



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL

HUMBÉRILA DA COSTA E SILVA MELO

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE PIPERINA NA PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA
DO ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL.

FORTALEZA – CEARÁ

2020

HUMBÉRILA DA COSTA E SILVA MELO

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE PIPERINA NA PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA
DO ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Silva Sá

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Francisca Lúcia Lima

FORTALEZA – CEARÁ

2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas**

Melo, Humberila da Costa e Silva.

Influência da adição de piperina na propriedade antimicrobiana do óxido de zinco e eugenol [recurso eletrônico] / Humberila da Costa e Silva Melo. - 2020.

87 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. José Luiz Silva Sá.

1. Piperina. 2. Óxido de Zinco/Eugenol. 3. Antimicrobiano. I. Título.

HUMBÉRILA DA COSTA E SILVA MELO

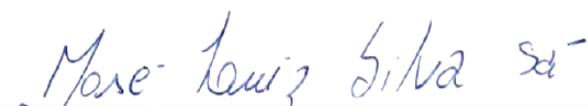
INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE PIPERINA NA PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA
DO ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 16 de junho de 2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Luiz Silva Sá
(UESPI – Presidente / Orientador)


Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho
(UESPI - Examinador(a))


Prof. Dr. Rondénelly Brandão da Silva
(UFPI - Examinador(a))

Aos meus avós (in memoriam): Algenira da
Costa e Silva e Agostinho da Silva Melo.
À minha família: Robson Almeida Borges
de Freitas, Sophia e Heithor Almeida Melo
de Freitas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Luiz Silva Sá pelo incentivo, apoio, orientação e por acreditar na minha competência.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Francisca Lúcia Lima pela paciência, atenção e apoio durante todo o momento de pesquisa e por ceder o Laboratório de Microbiologia para que fossem realizadas as análises.

A minha família pelo apoio e amor incondicional, especialmente, meu esposo Robson Freitas pela indispensável ajuda durante essa jornada.

Aos meus avós Algenira da Costa e Silva (*in memoriam*) e Agostinho da Silva Melo (*in memoriam*) pela dedicação, amor e cuidados de pais. Sempre preocupados com os estudos e a educação como forma de crescimento pessoal e indispensável para o desenvolvimento humano.

Ao meu pai Humberto da Costa e Silva Melo pela presença mesmo que seja tão distante fisicamente. À minha mãe Maria Ires da Silva pela empolgação e palavras de incentivo.

Aos meus irmãos pelo amor incondicional.

Ao professor Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho pela colaboração durante a escolha da melhor metodologia e pelas considerações colocadas na banca de qualificação e defesa.

Ao Dr. Rondenelly Brandão pela disponibilidade em contribuir com o trabalho e pelas contribuições durante a banca de defesa.

Aos meus colegas de mestrado pelo companheirismo e momentos de aprendizado mútuo.

Aos estagiários do LABMICRO (Ana Paula, Iron e João Paulo) que sempre estavam à disposição para colaborar durante o preparo para as análises microbiológicas.

Ao colega Danniel Cabral pela colaboração tão valiosa e fundamental durante a possibilidade de desenvolvimento de testes *in vivo*, assim como os estagiários Sabrina e Lucas.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar algum”.

(Frank Clark)

RESUMO

A piperina é a principal amida alcaloide extraída das sementes de *Piper nigrum* L., (pimenta-preta) e apresenta propriedades biológicas do tipo: antimicrobiana, anti-inflamatória e biodisponibilidade de fármaco. Óxido de Zinco/Eugenol (ZOE) juntos, constituem os conhecidos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, amplamente utilizados na odontologia como curativo temporário. Todavia, com ação limitada para alguns microrganismos da cavidade oral. Esse estudo teve como objetivos avaliar a ação da Piperina para potencializar a ação antimicrobiana do ZOE na formulação ZOE/PIP. Para determinar a atividade antimicrobiana do ZOE/PIP utilizou-se o método de difusão em ágar com perfuração de poços, sendo considerado o crescimento de halo de inibição para bactérias e/ou fungo nas respectivas amostras testadas em triplicata. Utilizou-se alíquotas de 20 µL da solução de ZOE com acréscimo de piperina nas concentrações P1, 4; P2, 5; P3, 10 e P4, 20%. As cepas de referências utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os melhores resultados foram observados com de piperina a 4% apresentando os maiores halos de inibição quando testadas com as cepas *S. aureus* (26 mm), *E. coli* (24 mm), *P. aeruginosa* (29 mm) e *Cândida albicans* (20 mm). O aumento da concentração de piperina na composição não influenciou para um aumento na formação dos halos de inibição, exceto para o *S. mutans* que formou halo de 15 mm na composição com 5% de piperina e *Enterococcus* que formou halos de 14 mm com 5 e 20% de piperina. Conclui-se que a composição ZOE/PIP mostrou-se eficiente no combate a microrganismos existentes na cavidade bucal. E que 4% da piperina na composição potencializou a ação *in vitro* da formulação proposta.

Palavras-chave: Piperina. Óxido de Zinco/Eugenol. Antimicrobiano.

ABSTRACT

Piperine is the main alkaloid starch extracted from the seeds of *Piper nigrum* L., (black pepper) and has biological properties of the type: antimicrobial, anti-inflammatory and bioavailability of drug. Zinc oxide / Eugenol (ZOE) together, form the cements based on zinc oxide and eugenol, widely used in dentistry as a temporary dressing. However, with limited action for some microorganisms in the oral cavity. This study aimed to evaluate the action of Piperine to enhance the antimicrobial action of ZOE in the ZOE / PIP application. To determine the antimicrobial activity of ZOE / PIP, used the agar diffusion method with well drilling, considering the growth of inhibition halo for bacteria and / or fungi in triplicate tests analyzes. Aliquots of 20 μ L of the ZOE solution with addition of piperine are used in analyzes P1, 4%; P2, 5%; P3, 10% and P4, 20%. As application strains used: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Candida albicans* ATCC 10231. The best results were observed with 4% piperine, showing the greatest inhibition halos when tested with *S. aureus* (26 mm), *E. coli* (24 mm), *P. aeruginosa* (29 mm) and *Cândida albicans* (20 mm). The increase in the concentration of piperine in the composition did not influence an increase in the formation of inhibition halos, except for *S. mutans* that form a 15 mm halo in the composition with 5% piperine and *Enterococcus* that form 14 mm halos with 5 and 20 % piperine. It is concluded that the composition ZOE / PIP proved to be efficient in combating microorganisms existing in the oral cavity. And that 4% of the piperine in the composition potentiated the in vitro action of the proposed formulation.

Keywords: Piperine. Zinc Oxide/Eugenol. Antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Grãos de <i>Piper nigrum</i> L. (pimenta-do-reino)	15
Figura 2 – Estrutura molecular da Piperina	16
Figura 3 – Estrutura molecular do Eugenol	19
Figura 4 – Objetivos da Prospecção Tecnológica.....	23
Figura 5 - Publicações por ano utilizando os termos (ZnO or ZOE) and ("zinc oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol")	31
Figura 6 - Publicações por País, relacionadas aos termos pesquisados (ZnO or ZOE) and ("zinc oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol").....	31
Figura 7 - Publicações por Universidades com os termos (ZnO or ZOE) and ("zinc oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol").....	32
Figura 8 - Autores que mais publicam sobre o Óxido de zinco e/ou eugenol	33
Figura 9 - Tipos de documentos sobre ZnO, ZOE e variantes	33
Figura 10 - Documentos por área de assunto sobre ZnO, ZOE e variantes	34
Figura 11 - Publicações por ano utilizando o tema Piperine	35
Figura 12 - Publicações por País sobre Piperine.	35
Figura 13 - Áreas de exploração das publicações com o termo Piperine	36
Figura 14 - Publicações por ano com os termos Piperine com Eugenol.	37
Figura 15 - Publicações por País sobre piperina e eugenol.....	37
Figura 16 - Áreas de publicações com o termo piperine e eugenol.	38
Figura 17 - Quantidade de patentes depositadas nos escritórios de patentes USPTO, ESPACENET e INPI sobre óxido de zinco-eugenol, Piperina e/ou eugenol e sobre o ZOE com adição de piperina.....	39
Figura 18 – Componentes da formulação elaborada no estudo	41
Figura 19 – Manipulação da formulação a base de piperina, óxido de zinco e eugenol.....	42
Figura 20 – Formulação embalada para observação de solidificação	42
Figura 21 – Teste de difusão em ágar com perfuração de poços contra cepas comuns na cavidade oral.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESPACENET	<i>European Patent Office</i>
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Intelectual
IRM®	Material Restaurador Intermediário
LABMICRO	Laboratório de Microbiologia da UESPI
P.A.	Princípio Ativo
PIP	Piperina
USPTO	<i>United States Patent and Trademark office</i>
ZOE	Óxido de Zinco e Eugenol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.	A origem da piperina e suas propriedades farmacológicas	15
2.2.	Atividade biológicas e aplicações do Óxido de Zinco e Eugenol	18
2.3.	Análise de indicadores bibliométricos	21
2.4.	Prospecção tecnológica: definição e objetivos	22
3.	OBJETIVOS	24
3.1.	Objetivo geral.....	24
3.2.	Objetivos específicos	24
4.	METODOLOGIA.....	25
4.1.	Delimitação do estudo.....	25
4.2.	Revisão bibliométrica.....	25
4.3.	Prospecção tecnológica.....	26
4.4.	Manipulação para formulação do ZOE/PIP.....	27
4.5.	Análise da atividade antimicrobiana.....	28
4.5.1.	Método de difusão com perfuração em ágar	29
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO	30
5.1.	Revisão bibliométrica.....	30
5.2.	Prospecção Tecnológica.....	39
5.3.	Formulação.....	40
5.4.	Ação antimicrobiana.....	43
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXOS.....	52
	ANEXO A - DADOS DA PESQUISA (MÉDIA, DP E IC).....	53
	ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CADERNOS DE PROSPECÇÃO	54
	ANEXO C - ARTIGO SUBMETIDO À MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	70

1. INTRODUÇÃO

O uso de substâncias extraídas de plantas para combater doenças causadas por microrganismos tem sido cada vez mais importante a medida em que os antibióticos tradicionais estão se tornando menos eficazes e também pelo surgimento de novos tipos de doenças. A piperina é uma amida natural encontrada em abundância nos frutos de *Piper nigrum* L., mais que também pode ser encontrada em diferentes espécies do gênero *Piper* (SEMLER, GROSS, 1998 apud FERREIRA, 2012).

O *P. nigrum* é usado principalmente como condimento e é popularmente conhecido no Brasil como pimenta do reino, seu principal alcalóide, a piperina, possui variada atividade biológica: ação inseticida (DAS et al. 1996), antipirética, analgésica, anti-inflamatória (LEE et al. 1984; MUJUNDAR et al. 1990; STÖHR et al. 2001 apud CARDOSO, 2005), contraceptiva e antiespermatogênica (PIYACHATURAWAT et al. 1982; MALINI et al. 1999), prolonga a ação de certas drogas no organismo, por inibição do metabolismo das mesmas a nível hepático (ATAL et al. 1985; BANO et al. 1991; SHOBA et al. 1998; KARAN et al. 1999), antiparasitária (KAPIL, 1993; GHOSHAL et al, 1996; RIBEIRO et al. 2004), antimicrobiana (REDDY et al. 2004) e biodisponibilidade de fármacos (CHAUDHRY e TARIQ, 2006; OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELOS, 2014).

A comercialização da piperina como fármaco vendida em cápsulas promete que ela apresenta ação antiinflamatória, ativa o metabolismo e estimula a produção de endorfinas que promovem a sensação de bem-estar, assim como apresenta o efeito termogênico. Características que são comuns às pimentas, o que faz com que as pessoas utilizem como forma de estimulação do sistema gastrointestinal no auxílio à perda de peso. Enquanto que a utilização da mistura entre Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE) é feita por profissionais na odontologia como material de enchimento temporário, bactericida e no auxílio da desinflamação de dentes careados, tendo sido recomendada desde 1930 por Sweet, e segundo Mortazavi & Mesbahi (2004), é bastante utilizado, especialmente, desde meados da década de 1980.

Esse tipo de material é de suma importância na odontologia porque garante a manutenção da assepsia, tratamento microbiano e anti-inflamatório aliado à

proteção do dente ao ataque de novos contaminantes durante o tratamento (HUM, 1986; MERYON, JOHNSON, SMITH, 1988; TROWBRIDGE, EDWALL, PANOPOULOS, 1982; TAI et al, 2002; JUN et al, 2017).

De fato, a ação da mistura ZOE abre um campo de estudo para melhoria dos tratamentos pré-cirúrgicos em odontologia, o que leva à possibilidade de serem testadas novas moléculas com potencial antibacteriano capazes de serem adicionadas de forma homogênea ao Óxido de Zinco (ZnO), gerando aderência ao dente aliada a ação medicamentosa. Conforme as instituições públicas investem na criação e desenvolvimento de patentes baseadas na inovação de produtos consolidados no mercado, criam-se oportunidades de exploração e de retorno do investimento, o que é vantajoso para as instituições.

Como evidenciado, tendo em vista as propriedades biológicas da piperina como alimento ou como fármaco e o uso do composto ZOE que é comum nos consultórios odontológicos, buscou-se através desse estudo contribuir na inovação do composto citado, potencializando suas características antimicrobianas. Ademais, os resultados aqui descritos servirão de base para outras pesquisas afins.

Assim, para embasar a pesquisa aqui descrita, foi necessário realizar a prospecção tecnológica para averiguar a existência de patentes depositadas e concedidas sobre o composto estudado. Por conseguinte, foi necessária uma revisão bibliométrica para termos um panorama das publicações sobre a temática.

Justifica-se a aplicação desse estudo pela necessidade de desenvolver novas alternativas para a criação de medicamentos de larga utilização, com criação de patentes que possam alavancar o conhecimento tecnológico, científico e melhorar a economia do país. A investigação das ações biológicas de novas moléculas pode nortear outros estudos específicos para a utilização destes novos materiais na odontologia, como uma opção viável e mais eficaz aos medicamentos (ZOE) já existentes.

O estudo das propriedades curativas da composição de Piperina com Óxido de zinco-Eugenol (ZOE), pode nortear a aplicação futura na odontologia como restaurador provisório. Então, como melhorar a biodisponibilidade do Óxido de Zinco e Eugenol aumentando os aspectos positivos desse produto? Através desse questionamento, usou-se a piperina com o intuito de potencializar a ação do

composto. A escolha baseou-se nos aspectos descritos na literatura para a piperina, em que relata-se sobre a característica potencializadora de fármacos e em ser uma substância antimicrobiana, como veremos no capítulo 2, que trata da revisão de literatura.

Este trabalho está organizado da seguinte forma:

1. Introdução: Apresenta uma descrição do tema pesquisado, a justificativa e o problema de pesquisa, para que o leitor possa imergir no assunto e ser orientado sobre a composição da dissertação.
2. Revisão de Literatura: O capítulo traz uma descrição sobre os componentes abordados que são necessários para o entendimento total da dissertação. Assim como busca autores que possuem trabalhos de pesquisa que possam contribuir com o entendimento do estudo.
3. Objetivos do trabalho: Esse capítulo apresenta os objetivos do trabalho.
4. Metodologia: Descreve os passos realizados na construção da pesquisa, os métodos e materiais utilizados, assim como a delimitação da pesquisa.
5. Resultados e Discussão: Nesse capítulo o leitor poderá observar os resultados obtidos em cada objetivo específico da pesquisa e a abordagem de discussão dos resultados em comparação com alguns autores citados na revisão de literatura.
6. Considerações Finais: Nesse capítulo são apresentadas as considerações feitas sobre a pesquisa, e aborda-se sobre trabalhos futuros a serem realizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A origem da piperina e suas propriedades farmacológicas

Extraída pela primeira vez em 1877 e sintetizada em 1882 (RODRIGUES e SILVA, 2010), a piperina é a substância responsável pelo sabor picante da pimenta-do-reino (Figura 1). N-[5(1,3-benzodioxola-4-il-1-oxo-penta-2E,4E-dienil)]piperidina (BUTLER, 2008 apud FERREIRA et al., 2012) é a mais abundante e uma das principais amidas alcalóides que é encontrada na espécie *Piper nigrum* L. popularizada como pimenta-preta ou pimenta-do-reino (BOMTEMPO, 2007; PISSINATEM, 2006 apud CARNEVALLI, 2013). A planta da família *Piperaceae* é do tipo trepadeira, perene, arbustífera, originada no sudoeste da Índia (PISSINATE, 2006 apud CARNEVALLI, 2013) e foi introduzida no Brasil pelo estado da Bahia no século XVII trazida por escravos (EMBRAPA, 2004).

Figura 1 - Grãos de *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino)



Fonte: Elaborado pelos autores, adaptado do site Boa Saúde e Wikipédia, 2020¹

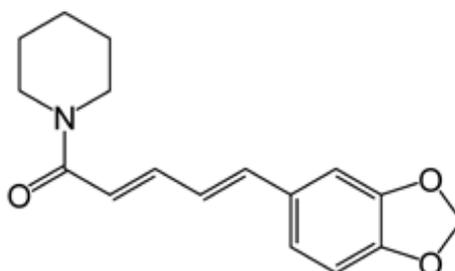
Segundo a Associação dos exportadores, o Brasil está entre os quatro países que mais produzem e exportam pimenta-do-reino, em 2016 foram 45 mil toneladas, dado que difere do IBGE que aponta uma produção de 54 mil toneladas (EMBRAPA, 2017). Os estados do Pará, Espírito Santo e Bahia são, nessa ordem, os maiores produtores no Brasil. Já no cenário mundial, os principais produtores de

¹ Imagem do site Boa Saúde. Disponível em: <https://www.boa-saude.pt/Artigos-e-Dicas/Emagrecimento/A-piperina-emagrece/> Acesso em: Janeiro de 2020.

pimenta-do-reino são: Vietnã, Índia, Indonésia, Brasil, Malásia, Tailândia, Sri Lanka, China, respectivamente (EMBRAPA, 2004).

Sua estrutura molecular (Figura 2) apresenta um grupo amida que são compostos orgânicos nitrogenados que apresentam como principal característica a presença de um grupo carbonila e é alcaloide, pois o nitrogênio está em uma cadeia heterocíclica.

Figura 2 - Estrutura molecular da Piperina



Fonte: wikipedia, 2020.

A estrutura molecular apresentada pela piperina justifica suas características, pois assim como outras amidas alcaloides ela apresenta diversas atividades biológicas, onde destacamos a ação antimicrobiana (REDDY et al, 2004), anti-inflamatória (PRADEEP e KUTTAN, 2004) e aumento na biodisponibilidade de fármacos (OLIVEIRA et al, 2014).

No estudo realizado por Reddy et al. (2004), foram encontrados compostos ativos contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus aureus* (Gram positivas) e *Klebsiella aerogenes* e *Chromobacterium violaceum* (Gram negativa). Estudos tem mostrado que o extrato aquoso do *Piper nigrum* L. é eficiente contra cerca de 176 espécies de 12 gêneros de bactérias na cavidade oral (CHAUDHRY e TARIQ, 2006).

Conforme Pradeep e Kuttan (2004) a piperina em determinadas concentrações inibiu a invasão da matriz de colágeno das células de melanoma. E ainda segundo Mueller, Hobiger & Jungbauer (2010) apud Zarai Z. et al (2013) a pimenta preta estimula a produção de uma citocina anti-inflamatória (IL-10). Wangsheng C et al. (2017) em estudo realizado sobre a atuação da piperina nas respostas

inflamatórias por lipopolissacarídeos em micróglia BV2 concluiu que a piperina é promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

A toxicidade que a substância pode causar aos organismos é uma das características importantes para a avaliação da dosagem do composto. Cardoso et al. (2005) em estudo sobre o efeito tóxico da piperina isolada da pimenta do reino em camundongos (*Mus musculus*) verificaram que a piperina utilizada na dose de 2,0 mg/Kg, via i.p., não apresentou efeitos colaterais, alterações macroscópicas ou microscópicas nos órgãos e tecidos analisados e ausência de toxicidade para fígado e rim.

Ainda sobre toxicidade, Ren e Liang (2018) em estudo sobre a ação anti-inflamatória da piperina, testou os potenciais efeitos citotóxicos nas células ATDC5 e observou que 10, 30 e 50µg/ml de tratamento com piperina não tiveram influência significativa na viabilidade das células ATDC5 de murinos. Quando testados os efeitos imunotoxicológicos da piperina em camundongos *Swiss* macho, os resultados indicaram que, para as doses utilizadas (1,12, 2,25 ou 4,5mg/kg), não obteve-se efeitos tóxicos evidentes e o fígado ganhou peso normalmente (DOGRA et al, 2004). Assim, Gagini et al. (2010) utilizou a dosagem de 1,12mg/kg e administrou via oral em ratos para observar seu efeito contra intoxicação por aflatoxinas e observou que produziu uma queda notável nas lesões hepáticas e inibiu o efeito tóxico da aflatoxina nos glóbulos brancos, ou seja, sugere-se que a piperina é um agente químico potencial contra a toxicidade das aflatoxinas.

Um teste de micronúcleo para avaliar possível efeito genoprotetor da piperina, foi realizado por Selvendiran et al (2005) com camundongos *Swiss*. No estudo eles usaram as concentrações de 25, 50 e 75mg/kg de piperina durante 5 dias consecutivos e todas as doses tiveram efeito eficaz significativo contra a genotoxicidade, inibindo a mutagênese induzida.

