

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
BACHARELADO EM AGROECOLOGIA

SUZANE LUISE GEROTTI

**Bioatividade do extrato de piperina (*Piper nigrum* L.) sobre *Atta sexdens*  
Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**

ARARAS

2025

SUZANE LUISE GEROTTI

**Bioatividade do extrato de piperina (*Piper nigrum L.*) sobre *Atta sexdens*  
Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Agroecologia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo T. Fujihara  
Coorientadora: Profa. Dra. Tatiana Santana Ribeiro

ARARAS  
2025

**SUZANE LUISE GEROTTI**

**Bioatividade do extrato de piperina (*Piper nigrum* L.) sobre *Atta sexdens*  
Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Agroecologia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara

**Data da defesa:** 05 de dezembro de 2025.

**Resultado:**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara

Universidade Federal de São Carlos \_\_\_\_\_

MSc. Juliana Keppe Zanini

Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) \_\_\_\_\_

Biólogo Mateus Banderchuk Dib

Universidade Federal de São Carlos \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Dentre todas as coisas pelas quais pensei em expressar minha gratidão em primeiro lugar, a que imediatamente me ocorreu foi agradecer à minha mãe e ao meu pa(i)drasto. Desde que me conheço por gente, ambos têm sido meu alicerce, oferecendo apoio, ensinamentos e constante inspiração. Serei eternamente grata a vocês, mesmo além desta vida. Nenhuma conquista ou experiência em minha trajetória será maior do que tudo o que vocês fizeram e continuam fazendo por mim.

Ao meu namorado, Renan, que está comigo desde 2019 oferecendo apoio, colo, risos e muito amor. Obrigada por ser o amor da minha vida nesses 6 anos.

Obrigada, Professor Ricardo, pelos ensinamentos, risadas e paciência. Para mim você é uma inspiração.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Tatiana S. Ribeiro e seus alunos por todo o apoio na pesquisa e desenvolvimento do projeto e pela disponibilidade do laboratório. Também agradeço ao Kauan, meu parceiro que me ajudou muito nessa pesquisa tão importante.

Ao GEPEG, grupo que sempre sonhei em integrar e que, ao fazer parte, mostrou-se ainda mais extraordinário do que eu poderia imaginar.

Meu agradecimento eternamente especial às minhas companheiras da Goiaba's House: Biba, Jota e MASP. Obrigada pelas noites, filmes, risadas, surtos, fofocas e, principalmente, pelo amor que transbordou pelos cômodos. Devo muito do que sou a vocês.

À República Essakna, gostaria de agradecer por terem me acolhido em momentos tão difíceis da minha vida e que apenas vocês foram capazes de me alegrar. Amo vocês e amo a Essakna para sempre.

E, é claro, aos meus animais de estimação — Rosinha, Bandit, Desa, Esmeralda e Xanaína — por estarem ao meu lado nos momentos em que ninguém mais me viu chorar, oferecendo o consolo silencioso que apenas vocês foram capazes de proporcionar à minha alma.

Por fim, deixo um agradecimento especial ao meu Tio Juca. Mesmo não estando mais entre nós, senti sua presença e alegria em cada dia da minha vida. O amor e as memórias que deixou continuam vivos em mim. Te amo profundamente, Tio.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial inseticida do extrato de piperina (*Piper nigrum* L.) sobre operárias de *Atta sexdens* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), espécie amplamente distribuída em regiões tropicais e reconhecida como praga de elevado impacto agrícola e florestal. A pimenta-do-reino da cultivar Bragantina foi utilizada como matéria-prima para a extração da piperina, por meio da metodologia de Soxhlet com etanol 99,8%, seguida de purificação e isolamento do composto. Foram conduzidos dois bioensaios de toxicidade tóxica, utilizando diferentes concentrações do extrato (1, 2,5 e 5%), tendo como controles etanol 92% (1º ensaio) e etanol 70% (2º ensaio). No primeiro ensaio, observou-se mortalidade total das operárias em até 72 horas, o que sugere toxicidade atribuída ao etanol 92%, e não ao extrato de piperina. No segundo ensaio, com etanol 70%, registrou-se, após 264 horas de observação, mortalidade de 30% no grupo controle e de 46,6, 56,6 e 40% nos tratamentos com piperina a 1, 2,5 e 5%, respectivamente. Apesar dos indícios de bioatividade, os resultados foram limitados pela baixa solubilidade da piperina no solvente empregado, o que impossibilitou a confirmação de sua eficácia como agente de controle. Assim, conclui-se que a realização de novos ensaios, com metodologias alternativas de solubilização, é necessária para validar o uso da piperina como potencial bioinseticida em programas de manejo agroecológico.

**Palavras-chave:** formigas-cortadeiras; pimenta-do-reino; extrato botânico; controle biológico; agroecologia.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the insecticidal potential of a piperine extract (*Piper nigrum* L.) against workers of *Atta sexdens* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), a species widely distributed in tropical regions and recognized as a pest with high agricultural and forestry impact. Black pepper of the Bragantina cultivar was used as the raw material for piperine extraction, employing the Soxhlet method with 99.8% ethanol, followed by purification and isolation of the compound. Two topical toxicity bioassays were conducted using different extract concentrations (1, 2.5%, and 5%), with 92% ethanol (first assay) and 70% ethanol (second assay) as controls. In the first assay, total mortality of the workers was observed within 72 hours, suggesting toxicity attributable to 92% ethanol rather than to the piperine extract. In the second assay, using 70% ethanol, mortality after 264 hours of observation was 30% in the control group and 46.6, 56.6, and 40% in the treatments with piperine at 1, 2.5, and 5%, respectively. Despite indications of bioactivity, the results were limited by the low solubility of piperine in the solvent used, which prevented confirmation of its efficacy as a control agent. Thus, it is concluded that further assays employing alternative solubilization methodologies are necessary to validate the use of piperine as a potential bioinsecticide in agroecological management programs.

**Keywords:** leaf-cutting ants; black pepper; botanical extract; biological control; agroecology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química da piperina.....6
- Figura 2.** Processo de preparação das amostras. A) Separação dos grãos; B) Trituração dos grãos; C) Pesagem da amostra triturada; D) Transferência da pimenta para o cartucho; E) Cartucho com a pimenta lacrado.....8
- Figura 3.** Montagem do extrator Soxhlet. A) Balão destilação de manta de aquecimento; B) Etanol e pedaços de porcelana; C) Montagem do extrator Soxhlet; D) Acondicionamento do cartucho com a amostra; E) Extrator Soxhlet completamente montado..... 9
- Figura 4.** Processo de extração e filtração da piperina. A) Início da extração; B) Concentração do extrato; C) Precipitação dos taninos; D) Filtração para remoção dos taninos..... 10
- Figura 5.** Processo de isolamento da piperina. A) Sistema de resfriamento para isolar a piperina; B) Piperina cristalizada; C) Cristais de piperina isolados por filtração a vácuo; D) Cristais de piperina prontos para purificação..... 11
- Figura 6.** Processo de purificação da piperina. A) Solubilização da piperina; B) Processo de cristalização da piperina; C) Piperina cristalizada; D) Filtração dos cristais de piperina; E) Piperina pura isolada..... 12
- Figura 7.** Exemplo de colônia de *Atta sexdens* mantida no laboratório do GEPEG - CCA/UFSCar, Araras, SP..... 13
- Figura 8.** Procedimentos realizados para os ensaios de toxicidade tópica. A) Operárias separadas das colônias; B) Operárias nos recipientes plásticos; C) Recipientes expostos à luz ultravioleta; D) Aplicação da solução de piperina no pronoto de uma operária..... 15
- Figura 9.** Primeiro ensaio: mortalidade diária acumulada de operárias de *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos: extrato de piperina 1%, 2,5% e 5% (m/v) e etanol 92% (controle)..... 18
- Figura 10.** Segundo ensaio: mortalidade diária acumulada de operárias de *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos: extrato de piperina 1%, 2,5% e 5% (m/v) e etanol 92% (controle).....21

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Mortalidade diária acumulada de operárias de *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos: extrato de piperina 1%, 2,5% e 5% (m/v) e etanol 92% (controle). As operárias foram obtidas de seis colônias (S).....17

**Tabela 2.** Mortalidade diária acumulada de operárias de *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos: extrato de piperina 1%, 2,5% e 5% (m/v) e etanol 92% (controle). As operárias foram obtidas de seis colônias (S).....19

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
2.1. As formigas-cortadeiras.....	3
2.2. Métodos de controle de formigas-cortadeiras.....	4
2.3. O extrato de piperina.....	5
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo Geral.....	6
3.2. Objetivos Específicos.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
4.1. Materiais.....	6
4.2. Preparo da amostra.....	7
4.3. Extração (Soxhlet).....	8
4.4. Purificação.....	11
4.5. Cálculo para o volume final das soluções de piperina.....	12
4.6. Criação das colônias de formigas-cortadeiras.....	13
4.7. Toxicidade tópica sobre operárias de <i>A. sexdens</i> .....	14
4.8. Análise dos dados.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5.1. Extração e purificação da piperina.....	16
5.2. Avaliação do primeiro ensaio de toxicidade tópica em operárias de <i>A. sexdens</i> .....	16
5.3. Avaliação do segundo ensaio de toxicidade tópica em operárias de <i>Atta sexdens</i> .....	18
5.4. Comparativos com outros extratos vegetais e implicações.....	21
5.5. Perspectivas futuras.....	22
6. Conclusão.....	23
7. Referências.....	24

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras são insetos amplamente distribuídos na região Neotropical e desempenham um papel ecológico relevante; contudo, representam um dos principais desafios para o manejo agrícola e florestal na América do Sul. Como herbívoros generalistas, essas formigas removem grande quantidade de material vegetal para cultivar seu fungo mutualista, o que afeta diretamente o crescimento das plantas, a cobertura vegetal e as características do solo (CORRÊA et al., 2010). A intensa desfolha por formigas-cortadeiras pode impactar gravemente a produtividade de plantações florestais, com redução do crescimento de árvores e prejuízos econômicos relevantes em plantios de *Pinus* e *Eucalyptus* no Brasil (ZANETTI et al., 2014).

