



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

CURSO DE ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

TAIRA ENDI DE FLAVIANO ALBUQUERQUE

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DA PIPERINA PROVENIENTE DA
PIPER NIGRUM.**

FORTALEZA

2020

TAIRA ENDI DE FLAVIANO ALBUQUERQUE

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DA PIPERINA PROVENIENTE DA
PIPER NIGRUM.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas do Centro Universitário Christus, como um dos requisitos exigidos para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jiovane Rabelo Neri

Coorientadora: Profa. Dra. Bruna Marjorie Dias Frota de Carvalho

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Centro Universitário Christus - Unichristus
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A345

Albuquerque, Taira Endi de Flaviano.

Extração, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano e antioxidante da piperina proveniente da Piper Nigrun / Taira Endi de Flaviano Albuquerque. - 2020.

53 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus - Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Jiovanne Rabelo Neri.

Coorientação: Profa. Dra. Bruna Marjorie Dias Frota de Carvalho.

1. Clareamento dental. 2. Antioxidantes. 3. Piper nigrun. 4. Antibacterianos. 5. Antifúngicos. I. Título.

CDD 617.6

TAIRA ENDI DE FLAVIANO ALBUQUERQUE

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DA PIPERINA PROVENIENTE DA
PIPER NIGRUM.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas do Centro Universitário Christus, como requisito para a obtenção do título de mestre em Odontologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jioavanne Rabelo Neri (orientador)
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Profa. Dra. Cecília Atem Gonçalves de Araújo Costa
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Lívia de Oliveira Barros
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Dedico este trabalho ao meu pai, Carlos Flaviano (in memoriam) e a todos os meus familiares, que sempre me apoiaram, dando-me o suporte necessário para concluir a realização de mais um sonho. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, sempre presente e enchendo de bênçãos minha vida. Sem Ele, nada seria possível.

Aos meus pais, **Flaviano e Núbia**, minha gratidão por todo amor, apoio, dedicação, ensinamentos e incentivos na minha vida. Vocês são minha base e maiores exemplos.

Ao meu marido, **Diego**, pela parceria, por entender minhas dificuldades e me dar todo o apoio necessário para superá-las, me encorajando e cuidando da nossa família.

Ao meu filho, **Murilo**, por todos os sorrisos e abraços dados quando precisei, por me presentear com o mais puro amor e por ser a razão de tudo na minha vida.

Às minha irmãs, **Uaira e Raíra**, maiores presentes que eu poderia ganhar na vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jiovane Rabelo Neri**, por todo o aprendizado, por compartilhar de forma tão generosa seus ensinamentos, pela confiança e oportunidade, pela paciência e palavras de apoio, por ser um exemplo de profissional e inspiração, não só para mim, mas para todos com quem convive. Sempre serei grata.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Bruna Marjorie Dias Frota de Carvalho**, pela amizade, disponibilidade e por todo o empenho e colaboração para engrandecer este trabalho.

Aos meus **colegas de mestrado**, turma querida, por suas risadas e brincadeiras que fez com que tudo ficasse mais leve. Os levarei sempre comigo.

À todos os **professores** do curso de Mestrado em Ciências Odontológicas do **Centro Universitário Christus**, obrigada pela dedicação e pela contribuição na minha formação acadêmica.

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO)** pelas oportunidades adquiridas durante essa pós-graduação, em especial por me permitir usar seu laboratório, local imprescindível para a realização desse projeto.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”

(Augusto Cury)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi realizar a extração da piperina, proveniente da *Piper nigrum*, avaliar sua atividade antimicrobiana e seu efeito antioxidante quando usado como pré-tratamento de cimento resinoso auto-adesivo unido ao esmalte clareado. A extração da piperina foi realizada através do sistema de refluxo de água e confirmada por espectrofotometria UV-Vis. Doze fragmentos de esmalte foram divididos em 6 grupos (n=2), de acordo com o tratamento do esmalte e tempo de cimentação: Sem peróxido de hidrogênio 35% (PH) (grupo controle); PH + cimentação imediata; PH + cimentação após 7 dias; PH + piperina 0,001%; PH + piperina 0,002% e PH + piperina 0,004%. Com exceção do grupo sem PH, todos os outros fragmentos foram submetidos ao clareamento. Os fragmentos foram reumidificados com a solução de piperina destinada para cada grupo e posterior cimentação de blocos confeccionados de resina composta, utilizando cimento auto-adesivo. Após a cimentação, os blocos foram imediatamente seccionados em fatias. Para a determinação do grau de conversão, foi realizada 1 leitura em cada espécime através de um espectrômetro micro Raman. Para determinação da ação antifúngica (*Candida albicans*) e antibacteriana (*Streptococcus mutans*) foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo preconizada pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (documento M27-A2). As concentrações das soluções dos extratos diluídos foram: 0,004%, 0,002%, 0,001%, 0,0005% e 0,00025% de piperina, que foram comparadas com os grupos controles. O rendimento da extração da piperina foi de 92,86% e sua pureza foi de 99,9%. O PH + cimentação imediata apresentou o menor grau de conversão quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos Sem PH, PH + cimentação após 7 dias; PH + 0,001% piperina, PH + 0,002% piperina; PH + 0,004% piperina ($p > 0,05$). A concentração bactericida mínima (CBM) comprovou ação antimicrobiana ($p < 0,05$) na concentração de 0,004% (08 ± 0.2 UFC/mL) em relação ao controle negativo, sem tratamento, (321 ± 2.5 UFC/mL), e ao controle positivo com uso de clorexidina 0,12% (3.2 ± 0.1 UFC/mL). A concentração fungicida mínima (CFM) comprovou redução de colônias na concentração de 0,004%, quando comparado aos demais grupos e controles. É possível concluir que a piperina apresentou capacidade antifúngica e antibacteriana e evitou a redução do grau de conversão de um cimento resinoso auto-adesivo aplicado em esmalte clareado com peróxido de hidrogênio a 35%.

Palavras-Chave: Clareamento dental. Antioxidantes. *Piper nigrum*. Antibacterianos. Antifúngicos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to perform the extraction and characterization of piperine, from *Piper nigrum*, to evaluate its antimicrobial activity and its antioxidant effect in a self-adhesive resin cement joined to the bleached enamel. The extraction of piperine was performed through the water reflux system and confirmed by UV-Vis spectrophotometry. Eighteen enamel fragments were divided into 6 groups, according to the antioxidant solution used: Without hydrogen peroxide (PH), control group; PH + immediate cementation; PH + cementation after 7 days; PH + piperine 0.001%; PH + piperine 0.002% and PH + piperine 0.004%. With the exception of the group without PH, all other fragments were subjected to whitening. The fragments were re-moistened with the piperine solution destined for each group and later cemented blocks made of composite resin, using self-adhesive cement. After cementation, the blocks were cut into slices. To determine the degree of conversion, 1 reading was performed on each specimen using a micro Raman spectrometer. To determine the antifungal (*Candida albicans*) and antibacterial (*Streptococcus mutans*) action, the broth microdilution technique recommended by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), document M27-A2, was used. The concentrations of the solutions of the diluted extracts were: 0.004%, 0.002%, 0.001%, 0.0005% and 0.00025% of piperine, which were compared with the control groups. The yield of piperine extraction was 92.86% and its purity was 99.9%. PH + immediate cementation showed the lowest degree of conversion when compared to the other groups ($p < 0.05$). There was no statistical difference between the groups without PH, PH + cementation after 7 days; PH + 0.001% piperine, PH + 0.002% piperine; PH + 0.004% piperine ($p > 0.05$). The minimum bactericidal concentration (CBM) proved antimicrobial action ($p < 0.05$) in the concentration of 0.004% (08 ± 0.2 UFC / mL) in relation to the negative control, without treatment (321 ± 2.5 UFC / mL), and the positive control using 0.12% chlorhexidine (3.2 ± 0.1 CFU / mL). The minimum fungicidal concentration (CFM) showed a reduction of colonies in the concentration of 0.004%, when compared to the other groups and controls. It is possible to conclude that the piperine showed antifungal and antibacterial capacity and avoided the reduction of the degree of conversion of a self-adhesive resin cement applied in a clear enamel with 35% hydrogen peroxide.

Keywords: *Piper nigrum*. Tooth Bleaching. Anti-Bacterial Agents. Antioxidants. Antifungal Agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Frutos frescos (a) e moídos (b) da Piper nigrun. Estrutura química da Piperina (c). Cristais de piperina após extração e caracterização (d)	15
Figura 2 – Espectro UV-Vis da piperina	32
Figura 3 – Espectro de RMN da piperina	33
Figura 4 - Protocolos terapêuticos realizados no experimento de MIC e os dados numéricos obtidos pelo Teste ELISA.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenho experimental	28
Tabela 2 - Valores de grau de conversão <i>in situ</i> (média \pm desvio padrão), de acordo com tratamento usado.	33

SUMÁRIO

1. Introdução geral	14
2. Objetivos	19
a. Objetivo geral	19
b. Objetivos específicos	19
3. Capítulo	20
4. Conclusão geral	46
5. Referências	47
6. Anexos	52

1. INTRODUÇÃO GERAL

O surgimento dos antibióticos, produzidos através da fermentação microbiana e os de origem sintética, causaram um declínio no interesse da indústria farmacêutica pela pesquisa de plantas medicinais (MONTARANI, BOLZANI, 2001). Contudo, nas últimas décadas, devido a uma mudança nos paradigmas da sociedade moderna, os produtos de origem vegetal voltaram a ocupar um papel de destaque nas pesquisas. (MONTARANI, BOLZANI, 2001)

O reino vegetal tem contribuído de forma significativa para o fornecimento de moléculas úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (QUIJIA, CHORILLI, 2020; PHILLIPSON, ANDERSON, 1989). Detentores de um mercado extremamente lucrativo, os fitofármacos, redirecionaram o foco da indústria farmacêutica para produtos de origem vegetal (MONTARANI, BOLZANI, 2001; SHARAFEDDIN, FARSHAD, 2015).