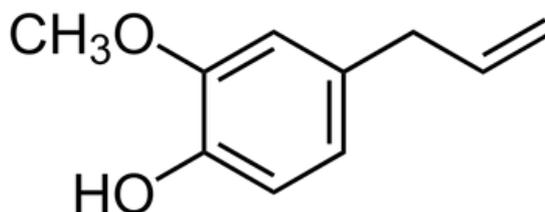
A piperina também apresenta uma importante função biológica que é a de prolongar a ação de certos fármacos no organismo e em uso associado pode potencializar os efeitos. Isso ocorre por inibição do metabolismo em nível hepático, conforme Atal, et al., (1985); Badmaev *et al.*, (1999), citado por Oliveira (2016) e Cardoso (2009), ela inibe diferentes isoformas do citocromo P-450 e outras enzimas envolvidas no metabolismo.

Em um trabalho recente, Guimarães-Stabili et al. (2019), relatam sobre a piperina e seu efeito no reparo tecidual do periodonto. A piperina aumentou, conforme descrito no trabalho, o nível de TGF- β , e o reparo do colágeno, e também diminuiu a celularidade e a ativação do NF- κ B nos tecidos periodontais. Os autores utilizaram ratos e trataram a periodontite induzida por via oral durante 15 dias. Se tratando de inflamação, a piperina possui efeitos consideráveis, além de ser significativo o efeito na proteção da perda óssea alveolar e degradação das fibras de colágeno na periodontite, que podem ser relacionados à sua atividade inibitória nas de IL-1 β , MMP-8 e MMP-13 (DONG, Y.; HUIHUI, Z.; LI, C. 2015).

2.2. Atividade biológica e aplicações do Óxido de Zinco e Eugenol

Alguns requisitos são necessários para que um cimento provisório seja considerado bom, são eles: requisitos biológicos (biocompatibilidade), físicos (resistência mecânica baixa) e fácil manipulação (SOUZA et al. 2000). O cimento formado por Óxido de Zinco e Eugenol atende tais requisitos e por isso é comumente utilizado para fixação provisória em tratamentos de restauração definitiva na odontologia.

O Eugenol é uma substância orgânica que foi sintetizada em 1919 (Figura 3), de odor característico, sendo obtida de diversas fontes naturais, no entanto, o cravo-da-índia é a fonte mais comum de onde ele é extraído. Na medicina asiática o cravo-da-índia é utilizado para tonificar os rins, combater bactérias, fungos, parasitas, micoses e entra nas preparações para dor de dente como analgésico (RODRIGUES e SILVA, 2010).

Figura 3 - Estrutura molecular do Eugenol

Fonte: Adaptado de FCIências, 2020²

Estudo realizado com o eugenol, provou que ele inibe a ação do P2X₃, um receptor de dor que se expressa no gânglio trigêmeo, confirmando o seu efeito analgésico (LI et al. 2008). Um estudo *in vitro* revelou que o eugenol influencia na função macrofágica por prejudicar a capacidade de adesão e modular reações imunes e inflamatórias na polpa dentária e em tecido periapicais (SEGURA, JIMENEZ-RUBIO, 1998 apud MOURA, RABELLO, PEREIRA, 2013).

Sobre os efeitos antibacterianos, estudos revelam que o ZOE tem bons resultados inibitórios sobre o *Streptococcus mutans*, um dos grandes causadores de cáries dentária, indicando que o material tem potencial para prevenção de cáries secundárias (LI et al. 2008 apud MOURA, RABELLO, PEREIRA, 2013). É possível que o eugenol apresente propriedade antibacteriana pela inibição da síntese de enzimas extracelulares e ruptura da estrutura da parede celular dos microrganismos que tiver contato (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012), assim sendo a célula perderá íons e outros componentes intracelulares, especialmente as proteínas, resultando em morte celular.

Beraldo et al. (2013) observou que, óleos essenciais como o eugenol podem ser aplicados como princípio ativo de sanitizantes para inibição microbiana em baixas concentrações. Esse estudo reforça a indicação que o eugenol em menores concentrações já apresenta resultados positivos contra microrganismos em geral, tendo inclusive várias aplicações industriais, o que pode ser um argumento favorável para o estudo aqui descrito. No entanto, o uso do eugenol na odontologia vem

² Imagem retirada de uma matéria do site FCIências. Disponível em: <https://www.fcencias.com/2014/02/06/eugenol-molecula-da-semana/> Acesso: Janeiro de 2020.

diminuindo porque estudos indicaram que sua aplicação em altas concentrações pode causar necrose pulpar (REIS e LOGUERCIO, 2007).

Um estudo de revisão realizado por Moura *et al.* (2013) concluiu que não existe um consenso sobre a influência do eugenol nos procedimentos curativos, porém outros fatores como o preparo eficiente da superfície antes do procedimento adesivo, o tempo entre o contato com esse composto e o momento de realizar a restauração definitiva são mais possíveis de influenciar nos efeitos adversos do adesivo.

Na continuação da explanação sobre os componentes do ZOE, temos o óxido de zinco que é um composto inorgânico com características semicondutoras. Sua fórmula química estável é ZnO, se apresenta como um pó branco, insolúvel em água e em álcoois, porém é solúvel em soluções ácidas (SÁNCHEZ, 2013). É encontrado na natureza na forma do mineral avermelhado zincita (GUIMARÃES, 2013).

Nogueira et al (2017) realizou um estudo com nanopartículas de óxido de zinco e comprovou que este tem ação eficiência antibacteriana contra a bactéria *Escherichia coli* na concentração a partir de 50mg.L⁻¹. O ZOE também é considerado um material de base adequado para restaurações de resina composta (HE; PURTON e SWAIN, 2010).

Streptococcus mutans é a principal espécie cariogênica, conforme Freitas et al (2008), e assim é importante o estudo da atividade dos materiais odontológicos contra esta espécie. Amostras de onze tipos diferentes de materiais restauradores, cimentadores e de revestimento foram analisadas inicialmente e 24h após a presa do material. O IRM[®] que é a base de óxido de zinco e eugenol formou halo inicialmente, porém não manteve a atividade após 24h da presa do material (FREITAS *et al.* 2008).

A aplicação do ZOE ocorre com a mistura das partes constituintes no momento da aplicação. O composto deve ser manipulado seguindo as instruções do fabricante, pois cada marca apresenta pequenos detalhes específicos. Sendo que o composto estará apto para ser aplicado na cavidade dental preparada pelo dentista logo após sua manipulação. Depois de aplicada na cavidade dental, o composto reage e se solidifica.

No prosseguimento da imersão no tema pesquisado, foi necessário realizar a bibliometria e a prospecção do composto estudado para que fosse obtido um entendimento mais profundo do tema.

2.3. Análise de indicadores bibliométricos

A bibliometria é um procedimento importante para a determinação e visualização de indicadores das publicações científicas em uma determinada área, sua origem vem da Ciências da Informação (SPLITTER; ROSA; BORBA, 2012).

Alan Pritchard em 1969 publicou um artigo onde utilizou o termo Bibliometria como sendo a área de estudo que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para obter e quantificar os processos de comunicação escritos (PAO, 1989 apud MEDEIROS et al., 2015). Mesmo tendo tomado para si a autoria do termo, Pritchard não é o autor dessa nomenclatura, pois a mesma já tinha sido usada a mais de três décadas por Paul Otlet (MOMESSO; NORONHA, 2017). Rousseau (2014, p.218) exige que a autoria da Bibliometria seja reconhecida à Otlet, o autor afirma que:

[...] o bibliotecário belga Paul Otlet cunhou pela primeira vez o termo “bibliometria”. Em seu livro *Traité de Documentation* (1934), ele inovou a fundação de um novo campo, *bibliométrie*, que definiu como a medição de todos os aspectos relacionados com a publicação e leitura de livros e documentos (traduzido por MOMESSO; NORONHA, 2017).

Ele observou que a matemática estava tornando-se cada vez mais importante na maioria dos campos científicos, além da biologia e da sociologia, e sentiu que também deveria ser incluída na Biblioteconomia. Ele sugeriu que fosse registrada a frequência com que um livro ou determinado autor é lido.

O processo de mensuração pode abranger dimensões como: número de autores, de artigos, citações, coautorias, número de revistas, de temas, frequência de cooperação de grupos, instituições ou até países, seguindo as leis da bibliometria (SOARES, PICOLLI & CASAGRANDE, 2018). As leis da bibliometria, contribuem para nortear o assunto a ser trabalhado, são elas:

- Lei de Lotka: estudo acerca da produtividade dos cientistas (GUEDES, 2012; RUSSO, 2017).
- Lei de Bradford: está relacionada à ordem de distribuição dos periódicos, sendo que estes devem estar organizados de forma enumerada (JUNIO, et al., 2014; RUSSO, 2017)
- Lei de Zipf: está relacionado à frequência do vocabulário de textos sobre um tema específico (OKUBO, 1997; SPLITTER, ROSA E BORBA, 2012).

Os estudos bibliométricos são desenvolvidos com informações extraídas de bases de dados como *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo*, *Science Direct*, Google Acadêmico, entre outros. Nesse estudo foi escolhida a base de dados da *Scopus*, por se tratar de uma referência internacional em pesquisa científica.

2.4. Prospecção tecnológica: definição e objetivos

Os estudos prospectivos somam valores às informações do presente e as transformam em conhecimento que subsidiará a construção de estratégias para futuras tomada de decisão (SANTOS *et al.* 2004).

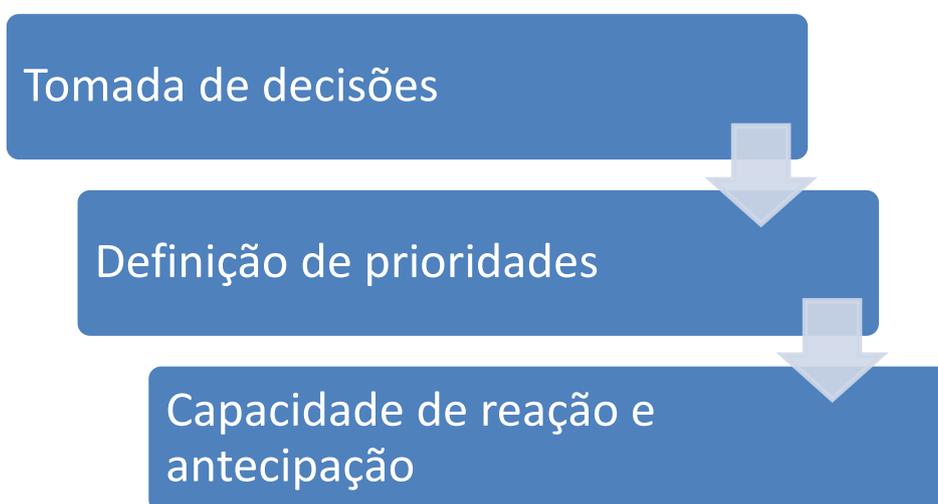
Conforme Kupfer e Tigre (2004, p.1), a prospecção tecnológica define-se como:

“um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo. Diferentemente das atividades de previsão clássica, que se dedicam a antecipar um futuro suposto como único, os exercícios de prospecção são construídos a partir da premissa de que são vários os futuros possíveis. Esses são tipicamente os casos em que as ações presentes alteram o futuro, como ocorre com a inovação tecnológica.”

Assim sendo, os exercícios de prospecção preparam os atores na indústria para aproveitar ou enfrentar oportunidades ou ameaças futuras, na construção de um futuro desejável. “É uma tentativa de predizer possíveis estados futuros da invenção, inovação, adoção e uso de determinada tecnologia” (TEIXEIRA, 2013).

Segundo Tigre (2006), o estudo de prospecção tecnológica deve envolver esforços sistemáticos com o objetivo de avaliar o conjunto dos fatores e dos atores envolvidos no processo de inovação, assim como a relação entre eles, para antecipar e entender suas potencialidades, progressões, características e consequências tecnológicas. É uma atividade de muitos critérios que estará sempre sujeita a incertezas e subjetividade, necessitando sempre de uma análise *ex post* (TEIXEIRA, 2013). Os principais objetivos da Prospecção Tecnológica estão sintetizados na Figura 4.

Figura 4 - Objetivos da Prospecção Tecnológica.



Fonte: Adaptado de Zackiewicz e Salles-filho (2001); Cardoso *et al.* (2005).

Em suma, o interesse pela piperina é crescente e baseando-se no exposto na construção do texto até o momento, apresenta-se no próximo capítulo os objetivos do trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a influência da Piperina na ação antimicrobiana do composto Óxido de zinco-Eugenol (ZOE).

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Efetuar a revisão bibliométrica sobre Piperina e Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE);
- ✓ Realizar a prospecção tecnológica sobre Piperina e Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE);
- ✓ Testar a atividade antimicrobiana do ZOE;
- ✓ Desenvolver uma formulação composta por Piperina e Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE);
- ✓ Analisar a atividade antimicrobiana da Piperina a 4, 5, 10 e 20% de concentração na composição com o Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE).

4. METODOLOGIA

4.1 Delimitação do estudo

O estudo foi desenvolvido durante a realização do curso de mestrado do Programa de Pós-graduação Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará – UECE. A formulação foi definida durante o estágio obrigatório e os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Piauí – UESPI, Campus Pirajá. Para avaliar a potencialização ou não da ação antimicrobiana da piperina na composição do óxido de zinco-eugenol, realizou-se o Teste de Difusão em Ágar com perfuração de Poços. Enquanto que a Revisão Bibliométrica foi feita utilizando dados obtidos na plataforma *Scopus* e a Prospecção Tecnológica usou as bases de patentes European Patent Office (Espacenet), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) como fonte para aquisição de dados.

4.2 Revisão bibliométrica

Na construção dessa etapa da pesquisa, utilizou-se a plataforma *Scopus* como base de dados para coletar e analisar as informações relativas ao tema abordado. A *Scopus* é uma base de dados bibliográfica que possui funcionalidades que auxiliam na coleta e processamento de dados científicos, com um largo espectro de abrangência que é devido ao seu banco de dados extenso.

Etapas da pesquisa:

1º Seleção da plataforma utilizada para a coleta dos dados.

2º Escolha dos termos para a pesquisa.

3º Coleta e análise dos dados encontrados para gerar informações para a pesquisa.

Os termos pesquisados foram: ZnO, ZOE, *Zinc Oxide*, Eugenol, óxido de zinco, piperina e *piperine*. Para melhorar o refinamento da pesquisa, utilizou-se da lógica Booleana para inserir os termos. Seguindo essa lógica, inserimos no campo de busca o seguinte texto:

- (ZnO or ZOE) and ("zinc oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol") para buscar trabalhos sobre óxido de zinco, eugenol e suas combinações, incluindo as abreviações ao qual são conhecidas.
- (((ZnO OR ZOE) AND ("zinc oxide-eugenol" OR "Zinc Oxide and Eugenol")) AND piperine) para buscar patentes com a adição de piperina no composto ZOE.

Por conseguinte, foi pesquisado pelos termos: *piperine* e *piperine and eugenol*, para buscar patentes com o uso da piperina e da piperina com eugenol. Todas as pesquisas foram feitas buscando os termos no título(*title*), no resumo (*abstract*), e nas palavras-chave (Keywords).

Nas bases da *Scopus*, além dos termos em inglês, inserimos os termos em português: “ÓXIDO DE ZINCO’ EUGENOL PIPERINA” na primeira busca e “ÓXIDO DE ZINCO’ EUGENOL” em uma segunda busca. A ferramenta adiciona o conector AND automaticamente quando o usuário não o faz.

4.3 Prospecção tecnológica

Para realizar a prospecção tecnológica buscou-se nas bases de patentes da European Patent Office (Espacenet), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) os termos através de busca avançada. Em seguida foram analisados os resultados e criados gráficos e tabelas com os dados encontrados.

Nas bases do Espacenet e USPTO, os termos utilizados para a pesquisa foram: ZnO, ZOE, *Zinc Oxide*, Eugenol, óxido de zinco, piperina e *piperine*. As bases utilizadas dão a alternativa de pesquisas booleanas com uso de conectores lógicos. Nos campos de buscas foram inseridos os seguintes termos: (ZnO or ZOE) and ("zinc

oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol") para buscar as patentes que contivessem o composto Óxido de Zinco e eugenol sem a piperina. Após essa busca, foi inserido os termos: (((ZnO OR ZOE) AND ("zinc oxide-eugenol" OR "Zinc Oxide and Eugenol"))) AND piperine) para buscar patentes com a adição de piperina no composto ZOE.

Por conseguinte, foi pesquisado pelos termos: *piperine* e *piperine and eugenol*, para buscar patentes com o uso da piperina e da piperina com eugenol. Todas as pesquisas foram feitas buscando os termos no título(*title*) e no resumo (*abstract*).

Nas bases do INPI foram pesquisadas as seguintes palavras: ‘ÓXIDO DE ZINCO EUGENOL PIPERINA’ na primeira busca e “ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL” em uma segunda busca, os termos foram buscados no Resumo e contendo todas as palavras.

Excluiu-se os dados de patentes duplicados. Com a utilização do aplicativo Excel, após coletas de dados, foi possível filtrar as patentes por ano de publicação, país de origem e classificação internacional de patentes.

4.4 Manipulação para produção do ZOE/PIP

As manipulações necessárias para produzir a formulação ZOE/PIP a partir do óxido de zinco, eugenol e piperina foram realizadas durante o Estágio Obrigatório do Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (MPBiotec), na sede da Farmácia de manipulação Med Pharma em Floriano – PI. A Piperina foi misturada ao ZOE em diferentes proporções: 4, 5, 10 e 20% denominadas P1, P2, P3 e P4, respectivamente. A formulação foi definida tomando por base as proporções utilizadas para o preparo na rotina de atendimento em consultório odontológico.

Em geral o kit de cimento a base de óxido de zinco e eugenol acompanha uma colher dosadora para medida do pó (ZnO) e o eugenol vem em frasco com contagotas. Tomando por base a proporção da massa em porcentagem dos componentes, ZnO (57,15%) e eugenol (42,85%), (que é utilizado para um dente), calculou-se os

valores em porcentagem para cada item. Na Tabela 1 estão os valores em porcentagem das formulação utilizadas nesse estudo.

Tabela 1 – Valores utilizados nas formulações do ZOE (amostra sem piperina) e ZOE/PIP (P1, P2, P3 e P4 com 4, 5, 10 e 20% de PIP, respectivamente).

Formulação	Porcentagem na mistura (%)		
	ZnO	Eugenol	Piperina
ZOE	57,15	42,85	-
P1	54,87	41,13	4
P2	54,28	40,72	5
P3	51,43	38,57	10
P4	45,72	34,28	20

Fonte: dados da pesquisa (2019)

Com os valores das proporções de cada item, calculou-se a massa necessária para o preparo de 20 mg de cada amostra a ser analisada (ZOE, P1, P2, P3 e P4), respectivamente.

Durante o preparo utilizou-se balança analítica, espátulas, vidro de relógio, placas de Petri, capela de fluxo laminar. Todo material utilizado foi devidamente esterilizado e preparando em ambiente asséptico, conforme preconiza as boas práticas de fabricação, para evitar possíveis contaminações das matérias-primas.

Para esse estudo utilizou-se matéria prima P.A sendo o óxido de zinco da Dinâmica® Química contemporânea Ltda., o eugenol da Sigma-Aldrich® com pureza de 99% de pureza e a piperina da Sigma -Aldrich® com pureza de 97%.

4.5 Análise da atividade antimicrobiana

As análises microbiológicas foram realizadas no LABMICRO – Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Piauí – UESPI – Campus Pirajá. Os

compostos formados (ZOE e PIP/ZOE) foram avaliados quanto as suas atividades antimicrobiana. As cepas utilizadas são todas de referência e foram cedidas pela Fiocruz para o LABMICRO, são elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Candida albicans* ATCC 10231. O método utilizado no teste de atividade microbiana está descrito a seguir.

4.5.1 Método de difusão com perfuração em ágar

Em placas de Petri, foi vertido o meio de cultura ágar TSA preparado conforme indicações do fabricante. Após solidificado o meio realizou-se a técnica de perfuração com o uso de um perfurador em cilindro de inox devidamente esterilizado medindo 5 mm de diâmetro para formação de poços onde, posteriormente, depositou-se o composto a ser analisado.

Utilizou-se alíquotas de 20 µL da solução de ZOE/PIP ou ZOE. Os poços foram cobertos por 8 mL de meio de cultura semi-sólido (TSB com 0,8% de agar-agar) com 100 µL da bactéria na concentração 10^8 UFC/mL, padrão de McFarland a 0,5. O sistema foi incubado por 24-48 h em $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ para cepas bacterianas e $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ para a levedura. Como controle positivo utilizou-se o meio de cultura sem a presença do agente antimicrobiano. Não foi realizado controle negativo visto que não existe consenso na literatura quanto ao material ideal para obturação de canais de dentes decíduos (Smaïl-Faugeron et al., 2014). Utilizou-se o ZOE sem adição de piperina para ser o parâmetro comparativo da atividade antimicrobiana influenciada pela adição da piperina na composição. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados como média dos três valores obtidos.

