

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Análise toxicológica, anti-inflamatória e anti-nociceptiva do extrato
etanólico e frações obtidas das folhas de *Piper glabratum* Kunth**

MAICON MATOS LEITÃO

**Dourados - MS
2018**

MAICON MATOS LEITÃO

Análise toxicológica, anti-inflamatória e anti-nociceptiva do extrato etanólico e frações obtidas das folhas de *Piper glabratum* Kunth

Área do CNPq: Etnofarmacologia (2.10.06.00-8)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cândida Aparecida Leite Kassuya

Dourados - MS
2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Ludio Lima Leitão e Valdete Silva Matos Leitão. E a minha avó Maria Ferreira dos Santos (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só tornou-se possível graças à colaboração de muitas pessoas, que agora quero demonstrar de forma sincera meu profundo agradecimento.

Primeiramente a Deus, causa primeira de todas as coisas, pelas oportunidades que colocou em meu caminho, me dando força, coragem, perseverança e por ter povoado minha vida de pessoas maravilhosas.

A minha orientadora, Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya, pelas oportunidades a mim confiadas, pelas orientações, paciência e contribuição em minha formação científica e acima de tudo pela amizade construída ao longo destes anos, onde pude observar que além de grande pesquisadora e professora és também uma pessoa com caráter admirável, ao qual aprendi muito e levarei comigo para o resto de minha vida!

Ao professor do Departamento de Química da UEMS Prof. Dr. Jonas Silva Mota, grande parceiro na preparação e obtenção de extratos, frações e análise fitoquímica. Obrigado pela atenção e disposição em nos auxiliar.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira e a Silvia, pesquisadores do Centro de Estudos e Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), pelo auxílio nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade.

Aos meus pais, Ludio e Valdete, pelo exemplo de luta e dignidade, e por terem dado condições materiais e morais para que eu pudesse alcançar meus objetivos, incentivando minha caminhada e acreditando no meu potencial. Esta conquista também é de vocês!

Aos meus irmãos Ludio e Alexander, pelo apoio, carinho e companheirismo que sempre tiveram comigo, sempre me apoiando e torcendo por mim durante esse caminho.

Aos meus avós Cladir e Narciso, pelo incentivo a prosseguir nos estudos e aos conhecimentos transmitidos a mim. Com certeza seus ensinamentos e palavras de sabedoria me ajudaram muito a trilhar esta fase de minha vida.

Aos meus avós Maria e Moisés (*in memoriam*), pelo exemplo de força e coragem a mim transmitidos, em especial a minha avó, motivo maior do meu interesse na carreira científica. A qual também dedico este trabalho.

À minha noiva Gabrieli, pelo apoio, compreensão, paciência, atenção e amor. Sempre estando presente nos momentos bons e ruins, me ajudando e me fortalecendo para a conclusão dessa etapa em minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, Joyce, Ângela, Luis Fernando, Saulo e Vinícius pela ajuda nos experimentos, troca de conhecimento e pelas horas de descontração e brincadeira. Por terem de alguma forma, auxiliado em meu crescimento profissional e pessoal.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências da Saúde, Alexsandra, Patrícia, Cristiano e Ana, pela ajuda que direta ou indiretamente, influenciaram no desenvolvimento do projeto.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

EPÍGRAFE

"O sucesso nasce do querer, da determinação e
persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis."

(JOSÉ DE ALENCAR)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. (A e B): Folhas de ramos de <i>P. glabratum</i>	18
Tabela 1. <i>Screening</i> hipocrático em teste de toxicidade aguda	21
Figura 2. Característica de sangue periférico no ensaio cometa segundo sua classificação de dano: Classe 0 (A); Classe 1 (B); Classe 2 (C) e Classe 3 (D)	22
Figura 3. Cascata do ácido araquidônico	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido Araquidônico
AIE	Anti-Inflamatório Esteroidal
AINE	Anti-Inflamatório não Esteroidal
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Artrite reumatoide
AZy	Artrite induzida por zymosan
A δ	Fibra Nervosa do Tipo A- δ
C	Fibra Nervosa do Tipo C
COX	Ciclooxigenase
COX 1	Ciclooxigenase 1
COX 2	Ciclooxigenase 2
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EEPG	Extrato etanólico de <i>P. glabratum</i>
FLA ₂	Fosfolipase A ₂
GC	Glicocorticoide
GCR	Glucocorticoid Cytosolic Receptor
HAPG	Fração hidroalcolica de <i>P. glabratum</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HXPG	Fração hexânica de <i>P. glabratum</i>
IASP	International Association for the Study of Pain
i.a.	Intra-articular
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferon
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina1
IL-1 β	Interleucina 1 β

IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
MS	Ministério da Saúde
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento nervoso
NMDA	Receptor N-metil D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PG	Prostaglandina
PGE	Prostaglandina do tipo E
PMNs	Polimorfonucleares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
s.c.	Administração Via Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TLR-1	Receptor toll-like do tipo 1
TLR-2	Receptor toll-like do tipo 2
TLR-6	Receptor toll-like do tipo 6
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TX	Tromboxano
v.o.	Administração Via Oral
OMS	Organização mundial da saúde

Análise toxicológica, anti-inflamatória e anti-nociceptiva do extrato etanólico e frações obtidas das folhas de *Piper glabratum* Kunth

RESUMO

A inflamação e a dor estão presentes em várias doenças como diabetes, câncer, artrite reumatoide e dislipidemias. As plantas medicinais são importantes para a pesquisa científica e desenvolvimento de novas terapias farmacológicas. Entre elas a *Piper glabratum*, por seu uso popular no tratamento de feridas e edemas, já possuindo evidências científicas de efeito anti-inflamatório e analgésico. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi realizar a análise fitoquímica e avaliar a toxicidade, atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva do extrato etanólico das folhas de *P. glabratum* (EEPG), e das frações hexânica (HXPG) e hidroalcoólica (HAPG) obtidas a partir do extrato, em modelos experimentais em animais. A avaliação toxicológica foi realizada a partir de ensaios de toxicidade aguda e genotoxicidade, além da avaliação do potencial quimiopreventivo do extrato etanólico. Foi demonstrado a baixa toxicidade do extrato, sendo a DL50 superior a 2000 mg/Kg, e um possível efeito quimiopreventivo do extrato frente a agentes indutores de dano ao DNA. A análise fitoquímica de HXPG, realizada por cromatografia em coluna de sílica e cromatografia em camada delgada preparativa, evidenciou a presença e isolamento de Fitol (17mg) e uma mistura de estigamastrol e β -sitosterol (14mg). A HAPG em cromatografia em fase reversa (C18), demonstrou a presença de dois compostos da classe dos flavonóis glicosilados. O potencial biológico foi determinado pelos testes de pleurisia e edema de pata induzidos por carragenina, dor espontânea induzida por formalina e inflamação articular induzida por zymosan, sendo observada a resposta nociceptiva espontânea, mecânica e térmica ao frio, formação de edema, migração leucocitária e exsudação proteica. Pode-se observar que no modelo de pleurisia induzida por carragenina, todos os tratamentos, mas não a dose de 30mg/Kg de EEPG, reduziram a migração leucocitária e apenas a dose de 300mg/Kg de EEPG e HXPG (19,5mg/Kg) reverteram a exsudação proteica. O EEPG (30, 100 e 300mg/Kg), a HXPG e HAPG (83,37mg/Kg), diminuíram o edema, hiperalgesia mecânica e térmica ao frio no modelo de edema de pata induzida por carragenina, com ênfase a HXPG e dose de 300mg/Kg de EEPG. No modelo de dor espontânea, EEPG (300mg/Kg), HXPG e HAPG, preveniram a formação de edema e alodinia ao frio, entretanto, apenas HXPG diminuiu a dor espontânea. Os tratamentos de 300mg/Kg de EEPG e HXPG foram testados frente a infamação articular induzida por zymosan, onde ambos reduziram a formação de edema,

hiperalgesia mecânica e migração leucocitária de forma bastante semelhante. Concluímos que o EEG e frações possuem atividade anti-inflamatória e analgésica, e que esta ação farmacológica pode estar relacionada a supra regulação de NFkB, induzida pela presença de fitol, estigmasterol e β -sitosterol encontrados na fração hexânica.

Palavras-chave: Toxicidade; Inflamação; Jaborandi; Nocicepção; Quimioprevenção.

Toxicological, anti-inflammatory and anti-nociceptive analysis of the ethanolic extract and fractions obtained from *Piper glabratum* Kunth leaves

ABSTRACT

Inflammation and pain are present in various diseases such as diabetes, cancer, rheumatoid arthritis and dyslipidemias. Medicinal plants are important for scientific research and development of new pharmacological therapies. Among them, *Piper glabratum*, for its popular use in the treatment of wounds and edemas, already possessing scientific evidences of anti-inflammatory and analgesic effect. The objective of this study was to evaluate the toxicity, anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of the ethanolic extract of *P. glabratum* (EEPG) leaves and the hexanic (HXPG) and hydroalcoholic fractions (HAPG) obtained from the extract, in experimental models in animals. The toxicological evaluation was carried out from acute toxicity and genotoxicity tests, in addition to the evaluation of the chemopreventive potential of the ethanolic extract. The low toxicity of the extract was demonstrated, with the DL50 higher than 2000 mg/kg, and a possible chemopreventive effect of the extract against DNA damage inducing agents. The phytochemical analysis of HXPG, performed by silica column chromatography and preparative thin-layer chromatography, showed the presence and isolation of Fitol (17mg) and a mixture of stigmellastrol and β -sitosterol (14mg). HAPG on reverse phase chromatography (C18), demonstrated the presence of two compounds of the class of glycosylated flavonols. The biological potential was determined by the tests of pleurisy and paw edema induced by carrageenan, spontaneous pain induced by formalin and zymosan induced joint inflammation, being observed the spontaneous mechanical and thermal nociceptive response to cold, formation of edema, leukocyte migration and exudation protein. It can be observed that in the carrageenan-induced pleurisy model, all treatments, but not the 30 mg/kg dose of EEPG, reduced the leukocyte migration and only the 300 mg/kg dose of EEPG and HXPG (19.5 mg/kg) reversed protein exudation. The EEPG (30, 100 and 300 mg/kg), HXPG and HAPG (83.37 mg/kg) decreased edema, mechanical and thermal hyperalgesia in the carrageenan-induced paw edema model, with emphasis on HXPG and dose of 300 mg/kg of EEPG. In the spontaneous pain model, EEPG (300 mg/kg), HXPG and HAPG, prevented cold edema and allodynia, but only HXPG reduced spontaneous pain. The 300 mg/kg treatments of EEPG and HXPG were tested against zymosan-induced joint inflammation, where both reduced the formation of edema, mechanical hyperalgesia and leukocyte migration

in a very similar way. We conclude that the EEGP and fractions have anti-inflammatory and analgesic activity, and that this pharmacological action may be related to the up-regulation of NF κ B, induced by the presence of phytol, stigmasterol and β -sitosterol found in the hexane fraction.

Keywords: Toxicity; Inflammation; Jaborandi; Nociception; Chemoprevention.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Plantas medicinais	16
2.2 <i>Piper glabratum</i>	17
2.3 Toxicidade	19
2.3.1 Genotoxicidade e quimioprevenção	19
2.3.2 Métodos experimentais de avaliação de toxicidade	20
2.3.2.1 Toxicidade aguda	20
2.3.2.2 Ensaio cometa	22
2.4 Inflamação	23
2.5 Dor	25
2.6 Anti-inflamatórios e analgésicos	26
2.7 Modelos de inflamação e dor	29
2.7.1 Pleurisia induzida por carragenina	29
2.7.2 Edema de pata induzido por carragenina	29
2.7.3 Dor espontânea induzida por formalina	30
2.7.4 Inflamação articular induzida por zymosan	31
3 OBJETIVOS	31
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5 APÊNDICES	44
5.1 Artigo 1: Avaliação da toxicidade aguda e efeito quimiopreventivo e genotóxico do extrato etanólico das folhas de <i>Piper glabratum</i> no dano ao DNA induzido por ciclofosfamida - a ser submetido à revista “Regulatory Toxicology and Pharmacology” (Qualis B1 – Medicina II: Fator de impacto = 2.815)	45
5.2 Artigo 2: Effects of an ethanolic extract and fractions from <i>Piper glabratum</i> (Piperaceae) leaves on pain and inflammation - Submetido à revista “Journal of Ethnopharmacology” (Qualis A2 – Medicina II: Fator de impacto = 3.115)	74
6 CONCLUSÕES	103
7 ANEXOS	104
7.1 Aprovação do Comitê de ética no uso de animais (CEUA)	105

1 INTRODUÇÃO

Os processos inflamatório e doloroso estão presentes em várias doenças como diabetes, câncer e artrite reumatoide, entre outras. Diversos mediadores participam ativamente, tais como as prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, óxido nítrico e moléculas de adesão (OLIVEIRA JÚNIOR, *et al.*, 2016).

Em processos de inflamação articular, como na artrite reumatoide, pode ocorrer, como consequência, a expressão de sinais, tais como: dores constantes, hipersensibilidade em resposta para os estímulos térmicos e mecânicos, interferindo dessa maneira no funcionamento normal do sistema nervoso periférico e central (GOELDNER *et al.*, 2011). Neste sentido, modelos experimentais em animais e os estudos clínicos têm sido utilizados para entendimento da complexa neurobiologia da dor e da inflamação, bem como o mecanismo de desenvolvimento de doenças inflamatórias (CARLINHO, *et al.*, 2014).

Atualmente, as estratégias terapêuticas para o controle e alívio da inflamação e dor, são restritas a medicamentos que quando utilizados cronicamente, apresentam efeitos adversos que por vezes sobrepõem os seus efeitos farmacológicos ou benéficos. Neste sentido, o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para o tratamento da dor e inflamação, tem se mostrado útil e clinicamente plausível (ELY *et al.*, 2015).

A fitoterapia mostra-se uma importante opção ou ferramenta farmacológica sendo uma excelente alternativa como exemplo destas novas estratégias. Trabalhos de vários grupos de pesquisa mostram que extratos brutos e/ou purificados, bem como suas frações obtidas de diferentes partes de plantas, apresentam eficácia farmacológica contra a nocicepção e resposta inflamatória em modelos experimentais e estudos clínicos (MALAIRAJAN *et al.*, 2006; VISCARDI *et al.*, 2017).

Neste sentido, plantas do gênero *Piper*, pertencente à família Piperaceae, que possui mais de 2000 espécies, têm sido quimicamente estudadas como fonte favorável de metabólitos secundários com atividade anticonvulsivante, ansiolítica, anti-inflamatória, anti-hiperalgésica, antiparasitárias e diuréticas (NAKAMURA *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2007; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2008).

Estudos mostram que *P. glabratum* têm atividade antiparasitária contra *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, atividade diurética, antidepressiva, atividade anti-inflamatória, anti-edematogênica, antinociceptiva e ausência de efeitos tóxicos agudos e subagudos (FLORES *et al.*, 2008; PRANDO *et al.*, 2014; OESTERREICH *et al.*, 2015; BRANQUINHO *et al.*, 2017).

Embora o gênero *Piper* se mostre importante, poucas informações são encontradas sobre espécies deste gênero nativas do Brasil. Considerando a disponibilidade de *P. glabratum* no país e seu potencial farmacológico já evidenciado na medicina popular, o então incentivo por parte das políticas nacionais e organizações governamentais à pesquisa de plantas medicinais, torna-se importante avaliar a toxicidade e atividade anti-hiperalgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico e frações obtidas das folhas de *P. glabratum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, não só quando constituintes das plantas são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como material de estudo para a síntese de novas moléculas (WHO, 1998). Cerca de 50% dos medicamentos aprovados durante os últimos 30 anos foram obtidos a partir de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

O Brasil possui grande diversidade vegetal, com mais de 55.000 espécies catalogadas, sendo que apenas uma pequena parte já foi estudada quanto aos seus constituintes químicos e efeitos biológicos. Além disso, a população brasileira destaca-se pelo uso de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, fazendo com que esse conhecimento popular seja de grande relevância para a pesquisa científica, tornando-se possível aliar o conhecimento popular e científico em pesquisas experimentais e clínicas, para comprovar a atividade biológica das plantas utilizadas na medicina popular, identificar seus constituintes químicos e garantir a segurança de seu uso (MATIAS *et al.*, 2013).

Com relação a produção de medicamentos no Brasil, até meados de 1930, a base produtiva nacional, em termos de tecnologia e organização, apresentava os mesmos padrões e níveis capital dos demais países do mundo. Entretanto, a partir do final dos anos 1940, com a chegada de laboratórios europeus e empresas estadunidenses, houve uma mudança na forma de pensar e agir da indústria nacional (TEMPORÃO, 1989; GADELHA, 1990; BICUDO, 2006). Este fato gerou uma desmoralização e desprestígio da utilização de plantas medicinais, por conta de uma maior veiculação de campanhas publicitárias de produção e venda de medicamentos sintéticos no país (TEMPORÃO, 1989).

