

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

NAIARA DA CRUZ LEITE SANTOS

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Piper aduncum* *IN VITRO***

CAMPO GRANDE

2023

NAIARA DA CRUZ LEITE SANTOS

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Piper aduncum* IN VITRO**

Tese apresentada como exigência para obtenção do título de Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof^a Dr^a Marilene Rodrigues Chang e Co-orientação da Prof^a Dr^a Mariana Mauro de Oliveira.

**CAMPO GRANDE
2023**

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Sérgio Leite meu maior incentivador, quem projetou para mim desde a infância o caminho do conhecimento e valorização do estudo. Dedico a minha amiga Mariana Mauro que acreditou no meu potencial e me inseriu nessa jornada acadêmica tendo grande contribuição na minha carreira profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus, Senhor e Rei** que governa sobre o Universo, quem me deu a graça da vida, o sustento, sabedoria, força, coragem e oportunidade de realizar esse sonho.

Agradeço a Deus pela vida do meu esposo **Wellington Santos** que embarcou nesse desafio comigo, me apoiou com um abraço e aconchego. Obrigada por me presentear no meio dessa jornada com uma filha maravilhosa e encantadora **Isabella**. Filha, parte da minha motivação em não desistir é você. Obrigada por me fazer Mãe.

Aos meus pais, **Sérgio e Iara**. Pelo exemplo de vida e conselhos. Que investiram amor, tempo, educação e sonhos. Vocês são meus maiores incentivadores e intercessores. Obrigada pelas orações!

As minhas queridas irmãs **Natália e Naiane**, amigas, companheiras, me apoiaram com palavras de motivação, encorajamento, oração e amor.

À minha orientadora inicial, **Profª Dra. Doroty Mesquita**, que aceitou me orientar no início dessa jornada e junto ao seu grupo de pesquisa permitiu que parte desse trabalho fosse desenvolvido em seu laboratório.

Sou imensamente grata à minha orientadora atual **Profª Dra. Marilene R. Chang** que me acolheu e aceitou o desafio de contribuir com a riqueza de seus conhecimentos e experiências na minha pesquisa. Obrigada por esse acolhimento, dedicação e tempo.

A **Profª Dra. Rosemary Matias** pela sugestão da espécie vegetal investigada nesta pesquisa. Obrigada por me abraçar com palavras de conselhos, orientação e constante disposição em ajudar. Para mim você é um exemplo de professora a ser seguido.

A minha **amiga e Profª. Dra. Mariana Mauro**. O sentimento de gratidão é imenso. Você é um instrumento de Deus para fazer cumprir na minha vida profissional o propósito pelo qual Ele determinou. Mari nossa amizade foi escrita desde o ventre de nossas mães e sou grata por essa dádiva, pela contribuição profissional e apoio, fazendo tornar esse sonho real.

Ao **Laboratório de Pesquisas Microbiológicas** e equipe de pesquisa da Profª Marilene, em especial Daniele Vitorelli, me apoiou em auxílio técnico e orientação na pesquisa.

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul** e ao **Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias** pela oportunidade e auxílio financeiro.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

Estudos mostram que fitoquímicos presentes em espécies do gênero *Piper* podem ter ação anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e antiviral. O chá de *Piper aduncum* é utilizado na medicina popular, embora, poucos estudos comprovem produtos bioativos em extrato etanólico de folhas desta espécie. Nessa pesquisa foram investigadas a composição fitoquímica, atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do extrato etanólico de folhas de *P. aduncum*. As classes de metabólitos secundários foram determinadas por HPLC-DAD e a atividade antioxidante foi determinada pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). A atividade antimicrobiana foi pesquisada por meio de testes de disco difusão e microdiluição em caldo frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KP-KPC) multidrogas resistentes e *Escherichia coli* ATCC-25922. Para investigação citotóxica foi realizado o ensaio de MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólico) utilizando extrato (62,50, 125, 250 e 500 µg/mL) sobre células de carcinoma intestinal (HT29). Em seguida, fez-se ensaio de cometa e apoptose nas mesmas concentrações. Os metabólitos secundários detectados foram compostos fenólicos e flavonóides. A atividade antioxidante do extrato foi superior a 50%. O extrato não apresentou atividade inibitória frente a *Escherichia coli* e MRSA, porém frente a KP-KPC foi observado halo de inibição de crescimento de $8,5 \pm 0,7$ mm e $10,5 \pm 2,12$ mm, nas concentrações de 500 µg/disco e 2000 µg/disco, respectivamente. A concentração inibitória mínima sobre KP-KPC foi elevada (superior à 2000 µg/mL) e a viabilidade das células HT29 não foi alterada nas concentrações de 62,50 a 250 µg/m. Na concentração de 500 µg/mL o extrato foi citotóxico (MTT) e genotóxico (cometa) com média de $47,7 \pm 2,9$ de células lesionadas, entretanto, no teste de apoptose *in situ*, não foi observada morte celular (HT29). No extrato etanólico de folhas de *P. aduncum* estão presentes compostos fitoquímicos de comprovada ação farmacológica, propriedades antioxidantes e citotóxicas. Acredita-se que a utilização de outros solventes (além do etanol) e um maior número de microrganismos são necessários para determinar o potencial antimicrobiano de *P. aduncum*.

Palavras-chave: Carcinoma; flavonóides; plantas medicinais; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Studies show that phytochemicals present in species of the genus *Piper* may have anti-inflammatory, antitumor, antimicrobial, and antiviral actions. *Piper aduncum* tea is used in folk medicine, however, few studies prove bioactive products in ethanolic extract of leaves of this species. In this research, the phytochemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of ethanolic extract of *P. aduncum* leaves were investigated. The secondary metabolite classes were determined by HPLC-DAD and antioxidant activity was determined by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method. Antimicrobial activity was performed by means of disk diffusion and broth microdilution tests against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), multidrug-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KP-KPC) and *Escherichia coli* ATCC-25922. For cytotoxic investigation, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay was performed using extract (62.50, 125, 250 and 500 µg/mL) on intestinal carcinoma cells (HT29). Then, comet assay and apoptosis assay were performed at the same concentrations. The secondary metabolites detected were phenolic compounds and flavonoids. The antioxidant activity of the extract was higher than 50%. The extract did not show inhibitory activity against *Escherichia coli* and MRSA, but against KP-KPC a growth inhibition halo of 8.5 ± 0.7 mm and 10.5 ± 2.12 mm was observed at concentrations of 500 µg/disc and 2000 µg/disc, respectively. The minimum inhibitory concentration on KP-KPC was high (greater than 2000 µg/mL) and the viability of HT29 cells was not altered at concentrations from 62.50 to 250 µg/mL. At the concentration of 500 µg/mL the extract was cytotoxic (MTT) and genotoxic (comet) with an average of 47.7 ± 2.9 injured cells, however, in the in situ apoptosis test, no cell death was observed (HT29). In the ethanolic extract of *P. aduncum* leaves are present phytochemical compounds of proven pharmacological action, antioxidant and cytotoxic properties. It is believed that the use of other solvents (besides ethanol) and a larger number of microorganisms are needed to determine the antimicrobial potential of *P. aduncum*.

Keywords: Carcinoma; flavonoids; medicinal plants; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|--|
| AMH | Ágar Mueller Hinton |
| ATCC | <i>American type culture collection</i> |
| CAMHB | Caldo Mueller Hinton cátion ajustado |
| CCR | Câncer de colo retal |
| CeTroGen | Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> |
| DAD | <i>Diode array detector</i> |
| DD | Disco Difusão |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> |
| DPPH | 2,2 difenil-1-picrilhidrazil |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ESBL | β-lactamases de espectro estendido |
| HPLC–DAD | Cromatografia líquida Detector de arranjo de diodos |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| <i>K. pneumoniae</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| KP-KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases |
| MIC | Concentração Inibitória Mínima |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina |
| MTT | Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio) |
| <i>Piper aduncum L.</i> | <i>Piper aduncum</i> Linnaeus, 1.753 |
| UFMS | Universidade Federal de Mato Grosso do Sul |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| µL | Microlitro |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 09 |
| 2 | CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA | 10 |
| 2.1 | PLANTA MEDICINAL | 10 |
| | 2.1.1 Família Piperaceae..... | 11 |
| | 2.1.2 O Gênero <i>Piper</i> | 11 |
| | 2.1.3 <i>Piper aduncum</i> Linnaeus, 1.753 | 13 |
| 2.2 | RESISTÊNCIA MICROBIANA | 15 |
| | 2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina..... | 16 |
| | 2.2.2 <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| | 2.2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase..... | 18 |
| 2.3 | O CÂNCER | 19 |
| | 2.3.1 Câncer de colorretal..... | 22 |
| 3 | OBJETIVOS | 24 |
| | 3.1 Objetivos Geral..... | 24 |
| | 3.2 Objetivos Específicos..... | 24 |
| 4 | REFERÊNCIAS | 25 |
| 5 | MANUSCRITO | 36 |

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento etnobotânico das propriedades terapêuticas de plantas medicinais, como fonte de tratamento para doenças, tem sido transmitido de geração a geração durante milhares de anos.

A família Piperaceae, composta de 10 a 12 gêneros, é considerada uma das mais primitivas do grupo das angiospermas. *Piper* é o maior gênero em representatividade, com cerca de 2000 espécies distribuídas em países tropicais e subtropicais. Na medicina tradicional tem sido usada para tratamento de enfermidades de pele, dores de cabeça e de estômago, tosse, febre e infecções como vaginite, urinária e gripes.

Piper aduncum L. é popularmente conhecida como pimenta-de-macaco, aperta-ruão, falso-jaborandi, jaborandi, matico e pimenta-longa, entre outros. Estudos mostram que os extratos de *P. aduncum* podem apresentar propriedades citotóxica, antibacteriana, antiparasitária, antifúngica e inseticida.

Diante do exposto, torna-se importante a busca por compostos bioativos provenientes de produtos naturais que podem ser base para descoberta de novos fármacos, vacinas peptídicas, alternativas terapêuticas para tratamento de doenças infecciosas, a exemplo de infecções bacterianas e doenças não infecciosas, como o câncer.

Neste estudo fez-se a detecção dos constituintes fitoquímicos presentes no extrato etanólico de folhas de *P. aduncum*, investigação da atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica sobre as células de carcinoma intestinal HT29.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

2.1 PLANTA MEDICINAL

Muitas plantas medicinais estão entre os principais recursos terapêuticos da medicina tradicional, medicina complementar e alternativa (FALZON & BALABANOVA, 2017). Parte dos medicamentos disponíveis no mercado provém de produtos naturais e a partir deles são isoladas moléculas que servem como protótipo para o delineamento e planejamento de novos fármacos e para a investigação de novas ações terapêuticas (PEDROSO et al., 2021).

Uma pesquisa realizada no Brasil demonstrou que 91,9% da população faz uso de algum tipo de planta medicinal e que 46% cultivam essas plantas em seus quintais (ETHUR et al., 2011). O uso dessas plantas muitas vezes é a única forma de terapia que algumas comunidades têm acesso e o conhecimento sobre as propriedades farmacológicas passa a ser transferido para gerações futuras, tornando-se um aspecto tradicional e cultural (FALCÃO et al., 2022; PASA et al., 2005; ONOFRE et al., 2015).

Porém, o uso indiscriminado em todas as suas formas pode levar a alterações fisiológicas no organismo, assim, é importante o conhecimento sobre a toxicidade para avaliar a relação risco/benefício (LOURENÇO et al., 2009; BRISKIN, 2000; ESSERS et al., 1998).

A segurança e eficácia na utilização de uma planta medicinal depende da identificação correta da planta, conhecimento de qual parte deve ser usada, modo de preparo, forma de uso e dose apropriada (COLET et al., 2015).

No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Programa Nacional de Plantas Medicinais fazem orientações de acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2016).

2.1.1 A família Piperaceae

O uso medicinal de Plantas da família das Piperaceae é bem conhecido pela população rural brasileira (PEREIRA et al., 2007). Essa Família é considerada uma das mais primitivas do grupo das angiospermas possui 12 gêneros, sendo *Macropiper*, *Zippelia*, *Manekia*, *Peperomia* e *Piper* os mais descritos e os três últimos recorrentes na Amazônia e Mata Atlântica (BRITO & PEREIRA, 2019). Estudos mostram que existem aproximadamente 3.700 espécies vegetais distribuídas em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul (BERNUCI et al., 2016; CHRISTENHUZ & BYNG, 2016; GUTIÉRREZ et al., 2016; QUIJANO-ABRIL et al., 2006).

2.1.2 O gênero *Piper*

O gênero *Piper*, popularmente chamado de “pimentas” é representado por aproximadamente 2.000 espécies de plantas, distribuídas em ambientes úmidos, áreas como selvas e florestas tropicais (BERNUCI et al., 2016; GUTIERREZ et al., 2016).

No Brasil é considerado o quinto maior em representatividade, com aproximadamente 291 espécies (MELO & ALVES, 2019) comuns nas formações florestais, particularmente na Mata Atlântica. As diversas espécies são ervas, arbustos ou pequenas árvores, frequentemente epífitas ou lianas, com folhas alternadas, simples com ou sem estípulas. E os frutos que muitas vezes são

utilizados na culinária são na forma de baga ou drupa (SOUZA & LORENZI, 2005), sendo de ocorrência também no Cerrado e Pantanal sul mato-grossense (POTT; POTT, 1994).

Compostos bioativos como taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides, lignanas, glicosídeos e terpenóides são encontrados nas sementes, folhas e casca do caule de espécies de *Piper* (VADLAPUDI et al., 2012; GUTIERREZ et al., 2013).

Espécies do gênero *Piper* vêm destacando-se em pesquisas na área da química e prospecção de ensaios biológicos por serem capazes de produzirem metabólitos secundários e óleos essenciais com potencial atividade antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória, anticancerígena, antileishmania, hepatoprotetora, antioxidante entre outras (CARSONO et al., 2022; PARMAR et al., 1997).

Na América do Sul, principalmente no Brasil, várias espécies desse gênero são usadas na medicina popular e tradicional, na alimentação, no comércio, com vendas de remédios caseiros, seguindo assim de importância comercial e econômica (BALDOQUI, 2009; GOGOSZ, 2012).

Uma das formas de utilização dessas espécies na medicina popular é o chá de raízes e folhas para combater enfermidades. Usado por povos de vários países, incluindo o Brasil, além do chá, emplastro e compressa é usado para tratar dores de cabeça e de estômago, tosse, gripe, garganta inflamada, febre, cicatrização de feridas, queimaduras, picada de inseto, pressão alta, diabetes, diarreias, cólica menstrual, infecção urinária e vaginite (PAVÃO et al., 2021; PEREIRA et al., 2007).

Das espécies desse gênero, rica em constituintes fitoquímicos e com uso na medicina popular está a *Piper aduncum* L. (ARROYO et al., 2014; BALDOQUI et al.; 1999; LAGO et al., 2004).

2.1.3 *Piper aduncum* Linnaeus, 1.753.