A pimenta do reino (*Piper nigrum*) é uma das espécies de arbustos e ervas da família *Piperaceae* que possui vários usos medicinais e tem despertado interesse científico há quase duzentos anos (MARQUES et al., 2010; PARTHASARATHY; CHEMPAKAM; JOHN ZACHARIAH, 2008). Nativa da região costeira da Índia e, amplamente, distribuída em regiões tropicais, a *Piper nigrum* é uma planta de grande valor econômico, pois é considerada um dos condimentos mais valorizados no mundo (BUTT et al. 2013; LOURINHO et al. 2014). A grande atenção científica destinada a pimenta do reino é devido a sua composição química, onde estão presentes substâncias com elevado potencial para o desenvolvimento de fármacos, como por exemplo, agentes antimicrobianos e antioxidantes (QUIJIA, CHORILLI, 2020).

A piperina (N-[5(1,3-benzodioxola-4-il-1-oxo-penta-2E,4E-dienil)]piperidina) é um alcalóide nitrogenado derivado da piperidina, e é principal componente ativo presente

na *Piper nigrum* (PARMAR et al. 1997; SRINISAVAN, 2007; FERREIRA et al. 2012). A estrutura química da piperina é composta por três subunidades: 1) um grupo 1,3-benzodioxola, também chamado núcleo piperonal (subunidade A); 2) uma cadeia de ácido pentadienóico (subunidade B) e um grupamento amina constituída de um anel de piperidina (subunidade C) (Figura 1) (FERREIRA et al., 2012). A maior ocorrência da piperina se dá nos frutos secos, e o rendimento da extração pode chegar à 7%, tornando a pimenta do reino uma fonte renovável desta substância (IKAN, 1991; FERREIRA et al., 2012).



Figura 1. Frutos frescos (a) e moídos (b) da *Piper nigrum*. Estrutura química da Piperina (c). Cristais de piperina após extração e caracterização (d). (FERREIRA et al., 2012)

Pesquisas indicaram que a piperina possui vários efeitos farmacológicos e excelentes propriedades terapêuticas já comprovadas, incluindo atividade antiparasitária (KAPIL, 1993), antipirética e analgésica (PARMAR et al. 1997), antiinflamatória (BAE et al. 2010), contraceptiva e antiespermatogênica (MALINI et al. 1999), inseticida (SRINIVASAN, 2007), imunomoduladora e anticarcinogênica (SUNILA, KUTTAN, 2004; ABOUITAH et al., 2020).

Os produtos naturais parecem representar, também, novos caminhos para o tratamento de doenças infecciosas (Saleem et al., 2010). Neste sentido, a piperina tem demonstrado atividade antimicrobiana frente a diversos tipos de agentes patógenos (ZARAI et al., 2012; MIRZA et al., 2011; CHAUDHRY, TARIQ, 2006; SHARMA et al., 2014). Este alcaloide mostrou considerável poder antibacteriano contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enterica*) (ZARAI et al., 2012). Segundo Chaudhry e Tariq (2006), o extrato obtido da *Piper nigrum* mostrou eficácia contra 176 espécies de bactérias isoladas na cavidade bucal, pertencentes a 12 gêneros distintos, como o *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (CHAUDHRY, TARIQ, 2006). Adicionalmente, durante a bioprospecção de compostos antifúngicos de espécies da família *Piperaceae*, a piperina apresentou atividade significativa contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (MARQUES et al., 2010). Embora, a piperina seja muito estudada, o conhecimento sobre a ação deste alcaloide contra *Streptococcus mutans* e a *Candida albicans* ainda pode ser considerado escasso, daí a importância de mais pesquisas na área.

Além da ação antimicrobiana, a piperina possui outras atividades biológicas e farmacológicas que podem ser de interesse na área médica (QUIJIA, CHORILLI, 2020). A atividade antioxidante da piperina foi demonstrada, em experimentos, ao impedir danos celulares provenientes do estresse oxidativos, através da inativação de radicais livres e formas reativas de oxigênio (MITTAL e GUPTA, 2000; SELVENDIRAN et al., 2004; VERMA et al., 2020). O uso da piperina pode ser uma alternativa para reduzir os danos causados pelo estresse oxidativos em patologias como o câncer e o diabetes

(SRINIVASAN, 2007; ZADOROZHNA, TATARANNI, MANGIERI, 2019; KAUR, INVALLY, CHINTAMANENI, 2016).

Por outro lado, o efeito antioxidante da piperina ainda não foi avaliado no contexto da Odontologia, onde um dos problemas frequentemente encarados é o impedimento da confecção de restaurações estéticas imediatamente após ao procedimento de clareamento dentário (SOUZA-GABRIEL et al., 2020). As substâncias comumente usadas no clareamento dental são à base de peróxido de hidrogênio, um forte agente oxidante, que ao entrar em contato com os tecidos orais, se dissocia em água e oxigênio (O₂) (NARI-RATIH; WIDYASTUTI, 2019). Os radicais livres (oxigênio e hidrogênio) gerados nessas reações químicas de oxidação e redução quebram as macromoléculas de pigmentos em moléculas cada vez menores e opticamente mais claras (CHEN; XU; SHING, 1993). Entretanto, o oxigênio oriundo do clareamento inibe a polimerização de materiais resinosos, através da formação de radicais superóxidos que impedem a propagação da cadeia poliméricas destes materiais (PEGORARO et al. 2011).

Estudos apontam que um intervalo seguro para realização dos procedimentos adesivos após clareamento seria entre uma a três semanas (NAIR et al. 2019; ARUMUGAM et al. 2014). Contudo, em alguns casos, o paciente não pode esperar todo esse tempo para realizar os ajustes estéticos, como a troca de restaurações, diretas e indiretas, reanatomizações dentárias, fechamento de diastemas, cimentação de laminados cerâmicos, dentre outros. Portanto, a fim de evitar o atraso no tratamento restaurador, várias pesquisas têm proposto o uso de agentes antioxidantes após o procedimento clareador (COPPLA et al. 2019; NAIR et al. 2019; NARI-RATIH; WIDYASTUTI, 2019).

A aplicação de antioxidantes em substratos clareados tem o potencial de remover os radicais livres de oxigênio oriundo do clareamento, e evitar a redução do grau de

conversão dos monômeros de materiais poliméricos, como sistemas adesivos ou cimentos resinosos. Desta forma, o procedimento reabilitador poderia ser executado imediatamente após o clareamento (COPPLA et al. 2019; NAIR et al. 2019; NARI-RATIH; WIDYASTUTI, 2019).

Portanto, mais pesquisas com a piperina extraída da *Piper nigrum* são necessárias devido ao seu grande potencial de uso na Odontologia e em outras áreas das ciências médicas. Resultados promissores deste agente em testes laboratoriais podem, no futuro, sugerir ou influenciar o desenvolvimento de novos fármacos, produtos médicos, protocolos restauradores e condutas clínicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Extrair e avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante da piperina proveniente da *Piper nigrum*

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a extração da piperina a partir de sementes de pimenta do reino (*Piper nigrum*) através de uma coluna de HPLC e teste de infravermelho.
- Avaliar o potencial antimicrobiano da piperina frente às cepas de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, através de teste de concentração inibitória mínima, concentração fungicida mínima e concentração bactericida mínima.
- Avaliar o efeito antioxidante do pré-tratamento com a piperina extraída na *Piper nigrum* e em diferentes concentrações (0,001%, 0,002% e 0,004%) no grau de conversão de um cimento resinoso auto-adesivo aplicado em esmalte clareado.

3 CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no regimento interno do Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Odontológicas do Centro Universitário Christus, que regulamenta o formato alternativo para dissertação de mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato. O projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da Unichristus, tendo sido aprovado sob o protocolo nº 003/18 (Anexo A). Assim sendo, esta dissertação é composta de um capítulo contendo um artigo científico que será submetido para publicação no periódico “Journal of Functional Biomaterials” conforme descrito abaixo:

Extração, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano e antioxidante da piperina proveniente da *Piper nigrum*.

Albuquerque, TEF; Carvalho, BMDF; Lemos, MVS; Silva, WMB; Santiago, SL; Rolim, JPML; Neri, JR

Extração, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano e antioxidante da piperina proveniente da *Piper nigrum*.

Autores:

Taira Endi de Flaviano Albuquerque^a

Bruna Marjorie Dias Frota de Carvalho^b

Marcelo Victor Sidou Lemos^c

Wildson Max Barbosa da Silva^d

Sérgio Lima Santiago^e

Juliana Paiva Marques Lima Rolim^f

Jiovanne Rabelo Neri^{g*}

Filiações:

a Aluna de mestrado, Curso de graduação em Odontologia, Centro Universitário Christus (Unichristus), Fortaleza, Ceará, Brasil.

b Professora, Curso de graduação em Odontologia, Centro Universitário Christus (Unichristus), Fortaleza, Ceará, Brasil.

c Professor, Curso de graduação em Odontologia, Universidade de Fortaleza (Unifor), Fortaleza, Ceará, Brasil; Aluno de doutorado, Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil.

d Professor, Curso de graduação em Biomedicina, Centro Universitário Christus (Unichristus), Fortaleza, Ceará, Brasil.

e Professor, Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil.

f Professora, Curso de graduação em Odontologia, Centro Universitário Christus (Unichristus), Fortaleza, Ceará, Brasil

g Professor, Curso de graduação em Odontologia, Centro Universitário Christus (Unichristus), Fortaleza, Ceará, Brasil; Professor, Curso de graduação em Odontologia, Universidade de Fortaleza (Unifor), Fortaleza, Ceará, Brasil;

*Autor de correspondência:

Jiovanne Rabelo Neri

Rua João Adolfo Gurgel, 133 – Cocó

60190-060

Fortaleza, CE - Brasil

E-mail: jiovanne@hotmail.com

Fax: +55853265-8100

RESUMO

Objetivo: Realizar a extração da piperina, proveniente da *Piper nigrum*, avaliar sua atividade antimicrobiana e seu efeito antioxidante em um cimento resinoso auto-adesivo unido ao esmalte clareado. **Métodos:** A extração da piperina foi feita através de um sistema de refluxo e confirmada por meio de espectrofotometria UV-Vis. Para testar seu efeito antioxidante, foram utilizados 12 fragmentos de esmalte (6 grupos, n=2) e feito o teste do grau de conversão com o espectrômetro micro Ramam. Para avaliação das atividades antifúngica (*C. albicans*) e antibacteriana (*S. mutans*), in vitro, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo preconizada pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), documento M27-A2. **Resultados:** O rendimento da extração da piperina foi de 92,86% e sua pureza foi de 99,9%. O grupo peróxido de hidrogênio 35% (PH) + cimentação imediata apresentou o menor grau de conversão quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos Sem PH, PH + cimentação após 7 dias; PH + 0,001% piperina, PH + 0,002% piperina; PH + 0,004% piperina ($p > 0,05$). A concentração bactericida mínima (CBM) comprovou ação antimicrobiana ($p < 0,05$) na concentração de 0,004% ($8 \pm 0,2$ UFC/mL) em relação ao controle negativo, sem tratamento, ($321 \pm 2,5$ UFC/mL), e ao controle positivo com uso de clorexidina 0,12% ($3,2 \pm 0,1$ UFC/mL). A concentração fungicida mínima (CFM) comprovou redução de colônias na concentração de 0,004%, quando comparado aos demais grupos e controles. **Conclusão:** a piperina apresentou capacidade antifúngica e antibacteriana e evitou a redução do grau de conversão de um cimento resinoso auto-adesivo aplicado em esmalte clareado.

Palavras-Chave: Clareamento dental. Antioxidantes. *Piper nigrum*. Antibacterianos. Antifúngicos.

ABSTRACT

Objective: Perform the extraction and characterization of piperine from *Piper nigrum*, evaluate its antimicrobial activity and its antioxidant effect in a self-adhesive resin cement bonded to bleached enamel. **Methods:** to test its antioxidant effect, 9 third molars cut into 18 fragments were used and the degree of conversion test was performed with the micro Raman spectrometer. For the evaluation of antimicrobial activity (*Candida albicans* and *Streptococcus mutans*), in vitro, the broth microdilution technique recommended by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), document M27-A2, was used. **Results:** The yield of piperine extraction was 92.86% and its purity was 99.9%. The group hydrogen peroxide (HP) + immediate cementation showed the lowest degree of conversion when compared to the other groups ($p < 0.05$). There was no statistical difference between the groups Without HP, HP + cementation after 7 days; HP + 0.001% piperine, HP + 0.002% piperine; HP + 0.004% piperine ($p > 0.05$). The minimum bactericidal concentration (MBC) proved antimicrobial action ($p < 0.05$) in the concentration of 0.004% (08 ± 0.2 UFC / mL) in relation to the negative control, without treatment, (321 ± 2.5 UFC / mL), and the positive control using 0.12% chlorhexidine (3.2 ± 0.1 CFU / mL). The minimum fungicidal concentration (MFC) showed a reduction of colonies in the concentration of 0.004%, when compared to the other groups and controls. **Conclusion:** the piperine showed antifungal and antibacterial properties and avoided the reduction in the degree of conversion of a self-adhesive resin cement applied in a bleached enamel.

Keywords: *Piper nigrum*. Tooth Bleaching. Anti-Bacterial Agents. Antioxidants. Antifungal Agents.

INTRODUÇÃO

A pesquisa e o uso de novos medicamentos, suplementos alimentares e produtos sanitários derivados de plantas aumentaram consideravelmente nos últimos anos [1,2]. A piperina é um alcaloide nitrogenado, derivado da piperidina, e é principal componente ativo presente na pimenta do reino (*Piper nigrum*) [3-5]. Pesquisas indicaram que este composto possui vários efeitos farmacológicos e excelentes propriedades terapêuticas, incluindo atividade antimicrobiana e antioxidante [6,7], que o configuram como uma substância de grande potencial nas pesquisas em ciências médicas.

A piperina mostrou notável poder antibacteriano contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enterica*) [6]. Adicionalmente, a piperina apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* [8]. Embora, a piperina seja muito estudada, o conhecimento sobre a ação deste alcaloide contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* ainda é escasso.

Além da ação antimicrobiana, a piperina possui atividade antioxidante que evita a ocorrência de danos celulares oxidativos através da inativação de radicais livres e formas reativas de oxigênio [7,9,10]. O uso da piperina pode ser uma alternativa para reduzir os danos causados pelo estresse oxidativos em patologias como o câncer e o diabetes [11-13].

Por outro lado, o efeito antioxidante da piperina ainda não foi avaliado no contexto da Odontologia, onde um dos problemas frequentemente encarados é o impedimento da confecção de restaurações estéticas imediatamente após ao procedimento de clareamento dentário [14], o que em muitos casos se faz necessário já que o tratamento clareador, por vezes, é apenas uma etapa da reabilitação estética oral do paciente. Troca de restaurações antigas, as quais ficam mais destacadas devido à diferença de cor com os dentes clareados, reanatomizações dentárias, fechamento de diastemas e cimentação de laminados cerâmicos são procedimentos rotineiramente feitos após o clareamento dentário. Este último configura uma demanda cada vez maior no mercado atual, por isso a importância do estudo dos cimentos resinosos auto-adesivos. Este material tem sido bastante indicado para cimentação de restaurações indiretas devido à simplificação da técnica e diminuição de chance de erros pelo cirurgião-dentista

[15]. O oxigênio oriundo da dissociação do peróxido de hidrogênio inibe a polimerização de materiais resinosos, através de formação de radicais superóxidos que impedem a propagação da cadeia poliméricas destes materiais [16].

Estudos apontam que um intervalo seguro para realização dos procedimentos adesivos após clareamento seria entre uma a três semanas [17, 18]. Com o objetivo de para evitar atraso no tratamento restaurador, tem sido proposto o uso de agentes antioxidantes após o procedimento clareador a fim de realizar o procedimento reabilitador imediatamente após o clareamento [17, 19, 20].

Pesquisas com a piperina extraída da *Piper nigrum* são necessárias devido ao seu grande potencial de uso na Odontologia e em outras áreas das ciências médicas. Resultados promissores deste agente em testes *in vitro* podem influenciar o desenvolvimento de novos fármacos, produtos médicos e condutas clínicas. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi extrair, caracterizar, e avaliar o efeito antimicrobiano e antioxidante da piperina proveniente da *Piper nigrum*. A hipóteses nulas testadas foram: 1) Não haverá diferença estatística entre os grupos quanto ao grau de conversão; 2) Não haverá diferença estatística entre os grupos quanto a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima; 3) Não haverá diferença estatística entre os grupos quanto a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração da Piperina

50g de pimenta do reino (*Piper nigrum*) em pó foram misturadas com 150 ml de acetato de etila (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) em um balão com fundo redondo com capacidade total de 250 ml. A mistura reacional foi mantida em um sistema de refluxo de água a temperatura de 70° C durante 5 horas. Posteriormente, o solvente foi completamente removido com o auxílio de evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-200; Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suíça) a 50° C. Foi acrescentado ao resíduo 30 ml de uma mistura contendo álcool e solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH), na proporção de 1:1, e deixou-se em repouso por 1 hora. Após este período, a mistura foi filtrada a frio com um funil de Büchner e lavada com a solução de KOH. O resíduo coletado foi seco em estufa (TE-394/1-MP; Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 40°C por 24h. [21]

O isolamento da piperina foi confirmado, inicialmente, através do ensaio de ponto de fusão, onde a substância foi aquecida até o seu ponto de fusão. Em seguida, o material foi submetido a espectrofotometria UV-Vis (DU-730; Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) com 600 MHz (Agilent DD; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

O rendimento da produção de piperina foi determinado de acordo com a razão entre a massa de piperina obtida durante a extração e a massa teórica de piperina contida no pó de pimenta do reino. A pureza da piperina foi obtida pela técnica de cromatografia em camada delgada em placa de sílica, onde a amostra foi diluída e eluída em solução acetato/hexano, na proporção de 1:1. Em seguida, a placa de sílica foi exposta a luz ultravioleta e a uma solução de iodo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

Preparo das soluções aquosas de piperina

A piperina foi pesada em balança digital analítica (AUX-220, Shimadzu, Tóquio, Japão) e, em seguida, foi diluída em água destilada com o auxílio de vórtex (QL-901, Biomixer, São Paulo, SP, Brasil), para obter soluções aquosas de piperina a 0,001%, 0,002% e 0,004% peso/volume.

Ensaio de atividade antioxidante - Grau de Conversão *in situ*

O teste de atividade antioxidante foi realizado através da análise do grau de conversão *in situ*, para a realização do presente estudo foi obtida a aprovação no Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos sob o protocolo N° 3.666.589. Nove terceiros molares humanos hígidos foram selecionados, limpos e armazenados em água destilada a 4°C. Os dentes foram fixados com cera pegajosa (Kota Ind. e Com. Ltda., São Paulo) em placas de acrílico e foram acopladas em uma máquina de corte (Extec, Enfield, CT, EUA). Os dentes foram cortados com o auxílio de um disco diamantado (ExtecCorp, Enfield, CT, EUA) e obteve-se 12 fragmentos, exclusivamente, de esmalte quadrangulares de 4 x 4 mm.

Os fragmentos foram aleatoriamente divididos pelo software Excel (Excel 2018, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) em 6 grupos (n=2), de acordo com o tratamento do esmalte e tempo de cimentação (Tabela 1).

Tabela 1. Desenho experimental.