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi considerada aquela concentração do composto capaz de desenvolver halo de inibição do crescimento microbiano maior ou igual a 10 mm de diâmetro. Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram mensurados com paquímetro digital e calculou-se a média dos diâmetros formados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

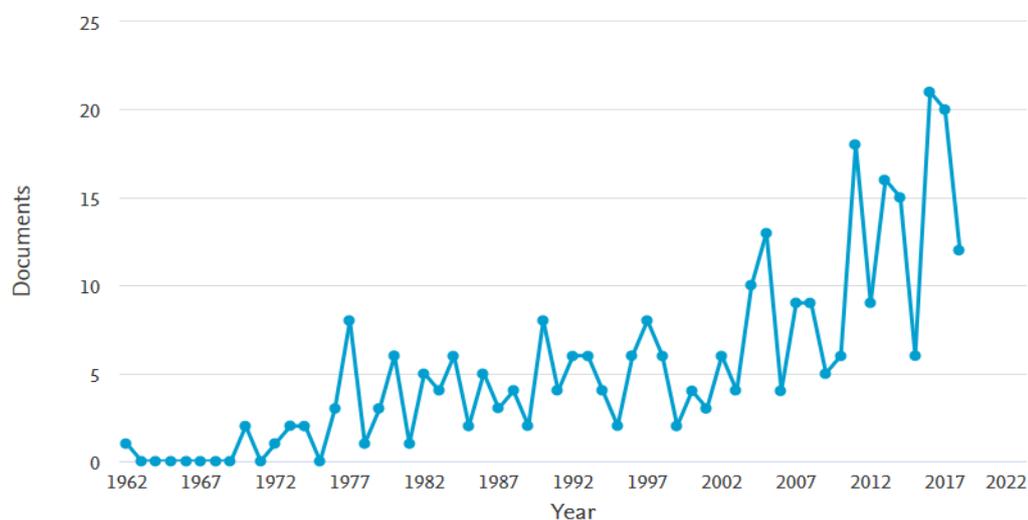
5.1. Levantamento Bibliométrico

Um recorte dos resultados a seguir, referentes ao levantamento bibliométrico, foram publicados nos anais do 10º Simpósio Internacional de Tecnologia e Inovação (ISTI –10th International Symposium on Technological Innovation, ISSN:2318-3403). O artigo original (D.O.I.: 10.7198/S2318-3403201900010922), com o título: “COMPOSTO ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL COM PIPERINA NO USO FARMACOLÓGICO NA ODONTOLOGIA: ESTUDO BIBLIOMÉTRICO”, pode ser encontrado no endereço: <http://www.api.org.br/conferences/index.php/ISTI2019/ISTI2019/paper/view/922/549/>.

As publicações relativas à pesquisa realizada utilizando os termos (ZnO or ZOE) and ("zinc oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol") para buscar trabalhos sobre óxido de zinco, eugenol e suas combinações indicam que em 1969 houve uma publicação com os termos da busca, iniciando uma série de publicações sobre o tema. Entre os anos 1963 a 1969, e em 1971 e 1975, houve um lapso temporal nas publicações. Contabilizou-se um total de 303 documentos, sendo 44 com acesso aberto ao conteúdo da publicação na íntegra e restante com acesso restrito.

Fora esse período sem publicações que foi citado, após 1962, foram encontradas publicações frequentes, incluindo o ano de 2018, conforme pode-se observar na Figura 5.

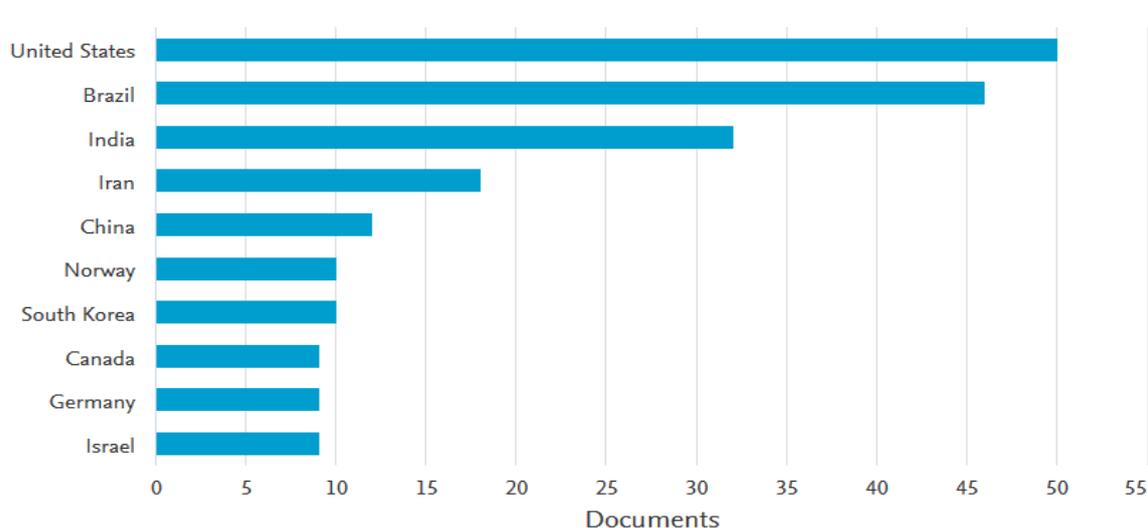
Figura 5 - Publicações por ano utilizando os termos (ZnO or ZOE) and ("zinc oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol")



Fonte: Scopus, 2019

O Brasil aparece como segundo que mais publicou trabalhos relacionados com os termos pesquisados. Com uma diferença pequena em relação ao Estados Unidos da América que ficou em primeiro em número de publicações, conforme exposto na Figura 6.

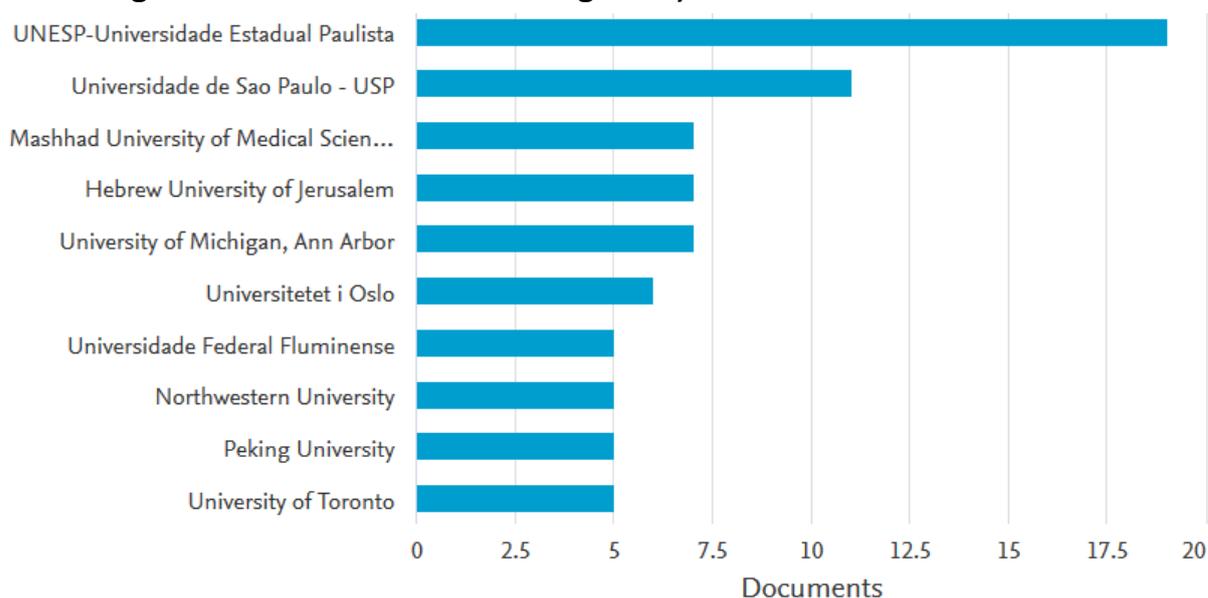
Figura 6 - Publicações por País, relacionadas aos termos pesquisados (ZnO or ZOE) and ("zinc oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol").



Fonte: Scopus, 2019

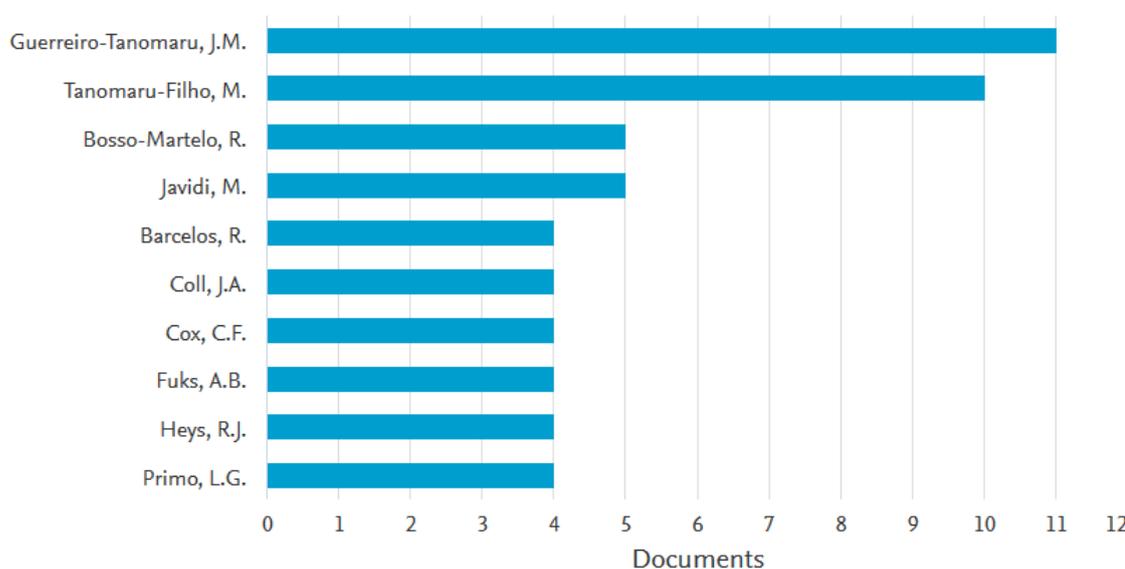
Pode-se observar que no Brasil, as pesquisas com essa temática possuem um interesse evidente, pois as instituições que mais publicaram foram as brasileiras, superando as publicações de instituições de países como os Estados Unidos. Os resultados são ilustrados na Figura 7.

Figura 7 - Publicações por Universidades com os termos (ZnO or ZOE) and ("zinc oxide-eugenol" or "Zinc Oxide and Eugenol")



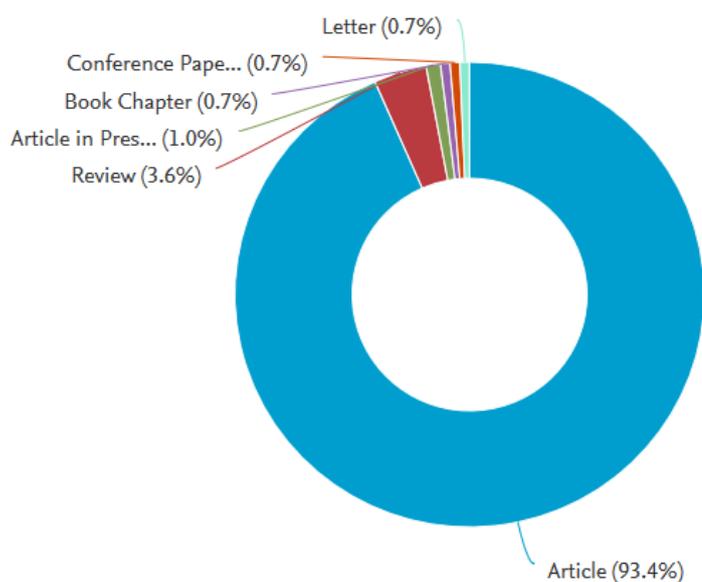
Fonte: Scopus, 2019

A figura 8 ilustra os documentos por autores, relacionando os nomes dos autores que possuem interesse na temática da pesquisa.

Figura 8 - Autores que mais publicam sobre o Óxido de zinco e/ou eugenol

Fonte: Scopus, 2019

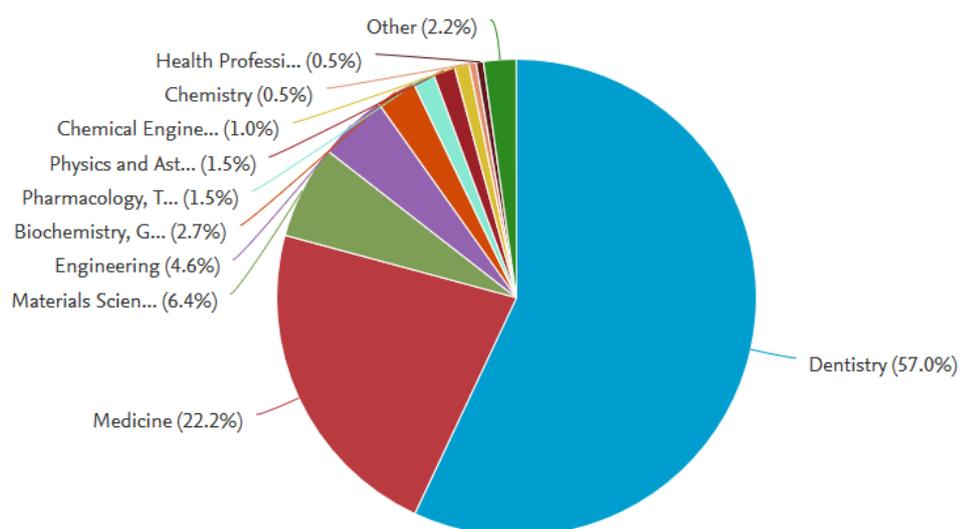
A figura 9 mostra os tipos de documentos encontrados na Scopus sobre ZnO, ZOE e suas variantes. Nota-se que os documentos em sua maioria (93,4%) são artigos.

Figura 9 - Tipos de documentos sobre ZnO, ZOE e variantes.

Fonte: Scopus, 2019

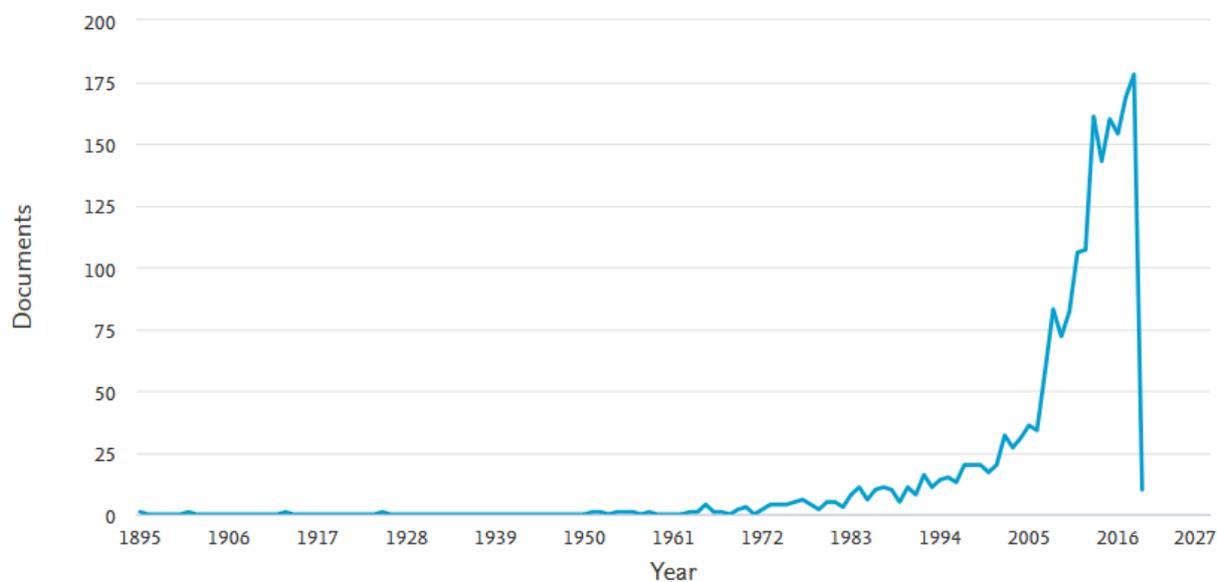
Na figura 10 observa-se que as áreas de Odontologia e Medicina são as que aparecem com maior frequência nas publicações, sendo Odontologia responsável por 57% dos documentos.

Figura 10 - Documentos por área de assunto sobre ZnO, ZOE e variantes.



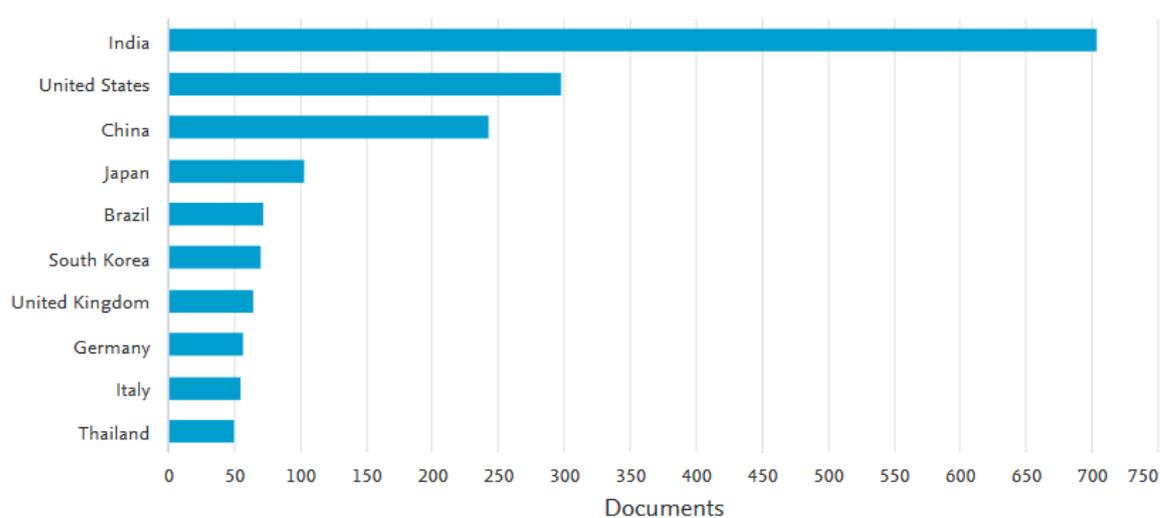
Fonte: Scopus, 2019

Nas buscas pelo termo *Piperine*, foram encontrados 1956 publicações. Cerca de 81% possuem acesso restrito. A figura 11 traz as publicações por ano.

Figura 11 - Publicações por ano utilizando o tema *Piperine*.

Fonte: Scopus, 2019

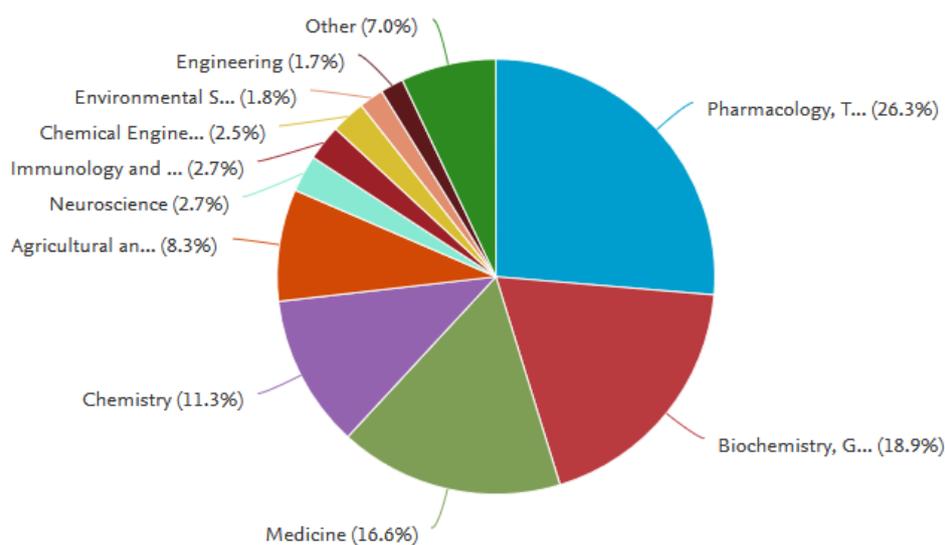
As publicações sobre *Piperine* por país estão descritas na figura 12. A Índia possui a maioria das publicações, seguida pelos Estados Unidos da América. No entanto, a Índia explora a piperina para publicações com enorme vantagem.

Figura 12 - Publicações por País sobre *Piperine*.

Fonte: Scopus, 2019

As áreas de exploração das publicações estão descritas na figura 13. Farmacologia, Bioquímica e Medicina são as áreas que juntas, possuem a maior quantidade de publicações, cerca de 61,8%.