A *P. aduncum* (fig. 1) é um arbusto tropical difundido na América do Sul e Central, crescendo naturalmente na Amazônia e na Mata Atlântica do Brasil, onde ocorrem espontaneamente em pastagens, beiras de matas e com diversos tipos de formação florestal. É uma das plantas que compõem o inventário preliminar de 294 espécies das plantas alimentícias silvestres do Mato Grosso do Sul usadas na dieta humana, ou com potencial para uso (BORTOLOTTO et al., 2018).

P. aduncum foi descrita na primeira edição da Farmacopeia Oficial do Brasil, publicada em 1926, onde consta a folha, como a parte utilizada na forma de extrato fluido, com nome popular, aperta-ruão (BRANDÃO et al., 2008).

Essa planta também é conhecida como “jaborandi do mato ou, “jaborandi”, “pimenta-de-macaco ou mático” e “erva-jaboti” (ARROYO et al., 2015; LORENZI & MATOS, 2008). Em Mato Grosso do Sul *P. aduncum* é mais conhecida como falso-jaborandi.

Figura 1. Foto de partes aéreas de *Piper aduncum* L., Fazenda Três Barras, Campo Grande – MS.



Fonte: Imagem cedida pela Profa. Eloty Schleder (2016).

Estudo de REBELO et al., (2009) relata a presença de terpenos do tipo canfeno, limoneno e cariofileno em *P. aduncum*.

Outros estudos comprovam a presença metabólitos secundários do tipo terpenos, flavonóides e outros compostos em suas folhas (LORENZI et al., 2021; MORANDIM et al., 2009; PIMENTEL et al., 1998a). Estes metabólitos têm sido associados a possíveis atividades biológicas como: antibacteriana (LOUREIRO, 2016; MONZOTE et al., 2017; ORJALA et al., 1994; RUIZ et al., 2013), antitumoral (ARROYO et al., 2014; CALDERON et al., 2006; CALDERON-HERRERA et al., 2019), antiprotozoária (VILLAMIZAR et al., 2017), antiparasitária (DUROFIL et al., 2021), antioxidante (REBELO et al., 2009), antifúngica (MORANDIM et al., 2005; SANTOS et al., 2013; VALADARES et al., 2018, 2020), inseticida (LUCENA et al., 2017; MEE et al., 2009; CELESTINO et al., 2016), anti-inflamatória (ARROYO et al., 2012) e citotóxica (BERNUCI et al., 2016).

Alves et al., (2008) realizaram um levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais na região de Dourados-MS e *P. aduncum* entrou na lista de uso medicinal pela população local onde o chá das folhas é utilizado como tônico e tratamento de infecções hepáticas.

Pavão et al., (2021) em outro estudo etnobotânico, listou *P. aduncum* entre 209 espécies de plantas usadas na terapêutica da febre, dor de cabeça e diarreia por povos guarani e kaiowá, localizados nos municípios de Amambai (aldeia Amambai), Caarapó (aldeia Te'yikue), Dourados (aldeia Jaguapiru), Douradina (aldeia Panambi) e Juti (aldeia Taquara), todos do estado do Mato Grosso do Sul.

O conhecimento etnofarmacológico abre portas para o desenvolvimento de novos fármacos e gera perspectivas de tratamento utilizando o contexto cultural, entretanto, pesquisas precisam ser desenvolvidas para avaliar ações farmacológicas a partir de extratos, frações, óleo essencial e substâncias isoladas que apresentam propriedades biológicas atribuídas a planta.

2.2. RESISTÊNCIA BACTERIANA

As substâncias denominadas antimicrobianas são aquelas que agem sobre os microrganismos inibindo o seu crescimento ou causando morte. Podem ser de origem natural, antibióticos, sintéticos ou quimioterápicos (MOTA et al., 2010).

Bactérias apresentam uma grande capacidade de responder a ameaças ambientais, ao sistema imune do hospedeiro e à presença de antibióticos, por isso conseguem desenvolver diferentes formas de resistência para se adaptarem ao meio em que vivem, o que acaba afetando negativamente a eficácia

antimicrobiana em diversas terapias (JOLIVET-GOUGEON & BONNAURE-MALLET, 2014).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos, aliadas à grande capacidade adaptativa dos microrganismos, possibilitou o surgimento de bactérias multidrogas resistentes (SILVA, 2008), tornando-se uma ameaça à saúde pública em todo o mundo (BRYCE et al., 2016).

Essa resistência está associada ao aumento da morbidade e mortalidade é reconhecida como uma ameaça emergente à saúde global (WHO, 2022). Estima-se que, se não for controlada, até 2050 ela poderá contribuir com até 10 milhões de mortes por ano (O'NEILL, 2016).

2.2.1 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva presente na microbiota humana, principalmente na pele, podendo-se tornar patogênica e levar a uma infecção quando há ruptura da barreira cutânea ou diminuição da imunidade (LEE et al., 2018; KIM et al., 2019). É responsável por várias infecções, como osteomielite, infecções de feridas, pneumonia, endocardite, meningite, abscessos cerebrais e impetigo (PAPADOPOULOS et al., 2018; HAAG et al., 2019, ADAME-GÓMEZ et al., 2020).

No ambiente hospitalar, um dos lugares mais comuns de colonização e infecção por MRSA são as unidades de terapia intensiva e estão associados a altos índices de morbimortalidade (KOURTIS et al., 2019; MENEGUIN et al., 2020 TONG et al., 2015).

Quando esse importante patógeno nosocomial apresenta resistência à meticilina, é denominado MRSA -*methicillin resistant Staphylococcus aureus* (KIM et al., 2019).

Esses microrganismos são responsáveis por numerosos surtos hospitalares em todo o mundo. Na década de 90, foram reportados casos de infecções fora do ambiente hospitalar causadas por linhagens específicas de *S. aureus*, denominados CA-MRSA (*community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), que possuíam maior suscetibilidade aos antimicrobianos e virulência associada, quando comparadas com as linhagens hospitalares HA-MRSA (*hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), (KONG et al., 2016; PENG et al., 2018; TURNER et al., 2019).

O MRSA é um desafio importante na terapia estafilocócica, não apenas por ser causador de infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde, mas, por apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos, o que o torna um dos microrganismos multirresistentes de alta prioridade para a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos (LEE et al., 2018; TURNER et al., 2019).

2.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacterales, gram-negativo, não esporulante, anaeróbio facultativo que coloniza o trato intestinal de animais de sangue quente e de humanos (TENAILLON et al., 2010). Apesar de ser comum no trato gastrointestinal e não representar perigo para seu hospedeiro, algumas estirpes podem ser patogênicas responsáveis por diarreias em crianças, septicemia, meningite neonatal e infecções do trato urinário. De acordo com os fatores de virulência elas podem ser classificadas em *E. coli*

enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC), (GORCHEV & OZOLINS, 2011).

É um dos um dos agentes mais frequentes de infecção trato urinário que pode ser resistente a fármacos comerciais tornando o tratamento de difícil cura (PINTO, 2016). Por exemplo, a taxa de resistência à ciprofloxacina, um antibiótico comumente usado para tratar infecções do trato urinário, variou de 8,4% a 92,9% para *E. coli* e de 4,1% a 79,4% para *Klebsiella pneumoniae* em países que reportaram ao *Global Antimicrobial Resistance and Use* Sistema de Vigilância (GLASS), (WHO, 2022).

2.2.3 *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

Klebsiella pneumoniae pertence à família Enterobacterales. São bastonetes gram-negativos, encapsulados, que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais saudáveis (NAVON-VENEZIA et al., 2017).

Entretanto, diante de condições desfavoráveis podem produzir uma série de infecções como do trato urinário, pneumonia, infecções de feridas cirúrgicas, endocardite e septicemia (VADING et al., 2018).

Um importante agente etiológico de infecções no ambiente hospitalar (GOMES & CASALINI, 2018), com elevação de índices de infecção em âmbito mundial, causadas por cepas resistentes como *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC, traz consequências graves, como o aumento do período de internação, da morbidade e mortalidade, tornando-se um

problema de saúde pública em diversos países, inclusive no Brasil, devido às limitações terapêuticas disponíveis para tratar infecções graves (MIRANDA et al., 2019).

A KP-KPC é uma bactéria restrita ao ambiente hospitalar, cuja característica é a produção de uma betalactamase denominada carbapenemase, que tem a propriedade de conferir a resistência aos carbapenêmicos, ou seja, de inibir a ação dos antibióticos carbapenêmicos (como Ertapenem, Imipenem e Meropenem), que são utilizados para tratar infecções graves por microrganismos multirresistentes, especialmente linhagens produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (GOMES & CASALINI, 2018; MIRANDA et al., 2019).

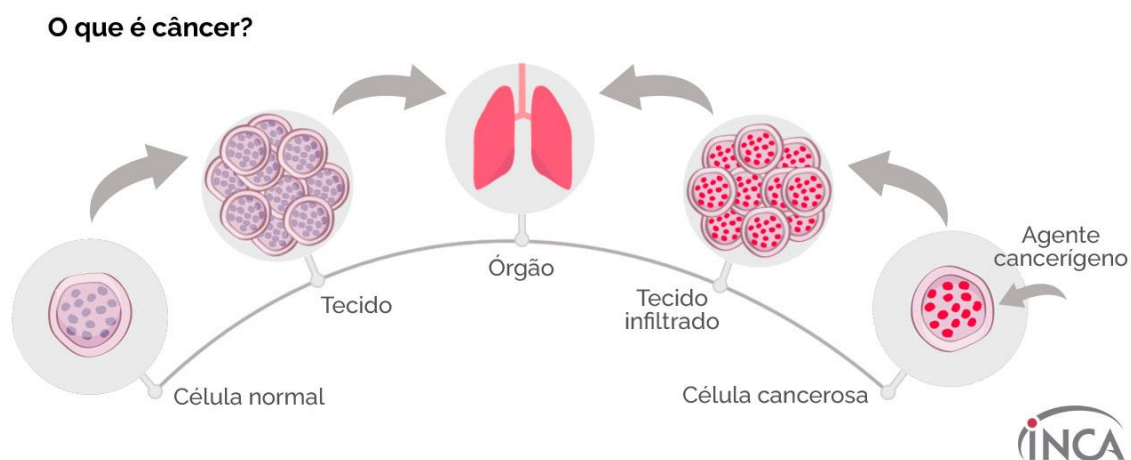
Em alguns países, os antibióticos carbapenêmicos não funcionam em mais da metade dos pacientes devido a resistência (BRITO et al., 2021).

Logo, a resistência a essa classe de fármacos, tornou-se um potencial problema a ser enfrentado em infecções decorrentes dessas bactérias, estabelecendo preocupação a nível de saúde mundial (REYES et al., 2019).

2.3 O CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que podem afetar qualquer parte do corpo, caracterizado por rápida proliferação de células anormais que crescem, invadem tecidos (fig. 2) e se espalham para vários órgãos por meio de metástases, prejudicando suas funções básicas (INCA, 2022).

Figura 2. Ciclo celular da carcinogênese



Fonte: INCA (2022)

A proliferação desordenada pode se originar a partir de uma única célula mutada, que sofre alterações genéticas decorrentes de agentes externos tanto como os agentes físicos (radiação ionizante e não ionizante), compostos químicos e agentes biológicos (infecções por determinados vírus, bactérias e parasitas) entre outros fatores (INCA, 2022). Estas mutações levam a alterações na expressão ou função de genes-chave para a manutenção da homeostasia celular, surgindo como consequência dessas alterações, a transformação de células normais em células tumorais que desencadeiam o câncer (STEWART & BROWN, 2013).

Desta forma, a diferença mais significativa entre uma célula neoplásica e uma célula não alterada é que o crescimento e a proliferação da primeira persistem mesmo na ausência de fatores de crescimento. Fenômeno ocorrido por meio das alterações genéticas anteriormente descritas. Tais alterações garantem que durante o processo de formação do tumor as células adquirem algumas características como: autossuficiência para sinais de crescimento;

insensibilidade aos sinais anti-crescimento; evasão de apoptose; potencial replicativo infinito; sustentação da angiogênese a fim de nutrir o tumor e elevada capacidade de invasão tecidual e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2011). As mudanças podem chegar a níveis extremos determinando altas taxas de morbimortalidade, afetando pessoas de todas as idades e em diferentes proporções. Enquanto isso, os índices de novos casos continuam a aumentar no mundo todo e estima-se que seja superior a 24 milhões até 2035 (STEWART, 2016).

Apesar dos avanços na terapia oncológica e aplicação de produtos farmacológicos, estima-se que 70 a 90% da população mundial prefiram o uso das plantas medicinais ou seus extratos para o tratamento do câncer, pois a maioria dessas pessoas não têm acesso aos medicamentos industrializados seja pela dificuldade de aquisição, ou devido ao seu alto custo (BRASIL, 2012; OMS, 2002).

Os pacientes que recebem o diagnóstico de neoplasia, geralmente procuram explorar todas as possíveis opções de tratamento, incluindo a quimioterapia, que por sua vez, atua de forma não específica. Lesiona células malignas mas também causam morte de células saudáveis. Diante disso, muitos pacientes recorrem ao uso de fitoterápicos e/ou plantas medicinais na busca da melhora de sua qualidade de vida (ALMEIDA et al., 2005; CHENG et al., 2010).

Levando-se em consideração esses dados epidemiológicos em uma época em que a medicina foca na prevenção como prioridade, faz-se importante a busca de melhores estratégias na prevenção do câncer.

2.3.1. Câncer de colorretal

O câncer de intestino, também conhecido como de colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais incidente na população em geral e ocupa a segunda posição tanto entre homens quanto em mulheres. São, aproximadamente, 40 mil novos casos diagnosticados por ano. É tratável e, na maioria dos casos, curável, se detectado precocemente. Estima-se que no Brasil serão mais de 45.000 novos casos e mais de 20.000 mortes em 2022 (INCA, 2022).

O cólon é o local mais frequente de neoplasias primárias como adenomas e adenocarcinomas, acomete o intestino grosso (cólon) e/ou o reto. Os sintomas são pouco perceptíveis aos doentes, até que estejam em fase avançada. Ela tem a particularidade de exibir lesão que é chamada de pólipos adenomatosos. O tempo estimado para aparecimento, crescimento e transformação desse adenoma em tumor é superior a 10 anos, período este suficientemente para permitir identificação, ressecção e, portanto, a prevenção (GAMA, 2005).

Os sintomas iniciais são consequência do tipo de tumor e localização. Tumores localizados no cólon direito levam ao surgimento de diarreia e dor no abdômen (síndrome dispéptica). Nos estágios mais avançados pode surgir anemia e outros sintomas associados. Nos tumores do cólon esquerdo, surgem obstipação intestinal progressiva, fezes afiladas, escuras ou eventualmente com sangue. Nos tumores do reto o sangramento é frequente, misturado ou não com fezes, muco ou pus. Neste caso, é frequente a sensação de evacuação incompleta (BALLESTER et al., 2016).

Os adenocarcinomas representam a quase totalidade dos cânceres colorretais e surge a partir de alterações genéticas de células da mucosa colônica normal que evoluem para pólipos adenomatosos (BENSON, 2007).