Historicamente, o controle de formigas-cortadeiras tem sido realizado principalmente com o uso de iscas formicidas contendo sulfluramida, princípio ativo caracterizado por sua ação lenta e não repelente (NAGAMOTO et al., 2007). Embora eficiente, esse composto tem gerado preocupação crescente devido aos impactos ambientais associados ao seu uso. A sulfluramida (EtFOSA), inclusive, tem sido objeto de regulação internacional, tendo sido incluída na lista de Poluentes Orgânicos Persistentes da Convenção de Estocolmo, que recomenda sua redução e, quando possível, proibição, incentivando a adoção de práticas ambientalmente mais seguras (NIP, 2015). No Brasil, embora o uso ainda ocorra em situações específicas, pesquisadores têm buscado alternativas sustentáveis, como os óleos essenciais vegetais, em consonância com diretrizes agroecológicas e os princípios da Convenção de Estocolmo (PINHEIRO et al., 2025).

Nesse contexto, extratos vegetais vêm ganhando destaque como alternativa viável no controle de pragas, devido à presença de metabólitos secundários com atividades inseticidas, fungicidas e repelentes. Esses compostos atuam por diferentes mecanismos, como a inibição da alimentação, interferência no sistema nervoso e destruição da cutícula dos insetos e, por isso, proporcionam alta eficácia biológica com baixa toxicidade ambiental (ISMAN et al., 2008). Além disso, por serem biodegradáveis e menos persistentes no ambiente, esses extratos são compatíveis com os princípios da agroecologia e têm sido amplamente estudados em busca de formulações eficazes e seguras (LENGAI et al., 2020).

Dentre os compostos naturais com potencial inseticida, destaca-se a piperina, um alcaloide presente nos frutos de *Piper nigrum* L. (Piperaceae), a popular pimenta-do-reino. Diversas publicações recentes ressaltam o amplo espectro de atividades biológicas da piperina, incluindo efeitos antioxidantes, inseticidas, antifúngicos, entre outros (HAQ, 2021). Sua estrutura química permite modificações que ampliam sua bioatividade, e seus derivados vêm sendo explorados como candidatos promissores para o desenvolvimento de pesticidas naturais (LV et al., 2023).

Apesar da ampla gama de estudos envolvendo a piperina, seu uso no controle de formigas-cortadeiras ainda é pouco explorado, o que representa uma lacuna significativa na literatura. Considerando o potencial do composto, associado à urgência de substituição de pesticidas convencionais e aos avanços nas técnicas de extração e purificação de alcaloides, justifica-se a investigação da toxicidade da piperina frente às operárias de *Atta sexdens* (LINNAEUS, 1758), como proposto neste trabalho.

Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade inseticida tópica do extrato de piperina, puro e isolado, sobre operárias de *A. sexdens*, contribuindo com dados experimentais para o avanço de estratégias de controle mais sustentáveis e ecologicamente seguras. Além disso, espera-se que os resultados possam subsidiar futuras pesquisas sobre formulações à base de compostos naturais e sua aplicação em programas de manejo integrado de pragas (MIP) com enfoque agroecológico.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. As formigas-cortadeiras**

As formigas-cortadeiras pertencem à subfamília Myrmicinae, tribo Attini e subtribo Attina. Elas incluem os gêneros *Atta* Fabricius, 1804, *Acromyrmex* Mayr, 1865 e *Amoimyrmex* Cristiano et al., 2020 (COLOMBARI et al., 2023). Esse grupo monofilético é composto por 50 espécies e 19 subespécies (BOLTON, 2025), das quais mais de 60% estão presentes no Brasil (FORTI; BOARETTO, 1997). No Brasil, as formigas do gênero *Atta* são popularmente chamadas de saúvas, enquanto as dos gêneros *Acromyrmex* e *Amoimyrmex* são conhecidas como quenquéns (BRITTO et al., 2016). Esses insetos podem promover impactos positivos no meio ambiente, contribuindo para o aumento da fertilidade

do solo, e favorecendo o crescimento das árvores. Além disso, alteram propriedades físicas e químicas do solo, colaborando para a dispersão de sementes, e promovem a ciclagem biogeoquímica (FARJI-BRENER; SILVA, 1995; SOUSA-SOUTO et al., 2007; SOPER et al., 2019).

No entanto, elas também são de grande importância econômica e representam um desafio significativo para a agricultura, silvicultura e pecuária por serem consideradas pragas importantes nas regiões tropicais e subtropicais da América (OLIVEIRA, 2006). Como herbívoros generalistas, essas formigas cortam e transportam folhas e outras partes vegetais para o cultivo do fungo mutualístico *Leucocoprinus gongylophorus* (Agaricaceae), essencial para as larvas e operárias das colônias (MONTROYA-LERMA et al., 2012; MUELLER et al., 2017).

O desfolhamento excessivo causado por essas formigas pode prejudicar o crescimento das plantas, afetar o regime de luz, modificar as propriedades físico-químicas dos solos e reduzir a quantidade de serrapilheira ao redor dos ninhos (CORRÊA et al., 2010). Vinha et al. (2020) estimam que os danos globais provocados por formigas-cortadeiras resultem em prejuízos de bilhões de dólares por ano, especialmente nas florestas plantadas, local em que o manejo deve ser feito antes que o nível de dano econômico, entre 13,4 e 39,2 m<sup>2</sup> de ninhos/ha, seja atingido.

## **2.2. Métodos de controle de formigas-cortadeiras**

Existem muitos problemas relacionados às formigas-cortadeiras e, por isso, variadas técnicas de controle se desenvolveram ao longo do tempo, como o controle químico, muito utilizado desde a década de 50 do século passado (BOARETTO; FORTI, 1997).

A aplicação de iscas formicidas é considerada a técnica mais prática, eficiente e econômica, e a sulfloramida (EtFOSA) é o ingrediente ativo mais utilizado devido às propriedades de não repelência e mecanismo de ação lenta (NAGAMOTO et al., 2004). Apesar de eficiente, esse composto é precursor perfluorooctano-1-sulfonato (PFOS), um poluente orgânico persistente com elevado potencial de bioacumulação e resistência à degradação (LÖFSTEDT et al., 2016). Estudos recentes confirmam a conversão de EtFOSA em PFOS em

solos agrícolas, reforçando os riscos ambientais associados ao seu uso (GUIDA et al., 2023).

Assim, existe uma pressão intensa do mercado no intuito de reduzir o uso de agroquímicos no controle de formigas-cortadeiras (DA SILVA et al., 2021) e por isso, é necessário buscar por métodos alternativos. Recentemente, o avanço nas estratégias de controle sustentável de formigas-cortadeiras tem incentivado a investigação de compostos de origem vegetal e métodos biotecnológicos. Masiulionis e Samuels (2025) destacam, entre as alternativas mais promissoras e ambientalmente seguras à sulfluramida, o uso de óleos essenciais, fungos entomopatogênicos e tecnologias como o RNA interferente (RNAi), que podem contribuir para um manejo mais sustentável e com menor impacto ecológico. Paralelamente, estudos como o de Araújo et al. (2022) reforçam o potencial dos extratos naturais na inibição do fungo mutualístico, essencial à sobrevivência das colônias, sugerindo novos alvos para intervenções biológicas.

Os extratos vegetais são ricos em compostos químicos bioativos que podem servir como inseticidas naturais eficazes, especialmente aqueles provenientes dos metabólitos secundários das plantas (KHAN et al., 2017). Pesquisas sugerem que esses compostos podem oferecer diversas ações, como repelência, inibição da alimentação, atraso no crescimento e na reprodução, bloqueio da oviposição e interrupção do desenvolvimento embrionário, além de apresentar efeitos neurotóxicos (ISMAN et al., 2008).

Em formigas-cortadeiras, o uso de espécies botânicas como *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Carapa guianensis* (Meliaceae), *Elaeis guineensis* (Arecaceae), *Eugenia florida* e *Eugenia handroana* (Myrtaceae), *Gleichenella pectinata* (Gleicheniaceae) (Faleiros et al., 2022), *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *Trichilia pallida* (Meliaceae) e *Zanthoxylum pohlianum* (Rutaceae) já foi investigado como alternativa para o manejo desses insetos (OLIVEIRA, 2006; TORRES et al., 2013). Por exemplo, colônias de *A. sexdens* tratadas exclusivamente com folhas de gergelim, *Sesamum indicum* (Pedaliaceae), apresentaram redução significativa no volume do jardim de fungo, além de mudanças no comportamento das operárias, nos níveis de umidade das câmaras, na consistência e na aparência do lixo acumulado (BUENO et al., 1995).

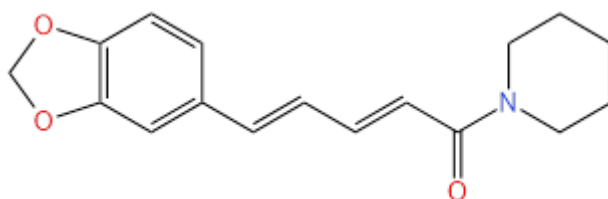
### 2.3. O extrato de piperina

A piperina é um alcaloide presente nos frutos da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e em outras espécies do gênero *Piper*, que fazem parte da família Piperaceae, popularmente conhecida como pimenta-do-reino. Seu extrato é frequentemente utilizado em suplementos alimentares e produtos farmacêuticos devido às suas propriedades bioativas (FRANÇA et al., 2021).