Grupo (n=2)	Descrição
Sem peróxido de hidrogênio 35% (PH) (controle)	Sem clareamento, sem aplicação de agente antioxidante (aplicação de água destilada) e cimentação imediata.
PH + cimentação imediata	Clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%, sem aplicação de agente antioxidante (aplicação de água destilada) e cimentação imediata.
PH + cimentação após 7 dias	Clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%, sem aplicação de agente antioxidante (aplicação de água destilada) e cimentação após 7 dias.
PH + 0,001% piperina	Clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%, aplicação de solução aquosa de piperina a 0,001% p/v (durante 60 s) e cimentação imediata.
PH + 0,002% piperina	Clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%, aplicação de solução aquosa de piperina a 0,002% p/v (durante 60 s) e cimentação imediata.
PH + 0,004% piperina	Clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%, aplicação de solução aquosa de piperina a 0,004% p/v (durante 60 s) e cimentação imediata.

Todos os dentes, exceto do grupo sem PH, foram submetidos ao clareamento com peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP Maxx, FGM Produtos Odontológicos, Ltda., Joinville, SC, Brasil- Lote #270316), que foi aplicado sobre o esmalte da superfície coronal, em uma camada de aproximadamente 1,0 mm de espessura (0,06 mL). O produto permaneceu em contato com a superfície de esmalte dos fragmentos por 15 minutos, em seguida, lavados com jatos de água durante 60 segundos e secos com jatos de ar, por 10 segundos. O procedimento clareador foi realizado 3 vezes, totalizando 45 minutos de aplicação do gel clareador.

Os fragmentos foram reumidificados com a solução destinada para o grupo (Tabela 1). As soluções permaneceram em contato com as superfícies de esmalte durante 60 segundos sob agitação com auxílio de um microbrush. Foi feita secagem com jatos de ar por 10 segundos e a aplicação de um cimento resinoso auto-adesivo (U200; 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA - Lote #1910000745) de acordo com as orientações do fabricante.

12 blocos de resina composta (Vitra, FGM, Joinville, Brasil), cada um contendo 4 mm de comprimento x 4 mm de largura x 3 mm de altura, previamente fabricados, foram jateados com óxido de alumínio (50 µm) por 10 segundos com posterior aplicação do silano (Prosil, FGM Produtos Odontológicos, Ltda., Joinville, SC, Brasil – Lote #270617) de acordo com as instruções do fabricante.

Os blocos de resina composta foram cimentados sobre os fragmentos de esmalte e fotoativados em 5 faces diferentes, por 40 segundos cada, com uma fonte de luz halógena (Optilux 501, SDS Kerr, Orange, EUA) a intensidade de 1000mW / cm².

Após a cimentação, os blocos foram seccionados longitudinalmente com auxílio da máquina de corte Isomet (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e de disco diamantado (ExtectCorp, Enfield, CT, EUA), sob irrigação abundante, a fim de se obter 2 espécimes em forma de fatia, com aproximadamente, 2 mm de espessura.

Para a determinação do grau de conversão, foi realizada 1 leitura em cada espécime através de um espectrômetro micro Raman (Xplora; Horiba Scientific, Kyoto, Japão). O espectro foi excitado a partir do uso de um laser com comprimento de onda em 532 nm através de uma objetiva (100 X). O espectro foi obtido, de acordo com as seguintes condições: tempo de irradiação: 60 s; número de acumulações: 10 e grade: 1200 linhas/mm. O grau de conversão foi calculado com base na redução da intensidade do pico correspondente aos grupos metacrilatos C=C em 1.636 cm⁻¹ e 1.608 cm⁻¹ no espécime polimerizado (P) comparado com um espécime não polimerizado (U), de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Grau de conversão} = (1 - P/U) \times 100$$

Todos os procedimentos foram feitos por um único operador.

Ensaio de atividade antimicrobiana

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Foram analisados, no estudo *in vitro*, a possível ação antifúngica da piperina e suas concentrações inibitórias mínimas (CIM), por meio da técnica de microdiluição em caldo preconizada pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), documento M27-A2.

Foram transferidas leveduras (*Candida albicans*, ATCC 10231) cultivadas em Ágar Sabouraud para meio de cultura líquida Sabouraud Dextrose, para a determinação da susceptibilidade de leveduras aos componentes da piperina. Foram utilizadas microplacas com 96 poços e cada poço recebeu o inóculo, o meio de cultura e as soluções dos extratos diluídos (0,004%, 0,002%, 0,001%, 0,0005% e 0,00025% de piperina), de tal forma que o volume final ficou de 210 µL. Para o controle da metodologia, foi utilizada uma solução de nistatina 100.000 U.I (controle positivo). Também foram realizados os seguintes controles: controle de esterilidade do caldo; controle do inóculo com ausência do controle positivo, controles de esterilidade dos extratos de piperina.

A solução inicial contendo densidade óptica (DO) estabelecida de 0.38, equivalente a 10^7 células/mL, foi diluída de 1/10 e 1/100 em solução de PBS e posterior diluição de 1/20 em Sabouraud caldo, segundo os critérios modificados do CLSI, obtendo-se uma quantidade final de inóculo de $5,0 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Logo após a micropipetagem dos inóculos, do meio de cultura e dos controles, as microplacas foram tampadas e incubadas a 35 °C por 24 h, sem agitação. Desta forma, foi possível determinar a menor concentração do extrato bruto capaz de inibir o crescimento desse microrganismo, utilizando a análise visual e absorbância do Teste de ELISA. Para determinação da CFM foram retirados 25 µl da diluição que representa a CIM e semeados em placas de Sabouraud Dextrose ágar por 24 h em estufa. Experimento foi realizado em três momentos diferentes, sendo caracterizado como triplicata.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Foram analisados, no estudo *in vitro*, a possível ação antibacteriana da piperina e suas concentrações inibitórias mínimas (CIM), por meio da técnica de microdiluição em caldo preconizada pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), documento M27-A2.

Foram transferidas cepas (*Streptococcus mutans*, ATCC UA159) cultivadas em ágar BHI (Blood heart infusion) sangue para meio de cultura líquida BHI dextrose, para a determinação da susceptibilidade de bactérias cariogênicas aos componentes da piperina. Foram utilizadas microplacas com 96 poços e cada poço recebeu o inóculo, o meio de cultura e as soluções dos extratos diluídos (0,004%, 0,002%, 0,001%, 0,0005% e 0,00025% de piperina), de tal forma que o volume final ficou de 210 µL. Para o controle

da metodologia, foi utilizada uma solução de digluconato de clorexidina 0,12% (controle positivo). Também foram realizados os seguintes controles: controle de esterilidade do caldo; controle do inóculo com ausência do controle positivo, controles de esterilidade dos extratos.

A solução inicial contendo equivalente a 10^8 células/mL, foi comparada com a escala 0.5 Mc Farland, diluída 1/100 em solução de BHI caldo, obtendo-se uma quantidade final de inóculo de 1×10^6 UFC/mL.

Logo após a micropipetagem dos inóculos, do meio de cultura e dos controles, as microplacas foram tampadas e incubadas a 37 °C por 24 h, sem agitação. Desta forma, foi possível determinar a menor concentração do extrato bruto capaz de inibir o crescimento desse microrganismo, utilizando a análise visual. Para determinação da CBM (Concentração bactericida mínima) foram retirados 25 ul da diluição que representa a CIM e semeados em placas de BHI sangue por 24h em estufa. Experimento foi realizado em três momentos diferentes, sendo caracterizado como triplicata.

Análise Estatística

A análise estatística dos resultados de CFM e grau de conversão foram realizadas com o programa SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). O teste de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe foram aplicados em todos os grupos para analisar a distribuição normal dos dados e a igualdade de variância, respectivamente. Os dados referentes aos testes de concentração inibitória mínima, concentração fungicida mínima e concentração bactericida mínima foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis. Enquanto, os dados de grau de conversão foram avaliados com o teste de Análise de Variância. Para as comparações *post-roc* foi utilizado o teste de Student-Newman-Keuls e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Extração e caracterização da piperina

Através do processo de extração utilizando um sistema em refluxo foi obtido um sólido cristalino e amarelado, cujo o ponto de fusão foi de 125°C. A figura 2 representa o gráfico gerado pela espectroscopia UV-vis e apresentou o comprimento de onda

(λ_{max}) de 343nm, condizente com a piperina. Adicionalmente, a Figura 3 é referente aos picos transmitância de RMN e caracterizam um composto derivado de alcaloide, classe de substâncias comum no gênero Piper. A estrutura caracterizada foi estabelecida como piperina.

Após a extração, foram obtidos 78mg de piperina, com um rendimento de 92,86% e com a pureza de 99,9%.