O pólipo é formado a partir de um crescimento anormal da mucosa do intestino que se projeta em sentido à luz do órgão. O pólipo hiperplásico não possui alterações malignas, mas é considerado como fator de risco para o CCR quando o indivíduo apresenta 5 ou mais pólipos na região proximal ou sigmóide, ou mais que 30 pólipos no cólon, ou ainda apresenta histórico familiar de primeiro grau com pólipos (DAVILA et al., 2006).

É uma doença complexa e multifatorial que progride ao longo de anos e envolve interações entre fatores genéticos, ambientais e alterações somáticas acumuladas no epitélio intestinal (WEITZ et al., 2005; BUCCAFUSCA, et al., 2019).

Com base nas evidências científicas atuais, pelo menos 40% de todos os casos de câncer podem ser evitados com medidas eficazes de prevenção primária, e a mortalidade adicional pode ser reduzida por meio da detecção precoce de tumores e tratamento eficaz com compostos anticancerígenos (IARC, 2022).

Parte dos medicamentos industrializados que estão no mercado são originários de produtos naturais (BOHATCH et al., 2016). Esses dados demonstram o interesse científico e comercial em estudos que correlacionam a biodiversidade de plantas com conhecimento etnobotânico em busca de potenciais fármacos fitoprotetores e compostos anticancerígenos (ARROYO et al., 2015; GUERRA, 2017; LIMEIRAS et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar a composição fitoquímica e investigar atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do extrato etanólico de folhas de *Piper aduncum*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os compostos fenólicos presentes no extrato etanólico *Piper aducum*.
- Investigar a atividade antioxidante do extrato etanólico de *Piper aducum* *in vitro*.
- Investigar atividade antimicrobiana do extrato etanólico *Piper aduncum* frente a isolados clínicos resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.
- Verificar ação citotóxica, genotóxica e apoptótica do extrato etanólico de *Piper aduncum* em células de carcinoma intestinal (HT29).

4 REFERÊNCIAS

ADAME-GÓMEZ, R.; CASTRO-ALARCÓN, N.; VENCES-VELÁZQUEZ, A. Genetic diversity and virulence factors of *S. aureus* isolated from food, humans, and animals. **International Journal of Microbiology**, v.2020, p. 10, 2020.

ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, p.118-129, 2005.

ALONSO-CASTRO A.J.; VILLARREAL M.L.; SALAZAR-OLIVO L.A. et al. Mexican medicinal plants used for câncer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.3, p.945-72, 2011.

ALVES E.O.; MOTA J.H.; SOARES T.S. et al. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.651-658, 2008.

ARROYO, J., ALMORA, Y., QUINO, M., et al. Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. In: **Anais da Faculdade de Medicina**. UNMSM. Faculdade de Medicina, 2012. p. 85-91.

ARROYO, J.; HERRERA-CALDERÓN, O.; CHÁVEZ-ASMAT, R. et al. Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de *Piper aduncum* L. (matico) y su toxicidad oral en ratones. In: **Anais da Faculdade de Medicina**. UNMSM. Faculdade de Medicina, 2014. p. 13-18.

ARROYO-ACEVEDO J.; CHÁVEZ-ASMAT R.J.; ANAMPA-GUZMÁN A. et al. Protective effect of *Piper aduncum* capsule on DMBA-induced breast cancer in rats. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v.9, p.41-48, 2015.

BALDOQUI, D.C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. et al. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**, v.32, n.5, p.1107-1109, 2009.

BALDOQUI, D.C.; KATO, M.J.; CAVALHEIRO, A.J. et al. Um cromeno e ácido benzóicoprenilado de *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.51, n.7, p.899-902, 1999.

BALLESTER, V.; RASHTAK, S.; & BOARDMAN, L. Clinical and molecular features of young-onset colorectal câncer. **Jornal Mundial de Gastroenterologia**, v.22, n.5, pág.1736, 2016.

BARH, D.; BARVE, N.; GUPTA, K. et al. Exoproteome and secretome derived broad spectrum novel drug and vaccine candidates in *Vibrio cholerae* targeted by *Piper betel* derived compounds. **PLoS one**, v. 8, n. 1, pág. e52773, 2013.

- BENAVENTE O & CASTILLO J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.15, p.6185-6205, 2008.
- BENITES R. Al. Efecto bactericida *in vitro* de *Piper aduncum* sobre *Streptococcus pyogenes*. Tesis para Optar el Grado de Bachilleren Medicina. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Trujillo, 2017.
- BENÍTEZ, N.P.; MELENDEZ, E.; STASHENKO, E.E. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper Lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. **Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas Medicinales y Aromáticas**, v.8, n.4, p.301- 304, 2009.
- BENSON, AL. Epidemiologia, progressão da doença e carga econômica do câncer colorretal. **Jornal de farmácia de cuidado gerenciado**, v.13, n.6, p.5-18, 2007.
- BERNUCI, K.Z.; IWANAGA, C.C.; FERNANDEZ-ANDRADE, C.M. et al. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, v.21, n.12, p.1698, 2016.
- BOHATCH M.S.J.; ESMERINO L.A.; DA SILVA R.Z. et al. Efeitos da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *Piper solmsianum* E *Equisetum arvense*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.13, n.2, p.100-106, 2016.
- BORTOLOTTO, I. M et al. Lista preliminar das plantas alimentícias nativas de Mato Grosso do Sul, Brasil. 2018.
- BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A. et al. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.127-134, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant physiology**, v.124, n.2, p.507-514, 2000.
- BRITO, A. C.; PEREIRA, L. A. Nível de conservação de *Peperomia* Ruiz & Pav. (PIPERACEAE) no estado do Amapá. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v.34, n.2, p.46-58, 2019.

BRITO, G. B. & TREVISAN, M. O uso indevido de antibióticos e o eminente risco de resistência bacteriana. **Revista Artigos. Com**, v. 30, p. e7902-e7902, 2021.

BRYCE, A.; HAY, A.D.; LANE, I.F. et al. Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**, v.352, 2016.

BUCCAFUSCA, G.; PROSERPIO, I.; TRALONGO, A.C. et al. Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care. **Critical reviews in oncology/hematology**, v.136, p.20-30, 2019.

CALDERON, A.I.; VAZQUEZ, Y.; SOLIS, P.N. et al. Screening of Latin American plants for cytotoxic activity. **Pharmaceutical Biology**, v.44, n.130–140, 2006.

CALDERON-HERRERA, O.; ALVARADO-PURAY, C.; ARROYO-ACEVEDO, J.L. et al. Phytochemical screening, total phenolic content, antioxidant, and cytotoxic activity of five peruvian plants on human tumor cell lines. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n. 2, 2018.

CARSONO, N. et al. A Review of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Properties of *Piper* Species. **Moléculas**, v.27, n.19, pág. 6774, 2022.

CELESTINO, C.O.; VARÃO, C.A.R.; VELUDO, H.H. et al. Ação Inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Jacq.). **South Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v.3, n.2, p.03-09, 2016.

CHENG, C.W.; FAN, W.; KO, S.G. et al. Evidences-based management of herb-drug interaction in câncer chemotherapy. **Explore: The Journal of Science and Healing**, v.6, n.5, p.324-329, 2010.

CHRISTENHUZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, p. 201-217, 2016.

COLET, Cristiane F. et al. Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.2, p.331-339, 2015.

CORREA, E.A.; HÖGESTÄTT, E.D.; STERNER, O. et al. *In vitro* TRPV1 activity of piperine derived amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.9 p.3299-3306, 2010.

DAVILA, RAQUEL E. et al. Diretriz ASGE: rastreamento e vigilância do câncer colorretal. **Endoscopia gastrointestinal**, v.63, n.4, p.546-557, 2006.

AGUIAR GUERRA, A.C.V. et al. *Libidibia ferrea* apresenta efeitos antiproliferativos, apoptóticos e antioxidantes em uma linha celular de câncer colorretal. **Biomedicina & Farmacoterapia**, v.92, p.696-706, 2017.

DUROFIL A.; RADICE M.; BLANCO-SALAS et al. *Piper aduncum* essential oil: a promising insecticide, acaricide and antiparasitic. A review. **Parasite**, v.28, n.42, 2021.

ESSERS, A. J. A.; ALINK, G. M.; SPEIJERS, G. J. A. et al. Food plants toxicants and safety: Risk assessment and regulation of inherent toxicants in plant foods. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.5, n.3, p.155-172, 1998.

ETHUR, L. Z.; JOBIM, J. C.; RITTER, J. G. et al. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui-RS. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.121-128, 2011.

FALCÃO, J.G.; MARINHO, L.C.; ZANANDREA, I. Uso medicinal de plantas no povoado Muquila, Arari, Maranhão – um estudo etnobotânico. **Ethnoscintia-Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology**, v. 7, n. 1, p. 67-87, 2022.

FALZON, C.C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy: an introduction to herbal medicine. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 2, p. 217-227, 2017.

GAMA, A.H. Câncer coloretal: a importância de sua prevenção. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.42, p.2-3, 2005.

GOGOSZ, A.M.; BOERGER, M.R.T.; NEGRELLE, R.B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v.63, n.2, 2012.

GOMES, D. R. M. & CASALINI, C. C. Características microbiológicas de *Klebsiella Pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar: uma revisão. **Revista Saúde Integrada**, v.11, n.22, p.71-84, 2018.

GORCHEV, H.G.; OZOLINS, G. Guidelines for drinking-water quality. **WHO chronicle**, v.38, n.3, p.104–108, 2011.

GUERREIRO, G.; BERNI, R.; MUÑOZ-SANCHEZ, J. A. et al. Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. **Genes**, v.9, n.6, p.309, 2018.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, T.; ROSSI, D. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from eastern Ecuador. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v.27, n.1, p. 39-48, 2009.

GUIMARÃES, E.F.; GIORDIANO, L.C.S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado de Ceará. **Rodriguésia**, v.55, p.21-46, 2004.

GUNDALA, R.S.; ANEJA, R. Piper betel leaf: a reservoir of potential xenohormetic nutraceuticals with cancer-fighting properties. **Cancer Prevention Research**, v.7, n.5, p.477, 2014.

GUTIERREZ, R.M.P.; GONZALEZ, A.M.N.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from Piper: A review of its phytochemistry and pharmacology. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.13, p.163–193, 2013.

GUTIÉRREZ, Y.; MONTES, R.; SCULL, R. et al. Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. **Chemistry & Biodiversity**, v.13, n.12, p.1715-1719, 2016.

HAAG, A.F.; FITZGERALD, J.R. & PENADÉS J.R. *Staphylococcus aureus* in animals. **Microbiology Spectrum**, v.7, n.3, p.7.3. 11, 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Marcas do câncer: a próxima geração. **Cela**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 2022. Tópicos de câncer. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/>

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2022. Câncer de intestino. As topografias referentes ao câncer de intestino C18-21. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/intestino>

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2022. O que é o câncer. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>

JOLIVET-GOUGEON, A., & BONNAURE-MALLET, M. Biofilms as a mecanismo of bacterial resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.11, p.49-56, 2014.

KIM, J.J.; BLEVINS, M.W.; BROOKS, D.J. et al. Successful control of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a burn intensive care unit by addition of universal decolonization with intranasal mupirocin to basic infection prevention measures. **American Journal of Infection Control**, v.47, n.6, p.661-665, 2019.

KONG, E.F.; JOHNSON, J.K.; JABRA-RIZK, M.A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An enemy amidst us. **PLoS Pathogens**, v.12, n.10, p.e1005837, 2016.

KOURTIS, A. P.; HATFIELD, K.; BAGGS, J. et al. Vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections—United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.68, n.9, p.214, 2019.

LAGO, J.H.G.; RAMOS, C.S.; CASANOVA, D.C.C. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium c ladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v.67, n.11, p.1783-1788, 2004.

LAGO, J.H.G.; KATO, M.J. 3- α , 4- α -Epoxy-2-piperidone, a new minor derivative from leaves of *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae). **Natural Product Research**, v.21, n.10, p.910-914, 2007.

LAGO J.H.G.; CHEN A.; YOUNG M.C.M. et al. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v.2, p. 96-98, 2009.

LEE, A.S.; LENCASTRE, H.; GARAU, J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease primers**, v.4, n.1, p.1-23, 2018.

LIMEIRAS, S.M.; OLIVEIRA, B.C.; PESSATTO LR. et al. Effects of *Moquiniastrum polymorphum* ssp *floccosum* ethnolic extract on colorectal carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. **Genética Molecular Resolução**, v. 16, 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2021.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa: Plantarum**, 2008.

LOUREIRO, R.J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, AT. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; GUARIDO, K. L.; SENSIATE, L. A.; SALLES, M. J. S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, p.407-413, 2009.

LUCENA, D. C.; BERTHOLDO-VARGAS, L. R.; SILVA, W. C. et al. Atividade biológica de extratos de *piper aduncum* sobre *anticarsia gemmatalis* (hübner) (Lepidoptera: erebidae) e *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, p.1869-1879, 2017.

MEE, KC.; SULAIMAN, S & OTHMAN, H. Eficácia do extrato de *Piper aduncum* contra a mosca doméstica (*Muscadomestica*) adulta. **Journal Tropical Medicine Parasitology**, v.32, n. 2, p.52-57, 2009.

MELO, A & ALVES, M. Novos registros de espécies de *Piper* L. (Piperaceae) em estados da Amazônia brasileira. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 9, n. 1, p. 26-30, 2019.

MENEGUIN, S.; TORRES, E.A & POLLO, C.F. Fatores associados à infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.73, 2020.

MIRANDA, I.F.; SANTOS, M.L.; OLIVEIRA, W.C.S. et al. *Klebsiellapneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC: Disseminação Mundial e Situação Atual no Brasil. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.25, n.2, p.113-119, 2019.

- MONZOTE, L.; SCULL, R.; COS P. et al. Essential Oil from *Piper aduncum*: Chemical Analysis, Antimicrobial Assessment, and Literature Review. **Medicamentos**, v.4, p. 49, 2017.
- MORANDIM, A.A.; KATO, M.J.; CAVALEIRO, A.J.; et al. Intraspecific variability of dihydrochalcone, chromenes and benzoic acid derivatives in leaves of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.10, 2009.
- MORANDIM, A.A.; BERGAMO, D.C.B.; KATO, M.J. et al. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v.16, n.4, p.282-286, 2005.
- MOTA, L.M.; VILAR, F.C.; DIAS, L.B.A et al. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.43, n.2, p.164-172, 2010.
- NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.41, n.3, p.252-275, 2017.
- NCUBE, B.; VAN STADEN, J. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. **Molecules**, v.20, n.7, p.12698-12731, 2015.
- OLIVEIRA, T. L. Utilização de plantas medicinais por idosos em três bairros do Município de Conceição do Almeida-BA. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.14, n.2, 2018.
- OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE et al. **Estratégia da OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005**. Organização Mundial da Saúde, 2002.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, 2016. Disponível em: <https://apo.org.au/node/63983>
- ONOFRE, S. B.; SANTOS, Z. M. Q.; KAGIMURA, F. Y. et al. Antifungal activity of the aqueous extract of *Stachytarpheta cayennensis*, (Rich.) Vahl. (Verbanaceae) on oral candida species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.9, n.20, p.42-47, 2015.
- ORJALA, J.; ERDELMEIER, CA.; WRIGHT, AD. Et al. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. **Planta Médica**, v. 59, n. 06, p. 546-551, 1993.
- ORJALA, J.; WRIGHT, A.D.; BEHREND S H et al. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products**, v.57, p.18-26, 1994.
- PAPADOPOULOS, P.; PAPADOPOULOS, T.; ANGELIDIS, A.S. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. **Food Microbiology**, v.69, p.43-50, 2018.
- PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.597-673, 1997.