A pimenta-do-reino, originária do sudeste asiático, apresenta inflorescências em forma de amentilho e suas folhas não têm cálices nem corola. Os frutos são indeiscentes, apresentando cor verde quando imaturos e vermelha ao amadurecer. As sementes de *P. nigrum* contêm uma resina que confere o sabor picante, além de um óleo essencial, no qual a piperina é o componente predominante (CARNEVALLI et al., 2013). A piperina é encontrada em grande quantidade, especialmente nos frutos, e foi a primeira amida isolada das espécies do gênero *Piper*. Quando extraída em sua forma pura, a piperina apresenta um rendimento que varia de 5% a 7% (MORAES, 2011).

A piperina corresponde a aproximadamente 98% do conteúdo total de alcaloides, e outros componentes incluem retinol (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), ferro, potássio, terpenos, flavonas, cumarina, pironas, flavonoides, fenilpropanoides e cromenos, entre outros (GARCIA et al., 2000). Sua fórmula química é representada por C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> (Figura 1).

**Figura 1.** Estrutura química da piperina.



Em testes de laboratório e campo, a piperina mostrou eficácia no controle de insetos-praga variados, como *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae), *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae), *Sitophilus zeamais* (Mots) e *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera, Curculionidae) (SCOTT, 2003; LIMA JÚNIOR, 2011).

Outras pesquisas também demonstraram a eficácia dos extratos acetônicos e metanólicos de *P. nigrum* em concentrações superiores a 20 mg/mL, resultando em aproximadamente 90% de mortalidade nas lagartas-da-traça-de-cereais *Sitotroga cerealella* (Oliv.) (Lepidoptera, Gelechiidae), com efeitos residuais que duraram de 60 a 90 dias (BOFF; ALMEIDA, 1995). Além disso, Chahad e Boof (1994) observaram que esses extratos provocaram uma mortalidade entre 25% e 98% em larvas de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Efeitos inseticidas também foram observados em *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera, Pieridae), *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera, Aphididae) e *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Blattodea, Isoptera, Termitidae) (PAULA et al., 2000; MOREIRA et al., 2005).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o potencial de controle do extrato de piperina sobre *A. sexdens*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Obter o extrato de piperina por meio de frutos da pimenta-do-reino (*P. nigrum*);
- Avaliar a toxicidade tópica do extrato de piperina sobre operárias de *A. sexdens*.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Materiais**

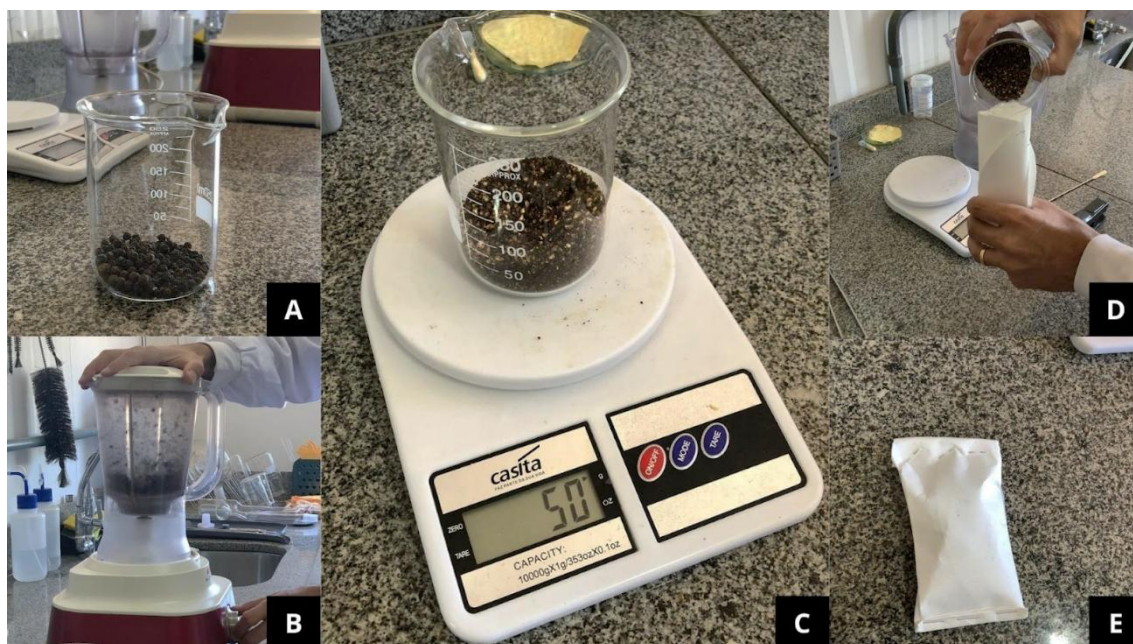
Os materiais e equipamentos empregados no preparo da amostra, bem como nas etapas de extração e purificação da piperina, seguiram aqueles descritos por Lima et al. (2021). O procedimento experimental baseou-se na extração em sistema Soxhlet, utilizando etanol como solvente extrator, a partir de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.).

## 4.2. Preparo da amostra

A pimenta-do-reino da cultivar Bragantina foi adquirida junto ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER-ES), no estado do Espírito Santo. Os processos de extração e purificação foram realizados no LABCOMAM - CCA/UFSCAR, Araras - SP. As amostras foram armazenadas em freezer até o momento do preparo. Inicialmente, os grãos foram selecionados manualmente para a remoção de impurezas, como pedaços de caule, folhas e partículas minerais (Figura 2A). Em seguida, os grãos limpos foram triturados em liquidificador até atingir granulometria adequada ao processo de extração (Figura 2B). Após a trituração, uma porção de 50 g da amostra foi pesada utilizando-se uma balança de bancada e um béquer (Figura 2C).

Para o acondicionamento da amostra no sistema Soxhlet, foi confeccionado um cartucho com duas folhas de papel filtro, fixado com grampos metálicos, de forma a comportar os 50 g triturados e permitir a adequada circulação do solvente no sistema (Figura 2D). O invólucro foi então lacrado cuidadosamente para evitar a liberação de partículas sólidas durante a extração (Figura 2E).

**Figura 2.** Processo de preparação das amostras. A) Separação dos grãos; B) Trituração dos grãos; C) Pesagem da amostra triturada; D) Transferência da pimenta para o cartucho; E) Cartucho com a pimenta lacrado.



Fonte: Autoria própria, 2023.

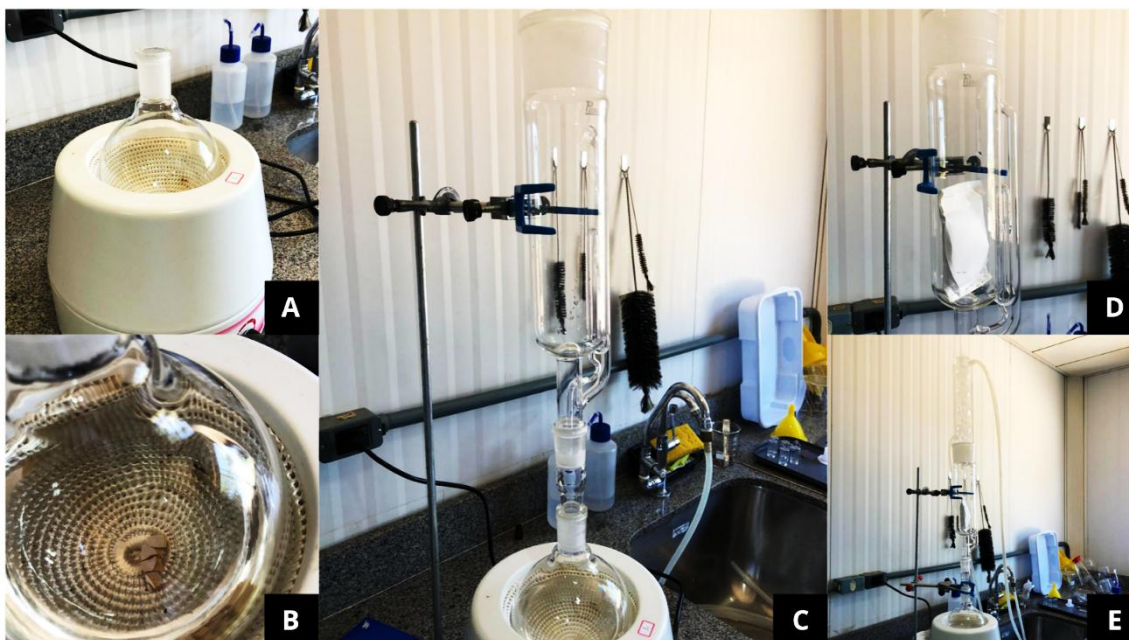
### **4.3. Extração (Soxhlet)**

A extração da piperina foi realizada por meio do método de Soxhlet, conforme descrito por Souza (2024), e visa à obtenção de extratos com maior concentração do composto de interesse (LIMA et al., 2021). Para a montagem do sistema, um balão de destilação com capacidade de 1 litro foi posicionado sobre uma manta de aquecimento, iniciando-se assim o preparo do aparato extrator. Em seguida, foram medidos 500 mL de etanol etílico 99,8%, utilizado como solvente extrator, com o auxílio de uma proveta, e transferidos para o balão de destilação (Figura 3A).