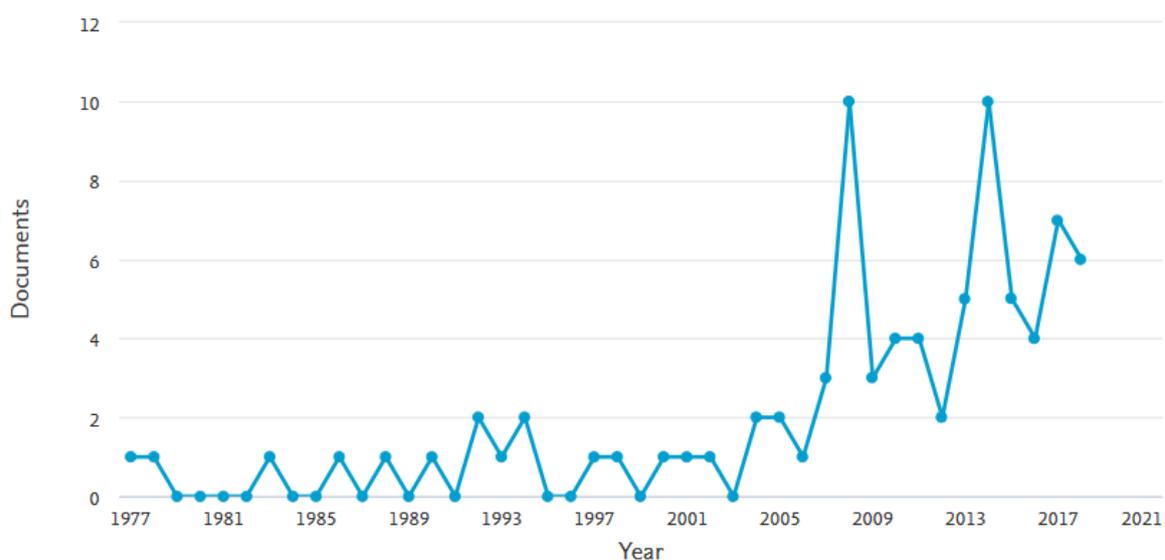
Figura 13 - Áreas de exploração das publicações com o termo *Piperine*.



Fonte: Scopus, 2019

Nas buscas por *Piperine* com Eugenol, foram encontrados 84 documentos. O período das publicações abrangem o ano de 1977 até 2018.

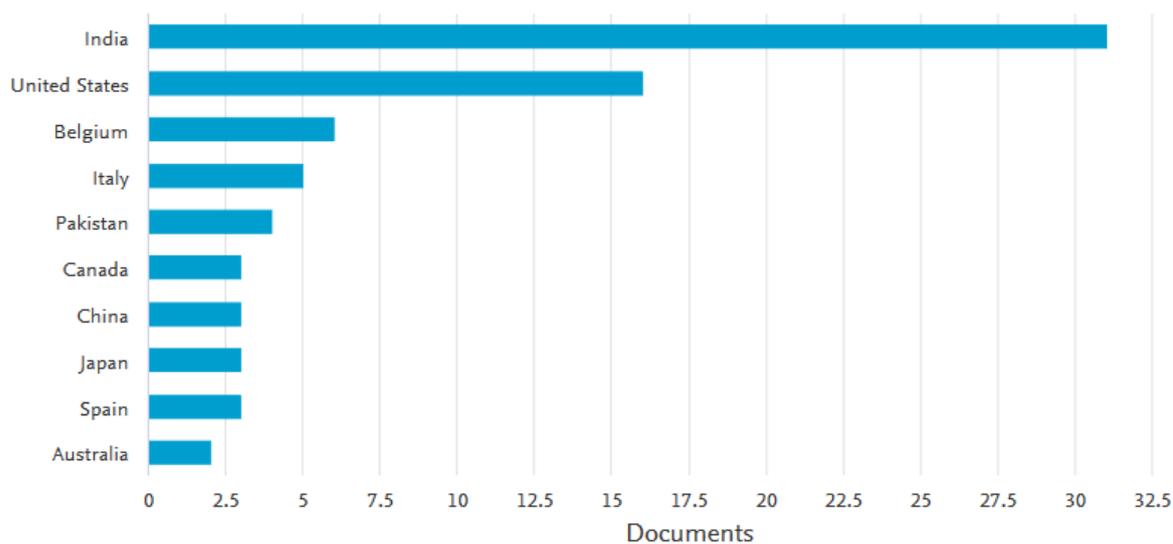
Figura 14 - Publicações por ano com os termos *Piperine* com *Eugenol*.



Fonte: Scopus, 2019

As publicações por países estão descritas na figura 15. A Índia e os Estados Unidos da América lideram as publicações com piperina e eugenol, embora a Índia permaneça com a vantagem ampla.

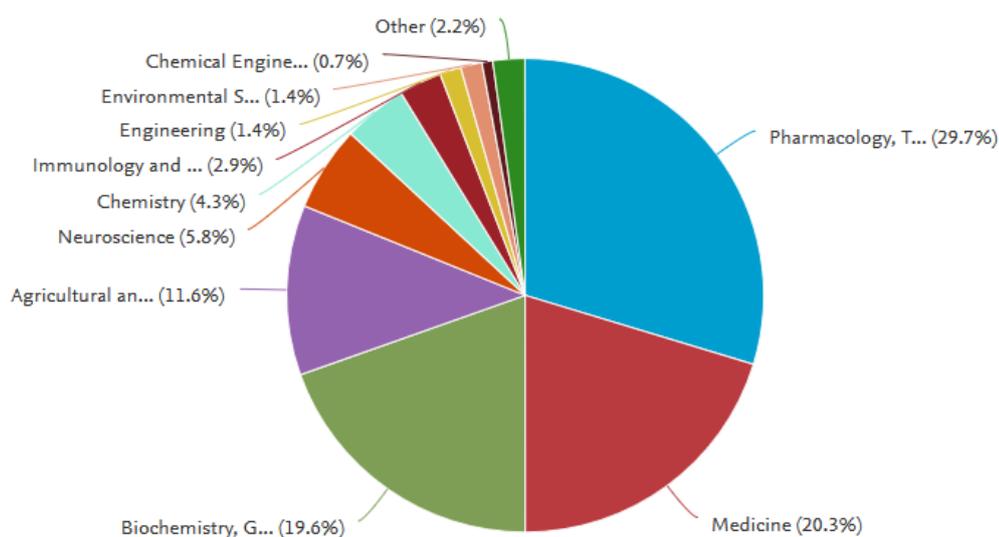
Figura 15 - Publicações por País sobre piperina e eugenol.



Fonte: Scopus, 2019

As publicações nas áreas de farmacologia, bioquímica e medicina, somando-se, resultam em 69,6% dos documentos encontrados na pesquisa, conforme pode ser observado na figura 16.

Figura 16 - Áreas de publicações com o termo *piperine* e eugenol.



Fonte: Scopus, 2019

Na busca bibliométrica não encontrou-se resultados sobre a ZOE com adição da piperina. Também não foram encontradas patentes que utilizem a piperina na composição com o Óxido de Zinco e eugenol. Isso mostra que embora reconhecidos os aspectos curativos das substâncias, o tema da pesquisa ainda é um campo pouco explorado, resultando na possibilidade de criação de um produto relativamente novo no mercado.

Os documentos disponibilizados na plataforma *Scopus*, na busca em sua maioria, possuem acesso restrito, em alguns casos, possibilitando apenas a leitura do resumo do trabalho. Em sua minoria, os artigos possuem acesso aberto ao usuário para consulta e leitura na íntegra. As pesquisas envolvendo ZOE, eugenol e piperina, em quaisquer circunstâncias, envolvem as áreas da farmacologia, medicina e bioquímica em sua maioria. Na busca bibliométrica, os resultados sobre ZOE foram abundantes, como era o esperado, porém não encontramos resultados sobre a ZOE

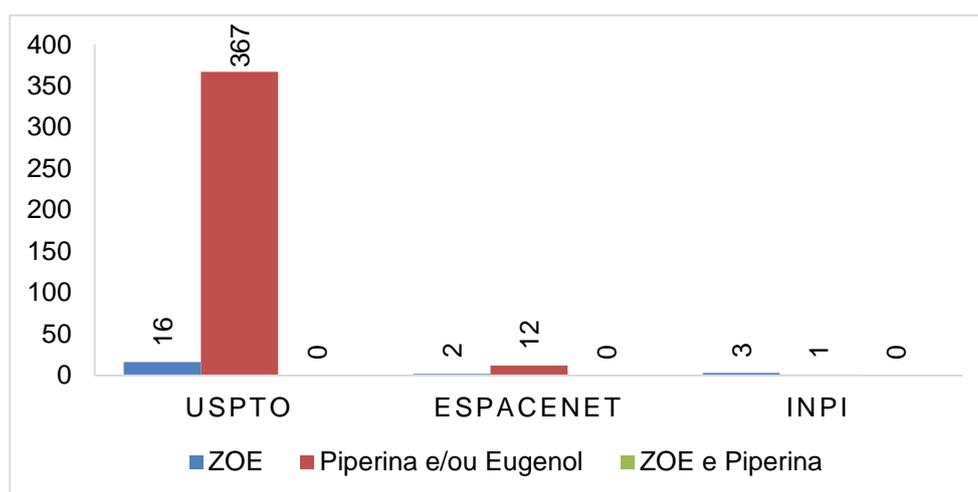
com adição da piperina. A piperina foi relacionada, em nossos resultados, ao uso farmacológico.

5.2 Prospecção tecnológica

Os resultados referentes à prospecção tecnológica, geraram um artigo (Anexo B) que foi submetido, aceito e publicado no periódico Cadernos de Prospecção, ISSN:1983-1358 (impresso) / ISSN: 2317-0026 (on-line), Qualis B3 no quesito Interdisciplinar, com publicação em março de 2020.

Na Figura 17 está condensada o resultado encontrado nos escritórios de patentes pesquisados para os termos de interesse que estão relacionados na metodologia para a Prospecção tecnológica.

Figura 17 - Quantidade de patentes depositadas nos escritórios de patentes USPTO, ESPACENET e INPI sobre óxido de zinco-eugenol, Piperina e/ou eugenol e sobre o ZOE com adição de piperina.



Fonte: Elaborado pelos autores com dados da pesquisa (2019).

Quando os termos buscados foram sobre o composto de óxido de zinco e eugenol, obtivemos o retorno de 16 patentes depositadas no Escritório de Patentes e

Marcas do Estados Unidos (USPTO) publicadas a partir do ano de 1981, chegando o ano de 2014, enquanto que no Escritório Europeu de Patentes (ESPACENET) foram encontradas apenas 2 patentes, sendo uma da Alemanha depositada de 1992 e a outra da China de 2018 e no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) 3 patentes, ambas com classificação para preparações com finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas e/ou odontologia; aparelhos ou métodos para higiene oral ou higiene dental (A61K-A61C, conforme Classificação Internacional – IPC).

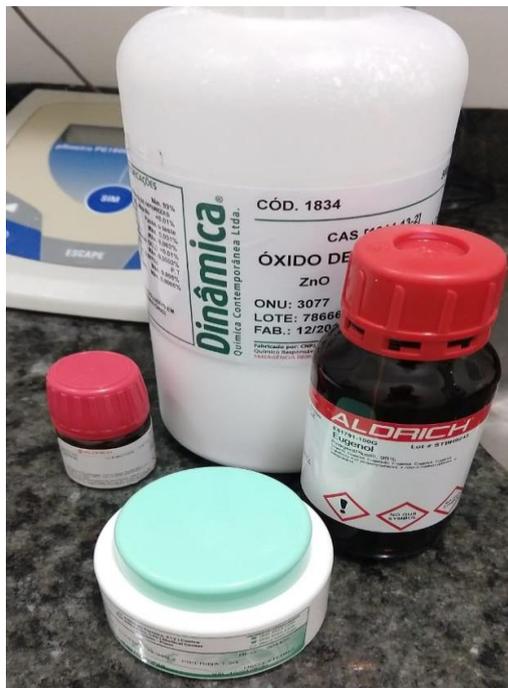
Quando os termos pesquisados relacionam “eugenol e piperina” estes são descritos como produtos antibacterianos com utilizações diversas e descrevem as substâncias como botânicas, visto que são derivadas de plantas. Algumas dessas patentes possuem a descrição de fungicidas o que ressalta o uso no controle biológico que também é evidente na literatura. Esse interesse vai ao encontro do relatado por Reddy *et al.* (2004) sobre a ação antimicrobiana; e por Pradeep e Kuttan (2004) sobre ação anti-inflamatória e aumento na biodisponibilidade de fármacos relatado por Oliveira, Alencar-Filho e Vasconcelos (2014).

Em nenhum dos escritórios de patentes, até o momento da pesquisa (2019), existe depósito com a composição de óxido de zinco-eugenol e piperina. A prospecção foi relevante como etapa inicial de novas pesquisas, dando um amplo espectro para prosseguimento de estudos relacionados.

5.3 Formulação

Na condução da pesquisa, houve a criação de uma formulação que pudesse ser aplicado nos testes *in vitro* (Figura 18). As formulações criadas foram submetidas a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* contra as diferentes cepas de microrganismos (citadas na metodologia da atividade antimicrobiana).

Figura 18 – Componentes da formulação elaborada no estudo.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2020.

Observou-se inicialmente que a composição apresentou um aspecto homogêneo na mistura e que, em até 24h horas, a formulação elaborada apresentou a solidificação que é necessária para a sua função como cimento dentário, assim como o produto já conhecido no mercado (ZOE). Com isso, criou-se uma pasta para observar a reação do produto e se ele teria alteração na sua solidificação. Após confirmação de eficiente solidificação, seguiu-se com os testes *in vitro*. A formulação foi colocado em análise *in vitro* antes da sua solidificação, ou seja, logo após o preparo (Figura 19).

Figura 19 - Manipulação da formulação a base de piperina, óxido de zinco e eugenol.



Fonte: Elaborado pelos autores com dados da pesquisa (2020).

A manipulação da fórmula foi realizada dentro dos padrões de controle de higiene para assegurar a qualidade e eficácia do produto final (Figura 20). A matéria-prima utilizada foi adquirida em lojas de venda de produtos químicos, sendo o óxido de zinco P.A (marca Dinâmica), eugenol P.A (Sigma Aldrich) e a piperina P.A (Sigma Aldrich). As substâncias utilizadas apresentam grau de pureza de 95 a 99%.

Figura 20 - Formulação embalada para observação de solidificação



Fonte: Elaborado pelos autores com dados da pesquisa (2020).

5.4 Ação antimicrobiana

Conforme Silveira et al., (2009), o método de ágar difusão em poços se baseia na difusão radial das substâncias, e a presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada é muito menos provável de interferir com a difusão da substância antimicrobiana no ágar que no disco de papel de filtro. Em conclusão do estudo comparativo das duas técnicas de ágar difusão (poços e disco) aplicada a extratos de plantas, Silveira et al., (2009) observou que a técnica de ágar difusão em poço mostrou-se mais sensível que a técnica ágar difusão em disco, embora ambos tenham se mostrado úteis para esta finalidade. Baseando-se nesses resultados da técnica de ágar difusão em poços, foi a técnica escolhida para ser aplicada no estudo

O método de difusão é do tipo quantitativo, em que o efeito pode ser graduado e fundamenta-se na difusão da substância a ser testada em um meio de cultura sólido e inoculado com um tipo de microrganismo; este que foi escolhido como técnica para alcançar a análise microbiológica. Com a difusão aparece um halo, no qual não existe o crescimento do microrganismo, portanto denomina-se halo de inibição. Nesse ensaio podem ser utilizados diferentes tipos de reservatórios: discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991).

A atividade antimicrobiana da formulação ZOE/PIP foi avaliada contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas para a determinação dos valores de Crescimento Inibitório Mínimo (CIM). A formulação, analisada em diferentes concentrações, apresentou variação nos graus de atividade antimicrobiana contra a maioria das cepas testadas. Vale ressaltar que, dentre estas, algumas das espécies de microrganismos testadas são comumente encontradas na cavidade oral dos seres humanos, por exemplo *S. mutans*, *Cândida Albicans* e *E. Coli*.

Alguns autores discutem a importância do ZOE (puro) na ação antimicrobiana. Um estudo de levantamento bibliográfico realizado por Moura, Rabello e Pereira (2013) sobre a influência do eugenol nos procedimentos adesivos, revelou também que o eugenol compõe com o óxido de zinco os conhecidos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE) que são amplamente utilizados devido seus

Tabela 2 – Medida (em mm) dos halos de inibição de crescimento microbiano de formulações com Piperina 4, 5, 10 e 20% em ZOE contra cepas da cavidade oral.

(Conclusão)

Cepas	Concentrações	<i>Cândida albicans</i>			<i>Enterococcus</i>			<i>P. Aeruginosa</i>			<i>E.coli</i>			<i>S.mutans</i>			<i>S.aureus</i>		
		ZOE e 10% de piperina	14,8	14,5	13	11,4	11,5	11,3	14	13,4	14	14,7	19,6	18	10,2	11,5	9,9	14,6	15,5
ZOE e 20% de piperina	12,3	12,3	12,6	11,6	10,5	11,1	12,3	12,7	11,7	13,6	12,7	12,3	10,6	10,5	10,1	11,1	13	12,9	

Fonte: dados da pesquisa (2020)

A Tabela 3 apresenta os resultados do teste feito com óxido de zinco e eugenol puro na presença das cepas *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Enterococcus*. Vale ressaltar que a matéria-prima utilizada é P.A., tendo em vista que as marcas que comercializam os cimentos a base de ZOE acrescentam aditivos na composição e aqui objetivou-se avaliar os princípios ativos das principais matérias-primas da composição.

Tabela 3 - Medida dos halos de inibição (mm) de crescimento microbiano do ZOE (puro) feito em triplicata contra cepas microbianas da cavidade oral.

CEPAS	Medidas			Média
	1	2	3	
<i>S. aureus</i>	16	15,1	15,4	15,5
<i>S. mutans</i>	10,1	9,2	9,2	9,5
<i>E. coli</i>	14,8	15,8	15,8	15,5
<i>P. aeruginosa</i>	14,2	14,9	16,2	15,1
<i>Enterococcus</i>	12,7	11,5	11,6	11,9
<i>Cândida albicans</i>	15	14,8	15,3	15,0

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Nos testes realizados com o ZOE sem adição da piperina pode-se perceber que a bactéria *S. mutans* foi resistente à ação do ZOE, tendo em vista o tamanho da média dos halos formados (9,5mm). Comparando-se os resultados do ZOE (puro): *S. aureus* de 15,5mm; *E. coli* 15,5mm; *P. aeruginosa* 15,1mm e *Enterococcus* 11,9 mm, com os dados já publicados, Vágula *et al.* (2010) verificou que o ZOE apresentou halo de inibição contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) sendo de 8 a 24,5 mm a média dos halos formados, onde o maior foi contra a bactéria *E. coli* e o menor para *P. aeruginosa*.

Na Tabela 4 apresentam-se os valores médios dos halos de inibição dos experimentos realizados nas cepas *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus* e *C. albicans* em presença de ZOE, P1, P2, P3 e P4.

Tabela 4 – Medida dos halos de inibição de crescimento microbiano para as 6 cepas testadas, em presença de ZOE, P1, P2, P3 ou P4 (média das triplicatas em mm).

Formulação	Cepas					
	<i>S.aureus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Cândida albicans</i>
	Medida do halo de inibição (mm)					
ZOE	15,5	9,5	15,5	15,1	11,9	15,0
P1	<u>26,0(+10,5)</u>	<u>13,0(+3,5)</u>	<u>23,7(+8,2)</u>	<u>28,9(+13,8)</u>	<u>11,9(0)</u>	<u>20,5(+5,5)</u>
P2	<u>16,4(+0,9)</u>	<u>10,5(+1,0)</u>	<u>17,0(+1,5)</u>	<u>17,3(+2,2)</u>	11,8(-0,1)	14,2(-0,8)
P3	15,0(-0,5)	<u>10,5(+1,0)</u>	<u>17,4(+1,9)</u>	13,8(-1,3)	11,4(-0,5)	14,1(-0,9)
P4	12,3(-3,2)	<u>10,4(+0,9)</u>	12,9(-2,6)	12,2(-2,9)	11,1(-0,8)	12,4(-2,6)

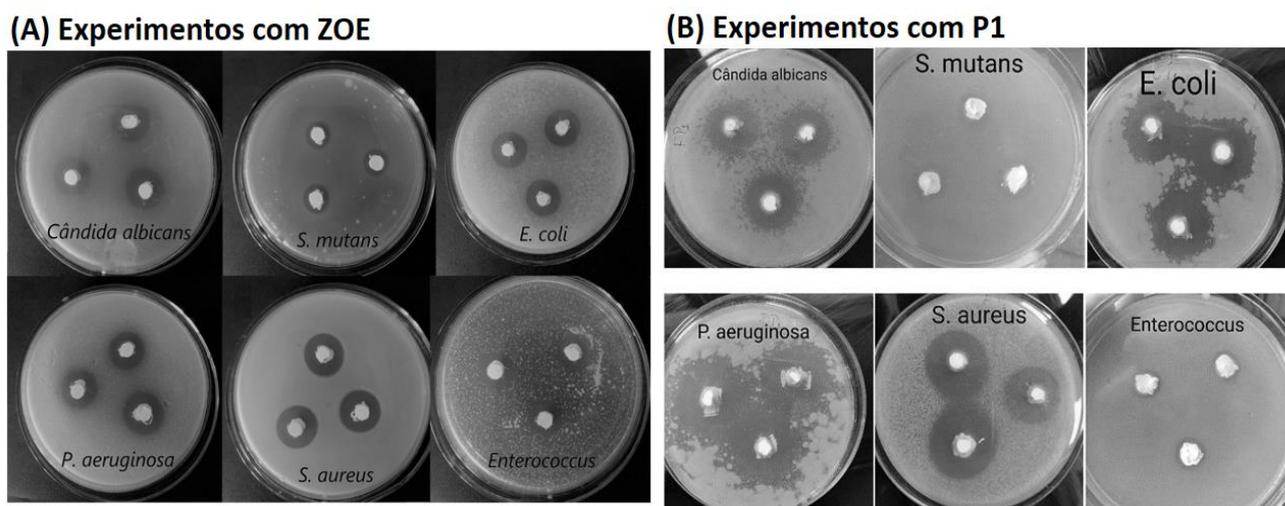
Fonte: Elaborado pelo autor com dados da pesquisa (2020). Valores entre parênteses = valor do halo do experimento com P1,2,3 ou P4-valor do halo do experimento com ZOE.