- PASA, M. C.; SOARES, J. J.; NETO, G. G. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Arica Açu, MT, Brasil). **Acta Botanica Brasílica**, v.19, n.2, p.195-207, 2005.
- PAVÃO, S.; LOPES, I. G.; VILHARVA, K. N. et al. Flora medicinal Guarani e Kaiowá: conhecimento tradicional como forma de resistência. **Espaço Ameríndio**, v.15, n.1, p.160-160, 2021.
- PEDROSO, R. D. S.; ANDRADE, G & PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v.31, 2021.
- PENG, H.; LIU, D.; MA, Y.; GAO, W. et al. Comparison of community-and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012–2017. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p.1-8, 2018.
- PEREIRA, L.A.; LIMA, R.B.; GUIMARÃES, E.F. et al. Plantas medicinais de uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental: aspectos utilitários de espécies das famílias Piperaceae e Solanaceae. **Cadernos de Agroecologia**, v.2, n.1, p.1385-1388, 2007.
- PEREIRA, L.A.; DOS SANTOS, D.C.; RODRIGUES, P.F.A. et al. Valor de uso, terapias e perfil farmacológico e etnofarmacológico de duas espécies do gênero *Piper* L. em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental Brasileira. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v.6, n.7, pág. 52027-52039, 2020.
- PIMENTEL, F.A.; CABRAL, W.G.; DA SILVA, M.R. et al. Processo de secagem de biomassa de pimenta longa (*Piper hispidinervum*). **EMBRAPA CPAF/AC**, 1998a.
- PINTO, E.G.; LIMA, R.A & LANA, A.J. Estudo fitoquímico do extrato etanólico de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre cepas de *Escherichia coli in vitro*. **Revista Sul-Americana de Educação Básica, Técnica e Tecnológica**, v.3, n.2, 2016.
- POHLIT, A.M; PINTO A.C.S; MAUSE, R. *Piper aduncum* L.: planta pluripotente e fonte de substâncias fitoquímicas importantes. **Revista Fitos**, v.2, n.1, p.7-18, 2006.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá, MS: EMBRAPA, 1994.
- QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; & MIRANDA-ESQUIVEL, D.R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, v.33, n.7, p.1266-1278, 2006.
- REBELO, M.M.; SILVA, J.K.R.; ANDRADE, E.H.A. et al. Capacidade antioxidante e atividade biológica de óleo essencial e extrato etanólico de *Hyptiscreata* Pohl ex Bent. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p.230-235, 2009.
- REYES, J.; AGUILAR, A.C.; CAICEDO, A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: microbiology key points for clinical practice. **International Journal of General Medicine**, v.12, p.437, 2019.

RIDZUAN P.M.; AISYAH B.; KAUSAR A. et al. *In vitro* antimicrobial inhibitory effect of *Piper aduncum* leaves extracts on bacteria and fungi. **Journal of medicine and Health Sciences**, v.4, p.48, 2021.

RUIZ, S.P.; ANJOS, M.M.; CARRARA, V.S. et al. Evaluation of the antibacterial activity of Piperaceae extracts and nisin on *Alicyclobacillus acido terrestris*. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 11, p. M1772-M1777, 2013.

SANTOS, M.L.; MAGALHÃES, C.F.; DA ROSA, M.B. et al. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1275-1278, 2013.

SCALDAFERRI, L. G.; TAMEIRÃO, E. R.; FLORES, S. A. et al. Formas de resistência microbiana e estratégias para minimizar sua ocorrência na terapia antimicrobiana: Revisão. 2020.

SILVA E.U. A importância do controle da prescrição de antimicrobianos em hospitais para melhoria da qualidade, redução dos custos e controle da resistência bacteriana. **Prática Hospitalar**, v.10, n.57, p.101-6, 2008.

SILVA, D.M.M.H.; & BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.143-145, 2007.

SOUSA, P. J.; BARROS, C. A.; ROCHA, J. C. S. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.217-221, 2008.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática - Guia ilustrado para identificação de famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II Instituto Plantarum de Estudos da Flora. **Nova Odessa**, v.2, 2005.

STEWART, W. P.; BROWN, K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **British Journal of Cancer**, v.109, n.1, p.1-7, 2013.

STEWART, BERNARD W. et al. Cancer prevention as part of precision medicine: 'plenty to be done'. **Carcinogênese**, v. 37, n. 1, p. 2-9, 2016.

TENAILLON, OLIVIER.; SKURNIK, D., PICARD, B & DENAMUR, E. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.3, p.207-217, 2010.

TONG, S.Y.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, E. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v.28, n.3, p.603-661, 2015.

TURNER, N.A.; SHARMA-KUINKEL, B.K.; MASKARINEC, S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v.17, n.4, p.203-218, 2019.

VADING, M.; NAUCLÉR, P.; KALIN, M. et al. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. **PloS One**, v.13, n.4, p.e0195258, 2018.

VADLAPUDI, V.; KALADHAR, D. Phytochemical evaluation and molecular characterization of some important medicinal plants. **Asian Pacific Journal Tropical Disease**, v.2, p.S26–S32, 2012.

VALADARES, ANNA CAROLINA F. et al. Óleos essenciais de inflorescências e folhas de *Piper aduncum*: composição química e atividade antifúngica contra *Sclerotinia sclerotiorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, p.2691-2699, 2018.

VALADARES, ANNA CAROLINA FERNANDES et al. Incorporação de óleos essenciais de *Piper aduncum* em filmes de amido de araruta: efeitos sobre suas propriedades físico-químicas e atividade antifúngica. **Química Nova**, v.43, p.729-737, 2020.

VALADEAU, C.; PABON, A.; DEHARO, E. et al. Plantas medicinais de Yanesha (Peru): Avaliação da atividade *leishmanicida* e antimalárica de extratos selecionados. **J. Ethnopharmacol.**, v.123, p.413–422, 2009.

VAN DEN BERG, M.E. Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém: **Museu Paraense Emílio Goeldi**, 1993.

VAN GOIETSENOVEN, G.; HUTTON, J.; BECKER, J.P. et al. Targeting eEF1A with isocarbostyryl from Amaryllidaceae as a strategy to fight melanomas. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 11, pág. 4575, 2010.

VÁSQUEZ, M.R.S. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de La región Amazonas. **In Crescendo Institucional**, v.6, n.1, p.33-43, 2015.

VIEIRA, S.C.H.; PAULO, L.F.D.; SVIDZINSKI, T.I.E. et al. Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.3, p.1001-1006, 2011.

VILLAMIZAR, L.H.; CARDOSO, M.D.G.; ANDRADE, J.D. et al. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, pág. 131-139, 2017.

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

WEITZ J.; KOCH M.; DEBUS J. et al. Colorectal cancer. **Lancet**, 365, p.153–165, 2005.

WHO. World Health Organization, WHO HEALTH TOPICS: ANTIMICROBIAL RESISTANCE. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

WIDOWATI W.; WIJAYA L.; WARGASETIA T.L. et al. Antioxidant, anticancer, and apoptosis-inducing effects of *Piper* extracts in HeLa cells. **Journal of Experimental & Integrative Medicine**, v.3, p.225-30, 2013.

5.MANUSCRITO

Manuscrito: Screening fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica do extrato etanólico de *Piper aduncum* L. *in vitro*

Periódico: Anais da Academia Brasileira de Ciências

Fator de impacto: 1.753

Qualis Medicina II: A2

Normas do Periódico: <https://www.scielo.br/journal/aabc/about/#about>

Resumo: *Piper aduncum* é um arbusto amplamente distribuído na América do Sul e Central. De importância comercial e econômica, essa planta apresenta compostos bioativos com efeitos farmacológicos tradicionalmente usados na medicina popular. No entanto, apesar de sua importância, poucos estudos foram realizados com extrato etanólico de folhas desta espécie e sua atividade frente a bactérias multidrogas resistentes e em células tumorais. Neste estudo fez-se a identificação fitoquímica e investigação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do extrato etanólico das folhas de *P. aduncum*. Na composição fitoquímica foram detectados compostos fenólicos e flavonóides que apresentaram capacidade antioxidante. Atividade antimicrobiana foi investigada frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KP-KPC). Não foram observados halos de inibição para *E. coli* e MRSA e a concentração inibitória mínima para KP-KPC foi superior à 2000 µg/mL. Para a atividade citotóxica e genotóxica foi utilizado a linhagem celular de carcinoma intestinal HT-29. Na maior concentração de 500 µg/mL o extrato inibiu em média 47,4% do número de células, demonstrando atividade citotóxica. E gerou média de danos em 47,7% das células apresentando atividade genotóxica sem causar morte celular. O extrato etanólico de *P. aduncum* não

demonstrou atividade antimicrobiana sobre MRSA, *E. coli* e KP-KPC. Novos estudos são necessários para correlacionar os compostos fenólicos com as atividades antioxidante, citotóxica e genotóxica detectadas no extrato etanólico de *P. aduncum*.

Palavras - chave: Extrato de plantas, genotoxicidade, morte celular, células HT-29.

INTRODUÇÃO

A pesquisa fitoquímica baseada em informações etnofarmacológicas é geralmente considerada uma ferramenta importante na descoberta de novos fármacos (Falcão et al. 2022, Kamiloglu et al. 2014).

Piper aduncum L. (família Piperaceae) é uma espécie conhecida no Brasil como pimenta-de-macaco ou mático, falso- jaborandi, entre outros nomes populares (Arroyo et al. 2014, Lorenzi & Matos 2008). É um arbusto com ocorrência nos seis biomas brasileiros: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Nascimento et al. 2022, Pavão et al. 2021, Prando et al. 2014, Queiroz et al. 2020).

Conhecida como planta medicinal, suas folhas e raízes são utilizadas sob forma de chá contra distúrbios intestinais (diarreias, náuseas, úlceras) e do trato genito-urinário, dores estomacais, febre, controle de hemorragias menstruais e emplastos para cicatrização de feridas (Berg et al. 1993, Guerrini et al. 2009, Orjala 1994, Pavão et al. 2021, Pereira et al. 2020, Salehi et al. 2019, Valadeau et al. 2010).

Pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar ações farmacológicas de *P. aduncum* a partir de extratos, frações, óleo essencial e substâncias isoladas que apresentam propriedades biológicas como atividade anticâncer (Arroyo et al. 2014, Alonso-Castro et al. 2011, Calderon-Herrera et al. 2018, 2019), citotóxica (Bernuci et al. 2016), antioxidante (Rebelo et al. 2009, Calderon-Herrera et al. 2019), antibacteriana (Silva et al. 2020, Gutierrez et al. 2016, Loureiro 2016, Orjala et al. 1994, Ruiz et al. 2013), antifúngica (Durofil et al. 2021, Ruiz-Vasquez et al. 2022, Santos et al. 2013, Valadares et al. 2018, 2020), antiprotozoária (Villamizar et al. 2017), anti-inflamatória (Arroyo et al. 2012) e inseticida (Celestino et al. 2016, Durofil et al. 2021, Lucena et al. 2017, Mamood et al. 2017).

Atividades biológicas relacionadas a *P. aduncum* tem sido descritas principalmente em óleos essenciais (Arroyo et al. 2012, 2014, Bernuci et al. 2016, Celestino et al. 2016, Loureiro 2016, Lucena et al. 2017, Orjala et al. 1994, Ruiz et al. 2013, Rebelo et al. 2009, Ruiz-Vasquez et al. 2022, Salehi et al. 2019, Santos et al. 2013, Villamizar et al. 2017).

Um menor número de estudos descreve propriedades biológicas a partir de extratos da planta (Alonso-Castro et al. 2011; Calderon-Herrera et al. 2018, 2019, Silva et al. 2020, Durofil et al. 2021, Gutierrez et al. 2016, Valadares et al. 2018, 2020, Mamood et al. 2017).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS 2022) mostram aumento progressivo de resistência bacteriana associada a elevada taxa de morbimortalidade (Gamboa et al. 2022, Scaldaferrri et al. 2020). Uma outra preocupação em saúde pública é o câncer. O tratamento quimioterápico e radioterápico aumenta a sobrevida, porém, estão associados a efeitos colaterais muitas vezes agressivos (Sousa et al. 2019). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer são esperados 704 mil casos novos de câncer no Brasil para cada ano do triênio 2023-2025 (INCA 2022).

Considerando as limitadas opções de tratamento para pacientes com infecções por bactérias multidrogas resistentes (MDR) e para o tratamento de indivíduos portadores de carcinoma intestinal, foram os objetivos deste estudo detectar compostos fenólicos e investigar atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica em extrato etanólico de folhas de *P. aducum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação da espécie vegetal

Folhas de *P. aduncum* foram coletadas de sete espécimes em um fragmento de Cerrado em dezembro de 2016, na Fazenda Três Barras, município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (S20°26'20.64"O54°32'26.78"). A espécie foi identificada pelo prof. Eloty Justina Dias Scheleder e uma exsicata foi preparada e incorporada ao herbário da instituição sob o registro nº 8265, Uniderp Agrárias.

Obtenção do extrato

O material vegetal de *P. aduncum* foi seco em estufa de circulação de ar (MARCONI®, MA35) a 45 °C. Após a secagem, o material foi moído até o estado de pó fino em moinho de facas (MARCONI®, MA048). O pó foi submetido à extração com etanol em banho de ultrassom (Unidque®, USC-1450) por 60 min, seguido de maceração estática por 24 h de acordo com as descrições de Dikin et al. (2024) e Sic Zlabur et al. (2022).

O extrato foi filtrado e concentrado em rotaevaporador a 40 °C (Tecnal®, MA120). Esse procedimento foi repetido por sete dias e a secagem final ocorreu em dessecador sob pressão reduzida para obtenção do extrato etanólico bruto.

Concentrações de 500, 250, 125; 62,50 µg/mL foram preparadas utilizando-se DMSO (Dimetilsulfóxido) a 1% como diluente do extrato e nos controles.

Estudo Fitoquímico qualitativo

Para identificar as classes de metabólitos secundários do extrato etanólico fez-se análise fitoquímica clássica por meio de testes colorimétricos e/ou de precipitação, com base em Matos (2009) e em Simões et al. (2017).

Foram realizadas análises de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, triterpenóides, esteróides, saponinas e alcaloides. Para a

análise de saponinas, foi utilizado 1 g da folha seca para estimar o teor de saponinas, segundo Schenkel et al. (2017).

A presença de precipitados ou a intensidade da cor foram consideradas como respostas a esses ensaios. Os resultados foram expressos em relação aos metabólitos detectados (+) ou não detectados (-) como previamente descrito (Fontoura et al. 2015).