Contudo, a utilização das plantas medicinais e fitoterápicos nunca deixou de existir em diversas partes do território nacional, por conta principalmente de sua importância cultural, social e econômica. Boa parte das regiões e populações brasileiras dispunham apenas da medicina popular como forma terapêutica no tratamento de doenças, situação que ainda persiste em algumas regiões, tanto pela falta de acesso ou escassez de medicamentos, como pela livre escolha de utilização de plantas (RIBEIRO, 2015).

Durante anos importantes práticas de valorização a utilização de plantas medicinais foram desenvolvidas a nível mundial. No Brasil, a partir da década de 1990, houve um aumento progressivo de projetos de incorporação do uso de fitoterápicos e plantas medicinais no SUS

(Sistema Único de Saúde), mas só em 2006 o Ministério da Saúde (MS) determinou a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a). Após isso, foi instituída a Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008, criando o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, objetivando “garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2008).

No ano de 2009, foi lançada pelo Departamento de Assistência Farmacêutica a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Renisus), contendo um lista de 71 espécies vegetais, com o objetivo de priorizar recursos e pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e uso no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2009).

Recentemente a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), através da Resolução da Diretoria Colegiada nº 26 (RDC 26/14), atualizou as normas para registro de fitoterápicos, contemplando testes clínicos padronizados, criando o registro e notificação da categoria de *produtos tradicionais fitoterápicos*. A partir de então, é permitido o registro de fitoterápicos que apresentem eficácia e segurança reconhecidos através do uso tradicional por um período determinado pela agência em 30 anos, mesmo não sendo objetos de estudos experimentais e clínicos (RIBEIRO, 2015).

Sendo assim, passam a ser reconhecidos pela Anvisa somente produtos fitoterápicos industrializados, não se aplicando o registro a formas tradicionais de terapia medicinal tradicional como “garrafadas, xaropes, misturas artesanais feitas por populações tradicionais (curandeiros, indígenas, quilombolas, ribeirinhos, entre outros).

2.2 *Piper glabratum*

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae e possui mais de 2000 espécies. Essas espécies têm sido quimicamente estudadas como fonte favorável de metabólitos secundários com atividade anticonvulsivante, ansiolítica, anti-inflamatória, antiparasitárias e diuréticas (NAKAMURA *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2007; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2008). Estas espécies caracterizam-se como arbusto, com folhas simples alternas e ramos segmentados unidos por nós grossos (DYER; PALMER, 2004). Uma propriedade comum entre a maioria das espécies é a exalação de aroma característico facilmente identificado após partes da planta serem danificadas, mesmo que superficialmente (JARAMILLO; MANOS, 2001).

Estas espécies são conhecidas popularmente como “pimenta-preta”, “pariparobacaapeba”, “falso jaborandi”, dentre outros (KATO; FURLAN, 2007). Seu reconhecimento comercial se dá na produção de pimenta e conteúdo oleífero, utilizadas também na medicina popular, alimentícias, entre outras (JUNQUEIRA *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2001);

Embora a importância do gênero, há poucas informações encontradas sobre espécies de *Piper* nativas do Brasil. Estudos sobre a *Piper glabratum* Kunth (Figura 1) são muito restritos, considerando as propriedades químicas e farmacológicas da espécie. Esta espécie é popularmente utilizada no tratamento anti-inflamatório de inchaços, feridas e irritações de pele (BERGO, 2012).

Existem relatos mostrando que derivados de ácido benzóico de *P. glabratum* têm atividade antiparasitária contra *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (FLORES *et al.*, 2008). Prando e colaboradores (2014) observaram a presença de aminas e determinaram a atividade diurética do extrato metanólico da espécie. Também foi demonstrada uma possível atividade antidepressiva do extrato etanólico das folhas de *P. glabratum*, além da presença de ácidos orgânicos, taninos, esteroides e triterpenos (OESTERREICH *et al.*, 2015). Também foi determinada a atividade anti-inflamatória, anti-edematogênica e antinociceptiva do óleo essencial das folhas de *P. glabratum*, constatando por fim baixa toxicidade aguda e subaguda (BRANQUINHO *et al.*, 2017). Neste caso, muito ainda pode-se prospectar a respeito desta espécie, levando em consideração seu uso popular e as evidências encontradas em estudos anteriores.



Figura 1. (A e B): Folhas de ramos de *P. glabratum*. Fonte: BRANQUINHO (2012, p. 5).

2.3 Toxicidade

A avaliação da segurança terapêutica é tão importante quanto a determinação da ação farmacológica de uma planta. Determinar os parâmetros toxicológicos levando em consideração a dose e frequência de exposição a compostos químicos presentes em plantas medicinais, torna possível determinar as condições seguras de uso da mesma. (BRANQUINHO, *et al.*, 2017). Visando garantir a segurança e uso racional de plantas medicinais, foram padronizados diversos protocolos experimentais *in vitro* e *in vivo*, por agências regulatórias nacionais e internacionais, necessários para registro e comercialização de tais compostos naturais. (CARDOSO, *et al.*, 2016).

As etapas necessárias até a comercialização e uso de um novo fitoterápico, consiste em etapa botânica, a farmacêutica, os ensaios biológicos pré-clínicos, e etapa clínica. De modo geral trata-se da identificação do material em estudo, a preparação da forma farmacêutica de uso, testes farmacológicos e toxicológicos em animais experimentais e então o teste em seres humanos. É evidente que para que o produto seja indicado para uso em humanos, este deve ser certificado de que seus benefícios farmacológicos são superiores aos riscos de toxicidade. (ANVISA, 2010).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão regulador do Brasil, publicou no ano de 2013 o “Guia para a condução de estudos não clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, pontuando protocolos e parâmetros de análise toxicológica para ensaios pré-clínicos como toxicidade aguda, em doses repetidas (subaguda), dentre outros (ANVISA, 2013). Outro órgão regulador entretanto de caráter internacional é a OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), que assim como a ANVISA, preconiza os métodos e parâmetros a serem seguidos em testes de toxicidade pré-clínicos (OECD, 2008).

Os ensaios mais utilizados são o de toxicidade aguda, o de doses repetidas (subaguda) e o ensaio crônico, mas podemos citar também os testes de genotoxicidade e mutagenicidade, que visam avaliar a capacidade do composto em alterar o material genético celular.

2.3.1 Genotoxicidade e Quimioprevenção

A genética toxicológica surgiu no início dos anos 80, sendo introduzida como parte essencial na análise toxicológica de compostos antes de serem comercializados no mercado

(DOLL; PETO, 1981). Isso porque diversas substâncias podem determinar alterações no material genético, sendo estes compostos classificados como mutagênicos. Estes agentes genotóxicos possuem a capacidade de interagir diretamente no DNA, alterando ou rompendo a fita de DNA, comprometendo a replicação e transmissão gênica. Esta ação normalmente é passível de reparo pelo próprio organismo, entretanto, em casos persistentes, ocorre mutação gênica que pode ser repassado às células filhas durante o processo de replicação, tornando-se mutações hereditárias (EASTMOND *et al.*, 2009).

Os estudos de genotoxicidade e mutagenicidade podem ser categorizados por permitirem a avaliação de mutação gênica, dano ao cromossomo e lesão ao DNA por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo considerados importantes no desenvolvimentos de inúmeros efeitos adversos, como por exemplo o câncer, visto que estes ensaios podem correlacionar-se aos eventos iniciais ou intermediários de tumorigênese (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003; ANVISA, 2013).

Além da capacidade de causar danos ao material genético, existem plantas que exercem o efeito quimiopreventivo, ou seja, previnem a lesão celular induzida por compostos químicos, ou mesmo de lesões naturais do metabolismo celular. Diversas pesquisas têm demonstrado o efeito anticâncer de substâncias naturais a partir deste mecanismo experimental. Muitos destes compostos podem ser sintetizados em laboratório, entretanto sabe-se de diversos compostos de origem natural que possuem esta característica como as isoflavonas da soja, o licopeno no tomate, a luteína do espinafre, dentre outros (BRASIL, 2006b; GAUTAM *et al.*, 2014).

2.3.2 Modelos experimentais de avaliação de toxicidade

2.3.2.1 Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda é um dos testes toxicológicos mais utilizados, pois permite obter informações preliminares sobre os eventuais efeitos tóxicos da substância teste, em uma administração única ou seriada ao longo de 24 horas, em animais experimentais acompanhados por 14 dias (ANVISA, 2013). A partir deste ensaio, torna-se possível determinar a DL50 (dose letal média) da substância em teste, isso significa que ao término do experimento, é estimada a dose da substância capaz de causar a morte de 50% dos animais experimentais (OECD, 2008).

Segundo a OECD (2008), substâncias que de alguma forma podem ser consideradas de baixa toxicidade, pode-se utilizar como limite de teste a dose de 2000 mg/Kg, iniciando a administração em um animal e, em caso de ausência morte nas primeiras 48 horas, passa-se a

administrar a mesma dose a outros 4 animais, que serão observados durante 14 dias. São observados os parâmetros de *screening* hipocráticos descritos por Malone & Robichaud (1962) nas primeiras 24 horas após a administração do composto e posteriormente, pelo menos uma vez ao dia até o término do experimento (Tabela 1).

Tabela 1. *Screening* hipocrático avaliados em teste de toxicidade aguda.

Parâmetro		Descrição
Estado consciente	Atividade geral	Verificar a locomoção dentro da caixa, bem como o ato de levantar e farejar do animal.
	Resposta ao toque	Tocar o animal por 15 segundos e examinar a resposta imediata dele.
Atividade e Coordenação do Sistema Motor e Tônus Muscular	Resposta ao aperto de cauda	Apertar a ponta da cauda do animal com pinça e observar a reação do mesmo.
	Endireitamento	Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que volta à posição normal.
	Força para agarrar	Colocar animal sobre grade e avaliar intensidade em que se segura na mesma.
	Tônus do corpo	Verificar sua presença ou não e o grau.
Reflexos	Auricular	Estalar os dedos e observar a posição da orelha após o estímulo.
	Corneal	Aproximar uma pinça até os olhos, sem tocá-los, e observar se o animal os fecha.
Atividades sobre o Sistema Nervoso Central	Tremores	Observar se estão presentes e qual intensidade.
	Convulsões	Observar a presença ou ausência.
	Cauda em straub	Verificar cauda em posição normal ou ereta.
	Sedação	Animal sem movimento, mas responde a estímulos.
	Anestesia	Animal sem movimento e sem resposta a estímulos.
	Ataxia	Movimentos descoordenados.
Atividades sobre o Sistema Nervoso Autônomo	Lacrimação	Observar se está presente e o grau.
	Cianose	Pele azulada.
	Ptose	Olho fechado, pálpebras caídas.
	Salivação	Observar se está presente e o grau
	Piloereção	Pêlos erguidos.

Fonte: TRAESEL (2014, p.18).

2.3.2.2 Ensaio cometa

Esta técnica baseia na avaliação de quebras na fita de DNA, observadas na migração celular individual em gel de agarose pela eletroforese em alcalino. Este método também é conhecido por eletroforese de célula única (“Single cell electrophoresis test”). O teste foi descrito por Singh e colaboradores (1988), sendo reproduzida com algumas modificações descritas por diversos outros pesquisadores ao longo dos anos.

O teste permite avaliação de lesões genômicas, mas não de mutações, e tais lesões são passíveis de reparo, entretanto, tais alterações podem também gerar mutações celulares (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). A avaliação das lesões celulares ocorre pela observação em microscopia de fluorescência, onde a célula quando submetida a uma corrente elétrica, apresenta-se com aparência de um cometa, com a cabeça (região nuclear) e a cauda contendo as fitas ou fragmentos de DNA (WITTE *et al.*, 2007) (Figura 2). Isso ocorre pela ocupação de proteínas nucleares (provenientes da lesão nuclear), no espaço de gel anteriormente ocupado por toda a célula. Neste teste é imprescindível a utilização de grupos controle positivo e controle negativo, visto que de maneira natural, nosso organismo produz em torno de 1000 lesões celular por dia (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

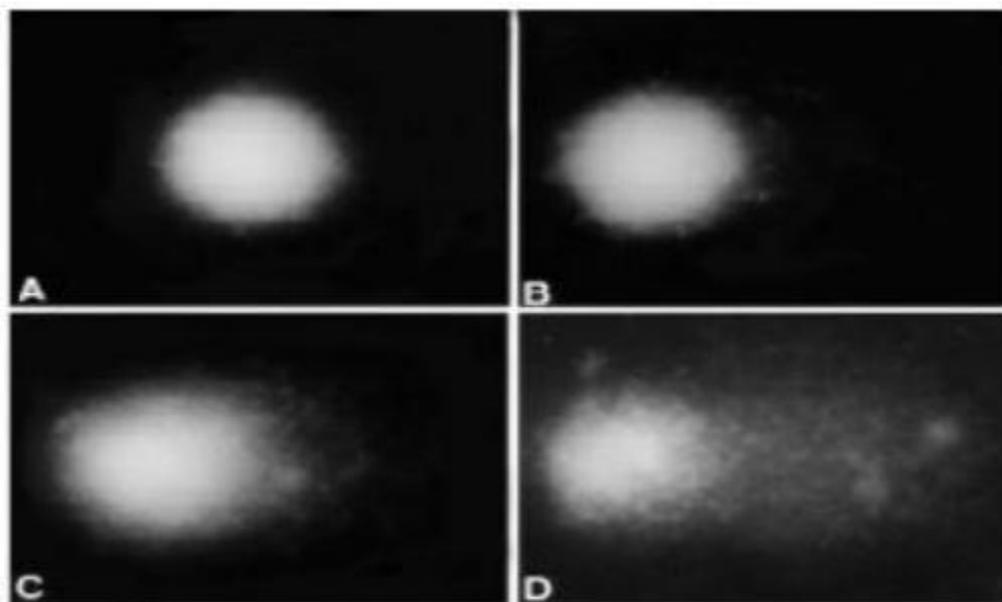


Figura 2. Característica de sangue periférico no ensaio cometa segundo sua classificação de dano: Classe 0 (A); Classe 1 (B); Classe 2 (C) e Classe 3 (D). Fonte: FREITAS (2007).

2.4 Inflamação

A inflamação ocorre como resposta do tecido a uma lesão celular, tecidual ou infecção, manifestando-se a partir de um agente lesivo, podendo ser ele físico (extremos de temperatura, radiação ou trauma), químico (substância corrosiva) ou biológico (vírus, fungos, parasitas e bactérias) (SILVA, 2006). Deste modo, a inflamação caracteriza-se por processo de defesa do organismo, afim de remover o agente causador da injúria, dando condições necessárias para a restauração tecidual, podendo ser dividida em aguda e crônica (NOAH *et al.*, 2012).

As manifestações clínicas observadas na inflamação aguda são, principalmente, rubor, calor, edema e dor. Estes sinais característicos ocorrem em resposta a um complexo processo de interações entre componentes vasculares e celulares, como: aumento do fluxo sanguíneo na área lesionada; aumento da permeabilidade vascular, promovendo à formação do exsudato; migração leucocitária, especialmente de neutrófilos, estimulados por quimiocinas que favorecem a interação das células com moléculas de adesão endoteliais (integrinas e selectinas), estimulando a diapedese (MEDZHITOV, 2010). Na inflamação crônica, além das anteriores, pode ocorrer também ativação de linfócitos e de células imunológicas residentes, aumentando a liberação de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, culminando em lesão tecidual e perda da função (WILLIAMS, 1983; SPRINGER, 1994; NOURSHARGH *et al.*, 2010).

Todas essas alterações são, em geral, iniciadas por células do sistema imunológico ativadas, como macrófagos e leucócitos, que produzem mediadores inflamatórios como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), histamina, prostaglandinas (PG), óxido nítrico (NO), serotonina, leucotrienos e substância P, capazes de induzir a expressão de moléculas de adesão, permitindo a interação dos leucócitos com as células endoteliais e pôr fim a diapedese (WALZOG; GAEHTGENS, 2000; RANG, *et al.* 2007). Essa ativação inicia-se pela resposta das células de imunidade inata a padrões moleculares associados a danos (DAMPs (moléculas resultantes de danos celulares)) ou a patógenos (PAMPs (moléculas microbianas como lipídeos e proteínas)), por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), sendo os do tipo *Toll* (TLR – *Toll-like receptors*) os mais conhecidos (MARCOVECCHIO *et al.*, 2012).

A liberação destes mediadores inflamatórios, gera também uma alteração no mecanismo periférico do estímulo nociceptivo, ocasionando a hiperalgesia (resposta exagerada aos estímulos nociceptivos), alodinia (dor espontânea) ou a diminuição na percepção de estímulos dolorosos (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998). Isso ocorre pelo aumento da sensibilidade dos

nociceptores, que foram sensibilizados pela liberação de PG, citocinas e bradicinina (RANG, *et al.* 2007).