Todos os experimentos com aplicação de alguma formulação com piperina (Pn, onde n=1-4) foram comparados com o resultado dos experimentos com aplicação do ZOE. A diferença entre os valores dos tamanhos da média dos halos (Pn - ZOE) estão entre parênteses na Tabela 3, onde observa-se que foram positivos quando o tamanho do halo da formulação (Pn) é maior que o tamanho do halo formado pelo ZOE.

Sendo assim a formulação P1 apresentou valor positivo na diferença entre os experimentos (Pn – ZOE) para todas as cepas estudadas. A medida que a quantidade de piperina foi aumentada nas formulações, de P1 à P4, os valores desta diferença tornaram-se negativos. Salvo com a cepa *S. Mutans* que os valores permaneceram positivos, porém, menores que P1. Observou-se com P1 o melhor resultado de halo de inibição para *S. aureus* e *P. aeruginosas*, e nenhuma diferença em relação ao resultado com ZOE puro, nos testes com *Enterococcus*. Na Figura 21

são apresentadas imagens dos experimentos de Teste de difusão de ágar para as 6 cepas testadas em presença de ZOE puro (A) e P1 (B), respectivamente.

Figura 21 - Teste de difusão em ágar com perfuração de poços contra cepas comuns na cavidade oral.



Fonte: Elaborado pelos autores com dados da pesquisa (2020).

Evidenciou-se que o aumento da concentração de piperina na formulação (Pn) não contribuiu para um aumento na formação dos halos de inibição (Tabela 3). É provável que o aumento de piperina na formulação saturou o efeito de formação do halo. No entanto, vale ressaltar que não levou a perda excessiva do efeito evidenciado na formação do halo em P1 para as cepas, respectivamente.

A literatura destaca que a ação do ZOE puro sobre o *S. mutans* não foi satisfatório, com halo de inibição 9,5 mm. No entanto, quando adicionado a piperina na composição o halo formado aumentou para até 13,0 mm nos experimentos com P1. O que foi um dos principais resultados encontrados já que, dentre diversos microrganismo encontrados na cavidade bucal, a bactéria *Streptococcus mutans* é considerada um dos principais patógenos que causam a cárie dentária (LEITES *et al.*, 2006). Apesar de apresentar halo de inibição de 9,5 mm, é importante ressaltar que a literatura destaca do uso do ZOE como principal cimento utilizado na odontologia. Por exemplo, Boeckh *et al.* (2002) mostrou que o ZOE apresenta o melhor resultado frente ao *S. mutans* comparando com outros materiais restauradores.

Outros estudos na linha de pesquisa apresentada nesta Dissertação têm mostrado que extratos aquosos de *P. nigrum* são eficazes contra cerca de 176 espécies de bactérias encontradas na cavidade bucal (CHAUDHRY e TARIQ, 2006). Utilizando extratos de *P. nigrum*, Reddy *et al.* (2004) encontraram atividade contra isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* e *Staphylococcus aureus* todas Gram positivo e *Klebsiella aerogenes* e *Chromobacterium violaceum* amostras Gram negativas. E para as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *Enterococcus* apresentaram halo de inibição com valores de 10,7, 8,0 e 7,5 mm, respectivamente, sendo considerados insatisfatórios, tendo em vista que o valor mínimo deveria ser de 10,0 mm (ZARAI *et al.*, 2013). Comparando com o experimento realizado com a piperina adicionada ao ZOE, as cepas citadas apresentaram melhores valores na formulação P1, sendo 26,0, 24,0 e 12,0 mm os maiores valores, respectivamente. Assim, pode-se concluir que a adição da piperina influenciou para o aumento no tamanho do halo.

Vale ressaltar ainda que é importante entender o mecanismo de ação das substâncias que compõe a formulação, no entanto ainda não está completamente elucidado o mecanismo de ação antimicrobiana de óleos essenciais, mesmo sendo clara a sua atividade antimicrobiana (BARBOSA, 2010). Nos alcaloides, como é o caso da piperina, o mecanismo de ação é a interação com a parede celular e/ou DNA (COWAN, 1999). Outros estudos relatam que o eugenol inibiu a produção de amilase e protease em cepas de *Bacillus cereus* e que houve também a degradação da parede celular e lise celular entre os achados (Thoroski *et al.*, 1989).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora reconhecidas as propriedades antimicrobianas e curativas das substâncias apresentadas aqui, o tema da pesquisa é ainda é campo pouco explorado, o que possibilita a criação de um produto relativamente novo no mercado. Observou-se pelo levantamento bibliométrico e de patentes que não existe dados sobre o óxido de zinco e eugenol com adição de piperina.

Após os estudos desenvolvidos e apresentados nesta dissertação, pôde-se concluir ainda que a composição ZOE/PIP mostrou-se eficiente no combate a microrganismos existentes na cavidade bucal. Em comparação com outros estudos apresentados na literatura, a formulação do ZOE com piperina mostrou-se equivalente para algumas culturas e superior em outras, e guarda entre si uma dependência em relação à quantidade de piperina. Concluindo-se que 4% desta amida alcaloide potencializou a ação *in vitro* da formulação proposta.

Portanto, como a piperina é um produto natural atóxico, a composição ZOE/PIP (4%) pode ser utilizada como cimento odontológico de restauração provisória com maior eficiência que o ZOE.

REFERÊNCIAS

- ATAL, C.K.; DUBEY, R.K.; SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. **J Pharmacology and Exp Therapeutics**, v.232, p.258-262, 1985.
- BADMAEV, V.; MAJEED, M.; NORKUS, E. Piperine, an alkaloid derived from black pepper increases serum response of beta-carotene during 14-days of oral beta-carotene supplementation. **Nutrition Research**, v.19, p.381-388, 1999.
- BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 107 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/87782>> Acesso em 10 jan 2020.
- BERNARDO, C.; DANELUZZI, N. S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J.T.; JÚNIOR, A. F.; MORITZ, C.M.F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 43, n. 4, 436-440, out./dez., 2013.
- BOECKH, C.; SCHUMACHER, E.; PODBIELSKI, A.; HALLER, B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. **Caries Res** 2002; 36(2):101-7
- BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaude, 2007.
- 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, Seropédica, RJ: EDUR**, v. 25, n.1, p. 85-91 jan.-jun., 2005.
- CARDOSO, V. da S. et al. Administração oral de piperina em frangos de corte. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1521-1526, 2009.
- CARNEVALLI, D. B. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. **UNICIÊNCIAS**, v. 17, n. 1, p. 41-46, 2013.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.
- CHAUDHRY, N. M.; TARIQ, P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. **Pak J. Pharm. Sci.**, v.19, n.3, p.214-218, 2006.

DIAS, D. L. "O que são amidas?"; **Brasil Escola**. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/quimica/o-que-sao-amidas.htm>. Acesso em: 02 mar. 2020.

DOGRA, R. K. S.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v.196, p.229-236, 2004.

DONG, Y.; HUIHUI, Z.; LI, C. Piperine inhibit inflammation, alveolar bone loss and collagen fibers breakdown in a rat periodontitis model. **Journal of periodontal research**, v. 50, n. 6, p. 758-765, 2015.

EMBRAPA. **Manual segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino**. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65p. Projeto PAS Campo. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/111882/manual-de-boas-praticas-agricolas-e-sistema-appcc>>. Acesso em: 30 Jan. 2019.

EMBRAPA. **Treinamento marca início da safra de pimenta-do-reino no Pará**. Brasília: Embrapa, 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/25748910/treinamento-marca-inicio-da-safra-de-pimenta-do-reino-no-para>> Acesso em 11 Fev. 2019

ESPACENET [Base de dados – Internet]. **European Patent Office**; 2019. Disponível em: < <https://worldwide.espacenet.com/>> Acesso em 10 jan. 2019.

FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T.N.; LOPES, N.D.; de LIMA, M.E.F. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Rev. Virtual Quim**. 2012, 4, 3, 208-224.

FREITAS, A. B. D. A de; SOARES, D.; FIORINI, J. E.; SWERTS, M. S. O.; BARROS, L. M. de. In vitro effect of restorative, cementing and lining materials on *Streptococcus mutans*. **RFO**, v. 13, n. 2, p. 33-38, maio/Agosto, 2008.

GAGINI, T. B. et al. Oral administration of piperine for the control of aflatoxin intoxication in rats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, 2010.

GUEDES, V. L. da S. A bibliometria e a gestão da informação e do conhecimento científico e tecnológico: uma revisão da literatura. **Ponto de Acesso**, Salvador, v. 6, n. 2, p. 74-109, ago. 2012.

GUIMARÃES, G. R. **Preparo e caracterização de óxido de zinco dopado com alumínio e hidrogênio para aplicações em células solares fotovoltaicas**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

GUIMARAES-STABILI, M. R. et al. Systemic administration of curcumin or piperine enhances the periodontal repair: a preliminary study in rats. **Clinical oral investigations**, v. 23, n. 8, p. 3297-3306, 2019.

HE, L. H., PURTON, D. G., SWAIN, M. V. A suitable base material for composite resin restorations: Zinc oxide eugenol. **J. Dent.** v. 38, n.4, p 290-5, 2010.

HUME, W. R. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol **JADA**, Vol. 113, November 1986.

INPI [Base de dados – Internet]. **Instituto Nacional de Propriedade Industrial**; 2019. Disponível em: < [https:// http://www.inpi.gov.br/](https://http://www.inpi.gov.br/)> Acesso em 11 jan. 2019.

JOAQUIM, N. M. **Análise da Citotoxicidade de Materiais Obturadores de Dentes Decíduos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, SP: [s.n.], 2004. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/288856/1/Joaquim_NataliaMartins_M.pdf> Acesso em 20 jan 2019.

JUN S. K, et al. Zirconia-incorporated zinc oxide eugenol has improved mechanical properties and cytocompatibility with human dental pulp stem cells. **Dent Mater** (2017).

KAMATOU, G.P; VERMAAK, I; VILJOEN, A.M. Eugenol--from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**. v. 17, n. 6, p. 6953-6981, 2012.

KUPFER, D; TIGRE, P.B. **Modelo SENAI de Prospecção: Documento Metodológico**. Capítulo 2: Prospecção Tecnológica. In: Organización Internacional Del Trabajo. CINTERFOR. Papeles de La Oficina Técnica no.14, Montevideo: OIT/CINTERFOR, 2004.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. de S. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p. 239- 252, 2006.

LI, H.Y.; LEE, B.K.; KIM, J.S.; JUNG, S.J.; Oh, S.B. Eugenol inhibits ATP-induced P2X currents in trigeminal ganglion neurons. **Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 12, p. 315-321, 2008.

MOMESSO, A.C; NORONHA, D.P. Bibliométrie ou Bibliometrics: o que há por trás de um termo? **Perspectivas em Ciências da Informação**, v.22, n.2, p.118-124, abr./jun. 2017.

MORTAZAVI, M; MESBAHI, M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. **International Journal of Paediatric Dentistry**. v. 14, p. 417–424, 2004.

MOURA, I. R. de; RABELLO, T. B; PEREIRA, K. F. A influência do eugenol nos procedimentos adesivos. **Rev. bras. odontol.**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 1, p. 28-32 jan./jun. 2013.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NOGUEIRA, A.L et al. Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. **Rev Matéria Suplemento**, 2017.

OLIVEIRA, R. G. de; ALENCAR-FILHO, E. B.; VASCONCELOS, M. L. A. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. **Química Nova** [on-line], São Paulo, v. 37, n. 1, p. 69-73, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422014000100013>. Acesso em: 12 dez. 2019

OLIVEIRA, P. de A. **Avaliação do potencial anti-nociceptivo e antiinflamatório do ácido pipérico**. 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2016.

OKUBO, Y. Bibliometric indicators and analysis of research systems: methods and examples. Paris, **OECD**, 1997.

PINTO, C. M. F.; PINTO, C. L. O.; DONZELES, S. M. Pimenta capsicum: Propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**. v. 3, nº 2, p.108-20, 2013.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells Int. **Immunopharmacology**, v.4, p.1795-1803, 2004.

REDDY, S.V.; SRINIVAS, P.V; PRAVEEN, B.; KISHORE, K.H.; RAJU, B.C.; MURTHY, U.S.; RAO, J.M. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v.11, p. 697-700, 2004.

REIS, A.; LOGUERCIO, A.D. **Materiais Dentários Diretos – dos Fundamentos à Aplicação Clínica**. 1 ed. São Paulo: Santos Editora, 2007.

REN, C.; LIANG, Z. Piperine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury by down-regulating microRNA-127 in murine chondrogenic ATDC5 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.103, p.947-954, 2018.

RODRIGUES, R. da S; SILVA, R. R. A história sob o olhar da química: as especiarias e sua importância na Alimentação humana. **Química Nova na Escola**. v. 32, n. 2, Maio, 2010.

SACRAMENTO, P. A.; PAPA, A. M. C.; CARVALHO, F.G.; PUPPIN-RONTANI, R. M. Antibacterial properties of lining materials – a review. **Rev Odontol UNESP**, v. 37, n.1, p. 59-64, 2008.

SÁNCHEZ, F. A. L. **Síntese de nanoestruturas de ZnO por evaporação térmica modificada e sua caracterização microestrutural e das propriedades fotofísicas**. Programa de Pós-graduação de engenharia de minas, metalúrgica e de materiais – PPGE3M, [Tese] Porto Alegre, 2013.

SANTOS, M.M; COELHO, G.M; SANTOS, D.M; FELLOWS, L. Prospecção de tecnologias de futuro: métodos, técnicas e abordagens. **Parc Estrat** [periódico na internet]. v.19, p.189, Dez. 2004. Disponível em: <<http://www.cgee.org.br/parcerias/p19.php>>. Acesso em: 27 set. 2019.

SELVENDIRAN, K. et al. Preliminary study on inhibition of genotoxicity by piperine in mice. **Fitoterapia**. v. 76, n. 3–4, p. 296-300, June 2005.

SILVA, M. J. A. **Lipozyme TL IM como catalisador na síntese de acetato de eugenila via acetilação do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) em sistema livre de solvente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) PPGEA. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 2014.

SILVEIRA, L.M. da S.; OLEA, S.G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. de L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SMAÏL-FAUGERON, V; COURSON, F; DURIEUX, P; et al. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. **Cochrane Database Syst Rev.** v.6, n.8, Ago 2014.

SOUZA, A. R., MELLO, F. B., TURBINO, M. L., YOUSSEF, M.N. Influência do eugenol na microdureza da resina composta utilizando sistemas adesivos atuais. **Pesq. Odontol. Bras.** v.14, n.3, p 237-42, 2000.

SPLITTER, K; ROSA, C.A da; BORBA, J. A. Uma análise das características dos trabalhos "ditos" bibliométricos publicados no Enanpad entre 2000 e 2011. In: ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA EM ADMINISTRAÇÃO, 36, 2012, Rio de Janeiro. **Anais [...]** Rio de Janeiro-RJ: ANPAD, 2012.

TAI, K.W.; HUANG, F.M; HUANG, M.S; CHANG, Y.C. Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an in vitro mammalian test system. John Wiley & Sons, Inc. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.59, p.73–77, 2002.

TEXEIRA, L. P. **Prospecção tecnológica: importância, métodos e experiências da Embrapa Cerrados.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2013.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.52, n.6, p.399–403, 1989.

TROWBRIDGE, H; EDWALL, L; PANOPOULOS, P. Effect of zinc oxide-eugenol and calcium hydroxide on intradental nerve activity. **Journal of Endodontics**, v. 8, n.9, September, 1982.

USPTO [**Base de dados – Internet**]. United States Patent and Trademark Office; 2019. Disponível em: < [https:// www.uspto.gov/](https://www.uspto.gov/)> Acesso em: 10 jan. 2019.

VÁGULA, M. P; PEDOTT, M.M; GUIMARÃES, M.R.F de S.G; ALEIXO, R.Q; BORRÉ, M.A.M. Avaliação da ação antimicrobiana dos materiais seladores

temporários utilizados pelos cirurgiões dentistas de Ouro Preto do Oeste – RO. *Saber Científico Odontológico*, Porto Velho, v.1, n.1, p. 21-30, jul./dez., 2010.

VANDEN BERGHE, D.A. & VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M. & HARBONE, J.D. (eds), *Methods in Plant Biochemistry*, **Academic Press**, London, p.47–69, 1991.

VEIGA, R.S; MARCUCCI, M.C. Atividades terapêuticas da pimenta vermelha (*Capsicum sp.*- solanaceae) e pimenta do reino (*Piper nigrum L.*- piperaceae). **Brazilian Journal of Natural Sciences**. Ed 1. vol. 2 , 2018.

VINHA, M. B.; LIMA, I. de M.; SECUNDINO, W. Contaminantes que comprometem a segurança da pimenta-do-reino ao longo de sua cadeia produtiva. **Incaper em Revista**, Vitória, v. 8, p. 55-67, jan/dez 2017.

WANG-SHENG, C; JIE, A; JIAN-JUN, L; LAN, H.L; ZENG-BAO, X; CHANG-QING, L. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 42, p.44-48, January 2017.

ZARAI, Z; SAYARI, A; BOUJELBENE, E; SALEM, B. N; GARGOURI, Y. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT-Food Science and Technology**. v. 50, p. 634-641, 2013.

ANEXOS

ANEXO A - Tabela de dados estatísticos (média, desvio padrão e intervalo de confiança)

S. aureus						S. mutans					
Formulação (Pn)	Média	DP	IC95%	IC90%	IC80%	Formulação (Pn)	Média	DP	IC95%	IC90%	IC80%
P1	26,0	2,07	5,14	3,49	2,25	P1	13,0	1,65	4,11	2,79	1,80
P2	16,4	0,25	0,63	0,43	0,28	P2	10,5	0,46	1,14	0,77	0,50
P3	15,0	0,47	1,18	0,80	0,52	P3	10,5	0,85	2,12	1,44	0,93
P4	12,3	1,07	2,66	1,81	1,17	P4	10,4	0,26	0,66	0,45	0,29
E. coli						P. aeruginosa					
Formulação (Pn)	Média	DP	IC95%	IC90%	IC80%	Formulação (Pn)	Média	DP	IC95%	IC90%	IC80%
P1	23,7	0,96	2,4	1,63	1,05	P1	28,9	2,62	6,52	4,43	2,86
P2	17,0	0,6	1,5	1,02	0,66	P2	17,3	1,74	4,34	2,94	1,9
P3	17,4	2,5	6,22	4,22	2,72	P3	13,8	0,35	0,86	0,58	0,38
P4	12,9	0,67	1,66	1,13	0,73	P4	12,2	0,5	1,26	0,85	0,55
Enterococcus						Cândida albicans					
Formulação (Pn)	Média	DP	IC95%	IC90%	IC80%	Formulação (Pn)	Média	DP	IC95%	IC90%	IC80%
P1	11,9	1,65	4,11	2,79	1,80	P1	20,5	0,46	1,14	0,77	0,50
P2	11,8	0,55	1,28	0,87	0,56	P2	14,2	0,67	1,66	1,13	0,73
P3	11,4	0,1	0,25	0,17	0,11	P3	14,1	0,96	2,40	1,63	1,05
P4	11,1	0,55	1,37	0,93	0,60	P4	12,4	0,17	0,43	0,29	0,19
ZOE											
Cepas	Média	DP	IC95%	IC90%	IC80%						
<i>S. aureus</i>	15,5	0,46	1,14	0,77	0,5						
<i>S. mutans</i>	9,5	0,52	1,29	0,88	0,57						
<i>E. coli</i>	15,5	0,58	1,44	0,98	0,63						
<i>P. aeruginosa</i>	15,1	1,01	2,52	1,71	1,11						
<i>Enterococcus</i>	11,9	0,67	1,66	1,13	0,73						
<i>Cândida albicans</i>	15,0	0,25	0,63	0,43	0,28						

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE) com Piperina na Farmacologia Aplicada à Odontologia: prospecção tecnológica para um panorama inovador

Zinc Oxide and Eugenol (ZOE) with Piperine in Pharmacology Applied to Dentistry: technological prospection for an innovative overview

Humbérila da Costa e Silva Melo^{1,2}

Robson Almeida Borges de Freitas²

José Luiz Silva Sá³

Antônio Martins de Oliveira Júnior⁴

Daniel Cabral Leão Ferreira^{3,5}

¹Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Instituto Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

³Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI, Brasil

⁴Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brasil

⁵Faculdade de Ciências Médicas, Teresina, PI, Brasil

Resumo

O Óxido de Zinco – Eugenol (ZOE) é amplamente utilizado como material restaurador terapêutico odontológico. No entanto, estudos indicam que o ZOE tem poucas propriedades mecânicas e alta citotoxicidade em relação às células-tronco da polpa dental humana. O objetivo deste trabalho é efetuar a prospecção tecnológica sobre o composto Óxido de Zinco e Eugenol com adição de Piperina. Na construção desta pesquisa, empregaram-se as bases de patentes da European Patent Office (Espacenet), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) para coletar e analisar as informações relativas ao tema abordado. Foram utilizados os termos: ZnO, ZOE, Zinc Oxide, Eugenol, Óxido de Zinco, Piperina e Piperine. Os resultados demonstraram que a inovação proposta ainda é de conhecimento restrito, pois não foram encontradas patentes que utilizem o ZOE com a adição da Piperina. Embora reconhecidos os aspectos curativos dos componentes, a combinação citada é uma novidade.