Análise HPLC–DAD

A análise por HPLC foi realizada para detectar classes de metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *P. aduncum*. A amostra foi analisada em um sistema analítico LC (LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com um detector de matriz de diodos (DAD) monitorado em $\lambda = 200 - 600$ nm. A coluna LC de C-18 (25 cm x 4,6 mm; tamanho de partícula, 5 μ m), com uma pequena pré-coluna (2,5 cm x 3 mm) contendo a mesma embalagem, usada para proteger a coluna. Em cada análise, a vazão e o volume injetado foram fixados em 1,0 mL/min e 20 μ L, respectivamente. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 22 °C.

A eluição foi realizada usando uma fase móvel binária de água com ácido acético a 6% e acetato de sódio 2 mM (eluente A) e acetonitrila (eluente B). O seguinte gradiente foi aplicado: 5% B (0 min), 15% B (30 min), 50% B (35 min) e 100% B (45 min). E padrões representando os compostos fenólicos simples e polifenóis (Sigma, ~97%) foram preparados em uma concentração inicial de 1000 μ g/mL. As concentrações dos compostos foram determinadas por calibração externa após diluições apropriadas na faixa de 0,01-10 μ g/mL.

Determinação dos compostos fenólicos

A determinação dos compostos fenólicos a partir de 100 mg de extrato etanólico foi realizada por meio do método de Folin-Ciocalteu's (Souza et al. 2007). Os testes foram realizados utilizando espectrofotômetro na região de 750 nm, cubetas de quartzo, e como

padrão ácido gálico (10 to 300 µg/mL), por interpolação da absorbância das amostras através da curva de calibração ($y = 0,0077 x - 0,0228$; $R^2 = 0,9985$). O delineamento experimental consistiu em três repetições para cada concentração e o cálculo das médias foi acompanhado pelo desvio padrão (Souza et al. 2007).

Determinação dos flavonóides

O método utilizado para a determinação de flavonoides no extrato etanólico foi adaptado por Peixoto et al. (2008). Como padrão foi utilizada quercetina (0,5 mg/mL) para construir a curva de calibração nas concentrações de: 0,04; 0,2; 0,4; 2; 4; 8; 12; 16; 20 µg/mL ($y = 0,0637 x - 0,0067$ $R^2 = 0,9991$). As análises foram realizadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm, em cubetas de quartzo. O delineamento experimental constituiu de três repetições para cada concentração e o cálculo das médias foi acompanhado do desvio padrão.

Atividade antioxidante

O potencial antioxidante do extrato etanólico foi determinado com base na atividade sequestradora de radicais livres do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH (Souza et al. 2007). O extrato nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL foram adicionados a 2 mL de uma solução de DPPH em metanol (24 mg/100mL de metanol). Após 30 min, a absorbância foi determinada em um espectrofotômetro UV-VIS a 515 nm. A solução de DPPH em metanol foi utilizada como controle negativo e o controle positivo foi BHT (butilhidroxitolueno), quercetina e ácido gálico nas mesmas concentrações utilizadas nas amostras (Thaipong et al. 2006).

O percentual de inibição (% I) foi calculado pela fórmula: $\% I = (A_0 - A) / A_0 \times 100$, onde A_0 é a absorbância do DPPH (controle) e A é a absorbância da amostra. Os resultados foram expressos através do calculador do IC_{50} , esse representa a concentração da amostra, que é necessário para inibir 50% dos radicais livres DPPH (Souza et al. 2007).

Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do extrato de *P. aduncum* foi avaliada contra uma cepa de referência da American Type Culture Collection (ATCC) de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e dois isolados clínicos resistentes: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KP-KPC).

Teste de disco de difusão em ágar

Inicialmente, foi realizada uma triagem pela técnica de difusão em disco (DD), adaptado de Clinical laboratory standards institute (CLSI 2012a). Discos de papel filtro com 6mm receberam o extrato bruto nas concentrações 2000 µg/disco e 500 µg/disco, suspensos em água destilada estéril com Tween a 5%. A partir de culturas puras de 24 h em ágar Muller-Hinton foi preparada uma suspensão bacteriana em 2 mL salina estéril com turbidez de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Com um swab umedecido na suspensão bacteriana fez-se a semeadura em placas de Petri contendo ágar Muller Hinton. Em seguida, os discos contendo os extratos foram distribuídos em duplicata. Como controle positivo, de inibição de crescimento, utilizou-se os discos de ciprofloxacina - 05 µg (Cecon®, São Paulo, Brasil) e ertapenem - 10 µg (ERT) (Sigma®, Saint Louis, EUA), e como controle negativo, discos contendo água destilada estéril com Tween 5%. A leitura dos halos de inibição de crescimento foi realizada após 24h de incubação a 35° ± 2°C.

A interpretação da atividade antimicrobiana nos ensaios realizados pelo método de (DD) foram as seguintes: halos com diâmetro ≤ 8 mm (não sensível), entre de 9-14 mm (sensível), entre 15-19mm (muito sensível) e ≥ 20 mm (extremamente sensível) conforme Moreira et al. (2005).

Teste de microdiluição de caldo

Da bactéria com halo de inibição > que 8mm no teste de DD, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) por ensaio de microdiluição em caldo (adaptado de CLSI 2012b), com modificações, conforme descrito anteriormente (Vitorelli-Venâncio et al. 2021). Suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina (0,85%) ajustadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland e diluídas em caldo Mueller Hinton cátion-ajustado (CAMHB) (CLSI 2012b). Placas de microtitulação de 96 poços, fundo “U”, contendo diluições seriadas do extrato nas concentrações de 2000 a 3,91 µg/mL receberam 100 µL de suspensão microbiana. Ertapenem (Sigma®, Saint Louis, EUA) foi utilizado como antimicrobiano padrão em concentrações variando de 32 a 0,062 µg/mL. Em cada teste utilizamos poços contendo apenas CAMHB, poços com caldo e inóculo, e poços com caldo, inóculo e solvente do extrato a fim de provar a esterilidade do meio de cultura, viabilidade do inóculo bacteriano e neutralidade do solvente, respectivamente. As placas foram incubadas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20h. A CIM foi definida como a menor concentração de extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano.

Linhagem celular e condições de cultivo

A linhagem celular de adenocarcinoma intestinal humano HT-29 (ATCC HTB-38), foi gentilmente cedida pela professora Dra. Renata Trentin Perdomo. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Gibco®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (v/v), 0,1% de penicilina (100 µg/mL) /estreptomicina (100 µg/mL) (v/v), em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Agente Químico

Como agente indutor de danos foi utilizado o quimioterápico Dacarbazina na concentração de 1400 µg/mL.

Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) conforme protocolo de Poindessous et al. (2003) e Mauro et al. (2011). Células HT-29 (2×10^4) foram adicionadas em poços de placas de 96 poços e mantidas por 24h a 37°C em incubadora com 5% de CO₂. Os tratamentos foram realizados por 24 e 48h com diferentes concentrações do extrato (62,50, 125, 250 e 500µg/mL). Ao final dos tratamentos, as placas foram incubadas com MTT 3,5 mg/mL por 4h. O meio de cultivo foi removido e adicionado DMSO para leitura da absorbância em espectrofotômetro (Robonik®, Campo Grande, Brasil) em filtro de 540nm. Para cada experimento foram realizadas três repetições independentes em quintuplicatas.

Ensaio do Cometa (avaliação de genotoxicidade).

Para realização do ensaio do Cometa foi utilizado o protocolo de Singh et al. (1988). Cerca de 2×10^5 células foram semeadas sobre lamínulas em placas de 06 poços e mantidas em cultura por um período de 24 h para estabilização e fixação das células nas lamínulas, sendo realizada também três procedimentos independentes. O ensaio foi assim delineado: Controle Negno (DMSO 5%), Controle positivo (dacarbazina 1400 µg/mL), Grupo *P. aduncum* na concentração de 500 µg/mL e grupo Grupo *P. aduncum* (500 µg/mL) associado à Dacarbazina (1400 µg/mL).

Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas e ressuspendidas em meio à cultura. A suspensão celular (20µL) foi misturada à agarose LMP 0,5% (120µL, low melting point), a 37°C, e distribuída sobre lâminas de microscopia, pré-gelatinizadas

com agarose normal 1,5%. Após, removeram-se as lamínulas e as lâminas foram imersas em solução de lise, protegidas da luz, à 4°C por 1h. Feita a lise, as lâminas foram levadas para cuba eletroforética, imersas em tampão à 4°C por 20 min para desnaturação. A eletroforese ocorreu a 4°C por 20 min, à 25V e 300mA (1,6V/cm). Após eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão, secas e fixadas em álcool etílico 100% e armazenadas até análise. No momento da leitura, as lâminas foram coradas com 100µL de brometo de etídio, 200µg/mL, e cobertas com lamínulas. O material foi analisado em microscópio de epifluorescência (MOTIC®, Modelo BA410) em objetiva de 40X, com filtro de excitação de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm. Foram analisadas 100 células por tratamento, em cada repetição, classificando-as em: (classe 0) ausência de cauda; (classe 1) cauda com até o diâmetro da cabeça do cometa; (classe 2) cauda de tamanho médio, com 2 vezes o diâmetro da cabeça; (classe 3) cauda longa, com comprimento superior a 2 vezes o diâmetro da cabeça (Kobayashi et al. 1995).

Avaliação de morte celular

As mortes celulares foram avaliadas por ensaio morfológico segundo o protocolo de Oliveira et al. (2007), diferenciadas em apoptóticas ou necróticas. A técnica para detecção da viabilidade celular, índice de apoptose e de necrose foi a de coloração diferencial com laranja de acridina e brometo de etídeo. Foram semeadas 5×10^5 células em placas de 12 poços e mantidas em incubadora por 24h. Após esse período as células foram submetidas a 4h de tratamento seguidos por 24h em meio livre de droga (4h + 24h). Para cada experimento, foram realizadas duas repetições independentes, no seguinte delineamento: Grupo controle negativo (DMSO 5%), Grupo Controle Positivo (dacarbazina 1400µg/mL) Grupo *P. aduncum* (500µg/mL) e grupo Associação (*P. aduncum* 500µg/mL + 1400µg/mL de dacarbazina). As lâminas foram preparadas com 20 µL de suspensão celular e 2 µL de corante contendo brometo de etídio (100 µg/mL) e

acridina laranja (100 µg/mL), na proporção de 1:1. Foram analisadas 100 células por replicata em microscópio de epifluorescência (MOTIC®, Modelo BA410) em aumento de 400x.

A classificação das células foi realizada segundo a descrição: (I) células vivas com membrana funcional possuem coloração verde uniforme em seu núcleo; (II) células em apoptose inicial com membrana funcional, mas com fragmentação de DNA, demonstram uma coloração verde no núcleo e citoplasma, sendo visível uma marginalização do seu conteúdo nuclear; (III) células em apoptose final apresentam áreas coradas em alaranjado, tanto no citoplasma como nos locais onde a cromatina está condensada no núcleo, o que as distingue de células necróticas; (IV) células necróticas têm coloração alaranjada uniforme no núcleo (Oliveira et al. 2007).

Análise estatística

As atividades antioxidante, citotóxica, genotóxica e apoptótica foram expressas como média ± desvio padrão. A análise estatística e gráfica foi realizada utilizando-se o software INSTAT, aplicando-se o teste ANOVA/Tukey para comparações das diferenças estatísticas, considerando $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Determinação fitoquímica dos constituintes

A análise fitoquímica do extrato etanólico de folhas de *P. aduncum* revelou classes de metabólitos secundários como compostos fenólicos, flavonóides, taninos, alcalóides, triterpenos, esteróides e saponinas.

Na tabela I estão descritos os compostos fenólicos e flavonoides identificados no extrato de *P. aduncum* e a figura 2 ilustra o cromatograma desses compostos.

Tabela I. Compostos fenólicos e flavonoides identificados em extrato etanólico das folhas de *P. aduncum* por HPLC-DAD-MS

| Tempo de retenção (min) | Compostos | Comprimento de onda (nm) | Fórmula Molecular |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---|
| 2,7 | Ácido gálico | 270 | C ₇ H ₆ O ₅ |
| 4,6 | Galocatequina | 275 | C ₁₅ H ₁₄ O ₇ |
| 11,1 | Epigalocatequina | 278 | C ₁₅ H ₁₄ O ₇ |
| 11,7 | Catequina | 275 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ |
| 13,5 | Ácido <i>p</i> -coumárico | 325 | C ₉ H ₈ O ₃ |
| 17,8 | Epicatequina | 278 | C ₁₅ H ₁₄ O ₇ |
| 24,8 | Quercetina 3-O-Glicosídeo | 260 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ |
| 25,9 | Kaempferol 3-O-Glicosídeo | 258 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ |
| 36,7 | Luteolina | 320 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ |
| 42,7 | Apigenina | 268 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ |

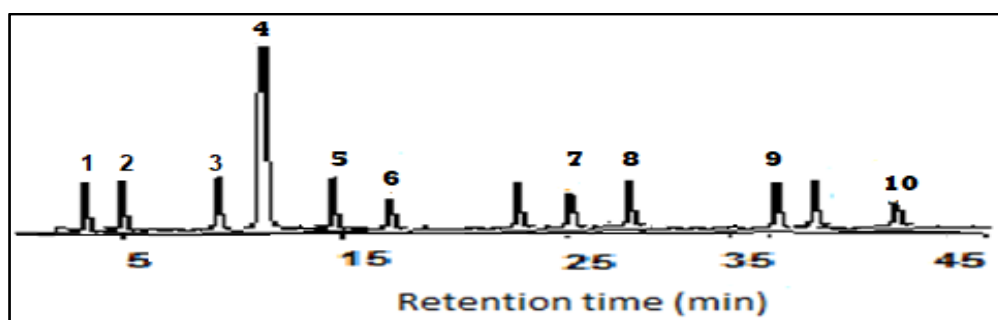


Figura 2. Cromatograma dos compostos fenólicos e flavonoides detectados no extrato etanólico das folhas de *P. aduncum* por HPLC-DAD. (1) Ácido gálico, (2) Galocatequina, (3) Epigalocatequina, (4) Catequina, (5) Ácido *p*-coumárico, (6) Epicatequina, (7) Quercetina 3-O-Glicosídeo, (8) Kaempferol 3-O-Glicosídeo, (9) Luteolina e (10) Apigenina.

A identificação de compostos individuais foi realizada comparando os tempos de retenção das amostras com os sinais obtidos para os padrões (Tabela I). Dez compostos foram detectados no extrato de acordo com seu tempo de retenção ilustrado na figura 2.

Atividade antioxidante

O extrato etanólico e os padrões (BHT, ácido gálico e quercetina), inibem 50% da concentração inicial de DPPH, conforme os valores representados na tabela II. O valor de IC₅₀ de 0,29 mg/g obtido para o extrato etanólico foi significativamente diferente ($p <$

0,05) dos obtidos para o padrão de ácido gálico (0,02 mg/g) e quercetina (0,11 mg/g), mas não difere estatisticamente do padrão BHT ($p > 0,05$).