No processo de formação e liberação de mediadores inflamatórios, também vale ressaltar a esterificação das fosfolipases A₂ (FLA₂), resultando na liberação de ácido araquidônico e posteriormente prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXs) por meio das enzimas cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (SILVA, 2006) (Figura 3). A COX-1, dentre outras funções, é responsável pela produção de PGs envolvidas na citoproteção gástrica, agregação plaquetária e regulação do fluxo sanguíneo renal. Já a COX-2, que é induzida por estímulos inflamatórios, produz grande quantidade de mediadores prostanóides, que possuem ações vasodilatadoras, aumentam a permeabilidade vascular e estão relacionadas a hiperalgesia (WILLIAMS; PECK, 1977; RANG, *et al.*, 2007). Existe ainda a isoforma COX-3, uma variante da COX-1, sugerida para desvendar o mecanismo do acetaminofeno, que codifica proteínas completamente diferentes da COX-1 e COX-2, estando mais presente no sistema nervoso central, sendo improvável que atue com um papel nas respostas mediadas pelas prostaglandinas (SHARMA, *et al.*, 2012).

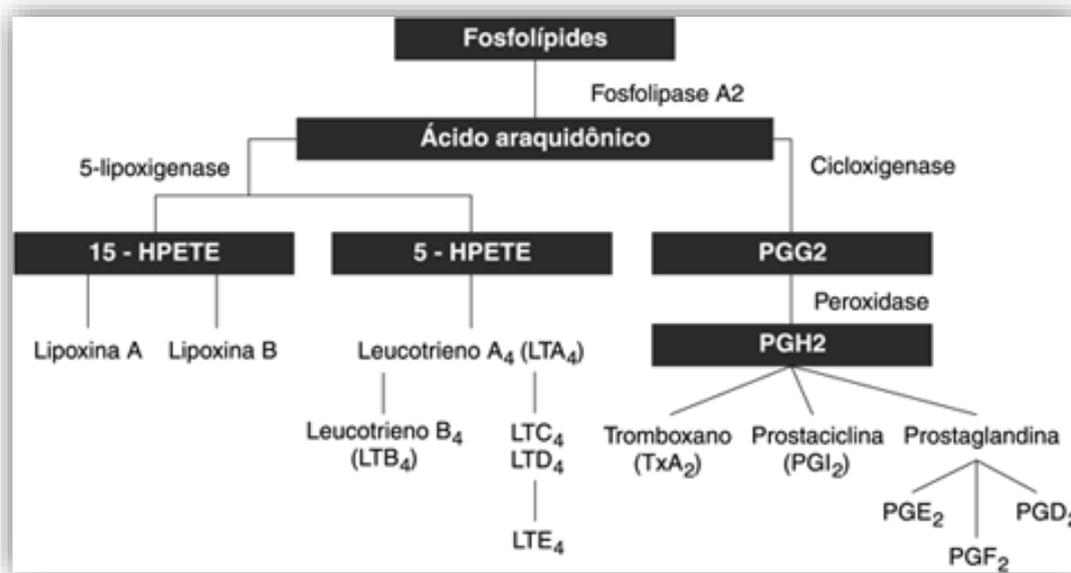


Figura 3: Cascata do ácido araquidônico. Fonte: GIORGI (2015, p.56).

Além dos mediadores pró-inflamatórios mencionados, é importante ressaltar a produção e liberação de substância anti-inflamatórias e/ou resolutorias pelo organismo, como resolvinas, protectinas e lipoxinas (MEDZHITOV, 2010), apresentando ação anti-inflamatória, pró resolutoras e anti-fibróticas (SERHAN, 2008). Pode-se mencionar algumas citocinas como IL-4, IL-10, IL-16 e TGF- β , responsáveis por inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias, controlando a evolução do processo inflamatório (REN *et al.*, 2013). Entretanto, estes

mecanismos fisiológicos, por vezes, não são capazes solucionar o processo inflamatório, tornando-se necessária a utilização de drogas anti-inflamatórias, afim de se evitar a lesão tecidual exacerbada e a evolução para um processo inflamatório crônico e aliviar sintomas (LAWRENCE *et al.*, 2002).

2.5 Dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP - International Association for the Study of Pain), dor é uma experiência sensorial desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões sendo que as emoções podem influenciar o indivíduo nessa sensação (LUMLEY *et al.*, 2011). A dor é uma experiência sensorial e emocional que é substancialmente modulada por fatores psicológicos, sociais e contextuais (CARLINO *et al.*, 2014).

Mesmo sendo uma sensação desagradável, a dor é extremamente importante para a conservação da integridade física do indivíduo, tendo como principal papel a sinalização da presença de um estímulo agressor. Entretanto, a dor pode desencadear consequências ao paciente, como depressão e ansiedade se persistir por longos períodos (KHUONG; NEELY, 2013; LUNDEBERG, 2015).

Em termos de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual. Por outro lado, a dor crônica pode se perpetuar por meses ou anos, se caracterizando em relação à persistência de alterações, o que muitas vezes dificulta o tratamento (PARK; VASKO, 2005).

A transmissão da dor aguda envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral. Vários estímulos nocivos ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os nociceptores das fibras A δ respondem a estímulos nocivos mecânicos e térmicos, diferenciando-se em fibras A δ , sendo responsivas a temperaturas elevadas (> 50° C) e as do tipo II, responsivas a temperaturas inferiores a 40° C. As fibras C também são polimodais, respondendo a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (capsaicina e histamina) (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A capacidade de condução da dor e seu potencial de ação nos nervos periféricos, dependem do diâmetro da fibra sensibilizada, sendo a dor rápida e com localização precisa

conduzida por fibras A δ , por possuírem diâmetro médio e serem pouco mielinizadas. Já a dor lenta, caracteriza-se por sensação de queimação, correspondente à ativação de fibras do tipo C, que não são mielinizadas e possuem diâmetro pequeno. Assim, a partir das propriedades dos nociceptores, podem ser modulados os sinais de dor aguda e também desenvolver a dor crônica (BASBAUM *et al.*, 2009; GEFFENEY; GOODMAN, 2012).

A dor pode ainda ser classificada como fisiológica ou nociceptiva (quando há ativação direta dos nociceptores sem alterações teciduais), inflamatória (provocada por danos teciduais), neuropática (provocada por lesão de células do sistema nervoso central) e idiopática, onde a causa não é identificada (THAKUR *et al.*, 2014). A dor inflamatória está presente em várias doenças e essa distinção do tipo de dor é importante para direcionar o tratamento do paciente.

A dor inflamatória ou dor associada a processos inflamatórios é resultante de mudanças funcionais em neurônios aferentes e pela estimulação em algumas fibras do tipo C silenciosas, que são ativadas por estímulos químicos bem como por mediadores inflamatórios. A literatura relata que na dor inflamatória ocorre sensibilização dos nociceptores quimiossensíveis através da acetilcolina, serotonina, bradicinina, histamina, substância P, PAF, TNF, PGE, interleucinas (IL-1 e IL-8), AMPc, dentre outras (CUNHA *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 2007), desencadeando a dor inflamatória e diminuindo o limiar de despolarização dos nociceptores, tornando-o responsivo a estímulos de intensidade baixa (COUTAUX *et al.*, 2005).

A dor inflamatória caracteriza-se por dor evocada por estímulos normalmente inócuos (alodinia) ou por uma sensibilidade exacerbada a estímulos nocivos ou não nocivos (hiperalgesia) (KUNER, 2010). O termo hipernocicepção refere-se à sensibilização dos nociceptores (central e periférica), isto é, a diminuição do seu limiar de ativação, e tem sido empregado para designar alodinia ou hiperalgesia em animais de experimentação (CUNHA *et al.*, 2004).

Alodinia, é uma resposta nociceptiva a um estímulo que anteriormente não era doloroso, já a hiperalgesia ocorre pela redução do limiar da dor, ativação exacerbada da via da dor, descargas ectópicas ou perda de processos inibitórios, determinando respostas dolorosas anormais, classificadas como hiperalgesia, ou seja, ocasionada por um aumento da sensibilidade à dor (LOESER; TREEDE, 2008; SANDKÜHLER, 2009).

2.6 Anti-inflamatórios e analgésicos

Dentre os fármacos disponíveis na prática clínica, os mais utilizados para fins anti-inflamatórios, são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) seletivos ou não à COX-2 e os

anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), ambos apesar de possuírem excelentes propriedades anti-inflamatórias, por vezes, determinam efeitos adversos que sobrepujam seus efeitos benéficos (BATLOUNI, 2010).

Os AINEs atuam inibindo a enzima COX, interferindo então na produção de PGs e TXs. Entretanto a maior parte desses fármacos não são específicos e bloqueiam as duas isoformas, COX-1 (constitucional ou fisiológica) e COX-2 (induzida ou inflamatória), desencadeando efeitos gastrointestinais como úlceras e sangramentos, visto que inibem a ação da COX-1 na proteção da mucosa gástrica, além da inibição plaquetária, aumentando o risco de hemorragias. Até mesmo nos fármacos específicos para COX-2 (COXIBEs) pode-se listar efeitos colaterais como aumento no risco cardiovascular como infarto agudo do miocárdio, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral, e efeitos renais como insuficiência renal aguda e síndrome nefrótica (BATLOUNI, 2010; SOSTRES *et al.*, 2010).

Já os AIEs ou glicocorticoides (GCs), são amplamente utilizados em protocolos de tratamento de doenças inflamatórias como alergias, dermatite, câncer e doenças autoimunes, como a artrite reumatoide (AR) e lúpus (DE BOSSCHER *et al.*, 2010). Ainda assim, estes fármacos também determinam efeitos adversos como hipertensão, distúrbios metabólicos, resistência à insulina, irritação gástrica, osteoporose, dentre outros (TORRES *et al.*, 2012).

Sua ação farmacológica se inicia a partir da sua ligação a receptores proteicos específicos de GC, GCR (*Glucocorticoid cytosolic receptor*), formando um complexo denominado GC/CR, que interage com sequências de DNA, induzindo a produção de proteínas anti-inflamatórias e reduzindo a produção de moléculas pró-inflamatórias. Mais precisamente, os AIE's inibem a transcrição via NF- κ B de mediadores inflamatórios como as citocinas (IL-1, interferon- γ (IFN- γ), TNF), e ativam genes anti-inflamatórios (IL-10 e lipocortina) (BARBOSA *et al.*, 2013; TORRES *et al.*, 2012).

Já no que diz a respeito ao tratamento da dor, é de extrema importância estabelecer um protocolo adequado, a partir do diagnóstico correto da etiologia da mesma. Para isso, é indispensável o conhecimento sobre a fisiopatologia e mecanismos que norteiam ao desequilíbrio orgânico do processo doloroso em questão (CALIL; PIMENTA, 2010). Deste modo, o fármaco de escolha deve ser embasado com relação ao tipo de dor a ser combatida. Neste sentido, podemos citar diversas classes de fármacos com propriedades analgésicas como relaxantes musculares, anestésicos gerais e locais, agonistas α -2 adrenérgicos, opióides, antagonistas de receptores adrenérgicos, AINEs, antidepressivos e antagonistas de NMDA, podendo ser utilizados isoladamente ou em conjunto, que por vezes, favorece o alívio da dor por meio de diferentes mecanismos de ação (CALIL; PIMENTA, 2010).

Em relação aos anestésicos gerais, seu mecanismo de ação ocorre pelo bloqueio da percepção dolorosa induzindo o córtex cerebral a não percepção da informação nociceptiva recebida, ocorrendo a inconsciência. Anestésicos locais bloqueiam canais de sódio voltagem dependentes, interrompendo a passagem do sódio pelas membranas nervosas, diminuindo a velocidade de despolarização, retardando o potencial de ação, determinando um bloqueio da condução nervosa motora e sensorial, podendo ser utilizados na dor aguda, crônica ou neuropática (KLAUMANN *et al.*, 2008).

Um outra classe de fármacos analgésicos são os opióides, caracterizados por possuírem uma alta potência terapêutica no alívio da dor, sendo representados pela morfina e seus derivados como fentanil e codeína. Esta classe de medicamentos são agonistas de receptores opióides (tipo μ , κ e, em alguns casos δ), localizados principalmente no SNC e na medula espinhal, responsáveis pela transmissão e modulação da resposta dolorosa, podendo ser utilizados na dor aguda, inflamatória persistente e neuropática (FRAGATA; IMAGAWA, 2008).

A classe dos AINEs também podem ser utilizados como analgésicos, visto que no bloqueio do metabolismo do ácido araquidônico e formação de eicosanoides, como por exemplo as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, pela inibição da isoenzima COX, ocorre diminuição da sensibilização nociceptiva induzida pelos eicosanoides. A utilização desta classe de fármacos possui vantagens como a ausência de depressão do sistema nervoso, respiratório e cardiovascular, sendo possível potencializar seus efeitos analgésicos a partir da combinação com opiáceos (OTERO, 2007).

De modo alternativo ao tratamento no alívio da dor, fármacos da classe dos antidepressivos tricíclicos demonstram possuir eficácia medicamentosa, de modo particular na dor crônica neuropática. Essa classe medicamentosa inibe a receptação da noradrenalina e serotonina nos neurônios, além de ativar vias descendentes de inibição da dor, diminuem também o AMP cíclico, via ativação de receptores da adenosina e bloqueio de canais de sódio voltagem dependentes (DWORKIN, 1999).

Apesar da ampla variedade de protocolos terapêuticos direcionados especificamente para determinados tipos de dor através de diversas classes medicamentosas, o que se observa é a alta incidência de efeitos adversos oriundos da utilização da maioria destes fármacos, provocado por efeitos gastrointestinais, renais e hepáticos, além de disfunção plaquetária e cardiovascular (RAO; KNAUS, 2008; LAM; NG, 2010).

2.7 Modelos experimentais de inflamação e dor

2.7.1 Pleurisia Induzida por Carragenina

Dentre os modelos experimentais de inflamação *in vivo*, os induzidos por carragenina são utilizados com frequência. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado, proveniente de algas vermelhas, principalmente da alga *Chondrus crispus*, encontrada em Carrageen (Waterford, Irlanda) (DI ROSA *et al.*, 1972).

O modelo de pleurisia induzida por carragenina é caracterizado por apresentar uma resposta inflamatória bifásica (4 e 48 h) após injeção intrapleural do agente flogístico, com pico máximo de infiltração leucocitária e formação de edema na quarta hora (COELHO, 2009).

Tracey *et al.* (1995), demonstraram o envolvimento do óxido nítrico no processo inflamatório desencadeado neste modelo experimental, onde foi observado a atividade da óxido nítrico-sintase sobre as células inflamatórias na cavidade pleural. A importância do óxido nítrico no processo inflamatório também foi demonstrada em outros modelos de inflamação por carragenina, como no caso do edema de pata (IALENTI *et al.*, 1992).

Na primeira fase (4 h) também ocorre aumento dos níveis de mieloperoxidase, correlacionada com o aumento do número de leucócitos no exsudato inflamatório desta fase (KRAWISZ *et al.*, 1984; RAO *et al.*, 1993). Nesta primeira fase, ocorre também uma resposta inflamatória mediada por bradicinina, que por meio de seu receptor B₂ modula a resposta inflamatória, algésica e o extravasamento plasmático (HALL, 1992; MARCEAU, 1995; M. HALL; MORTON, 1997), além de aumentar a liberação de mieloperoxidase. Outro mediador envolvido no processo inflamatório na pleurisia induzida pela carragenina é a histamina, importante no processo de aumento da permeabilidade vascular, prostanoídes, IL-1, IL-8 e TNF (FRÖDE, 2000).

2.7.2 Edema de pata induzido por carragenina

De modo particular, o edema de pata induzido por carragenina destaca-se pela possibilidade de mensurar o papel de diferentes mediadores presentes durante o processo inflamatório. O modelo experimental foi proposto por (WINTER *et al.*, 1962), utilizando-se apenas ratos, porém, Levy (1969) demonstrou que o modelo poderia ser realizado também em camundongos.

Neste modelo, é possível avaliar não apenas o processo inflamatório, onde ocorre infiltração local de neutrófilos, aumentando o tamanho da pata (edema), mas também a nocicepção, visto que ocorre a sensibilização de nociceptores, que podem ser avaliados quando estimulados de forma mecânica ou térmica (ZHANG *et al.*, 1997; PINHEIRO; CALIXTO, 2002).

O modelo caracteriza-se pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina na primeira fase (1-2 h, após indução com carragenina), e uma elevada produção de prostaglandinas e NO na segunda fase (3-6 h) (DI ROSA *et al.*, 1971; OGONOWSKI *et al.*, 1997). A formação do edema é oriundo do aumento da permeabilidade vascular, pela interação de substâncias como a histamina e a bradicinina por exemplo, com mediadores como as prostaglandinas E2, que causam principalmente vasodilatação, que por si só, aumentam a pressão de perfusão e o aporte sanguíneo nas vênulas da região inflamada (LAPA *et al.*, 2007).