Ao balão de destilação foram adicionados fragmentos de porcelana com a finalidade de evitar superaquecimento e ebulição abrupta durante o processo (Figura 3B). Em seguida, o balão foi acoplado à parte inferior do extrator Soxhlet, sendo devidamente fixado com suporte universal e garra metálica para garantir estabilidade do sistema (Figura 3C). O cartucho lacrado contendo a amostra de pimenta-do-reino foi então inserido no compartimento do extrator, com atenção para que não obstruísse o dreno, assegurando o funcionamento adequado do refluxo (Figura 3D).

A montagem do condensador, componente superior do sistema Soxhlet, foi realizada com a conexão das mangueiras: uma ligada à entrada de água da torneira, na parte inferior, e a outra à saída de água, localizada na extremidade superior. A montagem do sistema foi finalizada com a acoplagem do condensador ao corpo do extrator Soxhlet, completando o circuito de refluxo. Para garantir a estabilidade e segurança da aparelhagem, uma garra adicional foi fixada ao balão volumétrico, assegurando o correto posicionamento de todo o sistema durante a extração (Figura 3E).

**Figura 3.** Montagem do extrator Soxhlet. A) Balão destilação de manta de aquecimento; B) Etanol e pedaços de porcelana; C) Montagem do extrator Soxhlet; D) Acondicionamento do cartucho com a amostra; E) Extrator Soxhlet completamente montado.

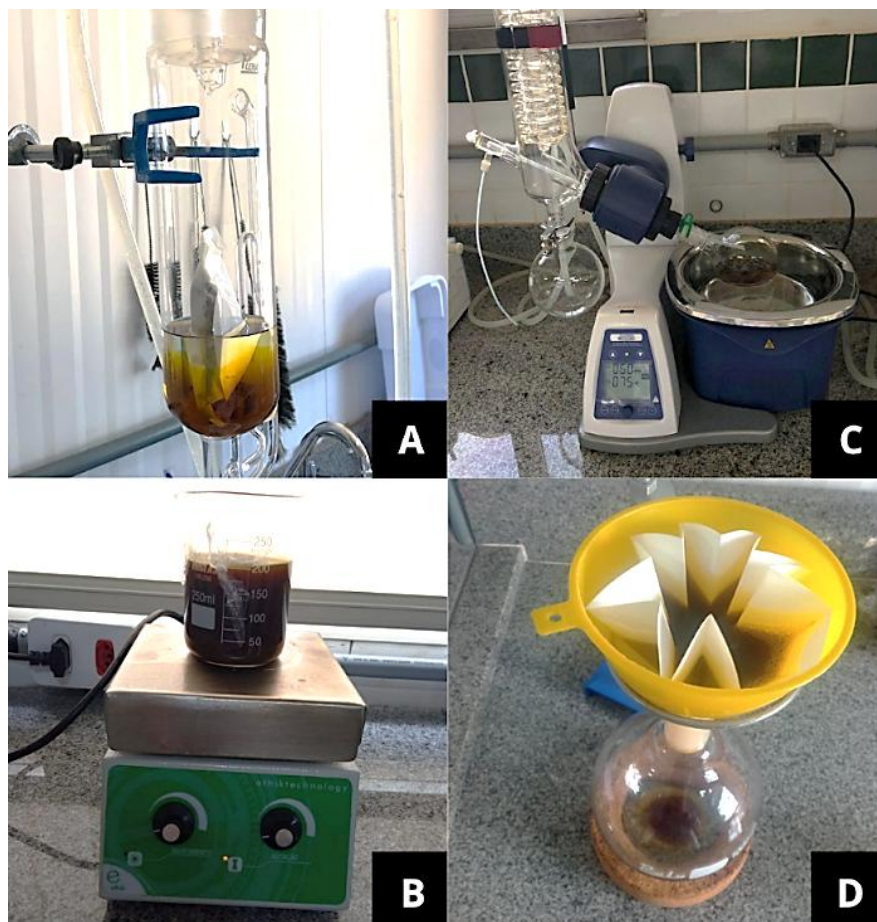


Fonte: Autoria própria, 2023.

A extração foi iniciada com a abertura do fluxo de água para o condensador e o acionamento da manta de aquecimento. Com o aumento da temperatura, o etanol presente no balão de destilação começou a evaporar. O vapor, ao atingir a superfície resfriada do condensador, se condensava, acumulando-se no compartimento do Soxhlet, onde passava a interagir com a amostra contida no cartucho, promovendo a extração do composto de interesse. O procedimento teve duração aproximada de 8 horas, correspondendo a 12 ciclos de 30 minutos sob refluxo contínuo com etanol (Figura 4A).

Em seguida, o extrato obtido foi concentrado utilizando um rotaevaporador (Figura 4B), operando a 60 °C, com rotação de 75 rpm e sob pressão reduzida, até atingir um volume final de aproximadamente 150 mL. A esse concentrado foram adicionados 20 mL de solução alcoólica de KOH a 10% (v/v). A mistura resultante foi submetida à agitação magnética por 1 hora, a fim de promover a precipitação dos taninos presentes (Figura 4C). Posteriormente, os taninos precipitados foram removidos por filtração simples com o objetivo de eliminar compostos fenólicos indesejados que poderiam interferir nos ensaios biológicos e comprometer a avaliação do efeito específico da piperina. (Figura 4D).

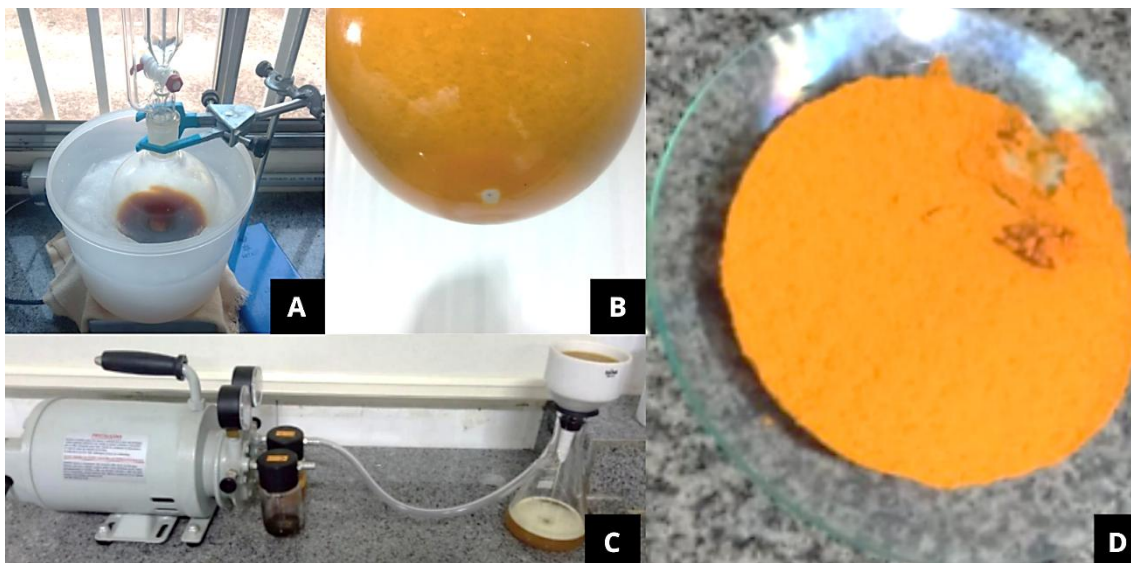
**Figura 4.** Processo de extração e filtração da piperina. A) Início da extração; B) Concentração do extrato; C) Precipitação dos taninos; D) Filtração para remoção dos taninos.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Com o objetivo de isolar a piperina, foi montado, após a etapa de filtração, um sistema de resfriamento composto por um banho de gelo, um balão contendo a solução concentrada, um funil de adição para aplicação de água gelada e uma placa de agitação magnética (Figura 5A). A cristalização da piperina foi induzida pela adição lenta e controlada de 600 mL de água gelada, aplicada gota a gota, até a formação completa dos cristais no meio reacional (Figura 5B). Os cristais formados foram então separados por filtração a vácuo (Figura 5C) e, em seguida, armazenados à temperatura ambiente para secagem, visando seu uso posterior na etapa de purificação (Figura 5D).

**Figura 5.** Processo de isolamento da piperina. A) Sistema de resfriamento para isolar a piperina; B) Piperina cristalizada; C) Cristais de piperina isolados por filtração a vácuo; D) Cristais de piperina prontos para purificação.

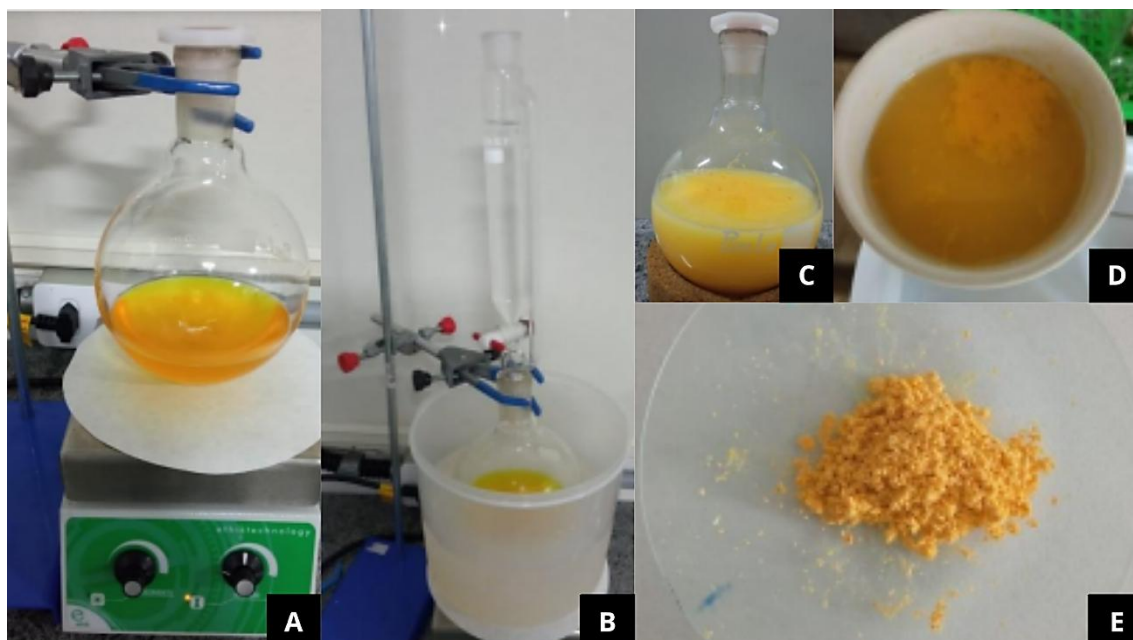


Fonte: Autoria própria, 2023.