Tabela II. Teor de fenóis e flavonoides totais e concentrações necessárias para inibir 50% do radical DPPH (IC₅₀) do extrato etanólico de *P. aduncum* e dos Padrões (ácido gálico, quercetina e BHT)

| Amostras/Padrões | Fenóis (mg/g de ácido gálico) | Flavonoides (mg/g de quercetina) | IC ₅₀ (mg/g) |
|-------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Ext. etanólico de <i>P. Aduncum</i> | 235,30 ± 0,98 | 198,55 ± 1,12 | 0,29 ± 0,24 ^a |
| Ác. Gálico | ----- | ----- | 0,02 ± 0,55 ^b |
| Quercetina | ----- | ----- | 0,11 ± 1,06 ^c |
| BHT | ----- | ----- | 0,27 ± 0,05 ^a |

Ext. etanólico= Extrato etanólico. BHT= Butilhidroxitolueno (padrão). Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana

Neste estudo, foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *P. aduncum* frente às bactérias *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KP-KPC).

Na triagem inicial realizada por meio da técnica de difusão disco em ágar, o extrato não demonstrou atividade antimicrobiana nas concentrações (500 µg/disco e 2000 µg/disco) sobre *Escherichia coli* e MRSA.

Em placas com KP-KPC foi observado halos de inibição de crescimento de 8,5 ± 0,71mm e de 10,5 ± 2,12mm nas concentrações de 500µg/disco e 2000µg/disco,

respectivamente. No teste de microdiluição em caldo o extrato de *P. aduncum* apresentou uma CIM superior a 2000 $\mu\text{g/mL}$ sobre KP-KPC.

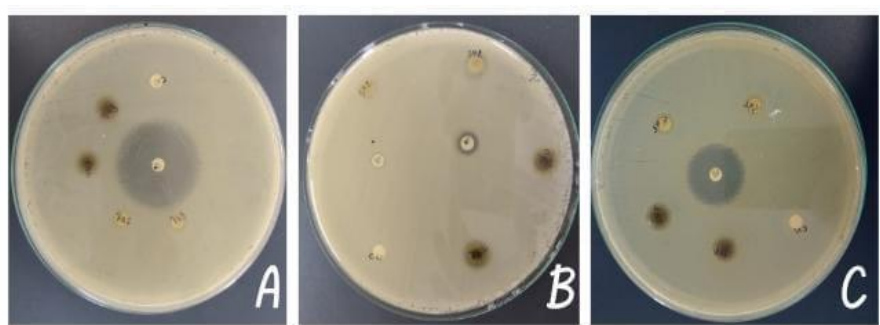


Figura 3. Foto ilustrativa do teste de susceptibilidade pelo método de disco difusão em ágar. (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) KP-KPC, (C) MRSA

Citotoxicidade

O resultado do ensaio de MTT demonstrou que *P. aduncum* manteve a viabilidade das células HT-29, em 24 h, nas concentrações de 62,50; 125; 250 $\mu\text{g/mL}$, porém a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em menos de 50% o número de células. Enquanto o grupo controle, Dacarbazina apresentou 57,3% de redução (Fig.5).

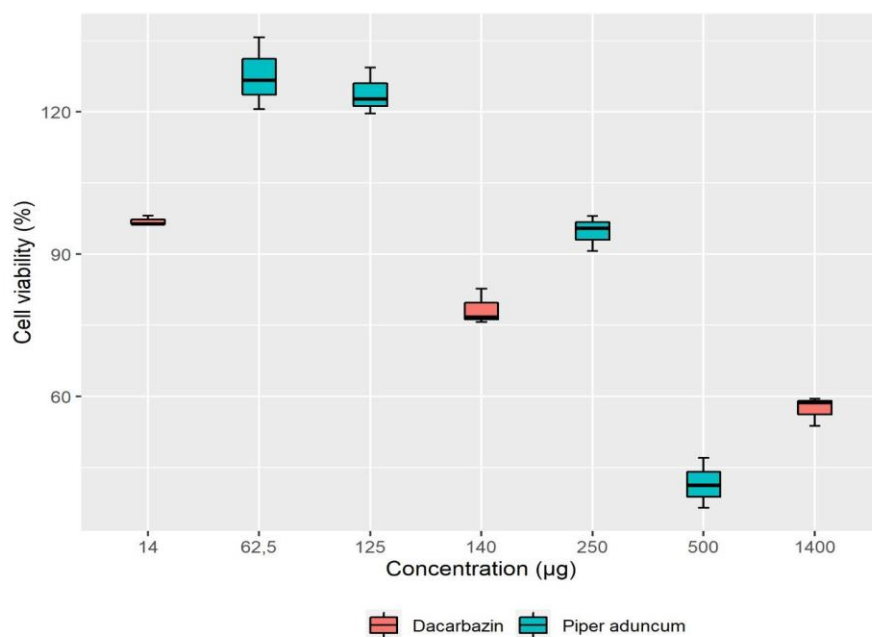


Figura 5. Gráfico de Viabilidade de células HT-29 frente a diferentes concentrações do extrato de *P. aduncum* e Dacarbazina em 24 h.

Em 48h, houve a manutenção dos resultados observados em 24 horas para as concentrações de 62,50; 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente (47,4%) a viabilidade das células HT-29. Este resultado foi comparado com a dacarbazina que apresentou redução de 50,3% do número de células, confirmando assim a atividade citotóxica de *P. aduncum* na maior concentração testada.

Baseado na viabilidade celular de cada uma das concentrações, foi calculada a IC_{50} para esse extrato. Porém, não foi verificada a formação de uma curva dose-resposta. Desta forma os resultados apresentados não obtiveram uma concentração que gerasse uma IC_{50} .

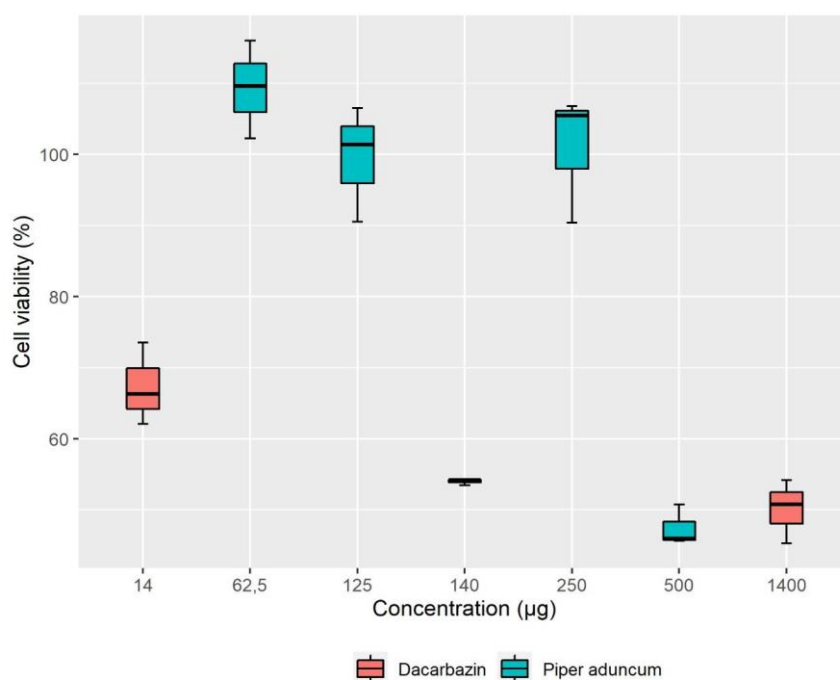


Figura 6. Gráfico de viabilidade de células HT-29 frente a diferentes concentrações do extrato de *P. aduncum* e da Dacarbazina em 48h.

Genotoxicidade

No ensaio de cometa (Tabela 2) o extrato da *P. aduncum* induziu aumento significativo na frequência de danos no DNA na dose de 500 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de $47,7 \pm 2,99$ de células lesionadas. Esse resultado, quando comparado com o controle ($4,28 \pm 2,81$), demonstra que a *P. aduncum* na concentração testada apresentou atividade

genotóxica. E em associação com a Dacarbazina a *P. aduncum* apresentou aumento dos danos ($90,57 \pm 1,87$), como ilustrado na tabela II.

Tabela III. Média \pm desvio padrão da frequência de células lesionadas, distribuição entre classes de danos e escores relacionados ao teste de genotoxicidade e antigenotoxicidade da *P. aduncum* em células HT-29.

| Grupos experimentais | Células lesionadas Média \pm DP | Classe de danos | | | | Escore |
|----------------------|--------------------------------------|-----------------|------------|-------------|-------------|-------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| Controle | 4,29 | 95,71 | 4,29 | 00,00 | 0,00 | 4,29 |
| | $\pm 2,81^a$ | $\pm 2,81$ | $\pm 2,81$ | $\pm 00,00$ | $\pm 00,00$ | $\pm 2,81^a$ |
| Dacarbazina | 97,14 | 2,86 | 6,43 | 10,51 | 80,20 | 268,05 |
| | $\pm 2,14^b$ | $\pm 2,41$ | $\pm 2,88$ | $\pm 2,22$ | $\pm 2,88$ | $\pm 4,83^b$ |
| <i>P. aduncum</i> | 47,57 | 52,43 | 47,20 | 0,37 | 0,00 \pm | 47,94 \pm |
| 500 μ g | $\pm 2,99^c$ | $\pm 2,38$ | $\pm 2,05$ | $\pm 1,25$ | 00,00 | 2,61 ^a |
| <i>P. aduncum</i> + | 90,57 | 14,43 | 5,00 | 8,43 | 72,14 | 2,38 |
| Dacarbazina | $\pm 1,87^c$ | $\pm 1,43$ | $\pm 2,15$ | $\pm 2,66$ | $\pm 3,10$ | $\pm 3,15^c$ |

Média de células lesionadas em 100 células analisadas em triplicata. Concentrações testadas: Dacarbazina 1400 μ g/mL; *Piper aduncum* 500 μ g/mL. DP: Desvio Padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

Apoptose

No teste de apoptose *in situ* o extrato etanólico de *P. aduncum* não induziu morte celular ($4,98 \pm 1,85$) nas células HT-29 se comparado com o controle negativo ($4,25 \pm 1,25$). Porém, em associação com a dacarbazina observou-se aumento ($79,53 \pm 2,64$) no número de células apoptóticas como ilustrado na Tabela IV.

Tabela IV. Média \pm Desvio padrão da frequência de células HT-29 apoptóticas e necróticas após 24 h de exposição à *Piper aduncum* e Dacarbazina.

| Grupos experimentais | Células Apoptóticas \pm DP | Células Necróticas \pm DP |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Controle | 4,25 \pm 1,25 ^a | 0,9 \pm 0,89 ^a |
| Dacarbazina | 82,7 \pm 2,88 ^b | 3,8 \pm 1,77 ^b |
| <i>P. aduncum</i> | 4,98 \pm 1,85 ^a | 0,86 \pm 0,93 ^a |
| <i>P. aduncum</i> Associado | 79,53 \pm 2,64 ^c | 3,16 \pm 1,98 ^b |

Frequência de células apoptóticas e necróticas. Foram analisadas 100 células, os dados representam a média e o desvio padrão (DP) de 100 células analisadas em triplicata. Concentrações testadas: Dacarbazina 1400 μ g/mL; *Piper aduncum* 500 μ g/mL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

DISCUSSÃO

Extratos e óleos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina tradicional (Barh et al.,2013; Monzote et al. 2017).

Piper aduncum L. (Piperaceae) é um arbusto amplamente distribuído na América do Sul (Equador, Brasil, Bolívia), América Central (Costa Rica, Panamá), Caribe (Cuba), Oceania (Papua Nova Guiné) e China (Salehi et al, 2019). Sua ocorrência já foi registrada nas 5 regiões do Brasil: **Norte** (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins); **Nordeste** (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte); **Norte** (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins); **Nordeste** (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte), **Centro-Oeste** (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), **Sudeste** (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e **Sul** (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (Guimaraes, 2020).

O estado do Mato Grosso do Sul destaca-se no cenário nacional e internacional por meio do agronegócio. É conhecido pela sua rica biodiversidade, composta por três biomas principais: o Cerrado, a Mata Atlântica e o Pantanal - Sul-Mato-Grossense. Na área urbana e rural, existe uma diversidade de plantas que são utilizadas na medicina tradicional, ensinamentos passados, de geração a geração, por antigos nativos. Apesar do conhecimento da presença de algumas espécies pertencentes a família Piperaceae, pouco se sabe sobre os componentes fitoquímicos de *P. aduncum* e sobre as atividades biológicas que poderiam confirmar a ação etnofarmacológica dessas plantas (antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, digestiva, diurética, inseticida, leishmanicida, pesticida e inseticida (Alves 2008, Pavão et al. 2021).

Neste estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *P. aduncum*, nativa do Cerrado Sul-Mato-Grossense foram identificados a presença de 10 compostos: flavonoides (galocatequina, epigalocatequina, catequina, epicatequina, quercetina 3-o-glicosídeo, kaempferol 3-o-glicosídeo, luteolina e apigenina) e compostos fenólicos (ácido gálico e ácido *p*-coumárico).

Em outro estudo, Escudero et al. (2008) identificaram a presença de 11 compostos em extrato etanólico das folhas de *P. aduncum* de cinco regiões do Peru, América do Sul, sendo eles: polifenóis (quercetina, floridzina e epicatequina, quercitrina e rutina) glicoflavonoides, catequina, ácido gálico, ácido clorogênico e floretina, uma hidrochalcona. Dos nove compostos identificados neste estudo apenas o ácido gálico, catequina e epicatequina foram concordantes com os nossos achados.

Lago et al. (2009), na busca por agentes antifúngicos ao utilizarem o extrato etanólico das folhas de *P. aduncum*, coletado de matrizes em Campos do Jordão, São Paulo, isolou três benzoatos de metila prenilados, uma flavanona a pinocembrina e dois cromenos.

Dos constituintes identificados por Lago et al. (2009) e Escudero et al. (2008) os cromenos, benzoatos de metila e hidrochalconas não foram identificados no extrato etanólico da planta em estudo.

Alguns fatores podem estar conectados e esse resultado. As classes de metabólitos secundários presentes em folhas de exemplares de *P. aduncum* podem diferir de acordo com a região geográfica, clima e sazonalidade (Arroyo-Acevedo et al. 2015, Lozano et al. 2021, Oliveira et al. 2013, Ridzuan et al. 2021). O meio ambiente de onde a planta foi extraída, assim como, idade, clima, solo, incidência solar, umidade da região, também podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as diversidades dos fitoconstituintes (Gobbo-Neto & Lopes 2007).

Neste estudo o valor de IC₅₀ de 0,29 mg/g obtido para o extrato etanólico foi estatisticamente próximo ao padrão BHT que apresentou IC₅₀ de 0,27 mg/g, o que justifica o elevado potencial antioxidante.

Os antioxidantes são moléculas que retardam ou inibem o processo de oxidação de moléculas instáveis e podem prevenir danos celulares causados por radicais livres (Carsono et al. 2022). A atividade antioxidante pode ser induzida pela presença de flavonóides, fitoconstituente identificado neste estudo no extrato etanólico de *P. aduncum*.