2.7.3 Dor espontânea induzida por formalina

Este teste possibilita a avaliação de diferentes tipos de mecanismos de ação analgésica em um curto período de tempo, sendo esta a vantagem deste modelo em relação aos outros métodos de avaliação nociceptiva (RANDOLPH; PETERS, 1997). Após a injeção da formalina na pata do animal, torna-se possível a quantificação da resposta comportamental do animal, em resposta à lesão tecidual causada pela substância em questão (DUBUISSON; DENNIS, 1977; MARTINS *et al.*, 2006).

As avaliações comportamentais à formalina são determinadas por um padrão bifásico bem definido, sendo uma fase inicial aguda (0-5min, primeira fase) - resultado da estimulação direta de nociceptores, refletindo na dor central - e por uma fase mais prolongada (15-30min, segunda fase) - caracterizada por dor inflamatória por liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987). O intervalo entre as duas fases denomina-se intervalo de quiescência (DUBUISSON; DENNIS, 1977; MARTINS *et al.*, 2006).

Na primeira fase ocorre à liberação de aminoácidos excitatórios, substância P e óxido nítrico (NO), com estimulação dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ . Já na segunda fase, observa-se principalmente a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, serotonina e prostaglandinas. No intervalo de quiescência ocorre bloqueio da transmissão nociceptiva pelos circuitos supra-espinhais e espinhais (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

A resposta nociceptiva da primeira fase é responsiva a drogas que atuam no sistema opióide, como por exemplo a morfina, e a resposta nociceptiva da segunda fase é antagonizada por anti-inflamatórios não esteróidais (AINES). Neste caso, drogas que agem periféricamente modulam somente a segunda fase, enquanto drogas de ação central (opióides) modulam ambas as fases (ROSLAND *et al.*, 1990).

2.7.4 Inflamação articular induzida por Zymosan

Os modelos experimentais de inflamação articular colaboram com a elucidação de mecanismos de ação que envolvem o sistema imunológico e a inflamação desencadeadas por diversas doenças. Isso torna-se importante por contribuir para a descoberta de novas drogas e protocolos de tratamento (NGOC *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2011).

No modelo em questão, é utilizado o zymosan, um polissacarídeo insolúvel, proveniente da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Este modelo é comumente utilizado para investigação de potencial terapêutico de produtos sintéticos e naturais, com base na inflamação da articulação avaliada (GEGOUT *et al.*, 1995).

O zymosan age como agonista de receptor TLR-1, TLR-2 e TLR-6, que ativa o fator de transcrição NF- κ B, que por sua vez atua regulando a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β , IL-6, NO e quimiocinas (OZINSKY *et al.*, 2000; KAWAI; AKIRA, 2007). Primeiramente ocorre aumento da permeabilidade vascular, gerando a formação de edema local e influxo de células PMN, com destaque aos neutrófilos (FRASNELLI *et al.*, 2005). Além disso, o zymosan induz a hipernocicepção entre a 3^a e 4^a hora após a indução e infiltração de células PMN na cavidade articular com pico máximo após 6 horas da indução da inflamação (ROCHA *et al.*, 1999; DA ROCHA *et al.*, 2004).

3 OBJETIVOS

GERAL

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, quimiopreventivas e genotóxica do extrato etanólico, bem como a atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva do extrato e frações hexânica e hidroalcoólica obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *P. glabratum* e determinação dos constituintes químicos das frações.

ESPECÍFICOS

Realizar a análise da toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas da planta;

Avaliar a genotoxicidade e capacidade quimiopreventivas do extrato etanólico das folhas da planta;

Realizar a análise fitoquímica das frações hexânica e hidroalcoólica;

Determinar a atividade anti-inflamatória em modelo de pleurisia induzida por carragenina;

Avaliar atividade anti-inflamatória e analgésica (térmica e mecânica) no modelo de edema de pata induzido por carragenina;

Avaliar a atividade analgésica na dor espontânea induzida por formalina, assim como a alodinia ao frio e formação de edema;

Determinar a atividade anti-inflamatória e analgésica (mecânica) em modelo de inflamação articular induzida por zymosan.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Esclarecimento sobre o “Parágrafo 26” do Protocolo OECD 474 - Teste de Micronúcleo em Eritrócitos de Mamíferos. Brasília, 16 de agosto de 2010.

ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013.

AMORIM, M. F. D.; ARAÚJO, M. S. T.; PITA, J. C. L. R.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; XAVIER, A. L.; PALOMARO, T. V.; JÚNIOR, N. L. B. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 448-454, 2007. ISSN 0102-695X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000300020&nrm=iso >.

BARBOSA, F. L.; MORI, L. S.; RIVA, D.; STEFANELLO, M. É. A.; ZAMPRONIO, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and 8-methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* tubers. **Basic Clinical Pharmacology Toxicology**, v. 113, n. 1, p. 1-7, Jul 2013. ISSN 1742-7843. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336113> >.

BARBOSA-FILHO, J. M.; ALENCAR, A. A.; NUNES, X. P.; TOMAZ, A. C. A.; SENA-FILHO, J. G.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; DA-CUNHA, E. V. L.; Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: a twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 135-154, 2008. ISSN 0102-695X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000100023&nrm=iso >.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837031> >.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 94, n. 4, p. 556-563. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2010000400019>.

BERGO, C. L. Identificação e potencialidade de uso de *Piper* sp. no município de Morretes Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. Anais... Brasília, DF: **Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos**, 2012.

BICUDO J. R.; Claudino, E. *O circuito superior marginal: produção de medicamentos e o território brasileiro*. Dissertação (Mestrado). Departamento de Geografia da Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

BRANQUINHO, L. S.; SANTOS J. A.; CARDOSO C. A. L.; MOTA J. D. S.; JUNIOR U. L.; KASSUYA C. A. L.; ARENA A. C. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 198, p. 372-378,

Feb 2017. ISSN 1872-7573. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28109914>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria no 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília: Diário Oficial da União*, maio de 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Gabinete do Ministro. Portaria Interministerial no 2.960 de 9 de dezembro de 2008, aprova o *Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União*, Brasília-DF, dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. *Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde*, 2009.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, v. 52, n. 1, p. 77-92, Oct 2006. ISSN 0896-6273. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015228>>.

Cardoso VDS, Vermelho A, Lima CRD, Oliveira JMD, Lima MFD, Silva LPD, Direito G and Danelli MM (2016) Antigenotoxic Effect of Piperine in Broiler Chickens Intoxicated with Aflatoxin B1. *Toxins* 8:316. doi: 10.3390/toxins8110316.

CARLINO, E.; FRISALDI, E.; BENEDETTI, F. Pain and the context. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 10, n. 6, p. 348-55, Jun 2014. ISSN 1759-4804. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567065>>.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 1998; 48: 137-158

COELHO, C. D. F. Avaliação do efeito anti-inflamatório do óxido nítrico administrado por via inalatório no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. 2009. 103 **Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo - USP

COELHO, L. S.; FELICIO L. P.; MIRANDA C. T.; DA SILVA E. M.; VALE C. R.; LIMA D.C.; DUARTE S. R.; FERREIRA H. D.; CHEN CHEN L.; CARVALHO S. Modulatory effects of *Duguetia furfuracea* (A. St. Hil) Benth. and Hook. f. in *Drosophila melanogaster* somatic and germinative cells. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, n. 1, p. 75-85, Jan 2011. ISSN 1676-5680. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264818>>.

COUTAUX, A.; ADAM F.; WILLER J. C.; LE BARS D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, v. 72, n. 5, p. 359-71, Oct 2005. ISSN 1297-319X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214069>>.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 3, p. 765-7, Nov 1991. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1797337> >.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. J. R.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 401-7, Mar 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060710> >.

DA ROCHA, F. A.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, J. C.; GIRÃO, V. C.; BEZERRA, M. M.; RIBEIRO, R. DE A.; CUNHA, F. DE Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, n. 1, p. 81-6, Aug 2004. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321738> >.

DE BOSSCHER, K.; BECK, I. M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 7, p. 1035-42, Oct 2010. ISSN 1090-2139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600811> >.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal Of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, May 1971. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4398139> >.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L.; PARENTE, L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and leucocyte emigration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, n. 7, p. 575-7, Jul 1972. ISSN 0022-3573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4403851> >.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of câncer: quantitative estimates of avoidable risks of câncer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, p. 1191-1308, 1981.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-74, Dec 1977. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/564014> >.

DYER, L. A.; PALMER, A. D. **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution**. Springer, 2004.

DWORKIN, R.H. 1999. Prevention of postherpetic neuralgia. **Lancet** 353 (9165): 1636-7.

EASTMOND DA, HARTWIG A, ANDERSON D, ANWAR WA, CIMINO MC, et al. (2009) Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis** 24: 341-349.

ELY, L. S.; ENGROFF, P.; GUISELLI, S. R.; CARDOSO, G. C.; MORRONE, F. B.; CARLI, G. A. DE. (2015). Uso de anti-inflamatórios e analgésicos por uma população de

idosos atendida na Estratégia Saúde da Família. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, 18(3), 475-485. <https://dx.doi.org/10.1590/1809-9823.2015.14141>

FLORES, N.; JIMÉNEZ, I. A.; GIMÉNEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1538-43, Sep 2008. ISSN 1520-6025. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18712933> >.

FRAGATA, F. S., IMAGAWA, V. I. 2008. Analgesia na Terapia Intensiva. Emergência e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais: **Bases para o atendimento hospitalar** 2ªed São Paulo 817 – 36

FRASNELLI, M. E.; TARUSSIO, D.; CHOBASZ-PÉCLAT, V.; BUSSO, N.; SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 2, p. R370-9, 2005. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743485> >.

FREITAS, P. S. Investigação do Potencial Mutagênico do extrato de frutos de *Vacciniumcorymbosum* (Mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos Swiss in vivo. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano - Alfenas, Minas Gerais, 2007.

FRÔDE, T. S. Mediadores e mecanismos envolvidos na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos 2000. 209 **Departamento de Farmacologia**, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

GADELHA, C. A. G. Biotecnologia em saúde: *Um estudo da mudança tecnológica na indústria farmacêutica e das perspectivas de seu desenvolvimento no Brasil*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Economia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas: Unicamp, 1990.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. Review article. **Biomed Research Internacional**. 2014.

GEFFENEY, S. L.; GOODMAN, M. B. How we feel: ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception. **Neuron**, v. 74, n. 4, p. 609-19, May 2012. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632719> >.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, v. 56, n. 20, p. PL389-94, 1995. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7723595> >.

GIORGI, R. D. N. Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) - 1ª parte. **Temas de reumatologia clínica**. v. 6, n. 2. p. 55-58.

GOODMAN L.; GILMAN, A. As bases farmacológicas daterapêutica. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, I. T. D. M.; UTIYAMA, S. R. D. R. 2011. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 47, 495–503. doi:10.1590/s1676-24442011000500002

GUIMARÃES, E. F.; DA CONCEIÇÃO VALENTE, M.; REIS, A. **Flora Ilustrada Catarinense: Piperaceae-Piper (Piperaceae)**. Herbário "Barbosa Rodrigues", 2001.

HALL, J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 56, n. 2, p. 131-90, Nov 1992. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1338478> >.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, Jul 1987. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3614974> >.

IALENTI, A.; IANAROA, A.; MONCADA, S.; DI ROSAA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 177-82, Feb 1992. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1612108> >.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001. Disponível em: < <http://www.amjbot.org/content/88/4/706.abstract> >.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557989> >.

JUNQUEIRA, A. P. F.; PERAZZOII, F. F.; SOUZA, F. H. B.; MAISTRO, E. L. Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an in vivo mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 656-663, 2007. ISSN 1415-4757. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572007000400025&nrm=iso >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 11, p. 460-9, Nov 2007. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029230> >.

KHUONG, T. M.; NEELY, G. G. Conserved systems and functional genomic assessment of nociception. **FEBS Journal**, v. 280, n. 21, p. 5298-306, Nov 2013. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23910505> >.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, F.; SILLAS, T. **Pathophysiology of pain**. 2008. 1-12.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-50, Dec 1984. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6092199> >.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258-66, Nov 2010. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20948531> >.

LAM, F. F.; NG, E. S. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 4, p. 958-69, Feb 2010. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128799> >.

LAPA, A. J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5.ed. São Paulo: Setor de Produtos Naturais, **Departamento de Farmacologia**, UNIFESP/EPM, 2007. 119 p.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787-95, Oct 2002. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360216> >.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, n. 11, p. 601-6, Jun 1969. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5799282> >.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 2008. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18583048> >.

LUCENA, R.N.; LINS, R. D. A. U.; RAMOS, I. N. C.; CAVALCANTI, A. L.; GOMES, R. C. B.; MACIEL, M. A. S. Estudo clínico comparativo do efeito anti-inflamatório da Matricaria recutita e da clorexidina em pacientes com gengivite crônica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde** v.11, n.3, p.31-36, 2009.

LUMLEY, M. A.; COHEN, J. L.; BORSZCZ, G. S.; CANO, A.; RADCLIFFE, A. M.; PORTER, L. S.; SCHUBINER, H.; KEEFE, F. J. Pain and emotion: a biopsychosocial review of recent research. **Journal of Clinical Psychology**, v. 67, n. 9, p. 942-68, Sep 2011. ISSN 1097-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21647882> >.

LUNDEBERG, S. Pain in children--are we accomplishing the optimal pain treatment? **Pediatric Anesthesia**, v. 25, n. 1, p. 83-92, Jan 2015. ISSN 1460-9592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25279762> >.

M. HALL, J.; K.M. MORTON, I. **The Pharmacology and Immunopharmacology of Kinin Receptors**. 1997. 9-43 ISBN 9780122493409.

MALAIRAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI, K. J. K. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 106, 425-428, 2006.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Llordya*, v. 25, n. 4, p. 320-331, 1962.

MARCEAU, F. Kinin B1 receptors: a review. **Immunopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 1-26, Jun 1995. ISSN 0162-3109. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7591710> >.

MARCOVECCHIO, M. L.; MOHN, A.; CHIARELLI, F. Inflammatory cytokines and growth in childhood. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**. v. 1, n. 19, p. 57-62. 2012.

MARTINS, M. A.; DE CASTRO BASTOS, L.; TONUSSI, C. R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 2, p. 100-7, Feb 2006. ISSN 1526-5900. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16459275> >.

MATIAS, E. F.; Alves, E. F.; Santos, B. S.; Souza, C. E. S.; Ferreira, J. V. A.; Lavor, A. K. L. S.; Figueredo, F. G.; Lima, L. F.; Santos, V. A. V.; Peixoto, F. S. N.; Colares, A. V.; Boligon, A. A.; Saraiva, R. A.; Athayde, M. L.; Rocha, J. B. T.; Menezes, I. R. A.; Coutinho, H. D. M.; da Costa, J. E. M. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 164215, 2013. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818919> >.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-6, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303867> >.

MENDES, R. T.; STANCZYK, C. P.; SORDI, R.; OTUKI, M. F.; SANTOS, F. A.; FERNANDES, D. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 5, p. 774-782, out. 2012

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115-21, 2003. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769480> >.

NAKAMURA, C. V.; Santos, A. O.; Vendrametto, M. C.; Luize, P. S.; Filho, B. P. D.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, T. U. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 61-66, 2006. ISSN 0102-695X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000100011&nrm=iso >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-35, Mar 2012. ISSN 1520-6025. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22316239> >.

NGOC, P. L.; GOLD, D. R.; TZIANABOS, A.O.; WEISS, S.T.; CELEDÓN, J. C. Cytokines, allergy, and asthma. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, n. 2, p. 161-6, Apr 2005. ISSN 1528-4050. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764907> >.

NOAH, A. T.; ZACHARY, W. M.; RANDY, N. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology**, v. 43, p. 385-406, 2012.

NOURSHARGH, S.; HORDIJK, P. L.; SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 366-78, May 2010. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414258> >.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425, in: OECD (Ed.), Acute oral toxicity - Up-and-down-procedure (UDP), Paris, 2008.

OESTERREICH, S. A.; TRAESEL, G. K.; PICCINELLI, A. C.; AQUINO, D. F. S.; KASSUYA, C. A. L.; MOTA, J. S.; ESTANISLAU, C. Antidepressant and anxiolytic effects of ethanol extracts from four *piper* species. 2015, **SaBios Revista de Saude e Biologia**. v. 10, n. 1, p. 9, 2015-07-31 2015. ISSN 1980-0002. Disponível em: < <http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1761> >.

OGONOWSKI, A. A.; MAY, S. W.; MOORE, A. B.; BARRETT, L.T.; O'BRYANT, C.L.; POLLOCK, S.H. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 2, p. 846-53, Feb 1997. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023299> >.

OLIVEIRA JUNIOR, J. O. de; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Mediadores inflamatórios na dor neuropática. **Revista Dor**, São Paulo , v. 17, supl. 1, p. 35-42, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-0013.20160045>.

OTERO, P. E. 2007. Acute pain management in emergency. **Acta Scientiae Veterinariae** 35:256-8.