#### 4.4. Purificação

Conforme descrito por Souza (2024), para a etapa de purificação, a piperina previamente isolada foi solubilizada em etanol (Figura 6A), e a solução resultante foi submetida a resfriamento em banho de gelo, permanecendo sob agitação magnética constante (Figura 6B). Em seguida, realizou-se a adição gradual de água destilada, até que se observasse a cristalização completa da piperina (Figura 6C). Os cristais formados foram então separados por filtração a vácuo e lavados com água gelada para remoção de impurezas residuais (Figura 6D). Por fim, os cristais foram secos à temperatura ambiente, visando sua utilização em testes posteriores de caracterização e aplicação biológica (Figura 6E).

**Figura 6.** Processo de purificação da piperina. A) Solubilização da piperina; B) Processo de cristalização da piperina; C) Piperina cristalizada; D) Filtração dos cristais de piperina; E) Piperina pura isolada.



Fonte: Autoria própria, 2023.

#### 4.5. Cálculo para o volume final das soluções de piperina

O volume final das soluções do primeiro ensaio foi ajustado para 10 mL cada. Para isso, procedeu-se da seguinte forma:

- Para a solução de 1% (m/v), foi pesada uma massa de 100mg de piperina e adicionado 10ml de etanol 92%;
- Para a solução de 2,5% (m/v), foi pesada uma massa de 250mg de piperina e adicionado 10ml de etanol 92%;
- Para a solução de 5% (m/v), foi pesada uma massa de 500mg de piperina e adicionado 10ml de etanol 92%.

Após a obtenção e purificação da piperina, o composto foi dissolvido em etanol para o preparo das soluções experimentais, devido à sua baixa solubilidade em água e elevada solubilidade em solventes orgânicos alcoólicos, característica amplamente descrita para este alcaloide (GOVINDARAJAN, 2000; SRINIVASAN, 2007). A utilização do etanol como solvente também se justifica por sua polaridade intermediária, que favorece a completa solubilização do composto e a obtenção de soluções homogêneas, condição essencial para a precisão das concentrações

aplicadas nos bioensaios. Além disso, o etanol é amplamente empregado como veículo em ensaios biológicos por apresentar rápida evaporação e compatibilidade com aplicações tópicas em pequenos volumes, sendo comumente utilizado como solvente-controle em testes toxicológicos com insetos (ISMAN, 2006).

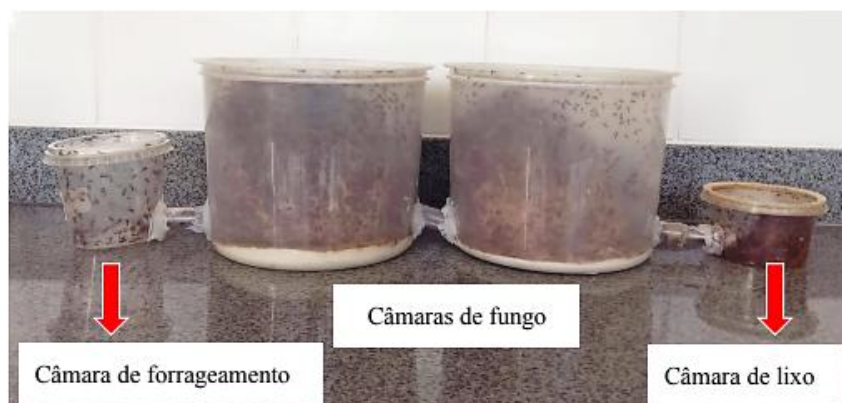
A mesma quantidade de volume final e o mesmo esquema experimental foram adotados no segundo ensaio; contudo, utilizou-se etanol 70% como solvente. No segundo ensaio, o etanol 70% foi usado como controle devido à sua capacidade de induzir mortalidade uniforme nas operárias. Essa concentração é reconhecida como a mais eficiente, pois possui maior capacidade de penetração no tegumento e menor taxa de evaporação quando comparada a soluções mais concentradas (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

#### 4.6. Criação das colônias de formigas-cortadeiras

As colônias de *A. sexdens* com aproximadamente cinco anos de idade (Figura 7) foram mantidas em uma sala climatizada ( $T = 24 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $UR = 70 \pm 10\%$ ) dentro de recipientes plásticos que funcionam como câmaras de fungo, com 1 cm de gesso no fundo para a manutenção da umidade.

Adicionalmente, dois recipientes foram conectados ao sistema principal por meio de tubos plásticos, formando as câmaras destinadas à forrageamento e ao descarte de resíduos. Para alimentação das colônias, foram fornecidas folhas frescas de *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) e aveia laminada (Poaceae) como substrato vegetal, além de pedaços de maçã, oferecidos como suplemento nutricional para as operárias.

**Figura 7.** Exemplo de colônia de *Atta sexdens* mantida no laboratório do GEPEG - CCA/UFSCar, Araras, SP.



Fonte: Autoria própria, 2023.

#### **4.7. Toxicidade tópica sobre operárias de *A. sexdens***

Foram selecionadas operárias forrageiras provenientes das colônias indicadas no item 4.5 (Figura 8A). Para evitar contaminações por contato, cada repetição experimental foi individualizada, conforme metodologia descrita por Nagamoto et al. (2004). As operárias foram alocadas individualmente em recipientes plásticos de 30 mL, contendo uma camada de 0,1 cm de gesso no fundo, com a finalidade de manter a umidade adequada ao longo do experimento (Figura 8B).

Os recipientes experimentais foram previamente submetidos à exposição à luz ultravioleta em capela por 20 minutos, com o objetivo de garantir condições assépticas para o ensaio (Figura 8C). Em cada unidade, foi adicionado um pélete de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> do fungo mutualístico oriundo da colônia de origem, servindo como fonte de alimento para as operárias ao longo do experimento, sendo substituído sempre que necessário (RAMOS et al., 2019). Além disso, o gesso no fundo dos recipientes foi previamente umedecido com água destilada, visando a manutenção da umidade interna adequada.

No primeiro ensaio, foram utilizadas seis colônias, das quais foram selecionadas cinco operárias por colônia, totalizando 30 repetições por tratamento. Já no segundo ensaio, foram empregadas dez colônias, com três operárias selecionadas por colônia, resultando igualmente em 30 repetições por tratamento. Em casos nos quais operárias foram encontradas mortas ou debilitadas antes do início do experimento, estas foram substituídas a fim de assegurar a padronização dos testes.

As soluções contendo piperina foram preparadas com volume final constante, variando-se apenas a quantidade do composto ativo, de modo a obter diferentes concentrações para os tratamentos. O preparo seguiu o seguinte procedimento:

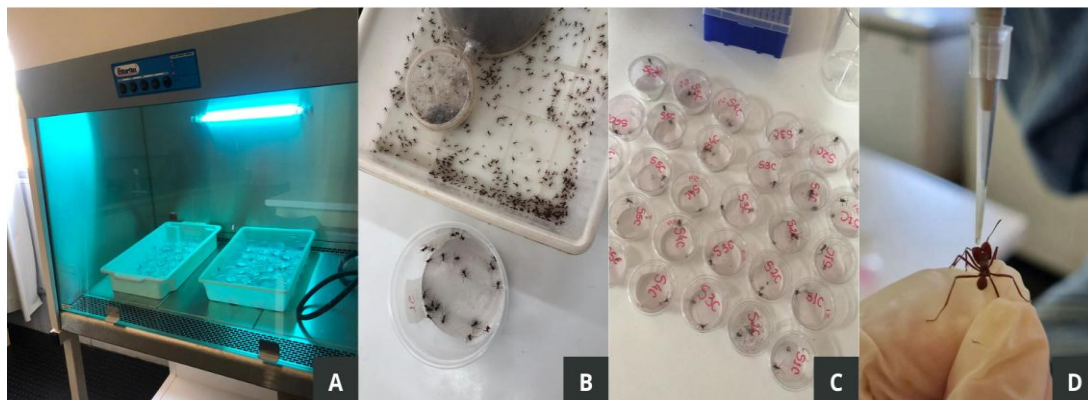
1. Solução de 1%: Para essa solução, foi adicionado 1% de piperina a um volume fixo de solvente (etanol), formando uma solução com uma concentração específica.
2. Solução de 2,5%: Nesta solução, foi adicionado 2,5% de piperina ao mesmo volume de solvente utilizado na solução anterior. Isso aumentou a concentração de piperina em comparação à solução de 1%.

3. Solução de 5%: Para esta solução, 5% de piperina foi misturado ao mesmo volume de solvente. Isso resultou em uma concentração ainda maior de piperina em relação às soluções anteriores.