Os flavonoides são conhecidos por serem sintetizados pelas plantas e quando este é inserido na dieta humana, podem afetar a função de sistemas enzimáticos criticamente envolvidos na geração de processos inflamatórios E como uma forma de proteção nos seres humanos, são atribuídos a esta classe atividade hepatoprotetora, propriedades anti-inflamatórias, atividade moduladora do sistema imunológico, e os efeitos antioxidantes contra processos degenerativos como doenças cardiovasculares, atividade sobre agentes

infecciosos (bactérias, fungos e vírus), atividade anticancerígena e outras doenças relacionadas à idade (Kumar & Pandey 2013).

Em extratos e frações de algumas espécies do gênero *Piper*, atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas vêm sendo investigadas (Nair & Burker 1990, Orjala et al. 1994, Okunade et al. 1997, Ridzuan et al. 2021). Atividade antimicrobiana já foram associada a óleos essenciais de *P. aduncum* (Brazão 2014, Silva et al. 2020; Gutierrez et al. 2016).

Atividade antifúngica frente a fungos patogênicos de interesse clínico e fitopatogênicos tem sido bastante estudada (Calderon-Herrera et al. 2018, Ruiz-Vasquez et al. 2022). Por outro lado, extrato e óleo essencial de *P. aduncum* com comprovada atividade antibacteriana tem sido descrita em poucos estudos frente a *Staphylococcus* coagulase negativos (como *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*) e *S. aureus* (Gutierrez et al. 2016), bactérias essas que podem fazer parte da microbiota normal (*S. epidermidis*) e transitória da pele (*S. aureus*), mas que diante de condições favoráveis podem causar infecções em diferentes sítios. No entanto, poucos estudos demonstram efetiva inibição de crescimento de bactérias patogênicas, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA, os quais normalmente são multidroga resistentes (Brazão et al. 2014, Silva et al. 2020). Em nosso estudo, o extrato etanólico de *P. aduncum* não foi capaz de inibir o crescimento de um isolado clínico de MRSA. Não se sabe se o resultado poderia ser diferente se utilizássemos um *S. aureus* sensível à meticilina, ao invés de um isolado multidroga resistentes como o MRSA. De acordo com estudo prévio (Brazão et al. 2014) o óleo essencial de *P. aduncum* é mais eficaz na inibição de *S. aureus* ATCC 25923 (CIM= 500 µg/mL) do que o extrato etanólico (CIM= 1000 µg/mL). Novos testes, incluindo um número maior de *S. aureus* são necessários para confirmar a susceptibilidade antimicrobiana a este patógeno.

Os resultados obtidos confirmam estudos realizados por Silva et al (2020) e Gutierrez et al (2016) que evidenciaram que extratos e óleo de *P. aduncum* não apresentam notável atividade frente a Gram negativos do grupo das enterobactérias como *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Lozano et al. (2021), ao avaliarem o extrato etanólico das folhas *P. aduncum* contra a cepa *E. coli* observaram halo de inibição de crescimento de 7-15 mm, valor este superior ao encontrado no presente estudo. Os resultados do teste de microdiluição por ser quantitativo são mais fidedignos do que os do teste de disco difusão, que é qualitativo.

Ainda sobre bacilos Gram negativos, reafirmamos a importância destes, como agentes de infecções no trato urinário, pneumonia, infecções de corrente sanguínea e até infecção disseminada. Novos estudos, com outras espécies de plantas disponíveis na rica flora Sul-Mato-Grossense são necessários para detectar atividade antimicrobiana frente a bactérias multidrogas resistentes como as KP-KPC, responsáveis por infecções graves e de difícil tratamento. A CIM do extrato para inibir o crescimento da KP-KPC foi considerada muito elevada (CIM superior a 2000µg.), demonstrando resistência desta bactéria às concentrações do extrato testadas. Uma das limitações deste estudo foi o número reduzido de microrganismos utilizados nos testes de susceptibilidade antimicrobiana.

Resultados negativos não indicam, necessariamente, a ausência de constituintes bioativos. O(s) composto(s) ativo(s) pode(m) estar presentes em quantidades insuficientes nos extratos brutos para mostrar atividade (Taylor et al. 2001).

Até o momento, não há um teste padronizado para se determinar em extratos de plantas, atividade antimicrobiana, diferente das drogas antimicrobianas, que possuem concentrações padronizadas (Gertsch 2011).

As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles, podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (Fennel et al. 2004).

Um estudo propôs uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados da CIM, considerando como forte inibição CIM até 50 µg; inibição moderada a CIM entre 60 e 150 µg e como fraca inibição a CIM acima de 160 µg (Aligiannis et al. 2001). De acordo com a classificação supracitada, o extrato apresentou fraca inibição.

Outros estudos, com maior número de cepas e com diferentes concentrações de extrato é essencial para confirmar o potencial antimicrobiano que esta planta apresenta na literatura.

De acordo com as Diretrizes do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos, um extrato bruto é considerado com atividade citotóxica *in vitro* se a IC_{50} for $\leq 20\mu\text{g/mL}$ em células tumorais *in vitro* e *in vivo* (Arroyo et al. 2014). Neste estudo *P. aduncum* apresentou IC_{50} de 47,4% sobre a linhagem HT-29 na concentração de 500 µg/mL, embora seja similar ao resultado do quimioterápico Dacarbazina, que apresentou IC_{50} de 50%. Essa importante redução de células tumorais HT-29, sugere atividade citotóxica. Apesar de ter sido testado uma única linhagem celular, o resultado obtido pode ser considerado em estudos futuros que visam a pesquisa de novos fármacos para o controle de células tumorais.

O extrato etanólico de folhas de *P. aduncum* frente a células tumorais pouco é relatado, mas no estudo de Calderón-Herrera et al. (2018) mostram que *P. aduncum*

apresentou baixa citotoxicidade frente às células tumorais de MCF-7, K-562, M-14, DU-145, HT-29 e H-460.

Wang et al. (2014) testaram o extrato de *P. aduncum* em células de glioma SF-368, células de carcinoma de pulmão H-460 e carcinoma de mama humano MCF-7 que se mostrou citotóxico para essas linhagens com IC50 nos valores de 23, 25 e 27 µg/ml, respectivamente.

O efeito citotóxico de muitos extratos vegetais pode estar relacionado a sua atividade antioxidante. Foi revelado que altas doses de antioxidantes em linhagens de células tumorais levam atividade citotóxica, geralmente atribuída a componentes fenólicos, flavonoides, alcaloides, triterpenos e outros (Herrera e t al. 2018).

A citotoxicidade pode ser conceituada como a capacidade que uma substância possui de inibir a proliferação celular ou causar danos e lesões às células, que as levam à morte celular. Assim, as substâncias citotóxicas podem diminuir a capacidade de autorrenovação de um tecido, ou causar a sua degeneração por morte das células. Por sua vez, essa morte pode ocorrer por mecanismos diferentes, que são agrupados em duas classes morfológicas, a necrose e a apoptose (Mauro et al. 2017). Desta forma, ao ser verificada a citotoxicidade do extrato na maior dose testada, foi evidenciada a necessidade de identificação de mecanismos de morte que estejam relacionados ao resultado obtido no ensaio de MTT.

Neste intuito, o resultado de MTT obtido neste estudo levou a uma análise mais profunda sobre a importância da determinação dos mecanismos citotóxicos que este extrato apresentou. Para tanto, foram realizados dois diferentes ensaios para avaliação da genotoxicidade e da dimensão dos danos celulares apresentados.

Quando avaliado no ensaio de cometa, o extrato mostrou-se genotóxico na concentração testada, também foi observado um aumento na frequência de danos no DNA

em uma média de $47,57 \pm 2,99$ se comparado com o grupo controle que apresentou média de $4,29 \pm 2,81$ quando testada isoladamente. Em associação com a Dacarbazina, foi observado um incremento de danos em uma média de $90,57 \pm 1,87$.

No entanto, no ensaio de apoptose não houve ativação dos mecanismos de morte na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, e não foi observado um efeito promotor de eventos de morte no grupo associado (Tabela IV).

Desta forma, infere-se que a citotoxicidade observada no MTT provavelmente está relacionada a inibição da proliferação celular frente ao contato das células com o extrato testado. Esta hipótese é corroborada por meio dos resultados obtidos no ensaio de genotoxicidade, o qual demonstrou que o extrato de *P. aducnum* é genotóxico. Ou seja, danos ao genoma levam a parada do ciclo celular, em especial quando ocorrem alterações cromossômicas ou na maquinaria mitótica. Estes eventos levam a paralisação funcional, tais como a senescência e morte celular tardia (Yaffe et al. 2007).

Com este estudo, fica evidente a necessidade de uma padronização de cultivo da planta e de extratos padronizados, com marcador químico evidenciado para validar o uso tradicional da planta. O conhecimento etnofarmacológico abre portas para o desenvolvimento de novos fármacos e gera perspectivas de tratamento utilizando o contexto cultural. Entretanto, o estudo aqui descrito entende que há grande importância na continuidade de estudo sobre o uso desta planta, pois ocorre em alta incidência dentro da cultura indígena de povos localizados na região centro-oeste do Brasil, prática essa disseminada em especial no estado de Mato Grosso do Sul e hoje presente no comércio popular local (Alves 2008, Pavão et al. 2021).

Estes direcionamentos são importantes, uma vez que o consumo desta planta como produto curativo ainda é feito sem determinação de dosagens adequadas e de suas características químicas e toxicológicas e com a Política Nacional de Práticas Integrativas

e Complementares no SUS, com diretrizes e linhas de ação para “Plantas Medicinais e Fitoterapia no SUS”, e a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, há necessidade de estudos que possam identificar as diferentes propriedades, marcador(s) químico(s) e toxicidade para validar a utilização desta planta medicinal nativa do bioma brasileiro, dentro do SUS (Brasil 2012). De acordo com Martins et al. (2016) é necessário avaliar cientificamente a toxicidade de plantas para fins medicinais, a fim de evitar riscos à saúde.

CONCLUSÃO

O presente estudo identificou compostos fenólicos e flavonóides presentes no extrato etanólico de *Piper aduncum*. A atividade antioxidante pode estar relacionada a presença dos flavonóides, porém, o extrato não apresentou atividade frente a MRSA, *E. coli* e KP-KPC, embora, frente as células tumorais (HT-29) o extrato etanólico de *Piper aduncum*, mostrou atividade citotóxica e genotóxica sem, entretanto, causar morte.

Investigações adicionais são necessárias, empregando modelos *in vitro* em linhagens tumorais e estudos *in vivo* com modelos de carcinoma para melhor compreensão da atividade antitumoral.

REFERÊNCIAS

ALIGIANNIS N, KALPOUTZAKIS E, MITAKU S & CHINOU IB. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* Species. J agric Food chem 49: 4168-4170.

ALONSO-CASTRO AJ, VILLARREAL ML, SALAZAR-OLIVO LA, GOMEZ-SANCHEZ M, DOMINGUEZ F & GARCIA-CARRANCA A. 2011. Mexican medicinal plants used for câncer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. J ethnopharmacol 133: 945-972.

ALVES EO, MOTA JH, SOARES TS, VIEIRA MDC, & SILVA CBD. 2008. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. Ciênc Agrotec 32: 651-658.

ARROYO J, HERRERA-CALDERÓN O, CHÁVEZ-ASMAT R, VENTURA E, BUENDÍA J, PACHECO J & PALOMINO R. 2014. Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de *Piper aduncum* L.(matico) y su toxicidad oral en ratones. In: A Fac Med 75: 13-18.

ARROYO J, ALMORA Y, QUINO M, RAEZ E, MARTÍNEZ J, BUENDÍA, J & HAÑARI, R. 2012. Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. In: An Fac Med. UNMSM. Faculdade de Medicina 85-91.

ARROYO-ACEVEDO J, CHÁVEZ-ASMAT RJ, ANAMPA-GUZMÁN A, DONAIRES R & RÀEZ-GONZÁLES J. 2015. Protective effect of *Piper aduncum* capsule on DMBA-induced breast cancer in rats. Breast Cancer: Basic and Clin Res 9: 41-48.

BARH D, BARVE N, GUPTA K, CHANDRA S, JAIN N, TIWARI S, LEON-SICAIROS N, CANIZALEZ-ROMAN A, SANTOS AR & HASSAN SS. 2013. Exoproteome and secretome derived broad spectrum novel drug and vaccine candidates in *Vibrio cholerae* targeted by *Piper betel* derived compounds. PLoS one 8: 52773.

BERNUCI KZ, IWANAGA CC, FERNANDEZ-ANDRADE CMM, LORENZETTI FB, TORRES-SANTOS EC, FAIÕES VS, GONÇALVES JE, AMARAL W, DESCHAMPS C, SCODRO RBL et al. 2016. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. Moléculas 21: 1698.

BRASIL. 2012. Ministério da Saúde. Práticas integrativas e complementares: Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. Brasília.

BRAZAO MAB, BRAZAO FV, GUILHERME J & MONTEIRO MC. 2014. Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. Bol latinoam Caribe plantas med aromát 13: 517-526.

CALDERON-HERRERA O, ALVARADO-PURAY C, ARROYO-ACEVEDO JL, ROJAS-ARMAS JP, CHUMPITAZ-CERRATE V, HAÑARI-QUISPE R & VALENZUELA-HERRERA R. 2018. Phytochemical screening, total phenolic content, antioxidant, and cytotoxic activity of five peruvian plants on human tumor cell lines. Pharmacognosy Research 10: 2.

CALDERON-HERRERA O, CHACALTANA-RAMOS L, YULI-POSADAS RÁ, PARI-OLARTE B, ENCISO-ROCA E, TINCO-JAYO JA, ROJAS-ARMAS JP, FELIX-VELIZ LMV & FRANCO-QUINO C. 2019. Antioxidant and cytoprotective effect of *piper aduncum* L. against sodium fluoride (NaF)-induced toxicity in albino mice. *Toxics* 7: 28.

CARSONO N, TUMILAAAR SG, KURNIA D, LATIPUDIN D & SATARI MH. 2022. A Review of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Properties of *Piper* Species. *Moléc* 27: 6774.

CELESTINO CO, VARÃO CAR, VELUDO HH, BRAGA AG & LIMA RA. 2016. Ação Inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Jacq.). *South Am J Basic Educ, Tech Technol* 3(2): 03-09.

CLSI. 2012a. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 11 ed. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical laboratory standards institute.

CLSI. 2012b. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 9 ed. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical laboratory standards institute.

DILKIN ERS, MATIAS R, OLIVEIRA AKM & CORRÊA BO. 2024. Fungitoxic effect and phytochemical characteristics of Brazilian Cerrado weeds against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* fungi. *Braz J Biol*, 84.

DUROFIL A, RADICE M, BLANCO-SALAS J & RUIZ-TÉLLEZ T. 2021. *Piper aduncum* essential oil: a promising insecticide, acaricide and antiparasitic. A review. *Parasite* 28:42.