OZINSKY, A.; Underhill, D. M.; Fontenot, J. D.; Hajjar, A. M.; Smith, K. D.; Wilson, C.B.; Schroeder, L.; Aderem, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13766-71, Dec 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11095740> >.

PARK, K. A.; VASKO, M. R. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 11, p. 571-7, Nov 2005. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16185776> >.

PINHEIRO, R. M.; CALIXTO, J. B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 51, n. 12, p. 603-10, Dec 2002. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12558194> >.

PRANDO, T. B.; BACIQUETE, T. F.; VIEIRA, J. A. C.; BRESSAN, J.; GASPAROTTO, F. M.; JESUS, D. R.; JUNIOR, E. L. C.; LOURENÇO, E. L. B.; JUNIOR, A. G. AMIDES from *Piper* as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of *Piper glabratum* Kunth. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 615109, 2014. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101133> >.

RANDOLPH, B. C.; PETERS, M. A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. **Anesthesia Progress**, v. 44, n. 1, p. 11-6, 1997. ISSN 0003-3006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9481975> >.

RANG, H .P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; GARDNER, P. 2007. *Farmacologia*, Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 320-329.

RAO, P.; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 81s-110s, Sep 2008. ISSN 1482-1826. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203472> >.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F.; ISAKSON, P. C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-41, Dec 1993. ISSN 0360-3997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8112831> >.

REN, L.; HU, H.; SUN, X.; LI, F.; ZHOU, J. J.; WANG, Y. M. The roles of inflammatory cytokines in the pathogenesis of ossification of ligamentum flavum. **American Journal of Translational Research**, v. 5, n. 6, p. 582-5, Sep 2013. ISSN 1943-8141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24093055> >.

RIBEIRO, L. H. L. Território e macrossistema de saúde: os programas de fitoterapia no sistema único de saúde (SUS). 2015. 305 **Instituto de Geociências da UNICAMP**, Universidade de Campinas - UNICAMP.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*. 1ª ed. Rio Grande do Sul: ULBRA Editora, 2003.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. DOS S.; SAKATA, R. K.. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, p. 94-105, 2007. ISSN 0034-7094. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942007000100011&nrm=iso >.

ROCHA, F. A.; ARAGÃO, A. G. JR.; OLIVEIRA, R. C.; POMPEU, M. M.; VALE, M. R.; RIBEIRO, R. A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485-90, Sep 1999. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10522803> >.

ROSLAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, n. 2, p. 235-42, Aug 1990. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2247320> >.

SANDKÜHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 707-58, Apr 2009. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342617> >.

SERHAN, C. N. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. **Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty**

Acids, v. 79, n. 3-5, p. 157-63, 2008 Sep-Nov 2008. ISSN 0952-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008087> >.

SHARMA V.; LAXMI, V.; CHAUHAN, S. Cyclooxygenase-3: A Review. **American Journal of PharmTech Research**. 2 (3). 2012.

SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation os low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121-32, Apr 2010. ISSN 1532-1916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227026> >.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301-14, Jan 1994. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507411> >.

TEMPORÃO, José Gomes. A propaganda de medicamentos e o mito da saúde. Rio de Janeiro: Graal, 1986.

TRAESEL, G. K. Avaliação do perfil toxicológico e genotóxico do óleo extraído da polpa da *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados.

TRINDADE, H.I.; BATISTA, M.C.S.; SILVA, L.L.B. Dor: Mecanismos envolvidos na sua transmissão e recursos terapêuticos aplicados à sua inibição. **Revista de Medicina Veterinaria**. 2013, 7, 6–18

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; DE FARIAS CARVALHO, V. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. **Corpus et Scientia**, v. 8, n. 2, p. 36-51, 2012

THAKUR, M.; DICKENSON, A. H.; BARON, R. Osteoarthritis pain: nociceptive or neuropathic? **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 6, p. 374-80, Jun 2014. ISSN 1759-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24686507> >.

VISCARDI, D. Z.; OLIVEIRA, V. S. DE; ARRIGO, J. DA S.; PICCINELLI, A. C.; CARDOSO, C. A. L.; MALDONADE, I. R.; KASSUYA, C. A. L.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J. (2017). Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of Campomanesia adamantium microencapsulated pulp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 27(2), 220-227. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.09.007>

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. **News in physiological sciences**, v. 15, p. 107-113, Jun 2000. ISSN 0886-1714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390891> >.

WILLIAMS, T. J. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. **British Medical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 239-42, Jul 1983. ISSN 0007-1420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6354350> >.

WILLIAMS, T. J.; PECK, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, v. 270, n. 5637, p. 530-2, Dec 1977. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/593374> >.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-7, Dec 1962. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14001233> >.

WITTE, I., PLAPPERT, U., DE WALL, H., AND HARTMANN, A. 2007. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity testes for early drug candidate selection. **The Journal of Toxicological Sciences**. 97:21-6.

WHO. Regulatory Situation of Herbal Medicines - A worldwide Review: 49 p. 1998

ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 3, p. 1069-75, Dec 1997. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9399978> >.

ZHANG, Z.; CAI, Y. Q.; ZOU, F.; BIE, B.; PAN, Z. Z. Epigenetic suppression of GAD65 expression mediates persistent pain. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1448-55, Oct 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983856> >.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo 1: Avaliação da toxicidade aguda e efeito quimiopreventivo e genotóxico do extrato etanólico das folhas de *Piper glabratum* no dano ao DNA induzido por ciclofosfamida - **a ser traduzido à língua inglesa e submetido à revista “Regulatory Toxicology and Pharmacology” (Qualis B1 – Medicina II: Fator de impacto = 2.815)**

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E EFEITO QUIMIOPREVENTIVO E GENTÓXICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Piper glabratum* NO DANO AO DNA INDUZIDO POR CICLOFOSFAMIDA

Maicon Matos Leitão^a, Joyce Alencar Santos^a, Silvia Cordeiro das Neves^b, Jonas da Silva Mota^c, Rodrigo Juliano Oliveira^b, Candida Aparecida Leite Kassuya^{a, *}

^a Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

^b Centro de Estudo de Células-Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares, Campo Grande, MS, Brasil.

^c Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

* Autor correspondente: Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya (Docente permanente da Faculdade de Ciências da Saúde e Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados - Dourados, Brasil. Endereço: Rodovia Dourados-Itahum, km 12, 79825-070, MS, Brasil, Telefone: +55 67 3410-2326 Fax: +55 67 3410-2326. E-mail: candida2005@gmail.com

Contagem de palavras, resumo: 140

Contagem de palavras, principal texto: 3.355

Contagem de palavras, referências: 1.647

Número de tabelas/figuras: 4/0

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a DL 50 e efeito quimiopreventivo e antígenotóxico do extrato etanólico das folhas de *Piper glabratum* (EEPG) em roedores. Foi realizado teste de toxicidade aguda em ratos *Wistar*, avaliando os parâmetros hipocráticos durante um período de 14 dias. Além disso, foi realizado testes de avaliação genotoxicológica através do ensaio cometa e análise da fagocitose esplênica, em camundongos C57BL/6 tratados por via oral com doses de 10, 100 e 1000 mg/Kg do EEPG, associados ou não com ciclofosfamida. Foram analisados parâmetros de peso corporal dos animais e peso relativo dos órgãos fígado, rins, baço, coração e pulmão. O estudo demonstrou a incapacidade do EEPG em exercer efeitos tóxicos agudos, sendo a DL 50 superior a 2000 mg/Kg, indicando baixa toxicidade, e genotóxicos, evidenciando uma capacidade quimiopreventiva e anticarcinogênica do extrato em associação com a ciclofosfamida.

Palavras-chave: Ensaio cometa, antitumoral, toxicidade, extrato, planta medicinal.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais, como alternativa farmacêutica (fitoterápico) ou como fonte de bioprospecção de novos compostos químicos, para o tratamento de diversas patologias, tem se elevado. Desta forma, é imprescindível a determinação de efeitos genotóxicos de compostos obtidos a partir de plantas medicinais (Chichioco-Hernandez *et al.*, 2011). Compostos que determinam aumento de efeitos genotóxicos, devem ser muito bem ponderados entre o risco e benefício à saúde humana (Pesarini *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015). Em contrapartida, é possível também determinar o potencial antigenotóxico de um composto, que pode ser utilizado no tratamento de tumores e na prevenção ao câncer (Fedel-Miyasato *et al.*, 2014; Mauro *et al.*, 2014).

Diante disso, podemos citar a pariparoba, nome popularmente conhecido da planta *Piper glabratum* (Piperaceae). Este arbusto está presente em regiões de temperatura média no Brasil, como por exemplo no estado do Mato Grosso do Sul (Kato e Furlan, 2007), sendo utilizada na medicina popular como diurética (Prando *et al.*, 2014). Entretanto, poucos estudos acerca dos efeitos farmacológicos desta planta foram realizados. Alguns autores, após testes *in vivo* e *in vitro*, descreveram os compostos químicos e diversas atividades terapêuticas referentes a estes compostos, presentes em diferentes partes da planta (Oesterreich *et al.*, 2015).

Quanto às atividades terapêuticas, foram determinados efeito antiparasitário, anti-inflamatório, analgésico e diurético das folhas e raízes da planta (Prando *et al.*, 2014; Flores *et al.*, 2008; Branquinho *et al.*, 2017). Os componentes químicos relacionados a esta planta são da classe de ácidos orgânicos, triterpenos, esteróides e taninos no extrato etanólico das folhas (Oesterreich *et al.*, 2015).

No entanto, o único estudo referente a toxicidade desta planta foi realizado por Prando *et al.* (2014), que demonstrou um efeito hepatotóxico do extrato metanólico das raízes de *Piper glabratum* em ratos e ratas tratados com dose de 3000 mg/Kg por via intraperitoneal e por via oral, na avaliação da toxicidade aguda. Diante disto, objetivou-se a avaliação desta planta, por meio de testes genotoxicológicos e antigenotoxicológicos *in vivo*, a avaliação de alteração da fagocitose esplênica e a formação ou prevenção de danos no DNA celular. As análises feitas neste estudo foram realizadas a partir do extrato etanólico das folhas de *Piper glabratum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material de estudo foi obtido a partir da coleta de folhas de *P. glabratum* Kunth (latitude 2,209'37, 7 "sul e longitude 54055'03, 2" oeste) no segundo mês do ano de 2017, na cidade de Dourados-MS, Brasil. O Prof. Dr. Elsie Franklin Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro-RJ, Brasil, identificou a amostra, preparou a exsicata e a incluiu no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD, MS, Brasil (DDMS4412).

2.2 Preparação das drogas e extrato etanólico

Ao final do processo de obtenção do extrato etanólico de *Piper glabratum* (EEPG), obteve-se uma massa de 203 g. O procedimento foi realizado após a coleta do material vegetal, onde as folhas foram secas à temperatura ambiente, moídas e

submetidas ao processo de extração por maceração, utilizado como solvente o etanol a 92% por sete dias. Posteriormente, com auxílio de evaporador rotativo, foi feita a concentração do material, que então foi seco em capela. O EEPG foi dissolvido por meio do veículo solução salina 0.9% e 1% de tween 80. A ciclofosfamida (Fosfaseron®, Ithaca Laboratório, Brazil), foi diluída em solução salina 0,9% (pH 7,4).

2.3. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, obtidos da Laboratório de Animais do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) e ratos *Wistar* machos, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Todos os animais foram mantidos com livre acesso a alimentação e condições de temperatura (22 ± 2 °C), umidade (50–10%) e ciclo de iluminação (12 h) controlados. Aprovação do Comitê de Ético no Uso de Animal (CEUA/UFGD) nº 26/2016.

2.4. Desenho experimental

Para análise do ensaio cometa e fagocitose esplênica, quarenta camundongos C57BL/6J machos foram aleatoriamente divididos em oito grupos experimentais. O grupo controle negativo recebeu por via oral (v.o.) o veículo (solução salina 0.9% e 1% de Tween 80) na proporção de 10 mL / Kg de peso corpóreo e intraperitonealmente (i.p.) solução salina 0,9% na mesma proporção; o grupo controle positivo recebeu 100 mg / Kg de ciclofosfamida (i.p.) e veículo (10 mL / Kg, v.o.); três grupos foram tratados com diferentes doses de EEPG (10, 100 e 1000 mg / Kg, v.o.); três grupos foram

tratados em associação com a ciclofosfamida, recebendo diferentes de EEPG (10, 100 e 1000 mg / Kg, v.o.) e ciclofosfamida (100 mg / Kg, i.p.). Os animais foram pesados antes e após 72 h de tratamento, feito isso, foi realizada a eutanásia e determinação do peso relativo dos órgãos coração, rins, fígado, baço e pulmões. O peso relativo foi calculado dividindo-se o peso absoluto do órgão pelo peso absoluto final do animal.

Na avaliação da toxicidade aguda, seguindo as orientações da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2008) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013), ratos *Wistar* machos foram divididos em dois grupos, sendo um grupo tratado com doses crescentes de EEPG (500, 1000 e 2000 mg / Kg, v.o.) e um segundo grupo tratado com solução salina 0,9% e 1% de Tween 80, sendo este o grupo controle negativo (OECD, 2008, BRASIL, 2013).

2.5. Toxicidade oral aguda

Seguindo o protocolo, foi administrado em cada animal, uma única administração via oral de extrato etanólico de *Piper glabratum* (EEPG). No animal número um, administrou-se a dose de 500 mg/Kg, sendo este observado por tempos pré-determinados de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 e 48 h. Não havendo morte do animal, após esse período, um segundo animal recebeu uma dose de 1000 mg/Kg. Da mesma forma, não havendo morte após 48 h, um terceiro animal recebeu uma dose de 2000 mg/Kg. Como não houve morte em nenhum dos animais, outros 4 animais foram tratados com a dose de 2000 mg/Kg. O grupo controle negativo recebeu solução salina 0,9% também por via oral.

Todos os animais foram observados durante as primeiras 24 h após a administração dos respectivos tratamentos e, posteriormente, uma vez ao dia por 14 dias. Nesta observação, foram verificados a presença ou não dos cinco parâmetros do screening hipocrático propostos por Malone e Robichaud (1962) e OECD (2008), sendo eles o estado consciente, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, reflexos, atividades sobre o sistema nervoso central e atividades sobre o sistema nervoso autônomo (OECD, 2008). Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e os órgãos (coração, baço e fígado) foram removidos, pesados e observados quanto a possíveis alterações macroscópicas.

2.6. Ensaio do Cometa

Seguindo a descrição feita por Singh (1988) e com modificações propostas por Oliveira (2009), após a administração em dose única dos respectivos tratamentos dos grupos experimentais, amostras de 20 μ L de sangue periférico foi coletado de todos os animais 24 horas após o início dos testes. O sangue coletado foi homogeneizado em 120 μ L de agarose de baixo peso molecular (LMP 0,5%). Esta mistura então foi adicionada em lâminas de microscopia com agarose (5%) previamente revestidas, e posteriormente recobertas com lamínula. Após este procedimento, as lâminas foram resfriadas a 4 °C por 20 min, e então colocadas contato com solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, 10 mM Tris, pH 10,0 [corrigido com NaOH sólido], Triton X-100 e DMSO), sendo posteriormente incubadas por 1 h a 4 °C em ambiente livre de iluminação. Para a desnaturação do DNA, as lâminas foram submergidas em cuba de eletroforese com tampão em pH > 13,0 (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, a partir de 10 N NaOH e 200mM EDTA, com pH 10.0) por 20 min a 4 °C. Posteriormente, foi iniciada

a eletroforese a 25 V e 300 mA (1,25 V/cm) e após 20 min as lâminas foram então neutralizadas em solução de Tris HCl 0,4 M, pH 7,5 por 3 ciclos de 5 min cada. O material foi então seco em temperatura ambiente e fixado em etanol absoluto por 10 min. Por fim, as lâminas foram coradas (100 µL de brometo de etídio, 20 µg/mL) e posteriormente levadas para análise de 100 células em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) com filtro de excitação de 420-490 nm e de barreira de 520 nm em 40x ampliação (Kobayashi, 1995). O escore total foi calculado pela somatório dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão a qual pertenciam pelo valor da classe.

2.7. Fagocitose esplênica

Após as 72 h horas de análise, foi realizada a eutanásia dos animais e o baço foi recolhido para o ensaio de fagocitose descrito por Schneider *et al.* (2016). O órgão foi macerado em solução salina 0,9%, obtendo-se uma suspensão celular homogênea. Lâminas de microscopia foram coradas com Alaranjado de Acridina (1 mg/mL) e 100 µL de cada suspensão celular foi acrescentada em cada uma delas, sendo então recobertas com lamínula e acondicionadas a uma temperatura de -20°C até o momento da análise. Em microscópio de fluorescência (Bioval® Modelo G2000 A, Brasil), filtro de 420-490nm e de barreira de 520nm, analisou-se 200 células por animal no aumento de 40x. De acordo com a descrição de Hayashi *et al.* (1990), foi avaliada a ausência ou presença de fagocitose.