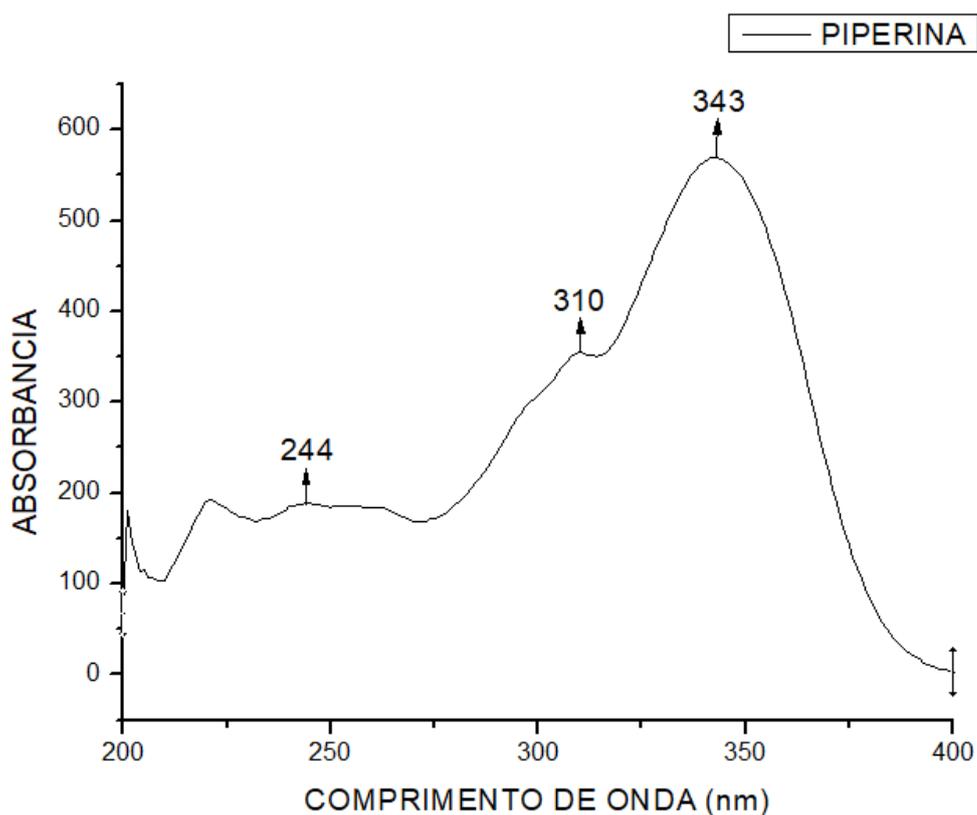


Figura 2. Espectro UV-Vis da Piperina.

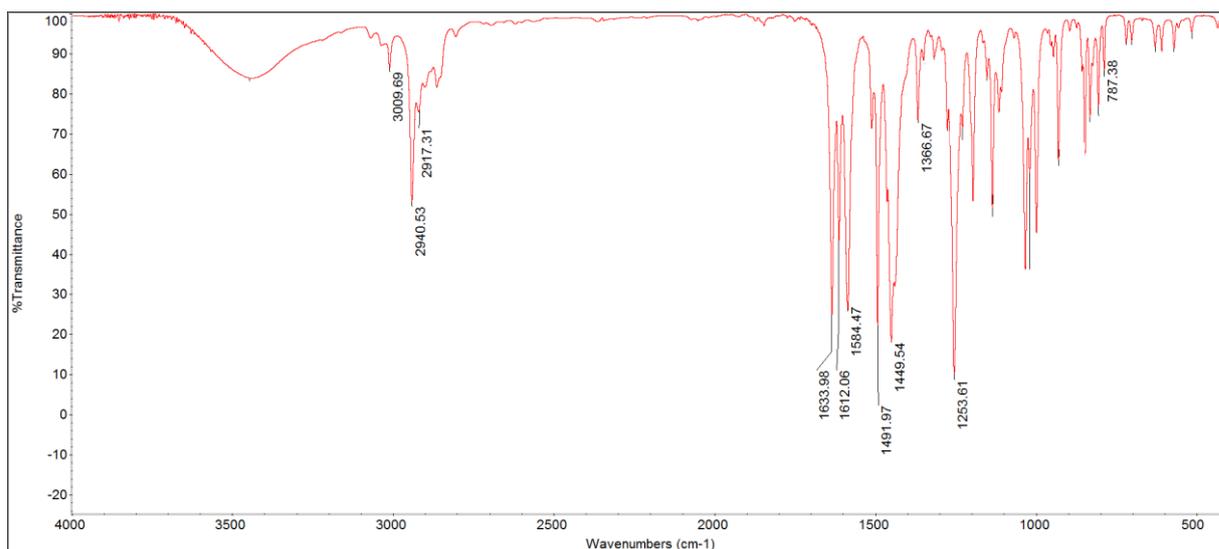


Figura 3. Espectro de RMN da piperina.

Teste de atividade antioxidante - Grau de Conversão *in situ*

Os dados de grau de conversão *in situ* estão apresentados na Tabela 2. Os valores de grau de conversão foram influenciados pelo tratamento ($p=0,002$; $F=5,177$). O peróxido de hidrogênio 35% (PH) + cimentação imediata apresentou o menor grau de conversão quando comparado aos demais grupos ($p<0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos sem PH, PH + cimentação após 7 dias; PH + 0,001% piperina, PH + 0,002% piperina; PH + 0,004% piperina ($p>0,05$).

Tabela 2. Valores de grau de conversão *in situ* (média \pm desvio padrão), de acordo com tratamento usado.

Grupos ($n=2$)	Grau de conversão <i>in situ</i>
Sem PH (controle)	66,64 \pm 2,60 ^A
PH + cimentação imediata	61,01 \pm 1,98 ^B
PH + cimentação após 7 dias	65,19 \pm 2,20 ^A
PH + 0,001% piperina	64,80 \pm 1,36 ^A
PH + 0,002% piperina	63,76 \pm 2,06 ^A
PH + 0,004% piperina	64,67 \pm 1,76 ^A

Letras sobrescritas similares indica que não houve diferença estatística entre os valores ($p>0,05$).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Através da análise visual foi verificada diminuição na turvação na concentração de 0,004% , após realização do ELISA, verificou-se diferença estatística nas concentrações 0,001%; 0,002% e 0,004% em relação ao controle negativo e positivo ($p < 0,05$), como visualizado na figura 4. A CFM comprovou redução de colônias na concentração de 0,004%, quando comparado aos demais grupos e controles, através de contagem de UFC/mL.

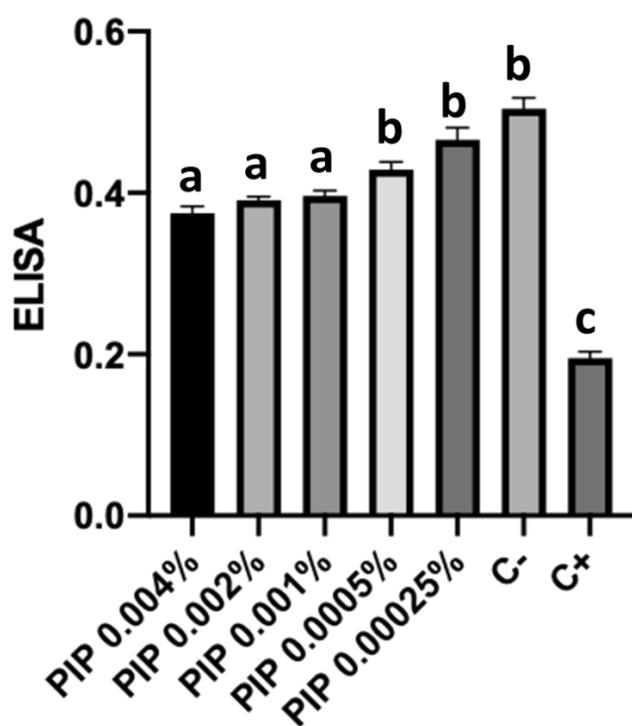


Figura 4. Protocolos terapêuticos realizados no experimento de CIM e os dados numéricos obtidos pelo Teste ELISA. A altura das colunas e as barras de erros indicam, respectivamente, os dados numéricos obtidos pelo Teste ELISA e o desvio padrão. Os grupos identificados com letras diferentes significam que houve diferença estatística entre os valores ($p < 0,05$).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Através da análise visual, turvação do meio, foi verificada inibição na concentração de 0,004%, comparada às concentrações 0,002% e 0,001% e também em relação ao controle negativo e positivo, com aparente inibição somente na concentração de 0,004%. O CBM comprovou ação antimicrobiana ($p < 0,05$) na concentração de 0,004% ($8 \pm 0,2$ UFC/mL) em relação ao controle negativo, sem tratamento, ($321 \pm 2,5$ UFC/mL), e ao controle positivo com uso de clorexidina 0,12% ($3,2 \pm 0,1$ UFC/mL).

DISCUSSÃO

A discrepância de cor entre os dentes clareados e as restaurações antigas gera, muitas vezes, desconforto para o paciente, que procura uma solução rápida para a sua queixa. Para solucionar o problema, os profissionais podem lançar mão de procedimentos restauradores diretos, como a troca de restaurações antigas, ou indiretos, como a colocação de laminados cerâmicos [16, 22, 23].

Após o término do tratamento clareador, os radicais livres gerados continuam presentes no interior dos túbulos dentinários, causando um efeito oxidativo que resulta em alterações microestruturais no esmalte dentário, diminuição do número, tamanho e qualidade dos *tags* resinosos e na inibição da polimerização dos materiais resinosos [24, 25]. Estes dados estão de acordo com os resultados do presente estudo, quando foi observada uma redução significativa no grau de conversão de um cimento resinoso auto-adesivo aplicado imediatamente em esmalte clareado quando comparado aos demais grupos (Tabela 2). Desta forma, a primeira hipótese nula foi rejeitada.

Para que a união não seja comprometida, sugere-se um tempo de espera entre 7 a 21 dias entre o final do clareamento e a realização do procedimento adesivo, uma vez que

a atividade dos radicais livres oriundos do clareamento pode ser considerada temporária [18, 25]. Entretanto, este intervalo de tempo não condiz com a expectativa do paciente em relação à conclusão do tratamento estético, pois estes desejam uma solução rápida. Desta forma, estudos vêm sendo realizados com o propósito de encontrar uma alternativa que viabilize o tratamento restaurador imediatamente após o clareamento [17, 18, 19, 26, 27, 28]. Para tanto, diferentes técnicas têm sido propostas, dentre elas a remoção da camada superficial de esmalte, o pré-tratamento com álcool, o uso de cimentos ou adesivos contendo solventes orgânicos e o uso de antioxidantes [20, 27].

Entre as estratégias mencionadas acima, o tratamento com antioxidantes tem demonstrado bons resultados nas pesquisas e várias substâncias com propriedades antioxidantes vêm sendo testadas na Odontologia [17, 20, 27, 29]. Um agente antioxidante pode ser definido como um composto químico que inibe ou diminui significativamente o processo de oxidação durante reações químicas [26].