ESCUDERO MR, D ESCUDERO FR, REMSBERG CM, TAKEMOTO JK, DAVIES NM & YÁÑEZ JÁ. 2008. Identificação de polifenóis e capacidade anti-oxidante de L. J *The Open Bioactive Comp J* 1 :1.

FALCÃO JG, MARINHO LC & ZANANDREA I. 2022. Uso medicinal de plantas no povoado muquila, arari, maranhão—um estudo etnobotânico. *J Ethnoscintia Braz* 7: 67-87.

FENNEL CW, LINDSEY KL, MCGAW LJ, SPARG SG, STAFFORD GI, ELGORASHI EE, GRACE OM & VAN STADEN. 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol* 94: 205-217.

FONTOURA FM, MATIAS R, LUDWIG J, OLIVEIRA AKM, BONO JAM, MARTINS PDFRB, CORSINO J & GUEDES NMR. 2015 Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Amaz* 45: 283–292.

GAMBOA LY, GAMBOA PELLICIER Y, RODRÍGUEZ CANTILLO Y & ARTEGA YANEZ YL. (2022). Resistencia microbiana a los antibióticos: un Problema de salud creciente. *Scientific Journal Hallazgos* 21. 7: 103–114.

GERTSCH J. 2011. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. *Planta médica* 77: 1086-1098.

GOBO-NETO L & LOPEZ NP. 2007. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Qui Nov* 30: 374-381.

GUERRINI A, SACCHETTI G, ROSSI D, PAGANETTO G, MUZZOLI M, ANDREOTTI E, TOGNOLINI M, MALDONADO ME & BRUNI R. 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ Toxicol Pharmacol* 27: 39-48.

GUIMARÃES EF, MEDEIROS EVSS & QUEIROZ GA. 2020. Piper in Flora do Brasil 2020. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.

GUTIÉRREZ Y, MONTES R, SCULL R, SÁNCHEZ A, COS P, MONZOTE L & SETZER WN. 2016. Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. *Chem Biodivers* 13: 1715-171.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2025: Incidência de Câncer no Brasil [online]. Rio de Janeiro; Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2022. [acesso: 15 fev. 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>.

KAMILOGLU S, CAPANOGLU E, YILMAZ O, DURAN AF & BOYACIOGLU D. 2014. Investigando o potencial antioxidante de ervas e especiarias turcas. *Garantia de Qualidade e Segurança de Culturas e Alimentos* 6: 151-158.

KOBAYASHI H, SUGIYAMA C, MORIKAWA Y, HAYASHI M & SOFUNI TA. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun* 3: 103-115.

KUMAR S & PANDEY AK. 2013. Química e atividades biológicas de flavonóides: uma visão geral. *A revista científica mundial* 2013: 2-11.

LAGO JHG, CHEN A, YOUNG MCM, GUIMARAES EF, DE OLIVEIRA A & KATO MJ. 2009. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC (Piperaceae). *Phytochem Lett* 2: 96-98.

LORENZI H & MATOS FJA. 2008. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. 2nd. Instituto Plantarum, Editora Nova Odessa, SP.

LOUREIRO RJ, ROQUE F, RODRIGUES AT, HERDEIRO MT & RAMALHEIRA E. 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Rev Port de Saúde Púb* 34:77–84.

LOZANO CM, VASQUEZ-TINEO MA, RAMIREZ M & INFANTE MI. 2021. In vitro Antimicrobial Activity of Tropical Medicinal Plants used in Santo Domingo, Dominican Republic: Part 2. *Pharmacognosy Comm*11: 52-60.

LUCENA DC, BERTHOLDO-VARGAS LR, SILVA WC, MACHADO AF, LOPES TS, MOURA S & BARROS NM. 2017. Biological Activity of *Piper aduncum* extracts on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidiae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *An Acad Bras Cienc* 89: 1869-1879.

MAMOOD SN, HIDAYATULFATHI O, BUDIN SB, AHMAD ROHI G & ZULFAKAR MH. 2017. The formulationoftheessentialoilof *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as aninsectrepellent. *Bull Entomol Res* 107: 49-57.

MARTINS RTMC, BORGES AK, ARMIATO AM & PIMENTA RS. 2016. AntimicrobialandphytotoxicityactivitiesofaqueouscrudeextractfromtheAmazonianethno medicinalplant*Belluciagrossularioides* (L.) Triana. *J Med Plants Res* 10: 130-138.

MATOS FJA. Introdução a fitoquímica experimental. 3ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150p.

MAURO MO, MATUO R, DAVID N, STRAPASSON RLB, OLIVEIRA RJ, STEFANELLO MÉA & COSTA DS. 2017. Ações de lactonasesquiterpênicas isoladas de *Moquiniastрупpolymorphum*subsp. *floccosum* na linha celular MCF7 e sua ação potencializadora sobre a doxorubicina. *BMC* 18: 1-11.

MAURO MO, SARTORI D, OLIVEIRA RJ, ISHII PL, MANTOVANI MS & RIBEIRO LR. 2011. Activityofseleniumoncellproliferation, cytotoxicity, andapoptosisandontheexpressionof CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. *Mutat Res-Fund and Mol M* 715: 7–12.

MONZOTE L, SCULL R, COS P & SETZER WN. 2017. Óleo essencial de *Piper aduncum*: análise química, avaliação antimicrobiana e revisão da literatura. *Medicamentos* 4: 49.

MORANDIM ADA, KATO MJ, CAVALHEIRO AJ & FURLAN M. 2009. Intraspecific variability of dihydrochalcone, chromenes and benzoic acid derivatives in leaves of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *Afr J Biotechnol* 8: 2157-2162.

MOREIRA MR, PONCE AG, DEL VALLE CE & ROURA SI. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT- F Science Tech* 38: 565-570.

NAIR MG & BURKE BA.1990. Antimicrobial Piper metabolite and related compounds. *J Agri F Chemistry* 38: 1093-1906.

NASCIMENTO EV, BONILLA OH, DE LUCENA EMP, DO NASCIMENTO YAP, VIEIRA MIC, FARIAS IBM, DO NASCIMENTO SF & DE LIMA FRA. (2022). Ocorrências e usos da Família Piperaceae, em especial no Estado do Ceará: Revisão e nova identificação geográfica Ocorrências e usos da Família Piperaceae, especialmente

no estado do Ceará: Revisão e nova identificação geográfica. *Rev Bras Desenv* 8: 183-205.

OKUNADE AL, HUFFORD CD, CLARK AM & LENTZ D. 1997. Antimicrobial Properties of the Constituents of *Piper aduncum*. *Phytother Res* 11: 142-144.

OLIVEIRA G, MOREIRA DDL, MENDES ADR, GUIMARÃES EF, FIGUEIREDO LS, KAPLAN MAC & MARTINS ER. 2013. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. *Rev Bras Farmac* 23: 743-753.

OLIVEIRA GL, CARDOSO SK, LARA JUNIOR CR, VIEIRA TM, GUIMARÃES EF, FIGUEIREDO LS, MARTINS ER, MOREIRA DL & KAPLAN MAC. 2013. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *An Acad Bras Cienc* 85: 1227-1234.

OLIVEIRA RJ, MATUO R, DA SILVA AF, MATIAZI HJ, MANTOVANI MS & RIBEIRO LR. 2007. Protective effect of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicol In Vitro* 21: 41-52.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report flags rising antibiotic resistance in bacterial infections in humans and need for better data.** Disponível em: <https://www.who.int/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>. Acesso em: 15 fev. 2023.

ORJALA J, WRIGHT AD, BEHRENDTS H, FOLKERS G, STICHER O, RÜEGGER H & RALI T. 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J Nat Products* 57: 18-26.

PAVÃO S, LOPES IG, VILHARVA KN, PERALTA A, DA SILVA PEDRO M, BENITES E & GISLOTI LJ. 2021. Flora medicinal Guarani e Kaiowá: conhecimento tradicional como forma de resistência. *Espaço Ameríndio* 15: 160-160.

PEIXOTO SOBRINHO TJDS, SILVA CHTPD, NASCIMENTO JED, MONTEIRO JM, ALBUQUERQUE UPD & AMORIM ELCD. 2008. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev Bras Ciênc Farm* 44: 683-689.

PEREIRA LA, DOS SANTOS DC, RODRIGUES PFA, DE AGUIAR ANDRADE EH & GUIMARÃES EF. 2020. Valor de uso, terapias e perfil farmacológico e etnofarmacológico de duas espécies do gênero *Piper* L. em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental Brasileira. *Rev Bras Desenv* 6: 52027-52039.

POINDESSOUS V, KOEPPPEL F, RAYMOND E, COMISSO M, WATERS SJ & LARSEN AK. 2003. Marked activity of irifolvent toward human carcinoma cells: Comparison with cisplatin and ecteinascidin. *Clin Cancer Res* 9: 2817-2825.

PRANDO TBL, DA BACIQUETE TF, VIEIRA JC, BRESSAN J, GASPAROTTO FM, JESUS DR, CARDOZO JUNIOR EL, LOURENÇO ELB & GASPAROTTO JUNIOR A. 2014. Amides from Piper as a diuretic: Behind the ethnopharmacological uses of *Piper glabratum* Kunth. Evid-Based Compl Alt. 2014.

QUEIROZ GAD, BARROS AAMD & GUIMARÃES EF. 2020. *Piper* (Piperaceae) do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói/Maricá, RJ, Brasil. Rodriguésia, 71.

REBELO MM, SILVA JKR, ANDRADE EHA & MAIA JGS. 2009. Capacidade antioxidante e atividade biológica de óleo essencial e extrato etanólico de *Hyptiscreata* Pohl ex Bent. Rev Bras Farm 19: 230-235.

RIDZUAN PM, AISYAH B, KAUSAR A, NAZIFIY, MISBAH O, AZLIN AA, ANAS AT, SYAZA Z, IZA NAR & ISMAIL S. 2021. Efeito inibitório antimicrobiano *in vitro* de extratos de folhas de *Piper aduncum* em bactérias e fungos. Rev Asiát Med Cienc Saúde 4: 48.

RUIZ SP, ANJOS MM, CARRARA VS, DELIMA JN, CORTEZ DA, NAKAMURA TU, NAKAMURA CV & DE ABREU FILHO BA. 2013. Evaluation of the antibacterial activity of Piperaceae extracts and nisinon *Alicyclobacillus* acido terrestris. J Food Sci78: 10-12.

RUIZ-VÁSQUEZ L, RUIZ MESIA L, CABALLERO CEFERINO HD, RUIZ MESIA W, ANDRÉS MF, DÍAZ CE & GONZALEZ-COLOMA A. Antifungal and Herbicidal Potential of *Piper* Essential Oils from the Peruvian Amazonia. Plants (Basel). 2022 Jul 7;11(14):1793. doi: 10.3390/plants11141793. PMID: 35890427; PMCID: PMC9324010.

SALEHI B, ZAKARIA ZA, GYAWALI R, IBRAHIM SA, RAJKOVIC J, SHINWARI ZK, KHAN T, SHARIFI-RAD J, OZLEYEN A, TURKDONMEZ E et al. 2019. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. Molecules. 2019 7;24(7):1364.

SANTOS ML, MAGALHÃES CF, DA ROSA MB, DE ASSIS SANTOS D, BRASILEIRO BG, DE CARVALHO LM, DA SILVA MB, ZANI CL, DE SIQUEIRA EP, PERES RL et al. 2013. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. Braz J Microbiol 44: 1275-1278.

SCALDAFERRI LG, TAMEIRÃO ER, FLORES SA, NEVES RASC, CORREIA TS, DO CARMO JR & FERRANTE M. 2020. Formas de resistência microbiana e estratégias para minimizar sua ocorrência na terapia antimicrobiana: Revisão. Pub Vet 14:163.

SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA & PETROVICK PR. 2017. Farmacognosia: da planta ao medicamento .3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC 27: 597-619

SIC ZLABUR J, RADMAN S, OPACIĆ N, RAŠIĆ A, DUJMOVIĆ M, BRNČIĆ M, BARBA FJ, CASTAGNINI JM & VOĆA S. 2022. Application of Ultrasound as Clean Technology for Extract ion of Specializ ed Metabolites From Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). Frontiers in Nutrition 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.870923>

SILVA L, MORAES LS, BENDER S & TAGLIETTI M. 2020. Desenvolvimento de um fotoprotetor com óleo essencial de canela. FJH 2: 434-439.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, MELLO JCP, MENTZ LA & PETROVICK PR. 2017. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. 1ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 502p.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR & SCHNEIDER EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175: 184-191.

SOUSA RS, VIEIRA ÂM, DA SILVA TF & DE SOUZA IA. 2019. Tratamento do câncer de próstata: radioterapia, quimioterapia e plantas medicinais como alternativa terapêutica. Rev Elet Ac Saúde 9: 537-537.

SOUZA CMM, SILVA HR, VIEIRA JGM, AYRES MCC, COSTA CD, ARAÚJO DS, CAVALCANTE LCD, BARROS EDS, ARAÚJO PBM, BRANDÃO et al. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quím Nova 30: 351-355.

TAYLOR JLS, RABE T, MCGAW LJ, JÄGERAK & VAN STADEN J. 2001. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. Plant Growth Regul 34: 23-37.

THAIPONG K, BOONPRAKOB U, CROSBY K, CISNEROS-ZEVALLOS L & BYRNE DH. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays to estimate the antioxidant activity of guava extracts. J composition analysis, 19: 669-675.

VALADARES ACF, ALVES CCF, ALVES JM, DE DEUS IP, DE OLIVEIRA FILHO JG, DOS SANTOS TCL & MIRANDA ML. 2018. Óleos essenciais de inflorescências e folhas de *Piper aduncum*: composição química e atividade antifúngica contra *Sclerotiniasclerotiorum*. An Acad Bras Cienc 90: 2691-2699.

VALADARES ACF, FERNANDES CC, DEU IPBD, LIMA TMD, SILVA EAJD, SOUCHIE EL & MIRANDA MLD. 2020. Incorporação de óleos essenciais de *Piper aduncum* em filmes de amido de araruta: efeitos sobre suas propriedades físico-químicas e atividade antifúngica. Quim Nova 43:729-737.

VALADEAU C, CASTILLO JA, SAUVAIN M, LORES AF & BOURDY G. 2009. The Rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanesha (Amuesha), na Amazonian Peruvian ethnic group. J ethnopharmacology 127: 175-192.

VAN DEN BERG ME. 1993. Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático 2 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi.

VILLAMIZAR LH, CARDOSO MDG, ANDRADE JD, TEIXEIRA ML & SOARES MJ. 2017. O linalol, componente do óleo essencial de *Piper aduncum*, tem atividade seletiva contra as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* a 4 C. Mem I Oswaldo Cruz 112: 131-139.

WANG YH, MORRIS-NATSCHKE SL, YANG J, NIU HM, LONG CL & LEE KH. 2014. Anticancer Principles from Medicinal *Piper* (胡椒 Hú Jiāo) Plants. *J Med T Comp* 4: 8-6.

YAFFE PB, DOUCETTE CD, WALSH M & HOSKIN, DW. 2013. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. *Exp molec pathology* 94: 109-114.