Os tratamentos foram constituídos por diferentes concentrações do extrato de piperina. No primeiro ensaio, foram testadas as concentrações de 1, 2,5 e 5%. Em todos os tratamentos, aplicou-se no pronoto de cada operária um volume fixo de 0,5  $\mu\text{L}$  da solução correspondente, além do controle, composto por 0,5  $\mu\text{L}$  de etanol 92%. No segundo ensaio, foram mantidas as mesmas concentrações (1, 2,5 e 5%) e o mesmo volume de aplicação (0,5  $\mu\text{L}$  por operária); entretanto, o controle foi substituído por 0,5  $\mu\text{L}$  de etanol 70% para estabelecer um padrão. Com a manutenção do volume total fixo, a variação na quantidade de piperina adicionada possibilitou a formulação de soluções com concentrações distintas, permitindo a comparação dos efeitos do composto em diferentes níveis de exposição.

Os tratamentos foram aplicados diretamente no pronoto de cada operária utilizando uma micropipeta monocal de volume variável (Figura 8D). Após a aplicação, os recipientes contendo as operárias foram acondicionados em câmara tipo BOD, sob temperatura controlada de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , sendo realizada a avaliação diária da mortalidade a cada 24 horas, durante um período total de 264 horas.

**Figura 8.** Procedimentos realizados para os ensaios de toxicidade tópica. A) Recipientes expostos à luz ultravioleta; B) Operárias separadas das colônias; C) Operárias nos recipientes plásticos; D) Aplicação da solução de piperina no pronoto de uma operária.



Fonte: Autoria própria, 2023.

#### **4.8. Análise dos dados**

Para avaliar a significância das diferenças na mortalidade das operárias entre os tratamentos, os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ), uma vez que não atenderam aos pressupostos de normalidade.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Extração e purificação da piperina**

A extração realizada a partir de 50 g de grãos de pimenta-do-reino resultou em 1,8038 g de piperina impura, correspondendo a um rendimento de 3,61%. Posteriormente, a purificação desse material proporcionou a obtenção de 1,1574 g de piperina pura e seca, o que representou um rendimento final de 61,4% após o processo de purificação.

#### **5.2. Avaliação do primeiro ensaio de toxicidade tópica em operárias de *A. sexdens***

No primeiro ensaio, verificou-se que a mortalidade total das operárias ocorreu em até 72 horas, apesar de o experimento ter sido originalmente planejado para uma duração de 264 horas. Observou-se um aumento gradativo na mortalidade das operárias entre os tratamentos, partindo do controle até a concentração de piperina a 5%. Porém, como a única variação observada entre os tratamentos foi o tempo até a mortalidade, não houve base para a realização de análise estatística.

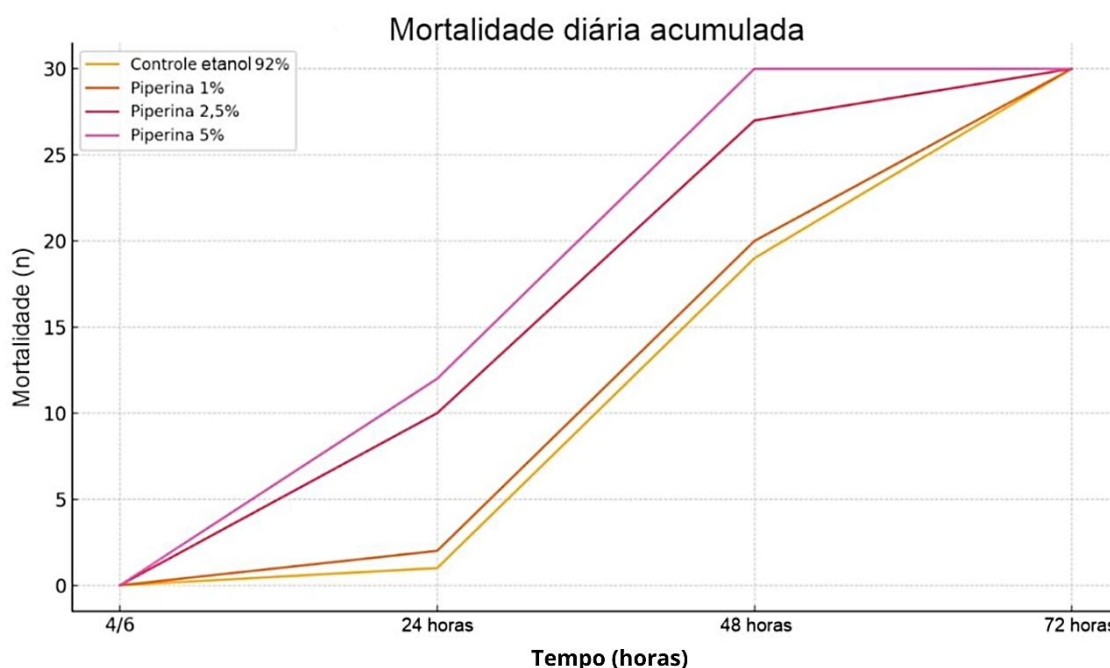
As soluções de piperina foram preparadas com etanol 92%, conforme protocolos adotados em estudos anteriores (SOUZA, 2024). Sousa et al. (2019) demonstraram que o uso de etanol puro resultou na morte de um formigueiro do gênero *Acromyrmex*, indicando que a mortalidade observada em seu experimento não foi causada pelos compostos testados, mas sim pelo próprio solvente. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a mortalidade das operárias de *A. sexdens* no primeiro ensaio pode ser atribuída principalmente ao etanol 92%, e não somente ao extrato de piperina pura e isolada (Tabela 1 e Figura 9).

**Tabela 1.** Mortalidade diária acumulada de operárias de *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos: extrato de piperina 1%, 2,5% e 5% (m/v) e etanol 92% (controle). As operárias foram obtidas de seis colônias (S).

<b>Controle etanol</b>					
	<b>04/06/2024</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>Mortalidade total</b>
<b>S1</b>	0	0	4	5	5
<b>S2</b>	0	0	2	5	5
<b>S3</b>	0	0	3	5	5
<b>S4</b>	0	0	0	5	5
<b>S5</b>	0	0	5	5	5
<b>S6</b>	0	1	2	5	5
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
<b>Piperina 1%</b>					
	<b>04/06/2024</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>Mortalidade total</b>
<b>S1</b>	0	1	4	5	5
<b>S2</b>	0	0	3	5	5
<b>S3</b>	0	1	4	5	5
<b>S4</b>	0	0	4	5	5
<b>S5</b>	0	0	4	5	5
<b>S6</b>	0	0	5	5	5
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
<b>Piperina 2,5%</b>					
	<b>04/06/2024</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>Mortalidade total</b>
<b>S1</b>	0	3	4	5	5
<b>S2</b>	0	0	4	5	5
<b>S3</b>	0	0	4	5	5
<b>S4</b>	0	1	5	5	5
<b>S5</b>	0	3	5	5	5
<b>S6</b>	0	0	4	5	5
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
<b>Piperina 5%</b>					
	<b>04/06/2024</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>Mortalidade total</b>
<b>S1</b>	0	0	5	-	5
<b>S2</b>	0	1	5	-	5
<b>S3</b>	0	1	5	-	5
<b>S4</b>	0	2	5	-	5
<b>S5</b>	0	3	5	-	5
<b>S6</b>	0	3	5	-	5
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

(-) Mortalidade totalizada.

**Figura 9.** Primeiro ensaio: mortalidade diária acumulada de operárias de *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos: extrato de piperina 1%, 2,5% e 5% (m/v) e etanol 92% (controle).



Fonte: Autoria própria, 2025.

### 5.3. Avaliação do segundo ensaio de toxicidade tópica em operárias de *Atta sexdens*

No segundo ensaio, não foram observadas diferenças significativas na mortalidade das operárias entre os tratamentos, conforme indicado pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p = 0,3813$ ).

O tratamento controle preparado com etanol a 70% resultou em uma taxa de mortalidade de 30%. Em relação às soluções contendo extrato de piperina nas concentrações de 1%, 2,5% e 5% (m/v), as mortalidades observadas foram de 46,67%, 56,67% e 40%, respectivamente. Esses resultados revelam uma variação na eficácia do extrato de piperina na indução de mortalidade entre as diferentes concentrações testadas (Tabela 2).

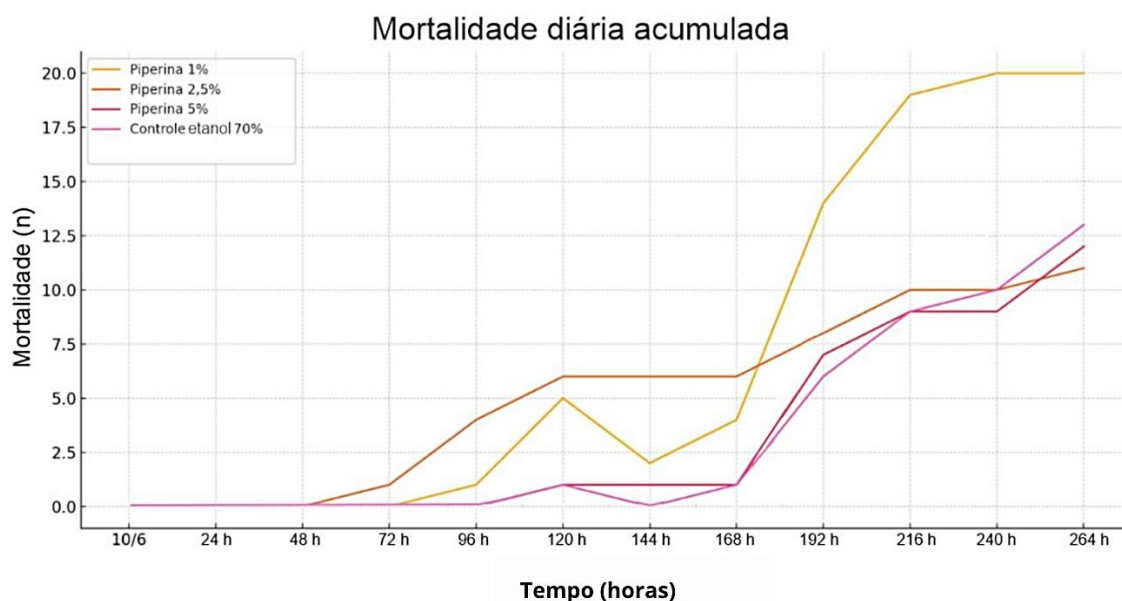
Essa limitação pode estar associada à menor solubilidade da piperina em etanol 70%, o que pode ter comprometido a homogeneidade das soluções e, conseqüentemente, a dose efetivamente aplicada. Recomenda-se a utilização de métodos alternativos para garantir a dissolução eficaz, condição essencial para a realização de testes futuros.