Palavras-chave: Piperina. Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE). Farmacologia.

Abstract

Zinc Oxide – Eugenol (ZOE) is widely used as a dental therapeutic restorative material. However, studies indicate that ZOE has few mechanical properties and high cytotoxicity relative to human dental pulp stem cells. The objective of this work is to make the technological prospecting on the compound Zinc Oxide-Eugenol with the addition of Piperine. In the construction of this research, the patent bases of the European Patent Office (Espacenet), the United States Patent and Trademark Office (USPTO) and the Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) were used to collect and analyze the information related to the subject. Was used the terms: ZnO, ZOE, Zinc Oxide, Eugenol, Zinc Oxide, Piperine and Piperine. The results showed that the proposed innovation is still of limited knowledge, because there are no patents using ZOE with the addition of Piperine were found. Although the healing aspects of the compound are recognized, the combination mentioned is new.

Keywords: Piperine. Zinc Oxide – Eugenol (ZOE). Pharmacology.

Área Tecnológica: Biotecnologia. Farmacologia. Propriedade Intelectual.



1. Introdução

A odontologia carece de fármacos para a condução de seus procedimentos cirúrgicos e curativos e podem ser citados os restauradores provisórios e definitivos, anestésicos, analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos. Entre os diversos produtos considerados restauradores provisórios no mercado da odontologia, o Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE) é um dos mais utilizados e foi recomendado por Sweet em 1930 (MORTAZAVI; MESBAHI, 2004). Isso se deve à facilidade do preparo, manipulação e eficácia na finalidade a que é destinado.

Esse tipo de material é de suma importância na odontologia porque garante a manutenção da assepsia, tratamento microbiano e anti-inflamatório aliado à proteção do dente ao ataque de novos contaminantes durante o tratamento. De fato, a ação da mistura ZOE abre um campo de estudo para melhoria dos tratamentos pré-cirúrgicos em odontologia, o que leva à possibilidade de serem testadas novas moléculas com potencial antibacteriano e anti-inflamatório capazes de serem misturadas de forma homogênea ao ZnO, gerando aderência ao dente aliada à ação medicamentosa.

Tratando-se mais especificamente do Eugenol, que é definido como um composto aromático que está presente especialmente nos cravos e que possui um efeito anestésico marcante, sendo amplamente utilizado na odontologia. Assim como o Eugenol, moléculas a partir de produtos naturais como a Piperina (*Piper nigrum* L.) têm ação anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana que pode auxiliar o curativo em problemas dentários. Além disso, não há implicações químicas para a mistura com o já conhecido Óxido de Zinco (ZnO), material utilizado como suporte do Eugenol em preenchimentos dentários temporários.

A Piperina é uma amida natural abundante nos frutos de *Piper nigrum* e também se encontra presente em diferentes espécies do gênero Piper (SEMLER; GROSS, 1998 *apud* FERREIRA, 2012). O *P. nigrum* é usado principalmente como condimento e é popularmente conhecido no Brasil como pimenta-do-reino. Seu principal alcaloide, a Piperina, possui variada atividade biológica, na qual se a ação anti-inflamatória (LEE; SHIN; WOO, 1984; MUJUNDAR *et al.*, 1990; STÖHR *et al.*, 2001 *apud* CARDOSO, 2005), antimicrobiana (REDDY *et al.*, 2004) e a biodisponibilidade de fármacos (CHAUDHRY; TARIQ, 2006; KHAN *et al.*, 2010; SIMAS *et al.*, 2007 *apud* CARNEVALLI, 2013).

Justifica-se a aplicação deste estudo pela necessidade de desenvolver novas alternativas para a criação de medicamentos de larga utilização, com criação de patentes que possam alavancar o conhecimento tecnológico, científico e melhorar a economia do país. Com o estudo espera-se patentear a inovação e, posteriormente, realizar a transferência dessa tecnologia para que a comunidade usufrua dos resultados da pesquisa. A investigação das ações biológicas de novas moléculas pode nortear outros estudos específicos para a utilização destes novos materiais na odontologia, como uma opção viável e mais eficaz aos medicamentos (ZOE) já existentes.

2. Revisão de Literatura

A fundamentação da temática baseou-se nos aspectos descritos na literatura para a piperina, assim como para o composto óxido de zinco-eugenol. A seção aborda as atividades biológicas e as aplicações do ZOE e, em seguida, a piperina e suas características de interesse para o presente estudo.

2.1. Atividades Biológicas e Aplicações do Óxido de Zinco e Eugenol

O composto formado por Óxido de Zinco e Eugenol é utilizado, em alguns casos, para fixação provisória em tratamentos de restauração definitiva na odontologia. Alguns requisitos são necessários para esse tipo de cimento provisório, como: requisitos biológicos (biocompatibilidade), físicos (resistência mecânica baixa) e ser de fácil manipulação.

Estudo realizado com o Eugenol, provou que ele inibe a ação do P2X3, um receptor de dor que se expressa no gânglio trigêmeo, confirmando o seu efeito analgésico (LI *et al.*, 2008). Um estudo *in vitro* revelou que o Eugenol influencia na função macrofágica por prejudicar a capacidade de adesão e modular reações imunes e inflamatórias na polpa dentária e em tecidos periapicais (SEGURA; JIMENEZ-RUBIO, 1998 *apud* MOURA; RABELLO; PEREIRA, 2013).

Sobre os efeitos antibacterianos, estudos revelam que o ZOE tem bons resultados inibitórios sobre o *Streptococcus mutans*, um dos grandes causadores de cáries dentária, indicando que o material tem potencial para prevenção de cáries secundárias (LI *et al.*, 2008 *apud* MOURA; RABELLO; PEREIRA, 2013). É possível que o Eugenol apresente propriedade antibacteriana pela inibição da síntese de enzimas extracelulares e ruptura da estrutura da parede celular dos microrganismos que tiver contato (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012 *apud* SILVA, 2014), e, assim sendo, a célula perderá íons e outros componentes intracelulares, especialmente as proteínas, resultando em morte celular. Beraldo *et al.* (2013) observou que óleos essenciais como o Eugenol podem ser aplicados como princípio ativo de sanitizantes para inibição microbiana em baixas concentrações. Esse estudo reforça a indicação de que o Eugenol em menores concentrações já apresenta resultados positivos contra microrganismos em geral, tendo inclusive várias aplicações industriais.

Quanto ao uso do Óxido de Zinco, Nogueira *et al.* (2017) realizaram um estudo com nanopartículas de Óxido de Zinco e comprovaram que este tem eficiência antibacteriana contra a bactéria *Escherichia coli* na concentração a partir de 50mg.L⁻¹. O ZOE também é considerado um material de base adequado para restaurações de resina composta (HE; PURTON; SWAIN, 2010).

2.2. Piperina

A Piperina, N-[5(1,3-benzodioxola-4-il-1-oxo-penta-2E,4E-dienil)] piperidina (BUTLER, 2008 *apud* FERREIRA *et al.*, 2012), é uma das principais amidas alcaloides que é encontrada na espécie *Piper nigrum* L. popularizada como pimenta-preta ou pimenta-do-reino (BOMTEMPO, 2007; PISSINATEM, 2006 *apud* CARNEVALLI, 2013). A planta da família Piperaceae é do tipo trepadeira, perene, arbustífera, de origem Indiana (PISSINATE, 2006 *apud* CARNEVALLI, 2013) e foi introduzida no Brasil no século XVII por escravos (EMBRAPA, 2004).

Conforme aponta o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2016, o segundo maior produtor de pimenta-preta no Brasil foi o Espírito Santo, que produziu 12,8 mil toneladas com rendimento de 1.880kg/hectares (VINHA; LIMA; SECUNDINO, 2017). Segundo a Associação dos Exportadores, o Brasil está entre os quatro países que mais produzem e exportam pimenta-do-reino: em 2016 foram 45 mil toneladas, dado que difere daquele do IBGE, que aponta uma produção de 54 mil toneladas (EMBRAPA, 2017). Os estados do Pará, Espírito Santo e Bahia são, nessa ordem, os maiores produtores no Brasil.

Entre as diversas atividades biológicas da Piperina, destaca-se a ação antimicrobiana (REDDY *et al.* 2004), anti-inflamatória (PRADEEP; KUTTAN, 2004) e o aumento na biodisponibilidade de fármacos (OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELOS, 2014). No estudo realizado por Reddy *et al.* (2004), foram encontrados compostos ativos contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*,

Staphylococcus aureus (Gram positivas) e *Klebsiella aerogenes* e *Chromobacterium violaceum* (Gram ;negativas).

Conforme apontam Pradeep e Kuttan (2004), a Piperina em determinadas concentrações inibiu a invasão da matriz de colágeno das células de melanoma. E ainda segundo Mueller, Hobiger e Jungbauer (2010 *apud* ZARAI *et al.*, 2013), a pimenta-preta estimula a produção de uma citocina anti-inflamatória (IL-10). Wang-Sheng *et al.* (2017), em estudo realizado sobre a atuação da Piperina nas respostas inflamatórias por lipopolissacarídeos em micróglia BV2 concluiu que a Piperina é promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

A toxicidade que a substância pode causar aos organismos é uma das características importantes para a avaliação da dosagem do composto. Cardoso *et al.* (2005), em estudo sobre o efeito tóxico da Piperina isolada da pimenta do reino em camundongos (*Mus musculus*), verificaram que a Piperina utilizada na dose de 2,0 mg/kg, via *i.p.* não apresentou efeitos colaterais, alterações macroscópicas ou microscópicas nos órgãos e tecidos analisados, com ausência de toxicidade para fígado e rim.

Ainda sobre toxicidade, Ren e Liang (2018), em estudo sobre a ação anti-inflamatória da Piperina, testaram os potenciais efeitos citotóxicos nas células ATDC5 e observaram que 10, 30 e 50µg/ml de tratamento com Piperina não tiveram influência significativa na viabilidade das células ATDC5 de murinos. Quando testados os efeitos imunotoxicológicos da Piperina em camundongos Swiss machos, os resultados indicaram que, para as doses utilizadas (1,12, 2,25 ou 4,5mg/kg), não foram obtidos efeitos tóxicos evidentes e o fígado ganhou peso normalmente (DOGRA *et al.*, 2004). Assim, Gagini *et al.* (2010) utilizaram a dosagem de 1,12mg/kg, a administraram via oral em ratos para observar seu efeito contra intoxicação por aflatoxinas e observaram que produziu uma queda notável nas lesões hepáticas e inibiu o efeito tóxico da aflatoxina nos glóbulos brancos, ou seja, sugere-se que a Piperina é um agente químico potencial contra a toxicidade das aflatoxinas.

Um teste de micronúcleo para avaliar um possível efeito genoprotetor da Piperina foi realizado por Selvendiran *et al.* (2005) com camundongos Swiss. No estudo eles usaram as concentrações de 25, 50 e 75mg/kg de Piperina durante cinco dias consecutivos e todas as doses tiveram efeito eficaz significativo contra a genotoxicidade, inibindo a mutagênese induzida.

3. Metodologia

Como procedimentos metodológicos para realizar a prospecção tecnológica, têm-se:

1. Busca nas bases de patentes da European Patent Office (Espacenet), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).
2. Realização de busca avançada por termos.
3. Análise dos resultados, criação de gráficos e tabelas com os dados encontrados.

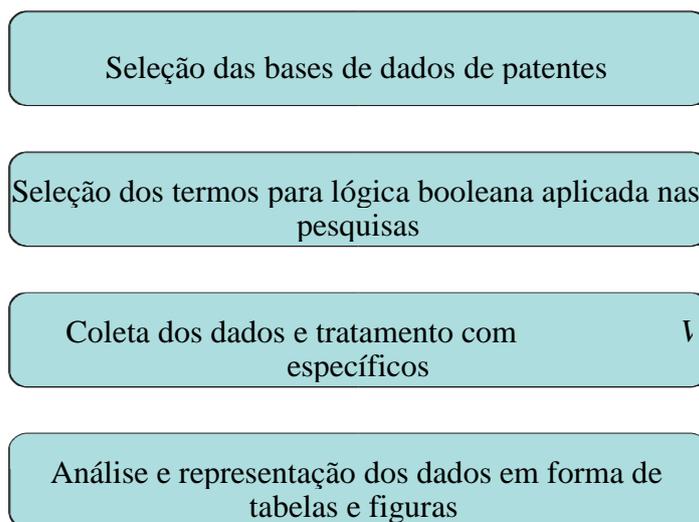
Nas bases do Espacenet e USPTO, os termos utilizados para a pesquisa foram: ZnO, ZOE, *Zinc Oxide*, Eugenol, Óxido de Zinco, Piperina e *Piperine*. As bases utilizadas dão a alternativa de pesquisas booleanas com o uso de conectores lógicos. Nos campos de buscas foram inseridos os seguintes termos: (ZnO or ZOE) and (“zinc oxide-eugenol” or “Zinc Oxide and Eugenol”) para buscar as patentes que contivessem o composto Óxido de Zinco e Eugenol sem a Piperina. Após essa busca, foram inseridos os termos: (((ZnO OR ZOE) AND (“zinc oxide-eugenol” OR “Zinc Oxide and Eugenol”)) AND piperine) para buscar patentes com a adição de Piperina no composto ZOE.

Por conseguinte, foi feita a pesquisa pelos termos: *piperine* e *piperine and eugenol*, para buscar patentes com o uso da Piperina e da Piperina com Eugenol. Todas as pesquisas foram feitas buscando os termos no título (*title*) e no resumo (*abstract*).

Nas bases do INPI foram pesquisadas as seguintes palavras: “ÓXIDO DE ZINCO EUGENOL PIPERINA” na primeira busca e “ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL” na segunda busca. Os termos foram buscados no Resumo e contendo todas as palavras.

Após a coleta dos dados e com a utilização do aplicativo Excel foi possível filtrar as patentes por ano de publicação, país de origem e classificação internacional de patentes. Os dados de patentes duplicados foram excluídos. A metodologia está esquematizada na Figura 1.

Figura 1 – Esquema da metodologia utilizada na pesquisa



Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo (2019)

A Classificação Internacional de Patentes (IPC) utilizada neste estudo é a disponibilizada no *site* do INPI, conforme mostra a Figura 2.

Figura 2 – Classificação Internacional de Patentes

+	A	SEÇÃO A — NECESSIDADES HUMANAS
+	B	SEÇÃO B — OPERAÇÕES DE PROCESSAMENTO; TRANSPORTE
+	C	SEÇÃO C — QUÍMICA; METALURGIA
+	D	SEÇÃO D — TÊXTEIS; PAPEL
+	E	SEÇÃO E — CONSTRUÇÕES FIXAS
+	F	SEÇÃO F — ENGENHARIA MECÂNICA; ILUMINAÇÃO; AQUECIMENTO; ARMAS; EXPLOSÃO
+	G	SEÇÃO G — FÍSICA
+	H	SEÇÃO H — ELECTRICIDADE

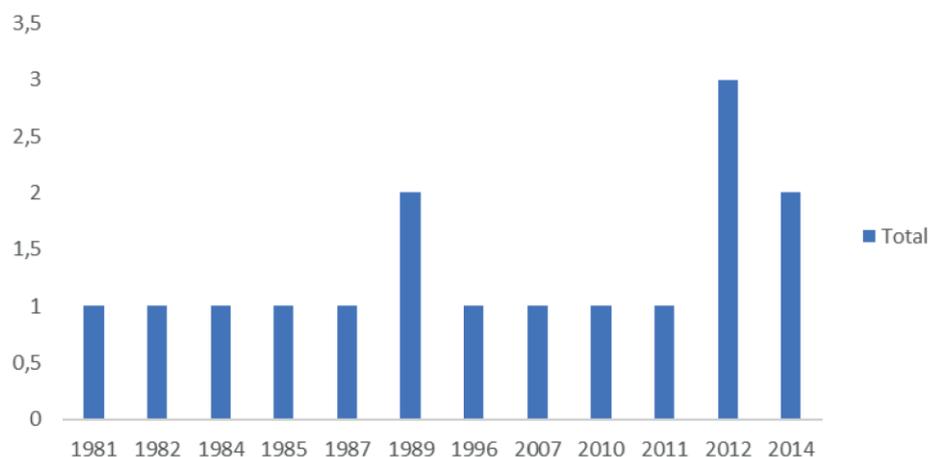
Fonte: Elaborada pelos autores com base no *site* do INPI (2019)

4. Resultados e Discussão

Nos resultados da prospecção tecnológica nas bases da USPTO, há o seguinte.

Quando os termos buscados foram sobre o composto de Óxido de Zinco e Eugenol, obteve-se o retorno de 16 patentes. As patentes foram publicadas a partir do ano de 1981 e chegaram até o ano de 2014, conforme a Figura 3.

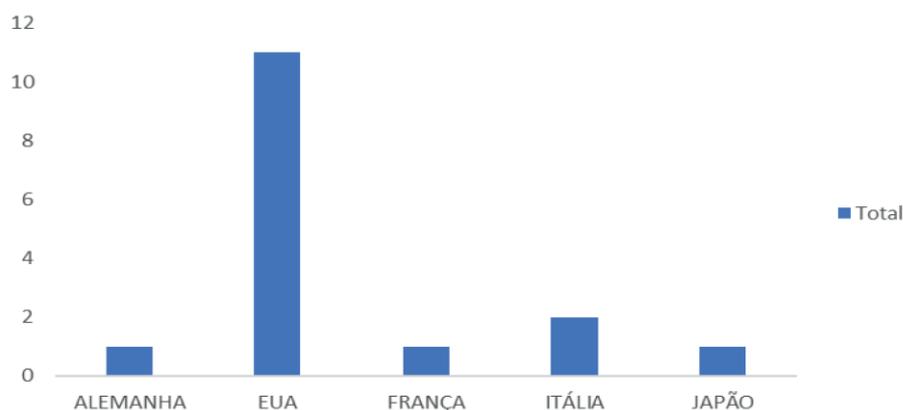
Figura 3 – Patentes por ano – USPTO



Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo com dados da pesquisa (2019)

Pela base da USPTO, os países que mais depositaram estão explícitos na Figura 4. Estados Unidos da América foi o país que mais depositou.

Figura 4 – Origem dos depósitos



Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo com dados da pesquisa (2019)

A publicação de 1981 tem como título: *Surgical Cement Composition*. Essa publicação é originária dos Estados Unidos da América e é descrita em seu resumo como um cimento cirúrgico de solução aquosa e moldável, com aplicação particular para dentes. Pode-se observar que, por ser a patente mais antiga, é o documento que dá início à proteção dos inventos relacionados com o ZOE.

Os Estados Unidos possuem o maior número de depósitos na USPTO e acredita-se que o país teve um maior interesse no desenvolvimento de patentes relacionadas ao uso do ZOE, porém, por

se tratar de um escritório de patentes norte-americano, o número por ser influenciado por esse fator. As patentes encontradas na USPTO são particularmente voltadas para a área da Odontologia.

Quanto à classificação das patentes encontradas na pesquisa às bases da USPTO, a Tabela 1 mostra a quantidade de patentes por sua classificação internacional depositada. Cada patente pode optar por mais de uma classificação a que se enquadra. Nota-se que as duas classificações mais escolhidas foram as relacionadas com necessidades humanas de higiene odontológica e médica.

Tabela 1 – Informações sobre a classificação internacional das patentes encontradas

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (IPC)	TOTAL
A61K (preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas)	31
A61C (odontologia; aparelhos ou métodos para higiene oral ou higiene dental)	17
A61P (atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais)	4
B29C (moldagem ou união de matérias plásticas)	4
C08L (composições de compostos macromoleculares)	3
A61L (métodos ou aparelhos para esterilizar materiais ou objetos em geral; desinfecção, esterilização ou desodorização do ar; curativos, etc.)	3
C09K (materiais para aplicações diversas)	2
CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (IPC)	TOTAL
C08K (uso de substâncias inorgânicas ou orgânicas não macromoleculares como ingredientes de composições)	2
C01B (elementos não metálicos)	2
A61B (diagnóstico; cirurgia; identificação)	1
G03F (produção fotomecânica de superfícies texturizadas ou estampadas)	1
C08G (compostos macromoleculares obtidos por reações)	1
Total Geral	71

Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo com dados da pesquisa (2019)

Nas buscas relacionando a Piperina ao Eugenol nas bases da USPTO, foram encontrados 367 resultados, no entanto, quando os termos inseridos nas bases da USPTO relacionaram o ZOE com a Piperina, não foi encontrado nenhum resultado. Observa-se que a quantidade de patentes de Óxido de Zinco e Eugenol como medicamento para a Odontologia confirma o interesse científico na sua utilização, e que, segundo Mortazavi e Mesbahi (2004), após 1930, foi bastante utilizado e teve sua composição, preparo e indicações modificados após estudos científicos de seus efeitos.