2.8. Cálculo da redução percentual de danos (% RD)

O cálculo do %RD foi realizado para avaliar se o EEPG, quando em associação com uma substância genotóxica, possui propriedades quimiopreventivas (Manoharan e Banerjee, 1985; Waters et al., 1990). O cálculo foi realizado da seguinte maneira: $(\text{média do controle positivo} - \text{a média do tratamento combinado} / \text{média do controle positivo} - \text{a média do controle negativo} \times 100)$.

2.9. Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism (versão 2.3; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores são relatados como a média \pm erro padrão da média. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Toxicidade aguda

Na avaliação da toxicidade aguda, nas primeiras 6 horas após o tratamento com EEPG na dose única de 2000 mg/Kg, os animais apresentaram sinais de depressão do sistema nervoso central, como sonolência e letargia, no entanto, ao longo do período de estudo, não foram observados morte ou sinais de toxicidade nos animais, indicados pela ausência de alterações nos parâmetros hipocráticos observados como piloereção, lacrimação, alteração nas mucosas, olhos ou fezes, resposta motora espontânea ou induzida, tremores, irritabilidade, contorção, convulsões e respiração.

3.2. Genotoxicidade e fagocitose

Quanto ao peso absoluto inicial e final dos animais, não houve diferença estatística entre o grupo controle negativo e positivo, entretanto, o grupo tratado com 1000 mg/Kg de EEPG diferenciou-se estatisticamente do grupo controle positivo, ocorrendo uma menor redução de massa corporal do grupo EEPG comparado aos dois grupos (Tabela 1).

O peso relativo dos órgãos fígado, rins, coração e pulmão não se diferenciaram estatisticamente entre os grupos. Entretanto, o peso relativo do baço foi estatisticamente diferente entre o grupo controle positivo e controle negativo, ocorrendo redução no peso do órgão no grupo ciclofosfamida. Esta redução ocorreu também nos grupos tratados com EEPG em associação a ciclofosfamida. Dentre os tratamentos isolados de EEPG, a dose de 10 mg/Kg foi similar ao controle negativo e as doses de 100 e 1000 mg/Kg geraram redução do peso relativo do órgão comparado ao controle negativo e grupo controle positivo, respectivamente (Tabela 2).

No ensaio cometa, foram observados o número de células com dano no DNA, e classificadas de acordo com o grau de dano genético. Nos grupos em associação do EEPG com a ciclofosfamida, foi calculada a porcentagem de redução do dano (%RD). O resultado, apresentou um maior dano no DNA celular do grupo controle positivo quando comparado aos demais grupos. Os grupos tratados somente com EEPG não apresentaram danos significativos no material genético. Os tratamentos em associação demonstraram uma redução do dano ao DNA celular, com destaque ao grupo EEPG 10 mg/Kg em associação a ciclofosfamida, como mostra a tabela 3.

Na avaliação da fagocitose esplênica, observou-se um aumento significativo nos eventos fagocíticos no grupo controle positivo, quando comparado aos demais tratamentos, onde os grupos tratados com 10, 100 ou 1000 mg/Kg do EEPG não tiveram alteração fagocitária comparada ao grupo controle negativo. Entretanto, foi observada diferença significativa dos grupos com associação entre o extrato e a ciclofosfamida, onde as doses de 10 e 100 mg/Kg de EEPG, reverteram significativamente o processo de fagocitose induzido pela ciclofosfamida, quando comparado ao grupo controle positivo (Tabela 4).

4. DISCUSSÃO

Muitas plantas medicinais possuem a capacidade de induzir efeitos tóxicos, portanto é muito importante a determinação destes possíveis efeitos para validar o uso terapêutico das mesmas (Melo *et al.*, 2011). Na avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico de *Piper glabratum* (EEPG), a administração oral da dose de 2000 mg/Kg, determinou efeito de depressão do sistema nervoso central, expresso pela sedação e diminuição do movimento espontâneo ou induzido por estímulo tátil, nas primeiras 6 horas após a gavagem. Estes resultados também foram observados no estudo conduzido por Prando *et al.*, (2014), onde foi determinado um possível efeito ansiolítico do extrato metanólico de *Piper glabratum*, nas doses de 1000 e 3000 mg/Kg administrados por via intraperitoneal e 3000 mg/Kg por via oral.

No estudo realizado por Branquinho *et al.* 2017, foi determinado a ausência de toxicidade do óleo essencial de *P. glabratum* na dose de 5000 mg/Kg em testes de toxicidade aguda e subaguda. Prando *et al.*, (2014) verificou toxicidade hepática na administração intraperitoneal de extrato metanólico de *P. glabratum*, com cálculo de

DL50 de 2426,216 mg/Kg em ratas, e superior a 3000 mg/Kg em ratos. Já na administração por via oral no mesmo estudo, não ocorreu morte dos animais, sendo a DL50 superior a 3000 mg/Kg em ambos os sexos dos animais. Diferentemente deste último estudo e corroborando com os achados de Branquinho *et al.* (2017), nossos resultados demonstraram que o EEGP na dose de 2000 mg/Kg, não determina efeitos de toxicidade aguda, visto que no decorrer do experimento não foram observados sinais de toxicidade ou morte nos animais, sendo a DL 50 superior a dose de 2000 mg/Kg.

A avaliação da genotoxicidade de plantas medicinais com potencial fitoterápico, como no caso da *Piper glabratum*, se faz necessário a fim de se obter dados comprobatórios referentes à possibilidade ou não de causar mutações celulares a nível genético. Da mesma maneira, a avaliação da fagocitose esplênica é importante para avaliação da atividade do baço em resposta aos respectivos tratamentos e possíveis danos nas células (Navarro *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015). Alterações genéticas servem como marcadores precoces de alteração celular que podem levar ao câncer e outras doenças, e é por isso que a avaliação destas mudanças são importantes para o uso seguro do produto (Cardoso *et al.*, 2016).

Os animais submetidos aos testes genotóxicológicos tiveram diferenças significativas no peso corporal final, ocorrendo perda da massa corpórea. Entretanto estas alterações não tiveram diferenças significativas entre os grupos, o grupo controle positivo apresentou maior perda de peso, assim como demonstrado por Kanno *et al.* (2009), este grupo demonstrou-se análise estatística similar ao grupo controle negativo.

Em relação à análise dos órgãos, em nosso estudo não foi observado diferença significativa no tamanho relativo dos órgãos pulmão, coração, rins e fígado, apesar

deste último ter seu tamanho levemente aumentado no grupo controle positivo, quando comparado ao controle negativo, esta diferença não foi estatisticamente diferente. A partir disso, pode-se concluir que não houve sinais de alteração hepática ou renal nos grupos testados, apesar da comprovada hepatotoxicidade e nefrotoxicidade da ciclofosfamida (DeLeve *et al.*, 1996; Kanno *et al.*, 2009).

Na análise do peso relativo do baço, não houve diferença significativa entre os tratamentos de EEPG e controle negativo. No entanto, foi observada uma diminuição significativa da massa tecidual do órgão no grupo controle positivo e associações entre EEPG e ciclofosfamida, em comparação ao grupo controle negativo. De acordo com Siegal *et al.* (1986), a ciclofosfamida pode levar a uma diminuição do peso do baço, nos quatro primeiros dias após a administração da droga. Esta diminuição pode estar relacionada à depleção da polpa branca do órgão, região que desempenha ação imunológica do mesmo, através da produção de anticorpos.

O ensaio cometa, serve para avaliar danos celulares ocasionados por agentes genotóxicos diretamente no núcleo celular (Ishikawa *et al.*, 2017). O grupo controle positivo, apresentou uma elevada contagem celular de danos ao DNA, assim como já reportado na literatura (Araújo *et al.*, 2017; Radai, 2018; Ishikawa *et al.*, 2017). A análise do ensaio cometa resultou em diferença estatística entre os grupos tratados isoladamente com EEPG e o grupo controle negativo, sugerindo que a planta possa determinar efeitos genotóxicos, no entanto, apesar de ter ocorrido um aumento de eventos celulares com dano no DNA nos grupos tratados apenas com EEPG, como observado no teste de fagocitose, tais danos não chegam ao ponto de alterar a fagocitose esplênica, que é um mecanismo de remoção de células lesadas do corpo (Ishii *et al.*, 2011; Fedel-Miyasato *et al.*, 2014).

As associações entre EEPG e ciclofosfamida se diferenciaram dos demais tratamentos, ocorrendo redução do dano celular em comparação ao grupo controle positivo, com um %RD significativa na dose de 10 mg/Kg de EEPG. Neste sentido, pode-se observar que a planta quando administrada de forma isolada em doses elevadas (1000mg/Kg), possui um potencial genotóxico, e quando associada a um quimioterápico, possui capacidade quimiopreventiva e antigenotóxica.

Compostos com efeitos bifuncionais já foram descritos na literatura. Araújo *et al.* (2017) observou que uma nova isocumarina avaliada no teste de micronúcleo, demonstrou resultados similares aos encontrados em nosso estudo, onde foi atribuído ao composto a capacidade genotóxica quando administrado isoladamente e quimiopreventiva frente a cisplatina e ciclofosfamida.

Esta capacidade quimiopreventiva pode estar relacionada a diversas atividades biológicas já atribuídas a plantas do gênero *Piper*, como por exemplo a capacidade antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória (Li *et al.*, 2014; Tasleem *et al.*, 2014; lawamoto *et al.*, 2015; Branquinho *et al.*, 2017). Atividade antioxidante está relacionada a capacidade quimiopreventiva e imunomoduladora (Murakami *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013, 2014) sobre os ânions superóxido que podem causar lesões ao DNA. A inflamação pode ser considerada como um processo facilitador do desenvolvimento de câncer, através da liberação de moléculas bioativas, fatores angiogênicos e enzimas que modificam a matriz extracelular, como sendo agentes mutagênicos, estando presente já em estágios iniciais da carcinogênese (Walczak, 2011; Hanahan e Weinberg, 2011; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012).

Ao observar os dados da análise de fagocitose no baço, pode-se inferir que não houve diferença entre os grupos tratados isoladamente com EEPG e o grupo controle negativo. O grupo controle positivo, tratado apenas com a ciclofosfamida, demonstrou

elevação fagocítica quando comparado ao grupo controle negativo. Esta elevação já é bem difundida no meio científico (Magosso *et al.*, 2016; Okamoto *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018).

Os grupos tratados em associação entre as doses de 10 e 100 mg/Kg de EEPG e a ciclofosfamida, diminuíram a fagocitose esplênica significativamente, quando comparados ao controle positivo. Como comentado anteriormente, como resposta ao aumento de danos ao DNA, o baço aumenta sua capacidade de fagocitose, com o intuito de reduzir a quantidade de células circulantes com dano no DNA (Carvalho *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

Vários estudos demonstraram atividade antimutagênica de diferentes plantas do gênero *Piper* (Hamss *et al.*, 2003; Dhote *et al.*, 2007). No estudo realizado por Wongpa *et al.* (2007), foi elucidada uma redução estatisticamente significativa nas alterações cromossômicas induzidas pela ciclofosfamida em células da medula óssea de ratos pela piperina, um composto presente em várias espécies do gênero *Piper*, demonstrando um potencial antimutagênico do composto, assim como no estudo de Balakrishnan *et al.* (2008).

5. CONCLUSÕES

Os achados no teste cometa, onde as associações reverteram significativamente os eventos de dano ao DNA, sendo assim, diminuindo a fagocitose esplênica em comparação ao grupo ciclofosfamida, reforça a hipótese de quimioprevenção e antigenotoxicidade do EEPG, nas doses testadas, frente a ciclofosfamida. Por fim, a partir de todas as análises, pode-se observar a ausência de toxicidade aguda, com DL 50 superior a 2000 mg/Kg e uma possível ação protetora do EEPG em doses baixas, frente a agentes indutores de dano no DNA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FUNDECT - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul, CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

Declarações de Isenção de Responsabilidade

Colaboradores

Atesto que todos os autores participaram o suficientemente do desenvolvimento do conteúdo intelectual, análise dos dados e redação do manuscrito, para assumir responsabilidade pública pelo mesmo.

Financiamento

FUNDECT - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul, CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Conflitos de interesse

Não há conflitos de interesse. Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo e escrita do artigo.

Aprovação de Ética

Todos os protocolos experimentais foram incluídos em projeto aprovado (026/2016) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFGD.

REFERÊNCIAS

- Araújo FHSD, Figueiredo DRD, Auharek SA, Pesarini JR, Meza A, Gomes RDS, Monreal ACD, Antonioli-Silva ACMB, Lima DPD, Kassuya CAL et al. (2017) In vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. *Genetics and Molecular Biology* 40:665–675. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2016-0316
- Balakrishnan S, Vellaichamy L, Menon VP and Manoharan S (2008) Antigenotoxic Effects of Curcumin and Piperine Alone or in Combination Against 7,12–Dimethylbenz(a)anthracene Induced Genotoxicity in Bone Marrow of Golden Syrian Hamsters. *Toxicology Mechanisms and Methods* 18:691–696. doi: 10.1080/15376510701781520
- Branquinho LS, Santos JA, Cardoso CAL, Mota JDS, Junior UL, Kassuya CAL and Arena AC (2017) Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 198:372–378. doi: 10.1016/j.jep.2017.01.008
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, DF, 31 jan. 2013 – Versão 2
- Cardoso VDS, Vermelho A, Lima CRD, Oliveira JMD, Lima MFD, Silva LPD, Direito G and Danelli MM (2016) Antigenotoxic Effect of Piperine in Broiler Chickens Intoxicated with Aflatoxin B1. *Toxins* 8:316. doi: 10.3390/toxins8110316
- Carvalho PC, Santos EA, Schneider BUC, Matuo R, Pesarini JR, Cunha-Laura AL, Monreal ACD, Lima DP, Antonioli ACMB, Oliveira RJ et al. (2015) Diaryl sulfide

analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug.

Environmental Toxicology and Pharmacology 40:715–721. doi:

10.1016/j.etap.2015.08.028

Chichioco-Hernandez C, Wudarski J, Gevaert L and Verschaeve L (2011) Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of some Philippine medicinal plants.

Pharmacognosy Magazine 7:171. doi: 10.4103/0973-1296.80683

Deleve L (1996) Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: Role of glutathione and site of metabolic activation. Hepatology 24:830–837. doi:

10.1053/jhep.1996.v24.pm0008855185

Dhote S, Devi PU, Pathak AK, Goswami RB (2007) Studies on Antigenotoxic Effect of *Piper betle* Leaves. Journal of Natural Remedies. 7, 2.

doi:10.18311/jnr/2007/316

Fedel-Miyasato L, Formagio A, Auharek S, Kassuya C, Navarro S, Cunha-Laura A,

Monreal A, Vieira M and Oliveira R (2014) Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: A

comparative study. Genetics and Molecular Research 13:3411–3425. doi:

10.4238/2014.april.30.2

Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G and Bazzocchi IL

(2008) Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Antiparasitic

Activity. Journal of Natural Products 71:1538–1543. doi: 10.1021/np800104p

Hamss RE, Idaomar M, Alonso-Moraga A and Serrano AM (2003) Antimutagenic

properties of bell and black peppers. Food and Chemical Toxicology 41:41–47.

doi: 10.1016/s0278-6915(02)00216-8

Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T and Ishidate Junior M (1990) Evaluation of

chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. *Mutat Res* 245:245-249.

Ishii PL, Prado CK, Mauro MDO, Carreira CM, Mantovani MS, Ribeiro LR, Dichi JB and Oliveira RJ (2011) Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59:412–422. doi: 10.1016/j.yrtph.2011.01.004

Ishikawa RB, Leitão MM, Kassuya RM, Macorini LF, Moreira FMF, Cardoso CAL, Coelho RG, Pott A, Gelfuso GM, Croda J et al. (2017) Anti-inflammatory, antimycobacterial and genotoxic evaluation of *Doliocarpus dentatus*. *Journal of Ethnopharmacology* 204:18–25. doi: 10.1016/j.jep.2017.04.004

Iwamoto LH, Vendramini-Costa DB, Monteiro PA, Ruiz ALTG, Sousa IMDO, Foglio MA, Carvalho JED and Rodrigues RAF (2015) Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015:1–8. doi: 10.1155/2015/948737

Kanno TYN, Sensiate LA, Paula NAD and Salles MJS (2009) Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45:313–319. doi: 10.1590/s1984-82502009000200017

Kato MJ and Furlan M (2007) Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry* 79:529–538. doi: 10.1351/pac200779040529

Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* 3:103–115

Li R, Yang J-J, Shi Y-X, Zhao M, Ji K-L, Zhang P, Xu Y-K and Hu H-B (2014)

- Chemical composition, antimicrobial and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Maqian* (*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens*) in Xishuangbanna, SW China. *Journal of Ethnopharmacology* 158:43–48. doi: 10.1016/j.jep.2014.10.006
- Magosso M, Carvalho P, Shneider B, Pessatto L, Pesarini J, Silva P, Correa W, Kassuya C, Muzzi R, Oliveira R et al. (2016) *Acrocomia aculeata* prevents toxicogenetic damage caused by the antitumor agent cyclophosphamide. *Genetics and Molecular Research*. doi: 10.4238/gmr.15027816
- Malone, M.H., Robichaud. R.C. (1962). A hippocratic screen for pure or crude drug materials. Vol. 25. *Lloydia*
- Manoharan and Banerjee (1985) β -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports* 9:783–789. doi: 10.1016/0309-1651(85)90096-7
- Mauro M, Pesarini J, Marin-Morales M, Monreal M, Monreal A, Mantovani M and Oliveira R (2014) Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. *Genetics and Molecular Research* 13:4808–4819. doi: 10.4238/2014.february.14.14
- Melo JGD, Santos AG, Amorim ELCD, Nascimento SCD and Albuquerque UPD (2011) Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011:1–14. doi: 10.1155/2011/365359
- Murakami A (2000) Suppression by citrus auraptene of phorbol ester- and endotoxin-induced inflammatory responses: role of attenuation of leukocyte activation.