Dentre os antioxidantes testados na Odontologia, o ascorbato de sódio é o mais estudado e é considerado por alguns autores como a melhor opção para reestabelecer a resistência de união diminuída em dentes clareados [26, 30, 31], porém a literatura mostra resultados conflitantes [17, 20, 27], daí a importância de se buscar outras opções, e dentre elas está a piperina.

A extração de substâncias orgânicas por solventes, através de processo de aquecimento e refluxo, é uma técnica tradicional que pode ser utilizada para o isolamento da piperina [6, 21, 32]. Este método continua sendo adaptado e aprimorado, devido principalmente à sua versatilidade, baixo custo e também visando a otimização de tempo e rendimento [5]. No presente estudo, o rendimento de extração da piperina pelo método do refluxo foi de 92,86%, um valor considerado alto.

A piperina apresenta uma grande variedade de atividades biológicas [6,7]. Sua ação inseticida foi confirmada cientificamente em 1924 e a partir daí várias pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de identificar outras atividades da *P. Nigrun*. Como a piperina é a piperamida que ocorre em maior proporção na planta, essa se tornou o principal alvo de avaliações biológicas [18].

De acordo com Mittal e Gupta (2000) [9], a piperina atua contra danos oxidativos por inibição dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio. A piperina mostrou-se um antioxidante eficaz em um estudo feito por Naidu e Thippeswamy (2002) [33]. Prasad et al (2014) [34], concluíram em seu estudo que a piperina da pimenta preta pode exercer um papel antioxidante fisiológico através da modulação da via 5-LO, a enzima-chave envolvida na biossíntese de leucotrienos. Khajuria et al (1998) [35] obtiveram resultados promissores ao investigar o potencial antioxidante da piperina em um modelo intestinal de rato.

Em nossa pesquisa, o grau de conversão de um cimento resinoso auto-adesivo aplicado sobre espécimes de esmalte submetidos a clareamento e tratados com diferentes concentrações de piperina foi semelhante aos espécimes não clareados e dos clareados e cimentados após 7 dias (Tabela 2). Provavelmente, a piperina agiu inibindo as espécies reativas de oxigênio oriundas do clareamento e evitou a redução do grau de conversão. De Paula et al. (2017) [36] observaram que a aplicação de glutathione 5%, glutathione 10% e ascorbato de sódio 10%, durante 5 minutos, sobre o esmalte clareado promoveu maior grau de conversão de monômeros resinosos em polímeros do que no grupo não tratado com os antioxidantes. Por outro lado, Harrison et al (2019) [37] observaram que a aplicação de alfa-tocoferol a 20%, durante 5 minutos, não foi eficiente em dentina clareada, ou seja, o grau de conversão foi semelhante ao grupo sem antioxidante.

No presente estudo, optou-se por testar a solução antioxidante de piperina por um período de tempo viável clinicamente, que foi de 60 segundos, o que demonstra ainda mais seu potencial, já que obtivemos bons resultados mesmo em baixas concentrações e com um período de tempo de ação bem inferior ao adotado em pesquisas semelhantes com outras substâncias antioxidantes, por exemplo, o tempo mínimo para que o ascorbato de sódio faça seu efeito antioxidante é de 5 minutos [38, 39, 40].

No presente trabalho, a piperina foi eficiente em reduzir colônias de *C. Albicans* no grupo com concentração da solução de Piperina de 0,004% (Figura 4), desta forma, a segunda hipótese nula foi rejeitada. O estudo de agentes fungicidas na odontologia é de extrema importância por esses microorganismos serem responsáveis por condições orais bastante comuns, como candidíase oral em pacientes imunossuprimidos ou associada à estomatite protética em pacientes portadores de prótese total. [41]

Buitimea-Cantúa et al (2018) [42] analisaram a atividade antifúngica da *Piper Nigrum* e da piperina e os resultados mostraram atividade antifúngica significativa dos extratos e dos compostos ativos puros contra *A. parasiticus*, o que sugere que eles podem ser usados como antifúngicos naturais. Os autores encontraram que a maior inibição do crescimento radial de *A. parasiticus* ocorreu na concentração de 200 mg / mL dos extratos etanólicos e dos compostos bioativos puros. Os valores de CIM50 (concentração mínima para inibir 50% do crescimento do fungo) foram de 68mg/ml para o extrato de Piper Nigrum e 67mg/ml para Piperina. O extrato de *P. nigrum* foi o extrato mais bioativo (78% de crescimento) a 200 mg / mL. Os valores de CIM50 revelaram que capsaicina e piperina requeria menor concentração para inibir o crescimento de 50% do *A. parasiticus* em comparação com os extratos de frutas. Moon et al (2016) [43] e seus colaboradores também relataram que a piperina tem moderada ação antifúngica contra *A. flavus* (WRRC 3-90-42).

Com relação à atividade antibacteriana, nossos resultados mostraram que a solução de piperina com maior concentração (0,004%) inibiu completamente o crescimento de *S. Mutans*, sendo assim, a terceira hipótese nula foi rejeitada. No estudo feito por Deepak Dwivedi e Vinod Singh (2016) [44] em que analisaram o efeito da Piperina contra *S. Mutans*, os resultados confirmam que a piperina apresentou ação antimicrobiana e antibiofilme.

Jaya Maitra and Shilpi [45], em 2017, concluíram que o efeito antibacteriano da piperina aumenta à medida que a concentração de piperina é aumentada. A piperina demonstrou atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas com zona de inibição variando de 2 mm a 7 mm. A zona máxima de inibição contra bactérias gram-positivas *Bacillus subtilis* foi 7 mm e para bactérias gram-negativas *E. coli* foi de 7 mm. O estudo ainda revelou que a combinação de piperina com o ciprofloxacino amplia seu espectro antibacteriano.

D´Souza et al. (2017) [46], encontraram que os extratos brutos e etanólicos de piperina da pimenta preta apresentaram atividade antibacteriana máxima contra bactérias gram-positivas resistentes, *Staphylococcus aureus* e atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, com zona de inibição bacteriana variando entre 15mm e 22mm. As mesmas descobertas também foram relatadas por Palaksha et al (2013) [47], em que a pimenta produziu atividade antibacteriana consideravelmente mais alta contra *Staphylococcus aureus* em comparação com outras bactérias gram-negativas.

Dessa forma, mais estudos se fazem necessários a respeito do uso da piperina na odontologia, pois esta planta tem demonstrado grande potencial nas pesquisas, apesar da literatura ainda ser escassa.

CONCLUSÃO

A extração e a caracterização da piperina proveniente de sementes da *Piper nigrum* foram eficientes. O alcaloide extraído apresentou um potencial antioxidante promissor, uma vez que evitou a redução do grau de conversão de um cimento resinoso auto-adesivo quando aplicado em esmalte clareado com peróxido de hidrogênio a 35%. Adicionalmente, a piperina promoveu redução de colônias de *C. albicans* e atividade bactericida contra *S. mutans*, na concentração de 0,004%.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology* **2018**, v. 1, p. 1–7.
2. Quijia, C. R.; Chorilli, M. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Piperine: A Review. *Crit Rev Anal Chem* **2020**, v. 50(1), p. 62-77.
3. Parmar, V. S. et al. Phytochemistry of the genus piper. *Phytochemistry* **1997**, v. 46, p. 597-673.
4. Srinivasan, K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2007**, v. 47, n. 8, p. 735-748.
5. 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**, v. 4, n. 3, p. 208-224.
6. Zarai, Z.; Boujelbene, E.; Ben Salem, N.; Gargouri, Y.; Sayari, A. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts, Piperine and Piperic Acid from *Piper nigrum*. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2013**, v. 50, p. 634–641.
7. Verma N1, Bal S1, Gupta R2, Aggarwal N3, Yadav A1. Antioxidative Effects of Piperine against Cadmium-Induced Oxidative Stress in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. *J Diet Suppl* **2020**, v.17(1), p. 41-52.
8. Marques, J. V.; de Oliveira, A.; Raggi, L.; Young, M. C. M.; Kato, M. J. Antifungal Activity of Natural and Synthetic Amides from Piper Species. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, v. 21, p. 1807–1813.
9. Mittal, R.; Gupta, R. L. In vitro antioxidante activity of piperin. *Exp. Clin. Pharmacol* **2000**, v. 22, p. 271–274.
10. Selvendiran, K. et al. Modulatory effect of Piperine on mitochondrial antioxidant system in benzo(α)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Phytomedicine*, **2004**, v. 11, p. 85–89.
11. Srinivasan, K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2007**, v. 47, n. 8, p. 735-748.

12. Zadorozhna M, Tataranni T, Mangieri D. Piperine: role in prevention and progression of cancer. *Mol Biol Rep.* **2019**, v. 46(5), p. 5617-5629.
13. Kaur G, Invally M, Chintamaneni M. Influence of piperine and quercetin on antidiabetic potential of curcumin. *J Complement Integr Med.* **2016**, v. 13(3), p. 247-255.
14. Souza-Gabriel, A. E. et al. Durability of resin on bleached dentin treated with antioxidant solutions or lasers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2020**, v. 104.
15. Ferracane, J.L.; Stansbury, J.W.; Burke, F.J.T. Self-adhesive resin cements - chemistry, properties and clinical considerations. *Journal of Oral Rehabilitation* **2010**, v. 38(4), p. 295 - 314.
16. Pegoraro, C. A. C. C. et al. Influência dos agentes clareadores na resistência adesiva de restaurações com compósitos aos tecidos dentários: momento atual. *Revista Dentística Online* **2011**, v. 10, n. 20, p. 11-18.
17. Nair, R.; Bandhe, S.; Ganorkar, O. K.; Saha, S.; Sial, S.; Nair, A. A comparative evaluation of the three different antioxidant treatments on the bond strength of composite resin to bleached enamel: An *in vitro* study. *J Conserv Dent* **2019**, v. 22, n. 1, p. 82-86.
18. Arumugam, M. T.; Nesamani, R.; Kittappa, K.; Sanjeev, K.; Sekar, M. Effect of various antioxidants on the shear bond strength of composite resin to bleached enamel: An *in vitro* study. *J Conserv Dent* **2014**, v. 17, p. 22-6.
19. Coppla, F. M.; Freire, A.; Bittencourt, B.; Armas-Vega, A.; Benítez, V. E. B.; Calixto, A. L.; Loguercio, A. D. Influence of simplified, higher-concentrated sodium ascorbate application protocols on bond strength of bleached enamel. *J Clin Exp Dent* **2019**, v. 11, n. 1, p. 21-26.
20. Nari-Ratih, D.; Widyastuti, A. Effect of antioxidants on the shear bond strength of composite resin to enamel following extra-coronal bleaching. *J Clin Exp Dent* **2019**, v. 11, n. 2, p. 126-132.
21. Cao, X.; Ye, X.; Lu, Y.; Yu Y, Mo W. Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of piperine from white pepper. *Anal Chim Acta* **2009**, v. 640, p.47-51.
22. Joiner, A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *Journal of Dentistry* **2007**, v. 35, n. 12, p. 889-896.