Quando os termos buscados foram sobre o composto de Óxido de Zinco e Eugenol, obteve-se o retorno de duas patentes nos resultados encontrados nas bases da ESPACENET, conforme mostra o Quadro 1. Ambas patentes descritas na Tabela 2 estão classificadas com finalidade higiênica, odontológica e médica.

Quadro 1 – Patentes encontradas na Espacenet – ZnO e Eugenol

PAÍS DA PATENTE	CLASSIFICAÇÃO IPC	ANO
China	A61K (Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas)	2018
Alemanha	A61K (Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas)	1992

Fonte: Elaborado pelos autores deste artigo com dados da pesquisa (2019)

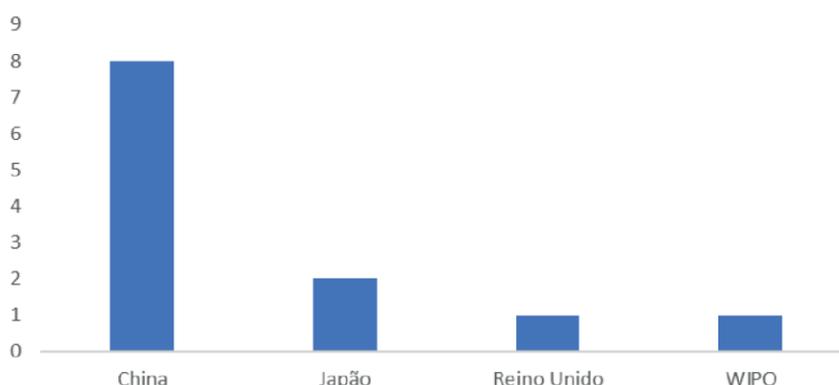
A patente da Alemanha é descrita como sendo uma formulação do cimento de Óxido de Zinco e Eugenol com melhorias de resistência à pressão, tempo de endurecimento melhorado e menor solubilidade em água. Pode-se observar que essa patente buscava melhorar os efeitos desse cimento para que fosse mais adequado para o uso odontológico. Logo após, a patente da China descreve uma pasta que promete efeitos melhores que o cimento de ZOE. A invenção relata que a pasta é composta por: Óxido de Zinco e Quelato de óleo de cravo, Iodofórmio e Hidróxido de Cálcio.

Quando relacionados os termos “eugenol e piperina”, encontraram-se 12 patentes (Figura 5), incluindo uma depositada na World Intellectual Property Organization (WIPO). Os depósitos relacionados com a WIPO são patentes que foram depositadas diretamente no órgão, que possui abrangência mundial. Essas patentes são descritas como produtos antibacterianos utilizados de maneiras diversas e descrevem as substâncias como botânicas, visto serem substâncias derivadas de plantas.

Algumas patentes relacionadas com Piperina e Eugenol possuem a descrição de fungicidas. Nota-se que a utilização da Piperina para controle biológico é evidente na literatura e também nas patentes encontradas na pesquisa. Esse interesse vai ao encontro do relatado por Reddy *et al.* (2004) sobre ação antimicrobiana; e por Pradeep e Kuttan (2004) sobre ação anti-inflamatória e aumento na biodisponibilidade de fármacos, conforme relata Oliveira, Alencar-Filho e Vasconcelos (2014).

Os países proprietários das patentes (Eugenol e Piperina) estão descritos na Figura 5. Nota-se que a China é a grande detentora das patentes.

Figura 5 – Patentes de Piperina e Eugenol depositadas por país: Espacenet



Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo com dados da pesquisa (2019)

A Tabela 2 mostra as classificações mais frequentes das patentes buscadas sobre Piperina e Eugenol. Observa-se que a maioria está relacionada com odontologia, medicina e higiene, sendo que as patentes podem ser alocadas em mais de uma classificação.

Tabela 2 – Maior frequência de classificações das patentes

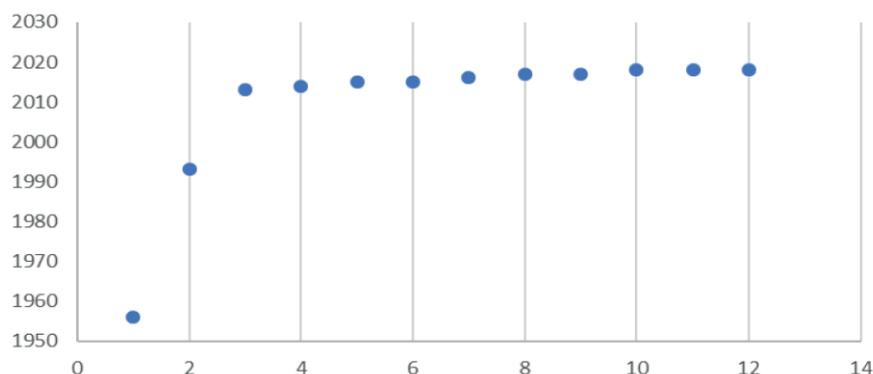
CLASSIFICAÇÃO IPC	TOTAL
A61K (preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas)	19
A01N (conservação de corpos de seres humanos ou animais ou plantas)	15
A61P (atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais)	8

Fonte: Elaborada pelos autores com dados da pesquisa (2019)

Na Figura 6 estão as publicações por ano. Em 1956 foi feito o primeiro registro encontrado na base em questão. Nota-se que, após o ano 2010, existe a maior concentração de patentes sobre Piperina e Eugenol. Esse aumento pode estar relacionado com alguma descoberta científica ou com o vencimento de alguma patente relacionada. Quando se buscou pelo composto ZOE com a Piperina, nenhum resultado foi encontrado.

Conforme abordado no estudo, o potencial da Piperina como agente curativo é evidenciado pelo alto número de patentes depositadas sobre esse produto. Nota-se que, na literatura, a Piperina é descrita como um agente potencializador de medicamentos, agindo na biodisponibilidade de fármacos (OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELOS, 2014), o que se tornou interessante para o prosseguimento de novos estudos. Conforme evidenciado nessa prospecção, como há pouca exploração do tema abordado, está sendo feito um estudo da criação de um fármaco com a utilização da Piperina. A prospecção foi favorável como etapa inicial de novas pesquisas, dando um amplo espectro para prosseguimento de estudos relacionados.

Figura 6 – Publicações de patentes por ano: Piperina e Eugenol



Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo com dados da pesquisa (2019)

Nas bases do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) não foram encontrados compostos com o relacionamento de ZOE e Piperina. Porém, foram encontradas patentes sobre Óxido de Zinco e Eugenol (3 patentes/A61K-A61C), ambas com classificação para: preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas e/ou odontologia; aparelhos ou métodos para higiene oral ou higiene dental; e patente de Eugenol e Piperina (1 patente/A23K-productos alimentícios preparados para animais).

5. Considerações Finais

Os resultados mostraram que a inovação proposta na pesquisa em andamento ainda é de conhecimento restrito. A pesquisa mostrou que as patentes com uso do Óxido de Zinco, Eugenol e Piperina, em outras circunstâncias que não a abordada pela pesquisa, são muito encontradas nas bases de patentes. A maior frequência de classificação é aquela relacionada com odontologia, medicina e higiene. Estão relacionadas, em sua maioria, com necessidades humanas, conforme aponta a Classificação Internacional de Patentes. A classificação A61K é relacionada com curativos e substâncias para uso cirúrgico.

Também não foram encontradas patentes que utilizem o Óxido de Zinco e Eugenol com a adição da Piperina. Isso mostra que embora reconhecidos os aspectos curativos das substâncias, o tema da pesquisa ainda é um campo pouco explorado, resultando na possibilidade de criação de um produto relativamente novo no mercado. Pode-se concluir nas buscas de patentes que o uso da Piperina é amplo e frequente, no entanto, na combinação com o ZOE, encontrou-se uma oportunidade de inovar com o desenvolvimento de pesquisas específicas para compreender a viabilidade dessa nova composição.

Referências

BERALDO, C. *et al.* Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 436-440, out.-dez. 2013. e-ISSN 1983-4063.

CARDOSO, J. F. R. *et al.* Avaliação do efeito tóxico da Piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) em camundongos. **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida**, Seropédica, RJ: EDUR, v. 25, n. 1, p. 85-91, jan.-jun., 2005.

CARNEVALLI, D. B.; *et al.* Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. **Uniciências**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 41-46, 2013.

CHAUDHRY, N. M.; TARIQ, P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. **Pak J. Pharm. Sci.**, [S.l.], v.19, n. 3, p. 214-218, 2006.

DOGRA, R. K. S. *et al.* Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, [S.l.], 196, p. 229-236, 2004.

EMBRAPA. **Manual segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino**. Brasília: Embrapa, 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/111882/manual-de-boas-praticas-agricolas-e-sistema-appcc>. Acesso em: 30 jan. 2019.

EMBRAPA. **Treinamento marca início da safra de pimenta-do-reino no Pará**. Brasília: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/25748910/treinamentomarca-inicio-da-safra-de-pimenta-do-reino-no-para>. Acesso em: 11 fev. 2019.

- ESPACENET. [Base de dados – Internet]. European Patent Office. 2019. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- FERREIRA, W. S. *et al.* Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Rev. Virtual Quim.**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 208-224, 2012.
- GAGINI, T. B. *et al.* Oral administration of piperine for the control of aflatoxin intoxication in rats. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], n. 41, p. 345-348, 2010. ISSN 1517-8382.
- HE, L. H.; PURTON, D. G.; SWAIN, M. V. A suitable base material for composite resin restorations: Zinc oxide eugenol. **Journal of dentistry**, [S.l.], n. 38, p. 290-295, 2010.
- INPI – INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. [Base de dados – Internet]. 2019. Disponível em: [https:// http://www.inpi.gov.br/](https://http://www.inpi.gov.br/). Acesso em: 11 jan. 2019.
- KHAN, S. *et al.* Development of RAPD markers for authentication of *Piper nigrum* (L.). **Environ We Int J Sci Tech**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 47-56, 2010.
- LEE, E. B.; SHIN, K. H.; WOO, W. S. LD50 of piperine. **Arch. Pharmacol. Rev.**, [S.l.], v. 7, p. 127130, 1984.
- Li, H. Y. *et al.* Eugenol inhibits ATP-induced P2X currents in trigeminal ganglion neurons. **Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, [S.l.], n. 12, p. 315-321, 2008.
- MORTAZAVI, M.; MESBAHI, M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. **International Journal of Paediatric Dentistry**, [S.l.], n. 14, p. 417-424, 2004.
- MOURA, I. R. de; RABELLO, T. B.; PEREIRA, K. F. A influência do eugenol nos procedimentos adesivos. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 1, p. 28-32 jan.-jun. 2013.
- MUJUMDAR, A. M. *et al.* Antiinflammatory activity of piperine. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, [S.l.], v. 43, p. 95-100, 1990.
- NOGUEIRA, A. L. *et al.* Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. **Rev. Matéria Suplemento**, [S.l.], artigo e-11912, 2017. ISSN 1517-7076.
- OLIVEIRA, R. G. de; ALENCAR-FILHO, E. B.; VASCONCELOS, M. L. A. A. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. **Quím. Nova [on-line]**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 69-73, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422014000100013>. Acesso em: 12 dez. 2019.

- PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. **Int. Immunopharmacology**, [S.l.], n. 4, p. 1.795-1.803, 2004.
- REDDY, S. V. *et al.* Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, [S.l.], n. 11, p. 697-700, 2004.
- REN, C.; LIANG, Z. Piperine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury by downregulating microRNA-127 in murine chondrogenic ATDC5 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], n. 103, p. 947-954, 2018.
- SELVENDIRAN, K. *et al.* Preliminary study on inhibition of genotoxicity by piperine in mice. **Fitoterapia**, [S.l.], v. 76, issues 3-4, p. 296-300, June, 2005.
- SILVA, M. J. A. **Lipozyme TL IM como catalisador na síntese de acetato de eugenila via acetilação do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) em sistema livre de solvente**. 2014. 87 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) PPGEA. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2014.
- USPTO. [Base de dados – Internet]. United States Patent and Trademark Office. 2019. Disponível em: <https://www.uspto.gov/>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- VINHA, M. B.; LIMA, I. de M.; SECUNDINO, W. Contaminantes que comprometem a segurança da pimenta-do-reino ao longo de sua cadeia produtiva. **Incaper em Revista**, Vitória, v. 8, p. 55-67, jan.-dez., 2017. ISSN 2179-5304.
- WANG-SHENG, C. *et al.* Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, [S.l.], v. 42, p. 44-48, jan. 2017.
- ZARAI, Z. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT-Food Science and Technology**, [S.l.], v. 50, p. 634-641, 2013.

Sobre os Autores

Humbérila da Costa e Silva Melo

E-mail: humberila@hotmail.com

Especialista em Educação Ambiental – IBPEX. Mestranda do Programa de Pós-Graduação Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal – UECE.

Endereço profissional: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Rua Projetada, s/n, Uberaba, Oeiras, PI. CEP: 64500-000.

Robson Almeida Borges de Freitas

E-mail: robson.freitas@ifpi.edu.br

Mestre em Tecnologias e Gestão para Educação a Distância – UFRPE. Doutorando em Ciência da Propriedade Intelectual pela UFS.

Endereço profissional: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Rua Projetada, s/n, Uberaba, Oeiras, PI. CEP: 64500-000.

José Luiz Silva Sá

E-mail: zeluzquimica@gmail.com Doutor em Química pela USP.

Endereço profissional: Universidade Estadual do Piauí, Rua João Cabral de 1295/1296 ao fim, Matinha, Teresina, PI. CEP: 64002-150.

Antônio Martins de Oliveira Júnior

E-mail: amartins.junior@gmail.com

Doutor em Engenharia Química pela UFRJ.

Endereço profissional: Universidade Federal de Sergipe, Reitoria, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos. Av. Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE. CEP: 49100-000.

Daniel Cabral Leão Ferreira

E-mail: danielclf@hotmail.com

Graduado em Medicina Veterinária pela UFPI. Mestrando do Programa de Pós-Graduação Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal pela UECE.

Endereço profissional: Faculdade de Ciências Médicas, Rua José dos Santos e Silva, centro, Teresina, PI. CEP: 64000-000.

ANEXO C - Artigo publicado à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

O anexo C apresenta o artigo submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (ISSN - 1678-8060), conforme as normas estabelecidas pelo programa. A revista possui Qualis B1 em biotecnologia (Qualis 2013-2016) e Qualis A2, sem extrato, conforme nova proposta da Capes para classificação.

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE PIPERINA NA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ZOE: ZOE/PIPERINA UMA NOVA PROPOSTA DE CIMENTO ODONTOLÓGICO.

Humbérila da Costa e Silva Melo – humberila@ifpi.edu.br

*Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (mestrado) -
Universidade Estadual do Ceará; Instituto Federal do Piauí*

José Luiz Silva Sá – zeluizquimica@gmail.com

*Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal - Universidade Estadual
do Ceará; Universidade Estadual do Piauí- UESPI*

Francisca Lúcia Lima – karnauba@gmail.com

Programa de Mestrado Profissional em Biologia (PROFBIO) - Universidade Estadual do Piauí - UESPI

Robson Almeida Borges de Freitas – robson.freitas@ifpi.edu.br

*Programa de Pós-graduação em Ciência da Propriedade Intelectual – Universidade Federal de
Sergipe; Instituto Federal do Piauí*

Antônio Martins de Oliveira Junior – amartins.junior@gmail.com

*Programa de Pós-graduação em Ciência da Propriedade Intelectual – Universidade Federal de
Sergipe*

Iron Jonhson de Araújo Veras – ironjonhson@gmail.com

Bacharelado em Ciências Biológicas – Universidade Estadual do Piauí – UESPI

RESUMO

A piperina é a principal amida alcaloide extraída das sementes de *Piper nigrum* L., (pimenta-preta) e apresenta propriedades biológicas do tipo: antimicrobiana, anti-inflamatória, biodisponibilidade de fármacos. Óxido de Zinco-Eugenol (ZOE) juntos, constituem os conhecidos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, amplamente utilizados na odontologia como curativo temporário. Esse estudo teve como objetivo verificar a ação antimicrobiana da composição a partir de Piperina e ZOE (ZOE/PIP). Para determinar a atividade antimicrobiana, utilizou-se o método de difusão em ágar com perfuração de poços considerando o crescimento de halo de inibição o indicativo de atividade bactericida ou fungicida. Utilizou-se alíquotas de 20 µL de soluções PIP/ZOE com diferentes porcentagens de piperina: 4, 5, 10 e 20%. As cepas de referências utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Candida albicans* ATCC 10231. A concentração de piperina 4% apresentou os maiores halos de inibição quando testadas com as cepas *S. aureus* (26 mm), *E. coli* (24 mm), *P. aeruginosa* (29 mm) e *Cândida albicans* (20 mm). O aumento da concentração de piperina na composição não influenciou os tamanhos dos halos de inibição, exceto para o *S. mutans* que formou halo de 15 mm na composição com 5% de piperina e *Enterococcus* que formou

halos de 14 mm com 5 e 20% de piperina. Sem piperina os melhores resultados de tamanho do halo de inibição para ZOE foram 15,5 mm para o *S. aureus*, 15,4 mm para *E. coli* e 15,1 mm para *P. aeruginosa* além da *Cândida albicans* que formou halo de 15 mm. A composição PIP/ZOE mostrou-se eficiente, em suas diferentes proporções, no combate a microrganismos mais resistentes (*S. aureus*), e nos microrganismos mais comuns na cavidade oral (*S. mutans*, *C. albicans*).

Palavras-chave: Piperina. ZOE. Antimicrobiano.

ABSTRACT

Piperine is the main alkaloid amide extracted from the seeds of *Piper nigrum* L., (black pepper) and has biological properties of the type: antimicrobial, anti-inflammatory, bioavailability of drugs. Zinc-Eugenol Oxide (ZOE) together, constitute the well-known cements based on zinc oxide and eugenol, widely used in dentistry as a temporary dressing. This study aimed to verify the antimicrobial action of the composition from Piperine and ZOE (ZOE/PIP). To determine the antimicrobial activity, the agar diffusion method with well drilling was used considering the growth of the inhibition halo, indicative of bactericidal or fungicidal activity. Aliquots of 20 μ L of PIP / ZOE solutions with different percentages of piperine were used: 4, 5, 10 and 20%. The reference strains used were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Candida albicans* ATCC 10231. The concentration of piperine with 4% showed the highest inhibition concentration the strains *S. aureus* (26 mm), *E. coli* (24 mm), *P. aeruginosa* (29 mm) and *Cândida albicans* (20 mm). The increase in the concentration of piperine in the composition did not influence the sizes of the inhibition halos, except for *S. mutans* that formed a 15 mm halo in the composition with 5% piperine and *Enterococcus* that formed 14 mm halos with 5 and 20% piperine. Without piperine, the best results for the size of the inhibition zone for ZOE were 15,5 mm for *S. aureus*, 15,4 mm for *E. coli* and 15,1 mm for *P. aeruginosa* in addition to *Candida albicans*, which formed a 15 mm. The PIP / ZOE composition proved to be efficient, in its different proportions, in combating more resistant microorganisms (*S. aureus*), and in the most common microorganisms in the oral cavity (*S. mutans*, *C. albicans*).

Keywords: Piperine. ZOE. Antimicrobial.

INTRODUÇÃO

O uso de substâncias extraídas de plantas para combater doenças causadas por microrganismos tem sido cada vez mais importante a medida em que os antibióticos tradicionais estão se tornando menos eficazes e também pelo surgimento de novos tipos de doenças. Extraída pela primeira vez em 1877 e sintetizada em 1882 (RODRIGUES e SILVA, 2010), a piperina é a substância responsável pelo sabor picante da pimenta-do-reino. É a mais abundante e uma das principais amidas alcalóides que é encontrada na espécie *Piper nigrum* L. popularizada como pimenta-preta ou pimenta-do-reino (BOMTEMPO, 2007; PISSINATEM, 2006 apud CARNEVALLI, 2013). Foi introduzida no Brasil pelo estado da Bahia no século XVII trazida por escravos (EMBRAPA, 2004). Segundo a Associação dos exportadores, o Brasil está entre os quatro países que mais produzem e exportam pimenta-do-reino, em 2016 foram 45 mil toneladas, dado que difere do IBGE que aponta uma produção de 54 mil toneladas (EMBRAPA, 2017).

A estrutura molecular apresentada pela piperina justifica suas características, pois assim como outras amidas alcalóides ela apresenta diversas atividades biológicas: ação inseticida (DAS et al. 1996), antipirética, analgésica, anti-inflamatória (LEE et al. 1984; MUJUNDAR et al. 1990; STÖHR et al. 2001 apud CARDOSO, 2005), prolonga a ação de certas drogas no organismo, por inibição do metabolismo das mesmas a nível hepático (ATAL et al. 1985; BANO et al. 1991; SHOBA et al. 1998; KARAN et al., 1999), antiparasitária (KAPIL, 1993; GHOSHAL et al, 1996; RIBEIRO et al. 2004), antimicrobiana (REDDY et al. 2004) e biodisponibilidade de fármacos (CHAUDHRY e TARIQ, 2006; KHAN et al. 2010; SIMAS et al. 2007 apud CARNEVALLI, 2013).