Carcinogenesis 21:1843–1850. doi: 10.1093/carcin/21.10.1843

Navarro SD, Beatriz A, Meza A, Pesarini JR, Gomes RDS, Karaziack CB, Cunha-Laura AL, Monreal ACD, Romão W, Júnior VL et al. (2014) A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *European Journal of Medicinal Chemistry* 75:132–142. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.01.057

Oesterreich, S. A., Traesel GK, Piccinelli AC., Aquino, DFS., Kassuya, CAL, Mota, JS., Estanislau, C. (2015). Antidepressant and anxiolytic effects of ethanol extracts from four piper specie, v. 10, n. 1, p. 9, 2015-07-31 2015. ISSN 1980-0002.

Okamoto A, Fujio K, Rooijen NV, Tsuno NH, Takahashi K, Tsurui H, Hirose S, Elkon KB and Yamamoto K (2008) Splenic Phagocytes Promote Responses to Nucleosomes in (NZB x NZW) F1 Mice. *The Journal of Immunology* 181:5264–5271. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5264

Oliveira RJ, Santos NDCL, Pesarini JR, Oliveira BCD, Berno CR, Araújo FHSD, Ingridhy Ostaciana Maia Freitas Da Silveira, Nascimento RO, Antonioli-Silva ACMB, Monreal ACD et al. (2018) Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. *Genetics and Molecular Biology* 41:154–166. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2017-0091

Oliveira RJ, Pesarini JR, Salles MJS, Kanno TYN, Lourenço ACDS, Leite VDS, Silva AFD, Matiazi HJ, Ribeiro LR, Mantovani MS et al. (2014) Effects of β -glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus

assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. *Genetics and Molecular Biology* 37:111–119. doi: 10.1590/s1415-47572014000100017

Oliveira RJ, Baise É, Mauro MDO, Pesarini JR, Matuo R, Silva AFD, Ribeiro LR and Mantovani MS (2009) Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28:120–124. doi: 10.1016/j.etap.2009.03.008

Oliveira RJ, Salles MJS, Silva AFD, Kanno TYN, Lourenço ACDS, Leite VDS, Matiazi HJ, Pesarini JR, Ribeiro LR, Mantovani MS et al. (2013) In vivo evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. *Genetics and Molecular Biology* 36:413–424. doi: 10.1590/s1415-47572013005000028

Oliveira RJ, Navarro SD, Lima DPD, Meza A, Pesarini JR, Gomes RDS, Karaziack CB, Mauro MDO, Cunha-Laura AL, Monreal ACD et al. (2015) A novel cytosporone 3-Heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. *BMC Cancer*. doi: 10.1186/s12885-015-1532-2

Pesarini J, Victorelli S, Vicentini A, Ferreira L, Mauro M, Matuo R, Oliveira J, Antonioli A, Mantovani M, Oliveira R et al. (2014) Antigenotoxic and antimutagenic effects of glutamine supplementation on mice treated with cisplatin. *Genetics and Molecular Research* 13:4820–4830. doi: 10.4238/2014.july.2.11

Prando, T. B. *et al.* 2014. Amides from Piper as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of *Piper glabratum* Kunth. *Evid Based*

Complement Alternat Med, v. 2014, p. 615109. ISSN 1741-427X.

Radai JAS, Graciani FDS, Berno CR, Leitão MM, Santos EPD, Oliveira RJ and Kassuya CAL (2018) Genetic toxicological assessment and anti-arthritic effects of an ethanolic extract obtained from *Salvia lachnostachys* Benth leaves in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 92:239–244. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.12.006

Roizen M (2012) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Yearbook of Anesthesiology and Pain Management* 2012:13. doi: 10.1016/j.yane.2012.02.046

Schneider BUC, Meza A, Beatriz A, Pesarini JR, Carvalho PCD, Mauro MDO, Karaziack CB, Cunha-Laura AL, Monreal ACD, Matuo R et al. (2016) Cardanol: toxicogenetic assessment and its effects when combined with cyclophosphamide. *Genetics and Molecular Biology* 39:279–289. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2015-0170

Siegal A, Kopel S and Leibovici J (1986) Histological changes in spleen and lymph nodes of mice administered cyclophosphamide and levan. *Cell and Tissue Research*. doi: 10.1007/bf00218099

Singh NP, Mccoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175:184–191. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0

Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S and Mahmood ZA (2014) Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. doi: 10.1016/s1995-7645(14)60275-3

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (2008) Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD Guidelines for the

Testing of Chemicals, Section 4. doi: 10.1787/9789264071049-en

Vendramini-Costa DB and Carvalho JE (2012) Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. *Current Pharmaceutical Design* 18:3831–3852. doi: 10.2174/138161212802083707

Walczak H (2011) TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunological Reviews* 244:9–28. doi: 10.1111/j.1600-065x.2011.01066.x

Waters MD, Brady AL, Stack H and Brockman HE (1990) Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 238:57–85. doi: 10.1016/0165-1110(90)90039-e

Wongpa S, Himakoun L, Soontornchai S, Temcharoen P (2007) Antimutagenic effects of piperine on cyclophosphamide-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. *Asian Pac J Cancer Prev.*8(4):623-7. PMID: 18260741

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Parâmetros biométricos (massa corporal inicial, final e ganho de peso) de avaliação do extrato etanólico de *Piper glabratum* (EEPG).

Grupos experimentais	Parâmetros Biométricos (g)		
	Inicial	Final	Ganho de Peso
CN	39,36±0,99 ^{a,b}	36,24±1,24 ^{a,b,c}	-3,13±0,44 ^{a,b}
CP	37,95±2,12 ^{a,b}	33,69±1,22 ^a	-4,26±0,99 ^a
EEPG 10	36,71±1,49 ^a	34,97±1,60 ^{a,b}	-1,75±0,34 ^{a,b}
EEPG 100	44,64±1,54 ^{a,b}	43,17±1,09 ^{c,d}	-1,47±0,61 ^{a,b}
EEPG 1000	42,92±1,21 ^{a,b}	41,69±1,17 ^{b,c,d}	-1,23±0,32 ^b
EEPG 10 + CP	46,29±1,14 ^b	44,33±1,43 ^d	-1,96±0,48 ^{a,b}
EEPG 100 + CP	46,00±2,96 ^b	43,18±2,06 ^{c,d}	-2,83±0,98 ^{a,b}
EEPG 1000 + CP	44,70±3,21 ^{a,b}	41,04±2,63 ^{a,b,c,d}	-3,66±0,61 ^{a,b}

Legenda: Controle Negativo (CN) - camundongos tratados com veículo (solução fisiológica 0,9% por via oral (v.o.) (10 ml/Kg de peso corporal (g) e Tween a 1%) e com solução fisiológica intraperitoneal (i.p.) (10 ml/Kg). Controle positivo (CP) - animais tratados com veículo (v.o.) e ciclofosfamida a 100 mg/Kg (i.p.); grupos PG 10, PG 100 e PG 1000 - animais tratados com EEPG em 3 doses diferentes (10, 100 e, 1000 mg/Kg, v.o., respectivamente) e com solução fisiológica (10 ml/Kg, i.p.); grupos EEPG 10 + CP, EEPG 100 + CP e EEPG 1000 + CP - animais tratados com EEPG em 3 doses diferentes (10, 100 e, 1000 mg/Kg, v.o., respectivamente) e ciclofosfamida (100 mg/Kg, i.p.). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Testes estatísticos utilizados: ANOVA/Tukey-Kramer (P <0,05).

Tabela 2. Peso relativo dos órgãos baço, fígado, rins, pulmão e coração na avaliação do extrato etanólico de *Piper glabratum* (EEPG).

Grupos experimentais	Peso Relativo dos órgãos				
	Baço	Fígado	Rins	Pulmão	Coração
CN	0,006±0,0003 ^d	0,049±0,0018 ^{ab}	0,012±0,0003 ^{a,b}	0,008±0,0011 ^a	0,005±0,0002 ^a
CP	0,004 ±0,0007 ^{a,b,c}	0,052±0,0014 ^b	0,014±0,0003 ^b	0,007±0,0003 ^a	0,005±0,0001 ^a
EEPG 10	0,007±0,0006 ^d	0,040±0,0012 ^a	0,011±0,0006 ^a	0,007±0,0004 ^a	0,005±0,0004 ^a
EEPG 100	0,005±0,0009 ^{c,d}	0,046±0,0006 ^{a,b}	0,014±0,0005 ^{a,b}	0,006±0,0005 ^a	0,005±0,0004 ^a
EEPG 1000	0,004±0,0002 ^{b,c}	0,042±0,0046 ^a	0,012±0,0004 ^{a,b}	0,006±0,0003 ^a	0,005±0,0004 ^a
EEPG 10 + CP	0,002±0,0001 ^a	0,044±0,0018 ^{a,b}	0,013±0,0006 ^{a,b}	0,006±0,0003 ^a	0,004±0,0001 ^a
EEPG 100 + CP	0,002±0,0002 ^a	0,042±0,0010 ^a	0,013±0,0006 ^{a,b}	0,006±0,0002 ^a	0,005±0,0003 ^a
EEPG 1000 + CP	0,002±0,0002 ^a	0,042±0,0017 ^a	0,013±0,0006 ^{a,b}	0,006±0,0007 ^a	0,004±0,0004 ^a

Legenda: Controle Negativo (CN) - camundongos tratados com veículo (solução fisiológica 0,9% por via oral (v.o.) (10 ml/Kg de peso corporal (g) e Tween a 1%) e com solução fisiológica intraperitoneal (i.p.) (10 ml/Kg). Controle positivo (CP) - animais tratados com veículo (v.o.) e ciclofosfamida a 100 mg/Kg (i.p.); grupos PG 10, PG 100 e PG 1000 - animais tratados com EEPG em 3 doses diferentes (10, 100 e, 1000 mg/Kg, v.o., respectivamente) e com solução fisiológica (10 ml/Kg, i.p.); grupos EEPG 10 + CP, EEPG 100 + CP e EEPG 1000 + CP - animais tratados com EEPG em 3 doses diferentes (10, 100 e, 1000 mg/Kg, v.o., respectivamente) e ciclofosfamida com 100 mg/Kg (i.p.). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Testes estatísticos utilizados: ANOVA/Tukey-Kramer (P <0,05).

Tabela 3. Ensaio cometa do extrato etanólico de *Piper glabratum* (EEPG).

Grupos experimentais	Células com dano no DNA	Classificação de dano no DNA				Score	%RD
		0	1	2	3		
CN	8,8±1,07 ^a	91,2±1,07	8,8±1,07	0,0±0,00	0,0±0,00	8,8±1,07 ^a	
CP	94,4±0,93 ^e	5,6±0,93	67,2±4,09	22,0±8,66	5,2±2,08	126,8±6,40 ^d	
EEPG 10	23,0±1,09 ^b	77,2±1,07	22,6±1,08	0,4±0,40	0,0±0,00	23,4±1,25 ^a	
EEPG 100	22,8±1,74 ^b	77,2±1,74	22,6±1,80	0,2±0,20	0,0±0,00	23,0±1,70 ^a	
EEPG 1000	23,2±3,54 ^b	76,8±3,54	23,6±3,54	0,0±0,0	0,0±0,00	23,2±3,54 ^a	
EEPG 10 + CP	59,8±1,20 ^c	40,2±1,20	48,2±2,01	9,8±1,24	1,8±0,58	73,2±2,48 ^b	40,42
EEPG 100 + CP	76±1,79 ^d	24,0±1,79	63,2±1,46	12,2±2,25	0,6±0,40	89,4±4,18 ^{b,c}	21,50
EEPG + 1000 CP	80,2±3,25 ^d	19,8±3,25	71,0±2,28	8,4±2,11	0,8±0,58	90,2±5,17 ^d	16,59

Legenda: Controle Negativo (CN) - camundongos tratados com veículo (solução fisiológica 0,9% por via oral (v.o.) (10 ml/Kg de peso corporal (g) e Tween a 1%) e com solução fisiológica intraperitoneal (i.p.) (10 ml/Kg). Controle positivo (CP) - animais tratados com veículo (v.o.) e ciclofosfamida a 100 mg/Kg (i.p.); grupos PG 10, PG 100 e PG 1000 - animais tratados com EEGP em 3 doses diferentes (10, 100 e, 1000 mg/Kg, v.o., respectivamente) e com solução fisiológica (10 ml/Kg, i.p.); grupos EEGP 10 + CP, EEGP 100 + CP e EEGP 1000 + CP - animais tratados com EEGP em 3 doses diferentes (10, 100 e, 1000 mg/Kg, v.o., respectivamente) e ciclofosfamida com 100 mg/Kg (i.p.). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Testes estatísticos utilizados: ANOVA/Tukey-Kramer (P <0,05).

Tabela 4. Ensaio de fagocitose esplênica do extrato etanólico de *Piper glabratum* (EEPG).

Grupos experimentais	Fagocitose
CN	3,4±1,17 ^a
CP	53,4±2,29 ^c
EEPG 10	2,2±1,28 ^a
EEPG 100	4,2±1,39 ^a
EEPG 1000	1,2±1,39 ^a
EEPG 10 + CP	25,0±2,61 ^b
EEPG 100 + CP	19,4±3,12 ^b
EEPG 1000 + CP	43,6±4,37 ^c

Legenda: Controle Negativo (CN) - camundongos tratados com veículo (solução fisiológica 0,9% por via oral (v.o.) (10 ml/Kg de peso corporal (g) e Tween a 1%) e com solução fisiológica intraperitoneal (i.p.) (10 ml/Kg). Controle positivo (CP) - animais tratados com veículo (v.o.) e ciclofosfamida a 100 mg/Kg (i.p.); grupos PG 10, PG 100 e PG 1000 - animais tratados com EEPG em 3 doses diferentes (10, 100 e, 1000 mg/Kg, v.o., respectivamente) e com solução fisiológica (10 ml/Kg, i.p.); grupos EEPG 10 + CP, EEPG 100 + CP e EEPG 1000 + CP - animais tratados com EEPG em 3 doses diferentes (10, 100 e, 1000 mg/Kg, v.o., respectivamente) e ciclofosfamida com 100 mg/Kg (i.p.). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Testes estatísticos utilizados: ANOVA/Tukey-Kramer (P <0,05).

5.2 Artigo 2: Effects of an ethanolic extract and fractions from *Piper glabratum* (Piperaceae) leaves on pain and inflammation - Submetido à revista “**Journal of Ethnopharmacology**” (Qualis A2 – Medicina II: Fator de impacto = 3.115)

Effects of an ethanolic extract and fractions from *Piper glabratum* (Piperaceae) leaves on pain and inflammation

Maicon Matos Leitão¹, Joyce Alencar Santos¹, Saulo Euclides Silva Filho³, Janaína Duarte Gomes², Rodrigo Oliveira Juliano³, Jonas da Silva Mota², Candida Aparecida Leite Kassuya¹.

¹School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil.

²Mato Grosso do Sul State University (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil.

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul - Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

Email addresses:

MML: mleitao02@hotmail.com

JAS: joycealencarr@hotmail.com

SESF: saulo.esf@gmail.com

JSM: js.mota@ig.com.br

RJO: rjo.rodrigojulianooliveira@gmail.com

JDG: janadg-cpo@hotmail.com

CALK: candida2005@gmail.com

* Author for correspondence:

Candida Aparecida Leite Kassuya

Address: School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Rodovia Dourados-Itahum, km 12, 79825-070, MS, Brazil, Phone: +55 67 3410-2326 Fax: +55 67 3410-2326.

E-mail address: candida2005@gmail.com

Running Title: Analgesic and anti-inflammatory effects of *Piper glabratum* leaves.

ABSTRACT

Etnopharmacological relevance

In the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, *Piper glabratum* leaves are used as a popular medicine for pain and inflammation.