23. Alqahtani, M. Q. Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *Saudi Dent Journal* **2014**, v. 26, n. 2, p. 33-46.
24. Perdigão J et al. Ultra-morphological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide-bleached enamel. *American Journal of Dentistry* **1998**, v. 11, p. 291-301.
25. Turkmen C, Guleryus N, Atah PY. Effect of sodium ascorbate and delayed treatment on shear bond strength of composite resin to enamel following bleaching. *Nigerian J Clin Pract* **2016**, v. 18, p. 91-8.
26. Whang H, Shin D. Effect of applying antioxidants on bond strength of bleached bovine dentin. *RDE* **2015**, v. 40, p. 37-43.
27. Bansal, M.; Kaur, P.; Cyriac, A. R.; Kadian, N.; Jaiswal, P.; Rathee, K. Impact of Different Antioxidants on the Bond Strength of Resinbased Composite on Bleached Enamel-An *In Vitro* Study. *J Contemp Dent Pract* **2019**, v. 20, n. 1, p. 64-70.
28. Sharafeddin, F.; Farshad, F. The effect of aloe vera, pomegranate peel, grape seed extract, green tea and sodium ascorbate as antioxidants on the shear bond strength of composite resin to home-bleached enamel. *Dent Shiraz Univ Med Sci* **2015**, v. 16, p. 296–301.
29. Sasaki RT, Flório FM, Basting RT. Effect of 10% sodium ascorbate and 10% alpha-tocopherol in different formulations on the shear bond strength of enamel and dentin submitted to a home-use bleaching treatment. *Oper Dent* **2009**, v. 34, p. 746–52.
30. Svizero NR, Romani LAC, Soares IBL, Moraes JE, Agulhari MAS et al. Effects of neutralizing or antioxidant agents on the consequences induced by enamel bleaching agents in immediate resin composite restorations. *Journal of Adhesion Science and Technology* **2017**, v. 31, p. 965–976.
31. Alrafaa AA, Bilal R, Alshahrani I. Does the antioxidant treatment affect the shear bond strength of orthodontic brackets: An in vitro study. *J Pak Med Assoc* **2019**, v. 69, p. 82-86.
32. Abayomi O, Nour A, Ruth A, Habeeb O. Optimized microwave reflux extraction and antioxidant activities of piperine from black and white piper nigrum. *Chemical Engineering Research Bulletin* **2017**, v. 19, p. 139-144.

33. Naidu KA, Thippeswamy NB. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. *Mol. Cell. Biochem* **2002**, v. 229, p. 19–23.
34. Prasad NS et al. Spice phenolics inhibit human PMNL5-lipoxygenase, Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty Acids* **2004**, v. 70, p. 521–528.
35. Khajuria, A.; Zutshi, U.; Bedi, k. l. Permeability characteristics of piperine on oral absorption - An active alkaloid from peppers and a bioavailability enhancer. *Indian J Exp Biol* **1998**, v. 36, p. 46-50.
36. De Paula FAR, Mendonça JS, Nojosa JS, Mendes TAD, De Paula DM, Lemos MVS, E Silva FJA, Moura MEM. Análise do Potencial Antioxidante da Glutathione e seu Efeito na Adesão ao Esmalte Bovino tratado com peróxido de hidrogênio 35%. *Journal of health sciences* **2017**, v. 19, n. 5.
37. Harisson MS, Wang MSY, Frick KJ, Moniz J, Walker MP. Effects of alpha-tocopherol antioxidante on dentin-composite microtensile bond strength after sodium perborate bleaching. *JOE* **2019**, v. 45, p. 1053-59.
38. Cavalli, V. et al. The effect of elapsed time following bleaching on enamel bond strength of resin composite. *Operative Dentistry* **2001**, v. 26, p. 597-602.
39. Basting RT et al. Shear bond strength of enamel treated with seven carbamide peroxide bleaching agents. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* **2004**, v. 16, p. 250-259.
40. Freire A et al. Reaction kinetics of sodium ascorbate and dental bleaching gel. *Journal of Dentistry* **2009**, v. 37, p. 932-936.
41. Crielaard, W. et al. (2008). Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of Applied Oral Science*, 16(2), pp. 86-94.
42. Buitimea-Cantúa G. V.; Velez-Haro J. M.; Buitimea-Cantúa N. E.; Molina-Torres J.; Rosas-Burgos E. C. GC-EIMS analysis, antifungal and anti-aflatoxigenic activity of Capsicum chinense and Piper nigrum fruits and their bioactive compounds capsaicin and piperine upon Aspergillus parasiticus. *Nat Prod Res* **2018**, v. 8, p. 1-4.
43. Moon YS, Choi WS, Park ES, Bae IK, Choi SD, Paek O, Kim SH, Chun HS, Lee SE. Antifungal and Antiaflatoxigenic Methylenedioxy-Containing Compounds and Piperine-Like Synthetic Compounds. *Toxins (Basel)* **2016**, v. 16, n. 8.

44. Deepak Dwivedi and Vinod Singh. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. *J Tradit Complement Med* **2016**, v. 6(1), p. 57–61.
45. Jaya Maitra and Shilpi. Synergistic Effect of Piperine, Extracted from *Piper nigrum*, with Ciprofloxacin on *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. *Der Pharmacia Sinica* **2017**, v. 8(3), p. 29-34.
46. D'Souza, S. P.; Chavannavar, S. V.; Kanchanashri B. and Niveditha S. B. Pharmaceutical Perspectives of Spices and Condiments as Alternative Antimicrobial Remed. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* **2017**, v. 22, n. 4.
47. Palaksha, M. N.; Banji, D.; Sambasiva, R. A. In-Vitro Evaluation Of Antibacterial Activity Of Alcoholic Extracts Of Ten South Indian Spices Against Multi-Resistant Gram Positive And Gram Negative Bacteria By Agar Well Diffusion Method. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2013**, v. 2, n. 5, p. 3840-47.

4 CONCLUSÃO GERAL

Através de nossos resultados, concluímos que a Piperina mostrou-se eficiente em evitar a redução do grau de conversão de um cimento resinoso auto-adesivo aplicado em esmalte clareado com peróxido de hidrogênio a 35% em todas as concentrações testadas. A piperina também se mostrou um potencial antimicrobiano na concentração de 0,004%, atuando na inibição das colônias de *C. albicans* e *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

1. ABOUAITAH, K. et al. **Effective Targeting of Colon Cancer Cells with Piperine Natural Anticancer Prodrug Using Functionalized Clusters of Hydroxyapatite Nanoparticles.** *Pharmaceutics*, v. 16, n. 12(1), 2020.
2. ANDRÉ, C. B.; AGUIAR, T. R.; AYRES, A. P.; AMBROSANO, G. M.; GIANNINI, M. **Bond strength of selfadhesive resin cements to dry and moist dentin.** *Braz Oral Res*, v. 27, n. 5, p. 389-95, 2013.
3. ARUMUGAM, M. T.; NESAMANI, R.; KITTAPPA, K.; SANJEEV, K.; SEKAR, M. **Effect of various antioxidants on the shear bond strength of composite resin to bleached enamel: An *in vitro* study.** *J Conserv Dent*, v. 17, p. 22–6, 2014.
4. BADMAEV, V.; MAJEED, M.; PRAKASH, L. **Piperine derived from black pepper increases plasma levels of coenzyme Q10 following oral supplementation.** *J Nutr Biochem*, v. 11, p. 109-113, 2000.
5. BAE, G. S.; KIM, M. S.; JUNG, W. S.; SEO, S. W.; YUN, S. W.; KIM, S. G.; PARK, R. K.; KIM, E. C.; SONG, H. J.; PARK, S. J. **Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine.** *Eur J Pharmacol.*, v. 10, n. 642(1-3), p. 154-62, 2010.
6. BANO, G.; RAINA, R. K.; ZUTSHI, U.; BEDI, K. L.; JOHRI, R. K.; SHARMA, S. C. **Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy-volunteers.** *Eur. J. Clin. Pharm*, v. 41, n. 6, p. 615-617, 1991.
7. BUTT, M. S.; PASHA, I.; RANDHAWA, M. A.; SAEED, F.; AHMED, W. **Black pepper and health claims: a comprehensive treatise black pepper and health claims.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, n. 9, p. 37-41, 2013.
8. CANTORO, A.; GORACCI, C.; CONIGLIO, I.; MAGNI, E.; POLIMENI, A.; FERRARI, M. **Influence of ultrasound application on inlays luting with self-adhesive resin cements.** *Clin Oral Investig.*, v.15, n. 5, p. 617-23, 2011.