Enquanto que a utilização da mistura entre Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE) é feita por profissionais na odontologia como material de enchimento temporário, bactericida e no auxílio da desinflamação de dentes careados e foi recomendada desde 1930 por Sweet, sendo bastante utilizado especialmente desde meados da década de 1980 (Mortazavi & Mesbahi, 2004). Esse tipo de material é de suma importância na odontologia porque garante a manutenção da assepsia, tratamento microbiano e anti-inflamatório aliado à proteção do dente ao ataque de novos

contaminantes durante o tratamento (HUM, 1986; MERYON, JOHNSON, SMITH, 1988; TROWBRIDGE, EDWALL, PANOPOULOS, 1982; TAI et al, 2002; JUN et al, 2017).

O cimento formado por Óxido de Zinco e Eugenol atende os requisitos biológicos (biocompatibilidade), físicos (resistência mecânica baixa) e fácil manipulação (SOUZA et al., 2000) necessários para que um cimento provisório seja considerado de qualidade e por isso é comumente utilizado para fixação provisória em tratamentos de restauração definitiva na odontologia. Sobre os efeitos antibacterianos, estudos revelam que o ZOE tem bons resultados inibitórios sobre o *Streptococcus mutans*, um dos grandes causadores de cáries dentária, indicando que o material tem potencial para prevenção de cáries secundárias (LI et al, 2008 apud MOURA, RABELLO, PEREIRA, 2013).

O objetivo do presente estudo foi de verificar a ação antimicrobiana da Piperina (PIP) incorporada ao ZOE (Óxido de Zinco e Eugenol), frente às principais cepas de microrganismos encontrados na cavidade bucal. Os ensaios de avaliação antimicrobiana da formulação ZOE/PIP aconteceram pelo método de difusão em ágar com perfuração de poços com diferentes concentrações de PIP

Justifica-se a aplicação desse estudo pela necessidade de desenvolver novas alternativas para a criação de medicamentos de larga utilização, como opção viável e mais eficaz aos medicamentos já existentes. Para tanto, utilizou-se a piperina com o intuito de potencializar a ação do ZOE. A escolha baseou-se nos aspectos descritos na literatura para a piperina, em que relatam-se suas características potencializadora de fármacos e por ser uma substância antimicrobiana.

METODOLOGIA

2.1 Manipulação para produção do ZOE/PIP

As manipulações necessárias para produzir a formulação ZOE/PIP a partir do óxido de zinco, eugenol e piperina foram realizadas durante o Estágio Obrigatório do Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (MPBiotec), na sede da Farmácia de manipulação Med Pharma em Floriano – PI. A Piperina foi misturada ao ZOE em diferentes proporções: 4, 5, 10 e 20% denominadas P1, P2, P3 e P4, respectivamente. A formulação foi definida tomando por base as proporções

utilizadas para o preparo na rotina de atendimento em consultório odontológico, ou seja, as indicações dos fabricantes.

Em geral o kit de cimento a base de óxido de zinco e eugenol acompanha uma colher dosadora para medida do pó (ZnO) e o eugenol vem em frasco com contagotas. Tomando por base a proporção da massa em porcentagem dos componentes, ZnO (57,15%) e eugenol (42,85%), (que é utilizado para um dente), calculou-se os valores em porcentagem para cada item. Na Tabela 1 estão os valores em porcentagem das formulação utilizadas nesse estudo.

Tabela 1: Valores utilizados nas formulações do ZOE (amostra sem piperina) e ZOE/PIP (P1, P2, P3 e P4 com 4, 5, 10 e 20% de PIP, respectivamente).

Formulação	Porcentagem na mistura (%)		
	ZnO	Eugenol	Piperina
ZOE	57,15	42,85	-
P1	54,87	41,13	4
P2	54,28	40,72	5
P3	51,43	38,57	10
P4	45,72	34,28	20

Fonte: dados da pesquisa (2019)

Com os valores das proporções de cada item, calculou-se a massa necessária para o preparo de 20 mg de cada amostra a ser analisada (ZOE, P1, P2, P3 e P4), respectivamente.

Durante o preparo utilizou-se balança analítica, espátulas, vidro de relógio, placas de Petri, capela de fluxo laminar. Todo material utilizado foi devidamente esterilizado e preparando em ambiente asséptico, conforme preconiza as boas práticas de fabricação, para evitar possíveis contaminações das matérias-primas.

2.2 Análise da atividade antimicrobiana

Em placas de Petri, foi vertido o meio de cultura ágar TSA preparado conforme indicações do fabricante. Após solidificado o meio realizou-se a técnica de perfuração com o uso de um perfurador em cilindro de inox devidamente esterilizado medindo 5

mm de diâmetro para formação de poços onde, posteriormente, depositou-se o composto a ser analisado.

Utilizou-se alíquotas de 20 µL da solução de ZOE/PIP ou ZOE. Os poços foram cobertos por 8 mL de meio de cultura semi-sólido (TSB com 0,8% de agar-agar) com 100 µL da bactéria na concentração 10^8 UFC/mL, padrão de McFarland a 0,5. O sistema foi incubado por 24-48 h em $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ para cepas bacterianas e $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ para a levedura. Como controle positivo utilizou-se o meio de cultura sem a presença do agente antimicrobiano. Não foi realizado controle negativo visto que não existe consenso na literatura quanto ao material ideal para obturação de canais de dentes decíduos (Smaïl-Faugeron et al., 2014). Utilizou-se o ZOE sem adição de piperina para ser o parâmetro comparativo da atividade antimicrobiana influenciada pela adição da piperina na composição. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados como média dos três valores obtidos.

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi considerada aquela concentração do composto capaz de desenvolver halo de inibição do crescimento microbiano maior ou igual a 10 mm de diâmetro. Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram mensurados com paquímetro e calculou-se a média dos diâmetros formados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de difusão é do tipo quantitativo, em que o efeito pode ser graduado e fundamenta-se na difusão da substância a ser testada em um meio de cultura sólido e inoculado com um tipo de microrganismo; este que foi escolhido como técnica para alcançar a análise microbiológica. Com a difusão aparece um halo, no qual não existe o crescimento do microrganismo, portanto denomina-se halo de inibição. Nesse ensaio podem ser utilizados diferentes tipos de reservatórios: discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991).

A atividade antimicrobiana da formulação ZOE/PIP foi avaliada contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas para a determinação dos valores de CIM. O

composto analisado em diferentes concentrações apresentou variação nos graus de atividade antimicrobiana contra a maioria das cepas testadas. Vale ressaltar que, dentre estas, algumas das espécies de microrganismos testadas são comumente encontradas na cavidade oral dos seres humanos, por exemplo *S. mutans*, *Cândida albicans* e *E. coli*.

Na Tabela 2 apresentam-se os valores médios dos halos de inibição dos experimentos realizados nas cepas *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus* e *C. albicans* em presença de ZOE, P1, P2, P3 e P4.

Tabela 2 – Medida dos halos de inibição de crescimento microbiano para as 6 cepas testadas, em presença de ZOE, P1, P2, P3 ou P4 (média das triplicatas em mm).

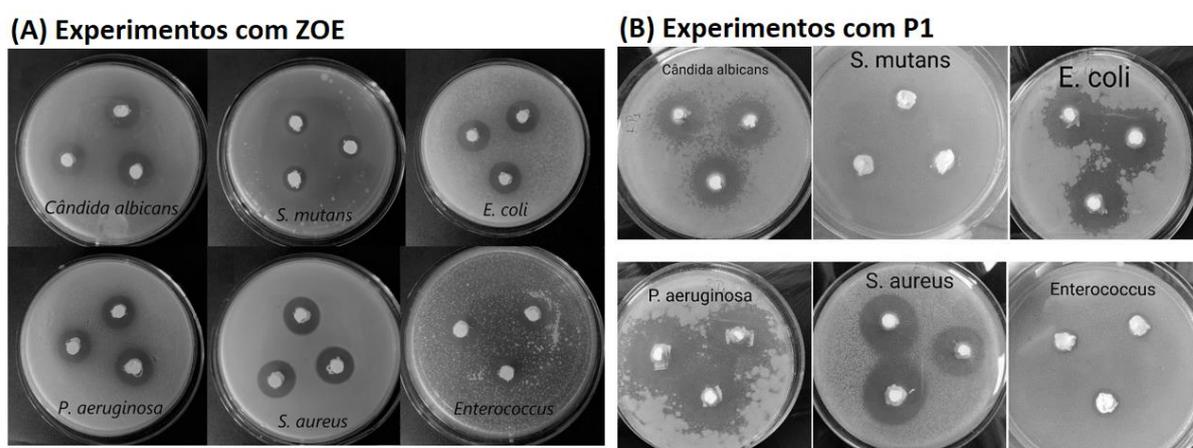
Formulação	Cepas					
	<i>S.aureus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Cândida albicans</i>
	Medida do halo de inibição (mm)					
ZOE	15,5	9,5	15,4	15,1	11,9	15,0
P1	26,0(+10,5)	13,0(+3,5)	24,0(+8,6)	29,0(+13,9)	12,0(+0,1)	20,0(+5,0)
P2	16,3(+0,8)	10,5(+1,0)	16,9(+1,5)	17,3(+2,2)	11,7(-0,2)	14,2(-0,8)
P3	14,9(-0,6)	10,5(+1,5)	17,4(+2,0)	13,8(-1,3)	11,4(-0,5)	14,1(-0,9)
P4	12,3(-3,2)	10,4(+1,4)	12,8(-2,6)	12,2(-2,9)	11,0(-0,9)	12,4(-2,6)

Fonte: Elaborado pelo autor com dados da pesquisa (2020). Valores entre parênteses = valor do halo do experimento com P1,2,3 ou P4 - valor do halo do experimento com ZOE.

Todos os experimentos com aplicação de alguma formulação com piperina (Formulação, Pn, n=1-4) foram comparados com o resultado dos experimentos com aplicação do ZOE. A diferença entre os valores dos halos (Pn-ZOE, resultados entre parênteses, Tabela 2) foram positivos quando os ensaios foram realizados com P1 para todas as cepas estudadas. A medida que a quantidade de piperina foi aumentada

nas formulações, de P1 à P4, os valores desta diferença tornaram-se negativos. Salvo com a cepa *S. Mutans* que os valores permaneceram positivos, porém, menores que P1. Observou-se com P1 o melhor resultado de halo de inibição para *S. aureus* e *P. aeruginosas*, e uma diferença de +0,1 mm em relação ao resultado com ZOE puro, nos testes com *Enterococcus*. Na Figura 1 são apresentadas imagens dos experimentos de Teste de difusão de ágar para as 6 cepas testadas em presença de ZOE puro (A) e P1 (B), respectivamente.

Figura 1: Teste de difusão em ágar com perfuração de poços contra cepas comuns na cavidade oral.



Fonte: Elaborado pelo autor com dados da pesquisa (2020).

Evidenciou-se que o aumento da concentração de piperina na formulação não contribuiu para um aumento na formação dos halos de inibição (Tabela 2). No entanto, vale ressaltar que com o aumento da proporção de piperina no composto não levou a perda excessiva do efeito evidenciado na formação do halo. E nos experimentos com a cepa *S. mutans* e a formulação P4, observou-se maior halo de inibição médio quando comparados ao resultado com ZOE puro, +1,4 mm.

A garantia de sucesso nos tratamentos endodônticos está diretamente associado à eliminação dos microrganismos nos canais radiculares infectados, sendo assim propõe-se a adição de piperina, o principal alcalóide da espécie *Piper nigrum* L. (CARNEVALLI, 2013; BONTEMPO, 2007), ao cimento de óxido de zinco e eugenol (ZOE) para potencializar a ação antimicrobiana, já conferida pelo eugenol, e também

acrescentar ao composto outras atividades biológicas importantes para o tratamento dos efeitos cariogênicos.

Outros estudos na linha de pesquisa apresentada neste artigo têm mostrado que extratos aquosos de *P. nigrum* são eficazes contra cerca de 176 espécies de bactérias que são encontradas na cavidade bucal (Chaudhry e Tariq (2006)). E para as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *Enterococcus* apresentaram halo de inibição com valores de 10,7, 8,0 e 7,5 mm, respectivamente, sendo considerados insatisfatórios, tendo em vista que o valor mínimo deveria ser de 10,0 mm (Zarai et al., (2013)). Comparando com o experimento realizado com a piperina adicionada ao ZOE, as cepas citadas apresentaram melhores valores na formulação P1.

O resultado encontrado com o ZOE puro sobre o *S. mutans* nesse estudo não foi satisfatório com halo de inibição 9,5 mm. No entanto quando adicionado a piperina na composição o halo formado aumentou para até 13,0 mm nos experimentos com P1. O que foi um dos principais resultados encontrados já que, dentre diversos microrganismo encontrados na cavidade bucal, a bactéria *Streptococcus mutans* é considerada um dos principais patógenos que causam a cárie dentária (LEITES et al., 2006).

Apesar de apresentar halo de inibição de 9,5 mm, é importante ressaltar que a literatura destaca do uso do ZOE como principal cimento utilizado na odontologia. Por exemplo, BOECKH et al., 2002 mostrou que o ZOE apresenta o melhor resultado frente ao *S. mutans* comparando com outros materiais restauradores. No entanto, as limitações do uso apenas do ZOE também são abordadas, Freitas, et al. (2008) que ao testar, entre outros, o cimento a base de óxido de zinco e eugenol imediatamente após a polimerização (t0) e após 24H (t1) observou que não manteve a atividade antimicrobiana após 24H do teste. Trazendo à tona a importância de estudos que possam potencializa esta mistura.

CONCLUSÃO

Na literatura vigente discute-se a importância do ZOE na ação antimicrobiana da cavidade bucal, a mistura do ZnO com eugenol gera um cimento odontológico de

fácil manipulação e extremamente bem aceito como principal material de tratamento e restauração provisória de dentes (VÁGULA et al., 2010; RODRIGUES e SILVA, 2010; MOURA, RABELLO, PEREIRA, 2013; SILVA, 2014; NOGUEIRA et al., 2017). Porém, existe um estímulo ao avanço das pesquisas já que, para alguma bactérias como *S. Mutans*, sua ação não é satisfatória.

O mecanismo de ação desta mistura ainda não está completamente elucidado, mesmo em se tratando do mecanismo de ação antimicrobiana apenas do eugenol, que é de óleo essencial já conhecido (BARBOSA, 2010). O que abre espaço para testes de moléculas com antecedentes de ação microbiana em outros tipos de estudo; como a piperina.

Após os estudos desenvolvidos e apresentados neste artigo, pôde-se concluir que a composição ZOE/PIP mostrou-se eficiente no combate a microrganismos existentes na cavidade bucal. Em comparação com outros estudos apresentados na literatura, a formulação do ZOE com piperina mostrou-se equivalente para algumas culturas e superior em outras, e guarda entre si uma dependência em relação à quantidade de piperina. Concluindo-se que 4% desta amida alcaloide.

Portanto, como a piperina é um produto natural atóxico, a composição ZOE/PIP(4%) pode ser utilizada como cimento odontológico de restauração provisória com maior eficiência que o ZOE.

REFERÊNCIAS

- ATAL, C.K.; DUBEY, R.K.; SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. **J Pharmacology and Exp Therapeutics**, v.232, p.258-262, 1985.
- BANO, G. et al. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.41 p. 615-617, 1991.
- BARBOSA, L. N. Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação. 2010. 107 f. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/87782>> Acesso em 10 jan 2020.
- BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaude, 2007.
- 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, Seropédica, RJ: EDUR**, v. 25, n.1, p. 85-91 jan.-jun., 2005.
- CARNEVALLI, D. B. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. **UNICIÊNCIAS**, 2013, v. 17, n. 1, p. 41-46.
- CHAUDHRY, N.M.; TARIQ, P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. **Pak J. Pharm. Sci.**, v.19, n.3, p.214-218, 2006.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12, p. 564-582, 1999.
- DAS, B.P.; CHOWDHURY, D.N.; CHOWDHURY, B.; DAS, G.K.; RAY, T. Studies on some alkaloides for toxicity on larvae of *Culex quinquefascitus*. Indian J. **Environ. Health.**, v. 38, p. 81-85, 1996.

EMBRAPA. **Manual segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino.**

Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65p. Projeto PAS Campo. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/111882/manual-de-boas-praticas-agricolas-e-sistema-appcc>>. Acesso em: 30 Jan. 2019.

EMBRAPA. **Treinamento marca início da safra de pimenta-do-reino no Pará.**

Brasília: Embrapa, 2017. Disponível em: < [https://www.embrapa.br/busca-de-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/25748910/treinamento-marca-inicio-da-safra-de-pimenta-do-reino-no-para)

[noticias/-/noticia/25748910/treinamento-marca-inicio-da-safra-de-pimenta-do-reino-no-para](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/25748910/treinamento-marca-inicio-da-safra-de-pimenta-do-reino-no-para)> Acesso em 11 Fev. 2019

FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T.N.; LOPES, N.D.; de LIMA, M.E.F. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Rev. Virtual Quim.** 2012, 4, 3, 208-224.

FREITAS, A. B. D. A de; SOARES, D.; FIORINI, J. E.; SWERTS, M. S. O.; BARROS, L. M. de. In vitro effect of restorative, cementing and lining materials on *Streptococcus mutans*. **RFO**, v. 13, n. 2, p. 33-38, maio/Agosto, 2008.

GHOSHAL, S. et al. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.50, p.167-170, 1996. Disponível em: . Doi: 10.1016/0378-8741(96)01382-7.

HE, L. H., PURTON, D. G., SWAIN, M. V. A suitable base material for composite resin restorations: Zinc oxide eugenol. **J. Dent.** 2010; 38 (4): 290-5
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.11.009>

HUME, W. R. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol **JADA**, Vol. 113, November, 1986.

JUN S. K, et al. Zirconia-incorporated zinc oxide eugenol has improved mechanical properties and cytocompatibility with human dental pulp stem cells. **Dent Mater** (2017), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.09.021>

KAPIL, A. Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro, **Planta Medica**, 59: 474, 1993.

KARAN, R.S.; BHARGAVA, V.K.; GARG, S.K. Effects of trikatu, an Ayurvedic prescription, on the pharmacokinetic profile of rifampicin in rabbits. **J. Ethnopharmacol.**, v. 64, p. 259-264, 1999.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. de S. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p. 239- 252, 2006.

MERYON, S.D; JOHNSON, S.G; SMITH A. J. Eugenol release and the cytotoxicity of diferente zinc oxide-eugenol combinations. **J. Dent.** 1988; 16:66-70.

MORTAZAVI M, MESBAHI M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. **International Journal of Paediatric Dentistry** 2004; 14:417–424

MOURA, I. R. de; RABELLO, T. B; PEREIRA, K. F. A influência do eugenol nos procedimentos adesivos. **Rev. bras. odontol.**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 1, p. 28-32 jan./jun. 2013.

NOGUEIRA, A.L et al. Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. **Rev Matéria Suplemento**, ISSN 1517-7076 artigo e-11912, 2017.

REDDY, S.V.; SRINIVAS, P.V; PRAVEEN, B.; KISHORE, K.H.; RAJU, B.C.; MURTHY, U.S.; RAO, J.M. Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, 2004, 11, 697-700.

RIBEIRO, T. S., Transformações químicas no alcalóide natural piperina e avaliação da atividade tóxica sobre *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de Mestrado**, UFRuralRJ, 2004.

RODRIGUES, R. da S; SILVA, R. R. A história sob o olhar da química: as especiarias e sua importância na Alimentação humana. **Química Nova na Escola**. Vol. 32, Nº 2, Maio, 2010.

SHOBA, G. et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v.64, p.353-356, 1998.

SILVA, M. J. A. Lipozyme TL IM como catalisador na síntese de acetato de eugenila via acetilação do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) em sistema livre de solvente. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) PPGEA. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 2014.

SMAÏL-FAUGERON, V; COURSON, F; DURIEUX, P; et al.

Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. **Cochrane Database Syst Rev.** 2014 Aug 6;8:CD003220.

SOUZA, A. R., MELLO, F. B., TURBINO, M. L., YOUSSEF, M.N. Influência do eugenol na microdureza da resina composta utilizando sistemas adesivos atuais. **Pesq. Odontol. Bras.** 2000; 14 (3): 237-42.

TAI et al. Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an in vitro mammalian test system. John Wiley & Sons, Inc. **J Biomed Mater Res** 59: 73–77, 2002

THOROSKI, J., BLANK, G., BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, 52, n.6, p.399–403, 1989.

TROWBRIDGE H; EDWALL L; PANOPOULOS P. Effect of zinc oxide-eugenol and calcium hydroxide on intradental nerve activity. **Journal of Endodontics** ~ Vol 8, Nº 9, September, 1982

VÁGULA, M. P; PEDOTT, M.M; GUIMARÃES, M.R.F de S.G; ALEIXO, R.Q; BORRÉ, M.A.M. Avaliação da ação antimicrobiana dos materiais seladores temporários utilizados pelos cirurgiões dentistas de Ouro Preto do Oeste – RO. **Saber Científico Odontológico**, Porto Velho, 1(1): 21-30, jul./dez., 2010.

VANDEN BERGHE, D.A. & VLIETINCK, A.J. p.47–69. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M. & HARBONE, J.D. (eds), *Methods in Plant Biochemistry*, **Academic Press**, London, 1991.

ZARAI, Z; SAYARI, A; BOUJELBENE, E; SALEM, B. N; GARGOURI, Y. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT-Food Science and Technology**. v. 50, p. 634-641, 2013.