**Tabela 2.** Mortalidade diária acumulada de operárias de *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos: extrato de piperina 1%, 2,5% e 5% (m/v) e etanol 70% (controle). As operárias foram obtidas de dez colônias (S).

<b>Controle etanol</b>													
	<b>10/06/2024</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>	<b>120 h</b>	<b>144 h</b>	<b>168 h</b>	<b>192 h</b>	<b>216 h</b>	<b>240 h</b>	<b>264 h</b>	<b>Total</b>
<b>S1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3
<b>S2</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3
<b>S3</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<b>S4</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S5</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S6</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2
<b>S7</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S8</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S9</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S10</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<b>Piperina 1%</b>													
	<b>10/06/2024</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>	<b>120 h</b>	<b>144 h</b>	<b>168 h</b>	<b>192 h</b>	<b>216 h</b>	<b>240 h</b>	<b>264 h</b>	<b>Total</b>
<b>S1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	3	3
<b>S2</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
<b>S3</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S4</b>	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2
<b>S5</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1
<b>S6</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2
<b>S7</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2
<b>S8</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2
<b>S9</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<b>S10</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>14</b>

<b>Piperina 2,5%</b>													
	<b>10/06/2024</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>	<b>120 h</b>	<b>144 h</b>	<b>168 h</b>	<b>192 h</b>	<b>216 h</b>	<b>240 h</b>	<b>264 h</b>	<b>Total</b>
<b>S1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S2</b>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>S3</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
<b>S4</b>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	3	3	3
<b>S5</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3
<b>S6</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2
<b>S7</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
<b>S8</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	3
<b>S9</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
<b>S10</b>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>17</b>
<b>Piperina 5%</b>													
	<b>10/06/2024</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>	<b>120 h</b>	<b>144 h</b>	<b>168 h</b>	<b>192 h</b>	<b>216 h</b>	<b>240 h</b>	<b>264 h</b>	<b>Total</b>
<b>S1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3
<b>S2</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<b>S3</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2
<b>S4</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	3
<b>S5</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S6</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S7</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
<b>S8</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
<b>S9</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>S10</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>12</b>

**Figura 10.** Segundo ensaio: mortalidade diária acumulada de operárias de *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos: extrato de piperina 1%, 2,5% e 5% (m/v) e etanol 70% (controle).



Fonte: Autoria própria, 2025.

#### 5.4. Comparativos com outros extratos vegetais e implicações

Os resultados obtidos com o extrato de piperina, embora preliminares, apresentaram níveis de mortalidade iguais ou superiores aos reportados para outros extratos vegetais, ainda que em condições experimentais distintas. Por exemplo, *T. pallida* e *Z. pohlmanum* apresentaram mortalidades máximas de aproximadamente 23% em bioensaios por ingestão com *A. sexdens* (TORRES et al., 2013). Em contrapartida, o presente estudo obteve mortalidade de até 56,6% com a concentração de 2,5% de piperina, mesmo diante das limitações impostas pela baixa solubilidade do composto no solvente adotado.

Tais evidências indicam que, para além da toxicidade direta, os extratos vegetais podem atuar de forma multifacetada, influenciando o comportamento e o equilíbrio mutualístico das colônias. A piperina, nesse contexto, apresenta vantagens importantes: é um alcaloide amplamente disponível, extraído de forma eficiente por meio do sistema Soxhlet, e possui reconhecida versatilidade química, que permite modificações estruturais capazes de potencializar sua atividade inseticida.

Zhang et al. (2022) sintetizaram derivados bisamida de piperina que demonstraram maior eficácia inseticida contra *P. xylostella* do que a piperina

original, destacando um composto que causou 90% de mortalidade em bioensaio a 1 mg/mL. Além disso, derivados éster de piperina também têm se mostrado promissores acaricidas contra *Tetranychus cinnabarinus* (Acari, Tetranychidae) (Boisduval) (LV et al., 2023). Esses resultados reforçam o potencial de uso da piperina como base para desenvolvimento de bioinseticidas eficazes no controle de pragas.

Do ponto de vista ecológico e econômico, destaca-se a possibilidade de obtenção da piperina em larga escala, sem necessidade de cultivos exclusivos, pois a pimenta-do-reino já é amplamente produzida no Brasil e no mundo. Essa acessibilidade fortalece a viabilidade do composto como matéria-prima para formulações de bioinseticidas dentro de uma lógica de manejo sustentável e agroecológico.

### **5.5. Perspectivas futuras**

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a piperina apresenta potencial para uso como bioinseticida; contudo, também evidenciam desafios que precisam ser superados. Um dos principais entraves observados foi a baixa solubilidade da piperina em etanol 70%, condição que possivelmente limitou sua disponibilidade e, conseqüentemente, sua ação sobre as operárias.

Por isso, uma das primeiras medidas para pesquisas futuras seria testar outros tipos de solventes ou veículos de aplicação, compatíveis com bioensaios e com viés ambiental. Há alternativas promissoras, como os óleos vegetais, as nanoemulsões ou até cápsulas microscópicas que facilitam a liberação da substância de forma mais eficaz.

Outro caminho importante seria explorar não apenas a mortalidade das operárias, mas também outros efeitos que a piperina pode causar, como mudanças no comportamento, a forma como cuidam do fungo ou a maneira como se alimentam. Essas mudanças, mesmo que não causem mortalidade imediata, podem potencialmente enfraquecer a colônia ao longo do tempo e contribuir para o controle de forma gradativa, mas ainda sim eficaz.

Também é interessante pensar na combinação da piperina com outros compostos naturais. Unir diferentes substâncias pode criar um efeito mais potente ou ampliar o alcance do controle, afetando mais de uma fase do ciclo de vida das formigas ou diferentes espécies. Essas combinações podem ser úteis

principalmente para reduzir a probabilidade de seleção de tolerância ou adaptação comportamental.

Por fim, vale reforçar que é essencial testar a piperina em condições de campo, já que os ensaios em laboratório, apesar de importantes, nem sempre representam exatamente o que acontece em áreas agrícolas ou florestais. A realização desses testes permitirá verificar a eficiência do composto em situações reais e ajudará a entender como ele se comporta no ambiente.

## **6. Conclusão**

As etapas de extração e purificação da piperina foram bem-sucedidas, demonstrando a viabilidade técnica de obtenção do composto com relativa simplicidade.

No primeiro ensaio, a mortalidade das operárias de *A. sexdens* pode estar diretamente associada ao uso de etanol 92%, e não às soluções de piperina. Isso foi evidenciado pelo fato de o controle apresentar taxa de mortalidade de 100%.

No segundo ensaio, os resultados indicaram bioatividade biologicamente relevante, embora sem diferença estatística significativa entre os tratamentos. No entanto, a baixa solubilidade da piperina em etanol 70% comprometeu o desempenho do composto, sugerindo que os efeitos observados podem ter sido subestimados.

A piperina representa uma alternativa promissora, embora ainda em fase exploratória. Os resultados aqui apresentados fornecem subsídios para investigações futuras e contribuem para o desenvolvimento de estratégias alinhadas aos princípios da agroecologia, visando a sistemas produtivos mais equilibrados e sustentáveis.

## 7. Referências

ARAÚJO, S.; SEIBERT, J.; RUANI, A.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; CRUZ, A.; PEREIRA, A.; ZANDONAI, D.; FORIM, M.; SILVA, M.F.; BUENO, O. The symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales, Agaricaceae) as a target organism to control leaf-cutting ants. *Insects*, v. 13, 359, 2022.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica Ipef*, Botucatu, v. 11, p. 31-46, maio 1997. Disponível em: <https://www.ipef.br/publicacoes/stecnica/nr30/cap3.pdf>.

BOFF, M. I. C.; ALMEIDA, A. A. DE. Efeito residual de extratos de *Piper nigrum* (L.) sobre larvas neonatas de *Sitotroga cerealella* (Oliv.). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 24, n. 1, p. 115–121, 1995.

BOLTON, B. An online catalog of the ants of the world. Disponível em: <<https://antcat.org>>. Acesso em: 01 dez. 2025.

BRITTO, J. S.; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, R. S. Use of alternatives to pros, its salts and PFOSF for the control of leaf cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *International Journal of Research in Environmental Studies*, p. 11-92, 2016.

BUENO, O.C.; M.J.A. HEBLING, O.A.S.; MATENHAUER, A.M.C. Effect of sesame (*Sesamum indicum*) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Applied Entomology*, v. 119, p. 341-343, 1995.

CARNEVALLI, D. B; ARAÚJO, A. Atividade biológica da pimenta-preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. *Uniciências*, v. 17, n. 1, p. 41-46. 2013.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, v. 58, p. 99–117, 2013.

CHAHAD, S.; BOOF, M.I.C. Efeito de extrato de pimento-preta sobre larvas de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 23, n. 1, p. 13-18, 1994.