9. CHAUDHRY, N. M. e TARIQ, P. **Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates.** Pak J Pharm Sci, v.19, n. 3, p. 214-18, 2006.
10. CHEN, J. H.; XU, J. W.; SHING, C. X. **Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions.** The Journal of Prosthetic Dentistry, v. 69, n. 1, p. 46-48, 1993.
11. COPPLA, F. M.; FREIRE, A.; BITTENCOURT, B.; ARMAS-VEGA, A.; BENÍTEZ, V. E. B.; CALIXTO, A. L.; LOGUERCIO, A. D. **Influence of simplified, higher-concentrated sodium ascorbate application protocols on bond strength of bleached enamel.** J Clin Exp Dent, v. 11, n. 1, p. 21-26, 2019.
12. DA SILVA R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; MAYSAFURLAN. **Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*.** *Phytochemistry*, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.
13. DE MUNCK, J.; VARGAS, M.; VAN LANDUYT, K.; HIKITA, K.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B. **Bonding of an auto-adhesive luting material to enamel and dentin.** Dent Mater, v. 20, p. 963-71, 2004.
14. FERRACANE, J. L.; STANSBURY, J. W.; BURKE, F. J. T. **Self-adhesive resin cements – chemistry, properties and clinical considerations.** Journal of Oral Rehabilitation, v. 38, p. 295–314, 2011.
15. 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., v. 4, n. 3, p. 208-224, 2012.
16. GUARDA, G. B.; GONÇALVES, L. S.; CORRER, A. B.; MORAES, R. R.; SINHORETI, M. A. C.; CORRER-SOBRINHO, L. **Luting glass ceramic restorations using a self-adhesive resin cement under different dentin conditions.** J Appl Oral Sci., v. 18, p. 244-248, 2010.
17. GUPTA, S. K.; BANSAL, P.; BHARDWAJ, R. K.; VELPANDIAN, T. **Comparative anti-nociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination.** Pharmacol. Res., v. 41, n. 6, p. 657-662, 2000.

18. HAN, L.; OKAMOTO, A.; FUKUSHIMA, M.; OKIJI, T. **Evaluation of physical properties and surface degradation of self-adhesive resin cements.** Dent Mater J., v. 26, n. 6, p. 906-912, 2007.
19. IKAN, R.; **Natural Products: A Laboratory Guide**, 2a. ed., Academic Press: London, 1991.
20. KAPIL, A. **Piperine: a potent inhibitor of Leishmania donovani promastigotes in vitro.** Planta Medica. 59: 474, 1993.
21. KAUR, G.; INVALLY, M.; CHINTAMANENI, M. **Influence of piperine and quercetin on antidiabetic potential of curcumin.** J Complement Integr Med, v. 1, n. 13(3), p. 247-255, 2016.
22. LOURINHO, M. P.; COSTA, C. A. S.; SOUZA, L. C.; SOUZA, L. C.; NETOS, C. F. O. **Conjuntura da pimenta do reino no mercado nacional e na região norte do Brasil.** Enc. Biosf, v. 10, n. 18, p. 1016-1031, 2014.
23. MAK, Y. F.; LAI, S. C.; CHEUNG, G. S.; CHAN, A. W.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. **Micro-tensile bond testing of resin cements to dentin and an indirect resin composite.** Dent Mater, v. 18, p. 609- 21, 2002.
24. MALINI, T. *et al.* **Effects of piperine on testis of albino rats.** Journal Ethnopharmacology, v. 64, p. 219-225, 1999.
25. MANSO, P. A.; CARVALHO R. M. **Dental Cements for luting and bond restorations self-adhesive resin cements.** Dent Clin, v. 61, p. 821-834, 2017.
26. MARQUES, J. V.; DE OLIVEIRA, A.; RAGGI, L.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. **Antifungal Activity of Natural and Synthetic Amides from Piper Species.** J. Braz. Chem. Soc, v. 21, p. 1807–1813, 2010.
27. MIRZA, Z.M.; KUMAR, A.; KALIA, N.P.; ZARGAR, A.; KHAN, I.A. **Piperine as an inhibitor of the MdeA efflux pump of Staphylococcus aureus.** J. Med. Microbiol,v. 60, p. 1472–1478, 2011.

28. MONTARANI, C. A.; BOLZANI, V. S. **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais.** Quím. Nova, vol.24, n.1, 2001.
29. NAIR, R.; BANDHE, S.; GANORKAR, O. K.; SAHA, S.; SIAL, S.; NAIR, A. **A comparative evaluation of the three different antioxidant treatments on the bond strength of composite resin to bleached enamel: An *in vitro* study.** J Conserv Dent, v. 22, n. 1, p. 82-86, 2019.
30. NARI-RATIH, D.; WIDYASTUTI, A. **Effect of antioxidants on the shear bond strength of composite resin to enamel following extra-coronal bleaching.** J Clin Exp Dent, v. 11, n. 2, p. 126–132, 2019.
31. OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **A influencia da piperina na biodisponibilidade de fármacos: Uma abordagem molecular.** Quim. Nova, v. 37, n. 1, p. 69-73, 2014.
32. PARMAR, V. S. et al. **Phytochemistry of the genus piper.** Phytochemistry, v. 46, p. 597-673, 1997.
33. PARTHASARATHY, V. A.; CHEMPAKAM, B.; JOHN ZACHARIAH, T. **Chemistry of spices.** CAB International: Oxfordshire, 2008, cap. 2.
34. PAVAN, S.; BERGER, S.; BEDRAN-RUSSO, A. K. B. **The effect of dentin pretreatment on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements.** The Journal of Prosthetic Dentistry, v. 104, n. 4, p. 258-264, 2010.
35. PEGORARO, C. A. C. C. et al. **Influência dos agentes clareadores na resistência adesiva de restaurações com compósitos aos tecidos dentários: momento atual.** Revista Dentística Online, v. 10, n. 20, p. 11-18, 2011.
36. PHILLIPSON, J. D.; Anderson, L. A.; J. **Ethnopharmacology and western medicine.** Ethnopharmacol. 1898, 25, 61.
37. QUIJIA CR, CHORILLI M. **Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Piperine: A Review.** Crit Rev Anal Chem, v. 50(1), p. 62-77, 2020.
38. RADOVIC, I.; MONTICELLI, F.; GORACCI, C.; VULICEVIC, Z. R.; FERRARI, M. **Self-adhesive Resin Cements: A Literature Review.** J Adhes Dent, v. 10, p. 251-258, 2008.

39. SELVENDIRAN, K. et al. **Modulatory effect of Piperine on mitochondrial antioxidant system in benzo(α)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis.** *Phytomedicine*, v. 11, p. 85–89, 2004.
40. SHARAFEDDIN, F.; FARSHAD, F. **The effect of aloe vera, pomegranate peel, grape seed extract, green tea and sodium ascorbate as antioxidants on the shear bond strength of composite resin to home-bleached enamel.** *Dent Shiraz Univ Med Sci*, v. 16, p. 296–301, 2015.
41. SHARMA, S.; KALIA, N. P.; SUDEN, P.; CHAUHAN, P. S.; KUMAR, M.; RAM, A. B.; KHAJURIA, A.; BANI, S.; KHAN, I. A. **Protective Efficacy of Piperine against Mycobacterium tuberculosis.** *Tuberculosis*, v. 94, p. 389–396, 2014.
42. SRINIVASAN, K. **Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007.
43. SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol.*, v. 90, n. (2-3), p. 339-46, 2004.
44. VANHAELEN, M.; *J. Pharm. Belg*, 44, 242, 1989.
45. VERMA, N.; BAL, S.; GUPTA, R.; AGGARWAL, N.; YADAV, A. **Antioxidative Effects of Piperine against Cadmium-Induced Oxidative Stress in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes.** *J Diet Suppl.*, v. 17(1), p. 41-52, 2020.
46. WHEELWRIGH, E. G. **Medicinal Plants and their History.** Dover Publications; New York, NY, 1974.
47. ZADOROZHNA M, TATARANNI T, MANGIERI D. **Piperine: role in prevention and progression of cancer.** *Mol Biol Rep.*, v. 46(5), p. 5617-5629, 2019.
48. ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; BEN SALEM, N.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. **Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts, Piperine and Piperic Acid from Piper nigrum.** *Lwt-Food Sci. Technol.*, v. 50, 634–641, 2013.

ANEXO A – Protocolo de aprovação do CEUA

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da resistência de união de um cimento auto-adesivo ao esmalte pré-tratado com piperina extraída da Piper Nigrum, imediatamente após tratamento clareador.

Pesquisador: TAIRA ENDI DE FLAVIANO ALBUQUERQUE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23015019.8.0000.5049

Instituição Proponente: Instituto para o Desenvolvimento da Educação Ltda-IPADE/Faculdade

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.868.589

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo quantitativo, do tipo investigação experimental em laboratório ou "in vitro".

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação da resistência de união de um cimento resinoso auto-adesivo ao esmalte pré-tratado com piperina extraída da Piper nigrum.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são inerentes ao contato dos pesquisadores à soluções biológicas de fixação dos dentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem pendências éticas ou documentais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa sem pendências éticas ou documentais.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133	CEP: 60.190-060
Bairro: Cocó	
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3265-6668	Fax: (85)3265-6668
	E-mail: fc@fchristus.com.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS

Continuação do Parecer: 3.666.589

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1438506.pdf	08/10/2019 11:08:16		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	08/10/2019 11:06:13	TAIRA ENDI DE FLAVIANO ALBUQUERQUE	Aceito
Outros	doscaodedentes.jpg	08/10/2019 10:15:48	TAIRA ENDI DE FLAVIANO ALBUQUERQUE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia.jpg	08/10/2019 10:12:35	TAIRA ENDI DE FLAVIANO ALBUQUERQUE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDissertacao.docx	23/09/2019 14:13:43	TAIRA ENDI DE FLAVIANO ALBUQUERQUE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 28 de Outubro de 2019

Assinado por:

OLGA VALE OLIVEIRA MACHADO
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
 Bairro: Cocó CEP: 60.190-060
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3265-6668 Fax: (85)3265-6668 E-mail: fc@fchristus.com.br