUARTE, E. R.; MOREIRA, D. de L.; KAPLAN, M. A. C.; MARTINS, E. R. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 288-292, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.004>. Acesso em: 12 maio 2025.

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, n. 3, p. 203-211, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.10.003>. Acesso em: 8 maio 2025.

PADILHA, T. **Controle dos nematodeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996.

PARKER, A. G. H. Selection for resistance to parasites in sheep. In: New Zealand Society of Animal Production, 51., 1991, New Zealand. **Proceedings...** Hamilton: New Zealand Society of Animal Production, 1991. p. 291-294. Disponível em: <https://www.nzsap.org/system/files/proceedings/1991/ab91053.pdf>. Acesso em: 9 maio 2025.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2). Acesso em: 8 maio 2025.

PISSINATE, K. Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. Disponível em: <https://rma.ufrj.br/jspui/handle/20.500.14407/14707>. Acesso em: 9 maio 2025

SEMLER, U.; GROSS, G. G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1566-1567, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80249-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80249-8). Acesso em: 12 maio 2025.

VIEIRA, L. da S. Endoparasitoses gastrintestinais de caprinos e ovinos: alternativas de controle. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO DE CAPRINOS E OVINOS, 2006, Campina Grande. **[Trabalhos apresentados]**. Campina Grande: SEDAP; SEBRAE; INSA; ARCO, 2006. Não paginado. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/533418>. Acesso em: 07 maio 2025.

VIEIRA, L. da S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES, L. J. F. **Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do nordeste**. Sobral: Embrapa-CNPC, 1997.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>. Acesso em: 05 maio 2025.