COLOMBARI, K. F. S.; FUJIHARA, R. T.; SOUZA-CAMPANA, D. R.; WAZEMA, C. T.; SOUZA, E. S. Survey of leaf-cutting ant species in the central region of the state of Tocantins, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, e248727, 2023.

CORRÊA, M. M.; SILVA, P. S.; WIRTH, R.; TABARELLI, M.; LEAL, I. R. How leaf-cutting ants impact forests: drastic nest effects on light environment and plant assemblages. *Oecologia*, v. 162, p. 103-115, 2010.

DA SILVA, J. P.; DE SOUZA, L. L.; SILVA NETO, C. de M.; BARREIRA, S. Inseticidas botânicos no controle de formigas. *Desafios - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins*, v. 7, n. 4, p. 163-171, 2021.

FALEIROS, M. V.; FALEIROS, J. H.; OLIVEIRA, R. C.; ROCHA, E. C.; LUZ, J. M. Q.; ARRUDA, A. da S. Atividade inseticida do extrato etanólico de *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) sobre formigas cortadeiras. *Scientia Plena*, v. 18, n. 10, p. 1-9, 2022.

FARJI-BRENER, A. G.; SILVA, J. Leaf-cutting ants and soil fertility in a well-drained Savanna in Western Venezuela. *Biotropica*, v. 27, n. 2, p. 250-254, 1995.

FRANÇA, A. A. C.; PEREIRA, A. D.; FERNANDES, K. A.; COSTA, A. K. B.; RAMOS, M. A. B.; MARTINS, F. A.; BATISTA, N. C.; MATOS, J. M. E.; SÁ, J. L. S. Potencialidades da Piperina: um estudo realizado por meio das técnicas de prospecção científica e tecnológica. *Revista Virtual de Química*, v. 13, p. 311-313, 2021.

GARCIA, J.; KAMADA, T.; JACOBSON, T. K. B.; CURADO, M. A.; OLIVEIRA, S. M. de. Superação de dormência em sementes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 30, n. 2, p. 17-23, 2000.

GOVINDARAJAN, V. S. Pepper—chemistry, technology, and quality evaluation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 40, n. 1, p. 1–42, 2000.

GUIDA, Y.; TORRES, F. B. M.; BARIZON, R. R. M.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. Confirming sulfluramid (EtFOSA) application as a precursor of perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in Brazilian agricultural soils. *Chemosphere*, v. 325, 138370, 2023.

HAQ, I. U.; IMRAN, M.; NADEEM, M.; TUFAIL, T.; GONDAL, T. A.; MUBARAK, M. S. Piperine: A review of its biological effects. *Phytotherapy Research*, v. 35, n. 2, p. 680-700, 2021.

ISMAN, M.B., WILSON, J.A., BRADBURY, R. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in relation to their chemical compositions. *Pharmaceutical Biology*, v. 46, n. 1-2, p.82-87, 2008.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, v. 51, p. 45–66, 2006.

LENGAI, G. M. W.; MUTHOMI, J. W.; MBEGA, E. R. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in insect control: A review. *Scientific African*, v. 7, e03449, 2020.

LI, S.; LV, M., XU, H. Overview of piperine: bioactivities, total synthesis, structural modification, and structure-activity relationships. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 917-940, 2023.

LIMA, P; CRUZ DA, D; GAZANI, T; PAIVA, S; PEREIRA, M; SOUZA, L; REBELO, M. Extração da piperina a partir da pimenta-do-reino: comparação de processos extrativos. *Revista Saúde em Foco*, v. 13, p. 614–627, 2021.

LIMA JÚNIOR, A. F. de. Efeito de diferentes extratos vegetais no controle de *Acanthoscelides obtectus* e *Sitophilus sp.* 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Câmpus Central - Sede: Anápolis – CET, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.

LV, M.; SHAOCHEN, L.; HOUPENG, W.; YANYAN, W.; JIAWEI, D.; HUI, X. Expedient discovery of novel oxime ester derivatives of piperine/piperine analogs as potent pesticide candidates and their mode of action against *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval. *Pest Management Science*, v. 79, 10.1002/ps.7521, 2023.

MASIULIONIS, V. E.; SAMUELS, R. I. Investigating the biology of leaf-cutting ants to support the development of alternative methods for the control and management of these agricultural pests. *Agriculture, MDPI*, v. 15, n. 6, p. 1-31, 2025.

MONTOYA-LERMA, J., GIRALDO-ECHEVERRI, C., ARMBRECHT, I., FARJIBRENER., A., CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. *International Journal of Pest Management*, v. 58, n. 3, p.225–247, 2012.

MORAES, J. *Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em Schistosoma mansoni*. 2011. 236 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MOREIRA, M; PICANÇO, M; SILVA, E; MORENO, S; MARTINS, J. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. 2006. 27 p.

MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BRUSCHI, S. M.; SMITH, C. C.; HERMAN, J. J.; SOLOMON, S. E.; BACCI JR, M. Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. *Molecular Ecology*, n. 26, p. 6921-6937, 2017.

NAGAMOTO N. S., FORTI L. C.; RAETANO C. G. Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic for leaf-cutting ants (Hymenoptera:

Formicidae) based on formicidal activity. *Journal of Pest Science*, v. 80, p. 9-13, 2007.

NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P.; BOARETTO, M. A. C.; WILCKEN, C. F. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 44, n. 2, p. 413-431, 2004.

OLIVEIRA, M. de F. S. dos S. de. *Controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) com produtos naturais*. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, SP, 2006.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A. J.; VELOSO, D.P.; PIKANÇO, M. C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest Management Science*, v.56, n.2, p. 168-174, 2000.

PINHEIRO, H.; CALAZANS, C.; MASIULIONIS, V.; ANDRADE, V.; DA S. CARVALHO, T.; GOIS, I.; RIBEIRO, G.; BLANK, A.; ARAÚJO, A.; BACCI, L. Potential of alternative control of leaf-cutting ants using essential oils: A systematic review. *Agricultural and Forest Entomology*, v. 27, n. 4, p. 497-511, 2025.

PLANO NACIONAL DE IMPLEMENTAÇÃO (NIP). *Convenção de Estocolmo*. Brasília: MMA, 2015. 192 p.

RAMOS, V.M.; FERREIRA LEITE, R.G.; ALMEIDA, V.T.; CAMARGO, R.S.; SOUZA CRUZ, J.V.; LEÃO, R.M.; PRADO, M.V.; SOUSA PEREIRA, M.C. Bioactivity of *Asclepias curassavica*, *Equisetum* spp. and *Rosmarinus officinalis* extracts against leaf cutting ants. *Sociobiology*, v. 66, n. 4, p. 536-544, 2019.

ROCHA, Felipe P.; BOGAR, Taylor A.; IBAÑEZ WEEMAELS, Andre; HU, Jiaxin; LIANG, Mingrong; PARK, Clara; LEE, Roger H.; KHAN, Shahmshad Ahmed;

HAN, Shaolin; NG, Yuen Lam; GUÉNARD, Benoit. Two sides of the same coin? Ants are ecosystem engineers and providers of ecosystem services. *Myrmecological News*, Viena, v. 34, p. 129–157, 2024. DOI: 10.25849/myrmecol.news\_034:129.

SCOTT, I.M.; JENSEN, H.; SCOTT, J.G.; ISMAN, M.B.; ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R. Botanical insecticides for controlling agricultural pests: piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Biochemistry and Physiology*, v. 54, p. 212-225, 2003.

SOPER, F. M.; SULLIVAN, B. W.; OSBORNE, B. B.; SHAW, A. N.; PHILIPPOT, L.; CLEVELAND, C. C. Leaf-cutter ants engineer large nitrous oxide hot spots in tropical forests. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 286, n. 1894, p. 1-7, 2019.

SOUSA, N. J.; REZENDE, E. H.; CRESPO, I.; GRANADOS, M. B.; RODRIGUES, C. R. Controle de formigas cortadeiras utilizando sementes de gergelim. *Enciclopédia Biosfera*, v. 16, n. 29, 2019.

SOUZA, A.V. *Extração e purificação da piperina da pimenta do reino preta para uso como bioinseticida no controle da cigarrinha do milho (Dalbulus maidis) (DeLong & Wolcott)*. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, 2024.

SOUZA-SOUTO, L.; GUERRA, M. B. B.; SCHOEREDER, J. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; DA SILVA, W. L. Determinação do fator de conversão em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e sua relação com a qualidade do material vegetal cortado. *Revista Árvore*, v. 31, n. 1, p. 163-166, 2007.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 47, p. 735–748, 2007.

VINHA, G. L.; ALCÁNTARA-DE-LA- CRUZ, R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; WILCKEN, C. F.; SILVA, E. D.; LEMES, P. G.; ZANUNCIO, J. C. Leaf-cutting ants in commercial forest plantations of Brazil: biological aspects and control methods. *Southern. Forests: a Journal of Forest Science*, v. 82, p. 95-103, 2020.

TORRES, A; LASMAR, O; CARVALHO, G; SANTA-CECÍLIA, L; ZANETTI, R; OLIVEIRA, D. Atividade inseticida de extratos de plantas no controle de formiga cortadeira, em cafeeiro. *Coffee Science*, Lavras, v. 8, n. 3, p. 371–378, jul./set. 2013.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; SANTOS, J.C.; SILVA, W.L.P.; RIBEIRO, G.T.; LEMES, P. G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. *Forests*, v. 5, p. 439–54, 2014.

ZHANG, C.; TIAN, Q.; LI, Y. Design, synthesis, and insecticidal activity evaluation of piperine derivatives. *Frontiers in Chemistry*, v. 10, 973630, 2022.