Aim of the study

In this study, we performed a phytochemical analysis and evaluated the effects of application of an ethanolic extract (EEPG) obtained from leaves of *P. glabratum* as well as the effects of application of the hexanic fraction (HXPG) and the hydroalcoholic fraction (HAPG) obtained from the EEPG on inflammatory parameters and pain in mice.

Materials and Methods

Swiss mice were treated with EEPG (30-300 mg/kg), HXPG (19.5 mg/kg) or HAPG (83.37 mg/kg) and then subjected to carrageenan-induced pleurisy and paw oedema tests, the spontaneous pain, and zymosan-induced intra-articular inflammation.

Results

Phytochemical analysis of the fractions demonstrated the presence of phytol, a mixture of stigmasterol and β -sitosterol, and glycosylated flavonols in the fractions. In the pleurisy test, there was a significant reduction in leukocyte migration and protein exudation. All treatments reduced cold and mechanical hyperalgesia and were anti-oedematogenic in the carrageenan-induced paw inflammation test. All treatments inhibited an oedematogenic effect and cold allodynia in the formalin test, but only HXPG significantly reduced paw licking in the second phase. All treatments significantly reduced oedema, mechanical hyperalgesia, and leukocyte migration in the zymosan-induced intra-articular inflammation model.

Conclusions

In this work, the antihyperalgesic and anti-inflammatory properties of an ethanolic extract of *P. glabratum* and fractions were demonstrated for the first time. These results may be related, at

least in part, to modulation of the activity of adhesion molecules and transcription factors by phytol, stigmasterol and β -sitosterol.

Keywords: *Piper glabratum*; analgesy; inflammation; carrageenan; formalin.

Authors' contributions

All authors participated in the design, interpretation of the studies, analysis of the data and review of the manuscript; MML, JAS, ROJ and SESF conducted the anti-inflammatory and analgesic evaluation; JSM and JDG were involved in the preparation of extract and fraction and phytochemical analysis; CALK and MML performed data analyses and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

1. INTRODUCTION

The inflammatory process produces cardinal signals in response to the action of exogenous and/or endogenous inducers such as microorganisms and cellular derivatives (Noah et al., 2012). Pain, which is an unpleasant sensory and emotional experience but useful for the preservation of homeostasis, occurs in several inflammatory and non-inflammatory states (Carlino et al., 2014).

New anti-inflammatory and analgesic drugs can be bioprospected from medicinal plants that are commonly used by the general population (Cabral Silva et al., 2013; Carlino et al., 2014). In Mato Grosso do Sul, one can find the plant used in folk medicine *Piper glabratum* Kunth (Piperaceae), popularly known as pariparoba or false jaborandi (Kato and Furlan, 2007; Prando et al., 2014; Branquinho et al., 2017). Only a few studies have described the pharmacological properties of this plant. It was shown that a methanolic extract of its roots has diuretic and hepatotoxic effects at high doses Prando et al., (2014) and that an ethanolic extract of its leaves that contains triterpenes, steroids, organic acids and tannins has antiparasitic and possible antidepressant effects (Flores et al., 2008, Oesterreich et al., 2015). Anti-inflammatory and analgesic effects of the essential oil of the leaves of *P. glabratum* have also been observed (Branquinho et al., 2017).

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are often used to treat acute inflammation, can trigger gastrointestinal lesions, causing bleeding and stomach ulcers, and may also result in renal complications and increase thrombotic and cardiovascular risk, as in the case of the second-generation specific COX-2 inhibitors (COXIBS); some of the anti-inflammatory drugs in this class were withdrawn from the market for this reason (Lapeyre-Mestre et al., 2013; Moore et al., 2015).

Considering the chemical and biological properties of *P. glabratum* and its popular use as an analgesic and anti-inflammatory agent, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory and analgesic effects of an ethanolic extract (EEPG) of *P. glabratum* leaves and those of the hexanic (HXPG) and hydroalcoholic (HAPG) fractions obtained from the extract.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Leaves of *P. glabratum* Kunth were collected in February 2017 in Dourados-MS (latitude 2.209'37, 7" south and longitude 54055'03, 2" west). An exsiccate of the species was identified by Prof. Elsie Franklin Guimarães of the Botanical Garden of Rio de Janeiro, RJ, Brazil and deposited (DDMS 4412) in the herbarium of the Federal University of Grande Dourados (UFGD), MS, Brazil.

2.2. Preparation of ethanolic extract, fractions, and phytochemical analysis

The *P. glabratum* leaves (1430 g) were dried at room temperature for 7 days, sprayed and subjected to 3 extractions by maceration using 92% ethanol. Thereafter, the extracts were concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator, and the final extract was dried in a hood, yielding 203 g of EEPG. A portion of the EEPG (38 g) was dissolved in 500 mL of methanol/water (8/2) and subjected to liquid-liquid extraction with hexane, yielding HXPG (6.5 g) and HAPG (27.9 g).

HXPG (4.11 g) was subjected to silica gel column chromatography by elution with increasing concentrations of AcOEt in hexane and to preparative layer chromatography in a system consisting of 95% hexane and 5% acetate. The compounds were identified by analysis of 1D and 2D NMR data, and the results were compared with data reported in the literature (Arigoni et al., 1999; Subhadhirasakul and Pharkphoom, 2005; Melos et al., 2007).

HAPG (3.0 g) was fractionated by reverse-phase (C18) bench chromatography by elution with increasing concentrations of methanol in water. The chromatographic fractionation resulted in two samples. ¹H-NMR experiments using the two samples resulted in proton signals between δ 7.00 and 8.0 and between 3 and 5, indicating that these two compounds belong to the class of glycosylated flavonols (Agrawal, 1989).

2.2.1. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometry

To obtain the NMR spectra of the samples, the Bruker AC 600 MRI spectrometer of the Institute of Chemistry of Araraquara was used; it was operated at 600 MHz frequency for ¹H and at 150.86 MHz frequency for ¹³C.

2.3. Drug preparation

For the *in vivo* assays, the EEPG and the HXPG and HAPG fractions were dissolved in saline solution containing Tween 80 (1% Tween 80 in 0.9% saline). The animals in the control groups received the vehicle (1% Tween 80 in 0.9% saline).

Calculation of the doses for HXPG (6.5%) and HAPG (27.79%) was performed according to the yield of the fractions from the EEPG.

2.4. Animals

The experiments were conducted using male and female *Swiss* mice (20-30 g, 60 days old) obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Grande Dourados (UFGD) and maintained in the Animal Laboratory Sector of the School of Health Sciences of the UFGD. The mice were kept at a controlled temperature (22 ± 2 °C) with a light/dark cycle of 12 h and free access to water and food. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (026/2016).

2.5 Pleurisy test

Female *Swiss* mice were divided into eight groups (n=6). The animals received EEPG (30, 100 or 300 mg/kg), HXPG (19.5 mg/kg), HAPG (83.37 mg/kg) or vehicle orally. The animals that received the latter treatment were designated control and naïve. The animals that were used as positive controls received subcutaneous (s.c.) injections of dexamethasone (1 mg/kg). Using an adapted needle, the animals were then injected intrapleurally on the right side of the thoracic cavity with 100 μ L of 1% carrageenan diluted in saline solution. The animals in the naïve group received similar injections of 0.9% saline solution. Four hours after pleurisy induction, the animals were euthanized, thoracic opening was performed, and the thoracic cavity was washed with 1 mL of PBS/EDTA solution. Quantitative analysis of leukocytes and total proteins (Vinegar et al., 1973) was performed using an automated haematology analyser (KX-21N Sysmex), and analysis of the protein exudate was determined by the Bradford method using a commercial kit (Bioagency, São Paulo, Brazil).

2.6 Oedema, mechanical and cold hyperalgesia induced by the intraplantar carrageenan test

Male *Swiss* mice were divided into seven groups (n=6) and received their treatments 1 h prior to induction of oedema. The groups received EEPG (30, 100 or 300 mg/kg, oral route), HXPG (19.5 mg/kg, oral route), HAPG (83.37 mg/kg, oral route) or vehicle (oral route, control). The animals in the positive control group were treated with dexamethasone (1 mg/kg, s.c.). Oedema induction was performed by injecting 100 μ L of carrageenan (1%) dissolved in 0.9% saline solution into the right hind paw of each animal. In the contralateral paw, 0.9% saline solution was injected. At preselected time intervals (0.5, 1, 2 and 4 h) after induction, carrageenan-induced paw oedema was determined using a plethysmometer device (Panlab, Spain), and the degree of oedema was compared to that in the contralateral paw. At 3 h and 4 h

after induction, analyses of mechanical hyperalgesia and cold allodynia were performed (Silva Balin et al., 2018).

2.7 Spontaneous pain test

Male *Swiss* mice were divided into five groups with six animals in each group. One hour before induction, the mice were treated with EEPG (300 mg/kg; oral route), HXPG (19.5 mg/kg, oral route), HAPG (83.37 mg/kg, oral route) or vehicle (control). One group was treated with morphine (10 mg/kg) intraperitoneally 45 minutes prior to induction. After treatment, each animal received an intraplantar injection of 30 μ L of 1% formalin in the right hind paw (Hunskar and Hole, 1987). Immediately after induction, the animals were placed individually in glass funnels and observed for time to paw lick during two phases (0-5 min initially and a second phase at 15-30 min). Shortly thereafter, cold allodynia was determined by the acetone drop method, and paw oedema was measured using a plethysmometer.

2.8. Zymosan-induced articular inflammation test

Female *Swiss* mice were divided into 6 groups (n=6). The animals were treated orally with EEPG (300 mg/kg), HXPG (19.5 mg/kg), vehicle (control and naïve). One group received subcutaneous injection of dexamethasone (1 mg/kg). Joint inflammation was induced by intra-articular injection of 20 μ L zymosan (200 μ g/joint) at the right hind knee joint through the suprapatellar ligament (Yamada et al., 2013). The animals in the naïve group received intra-articular injection of an equal volume of 0.9% saline solution. Mechanical analgesia was analysed 3 and 4 h after zymosan injection by measuring the paw withdrawal limit using an electronic analgesimeter (InSight®, Ribeirão Preto, Brazil) and the Von Frey method. Knee oedema was determined using a digital micrometre by measuring the difference in the diameters of the test and contralateral knees (in μ m) at 4 and 6 h after zymosan injection. Six hours after

zymosan injection, the animals were euthanized, and their knee joint cavities were washed with PBS/EDTA for evaluation of leukocyte migration.

2. 9. Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). To compare the results, one-way ANOVA analysis followed by the Newman-Keuls test was used. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statistical analysis and graphing were performed using GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. Phytochemical analysis

Chromatographic fractionation of the hexanic fraction resulted in the isolation of phytol (1) (17 mg) and in the identification of stigmasterol (2) and β -sitosterol (3) in a mixture (14 mg) (Figure 1). The chemical study of the hydroalcoholic fraction indicated the presence of glycosylated flavonols.

3.2. Effects of the ethanolic extract and fractions on carrageenan-induced pleurisy

In carrageenan-induced pleurisy, administration of EEPG at doses of 100 and 300 mg/kg resulted in significantly reduced leukocyte migration. The maximum observed inhibition was 81% at 300 mg/kg, demonstrating a dose-dependent effect of the extract. The dexamethasone group displayed a maximal inhibition of 69% compared to the control group. Protein exudation was significantly reduced after EEPG treatment at a dose of 300 mg/kg, with maximum inhibition of 77%. Protein exudation also decreased significantly (by 68%) in the dexamethasone group. Treatment with the fractions resulted in significant inhibition of leukocyte migration. The effects of HXPG, which showed a maximum inhibition of 68%, were

more prominent, whereas HXPG only resulted in a significant decrease in protein exudation (54%) in relation to the control group (Figure 2).

3.3. Effects of treatments on oedema and on mechanical and cold hyperalgesia induced by carrageenan

The evaluation of paw oedema showed that doses of 30, 100 and 300 mg/kg EEPG reduced paw volume at all times, with maximum inhibition of 48%, 45% and 51%, respectively, at one hour after induction, 61%, 46% and 69%, respectively, at two hours after induction, and 62%, 57% and 63%, respectively, at four hours after induction (Figure 3C). Treatment with HXPG significantly reduced oedema at all times, with 83% inhibition at 1 h after injection (Figure 3D). Dexamethasone was effective in all evaluations (Figure 3A). Administration of the HAPG fraction resulted in a significant (39%) reduction of oedema 2 h after carrageenan injection (Figure 3E).

Oral administration of EEPG and HAPG at all tested doses blocked mechanical hyperalgesia 3 h after carrageenan injection. Only doses of 100 and 300 mg/kg resulted in significant responses at 4 h after injection. The dexamethasone group showed significant results in all evaluations (Figure 4).

The evaluation of cold allodynia showed that EEPG at doses of 100 and 300 mg/kg decreased cold sensitivity in all analyses. The 30 mg/kg dose produced a significant result only at 4 h after carrageenan injection (Figure 5A-B). The most effective dose was 300 mg/kg; animals that received this dose showed a maximum inhibition of 80% at 4 h after the injection. Treatment with the HXPG and HAPG fractions decreased the animals' sensitivity to cold at 3 h and 4 h after carrageenan injection compared to the control group (Figure 5C and D). The maximum inhibition by the HXPG and HAPG fractions was 55% and 65%, respectively. Significant inhibition was observed in the dexamethasone group.

3.4. Effects of spontaneous pain test

In the first phase of spontaneous pain induced by formalin, only the morphine group displayed reduced nociception. Treatment with the HXPG fraction reduced nociceptive pain significantly in the second phase (by 39%); significant reduction was also observed in the morphine group. Treatment with EEPG (300 mg/kg) and HXPG (19.5 mg/kg) resulted in significant reduction in formalin-induced paw oedema (56% and 68%, respectively). All groups showed significant reductions in cold allodynia (EEPG 90%, HXPG 80%, HAPG 92% and morphine 100%) (Figure 6).

3.5. Effects of the treatments on articular inflammation induced by zymosan

In the zymosan-induced intra-articular inflammation test, HXPG treatment produced a significant decrease in oedema compared to the control group (Figure 7A-B), with maximum inhibition of 37% and 46% at 4 h and 6 h, respectively, after injection. Administration of EEGG resulted in a significant difference in all evaluations, with maximum inhibition of 47% at 4 h after injection. The dexamethasone group showed a significant difference in all evaluations. In the evaluation of mechanical hyperalgesia, all treatments resulted in significant differences relative to the control group. All treatments except HXPG produced a significant difference in mechanical pain block at 3 h after injection (Figure 7C-D).

In the evaluation of total leukocytes, all treatments resulted in significant differences in relation to the control group. HXPG treatment inhibited leukocyte migration by 33%, treatment with EEPG inhibited it by 35%, and treatment with dexamethasone inhibited it by 43% (Figure 7E).

4. DISCUSSION

This work demonstrates the antinociceptive and anti-inflammatory action of an ethanolic extract of *P. glabratum* based on analyses of inflammation, nociception, and mechanical and cold hyperalgesia. The results of our in vivo tests of animals treated with HXPG and HAPG confirmed the anti-inflammatory and analgesic action of EEPG. The results obtained in this study are consistent with those reported by Branquinho et al. (2017), who demonstrated the anti-inflammatory effect of *P. glabratum* leaf essential oil.

In the pleurisy model, carrageenan generates maximal activation of an inflammatory response four hours after its administration. This response is caused by the release of histamine, bradykinin and nitric oxide (NO), which leads to increased vascular permeability and favours leukocyte migration (Fröde, 2000). Evaluations of leukocyte migration and protein exudation were performed in mice treated with EEPG, HXPG and HAPG; treatment with EEPG or HXPG reduced both parameters compared to the control group, suggesting that EEPG and HXPG may act as modulators of vasodilation.

In addition to carrageenan-induced inflammation, pain may be present because bradykinin and prostaglandin E₂ may cause sensitization of nociceptors (Posadas et al., 2004). TNF, IL-1 β , chemokines and quinine favour an increase in the sensitivity to pain induced by mechanical or thermal stimuli; this is due to a decrease in the activation threshold of type C nerve fibres, leading to hyperalgesia (Zhang and An, 2007). EEPG reduced the formation of oedema at 4 hours, suggesting that the components of this extract affect the production of prostaglandins. The effects of all tested doses of EEPG and the hexane fraction were similar to those observed for dexamethasone. In this case, it can be inferred that EEPG and HXPG act to inhibit the release of prostaglandins, thereby interfering with vasodilation and cell migration. Treatment with EEPG increased the paw withdrawal threshold and reduced the hyperalgesia induced by the administration of carrageenan. In our evaluation, only HAPG increased the paw

withdrawal threshold two hours after the injection of carrageenan. In nociception induced by acetone, EEPG and its fractions decreased the duration of sensitivity to cold, demonstrating its antihyperalgesic and antinociceptive potential.

The formalin-induced spontaneous nociception model is used to evaluate neurogenic pain (first stage) and inflammatory pain (second stage). The first phase primarily involves direct stimulation of type C and A δ fibres. In the second phase, inflammatory mediators such as bradykinin, serotonin and prostaglandins are released (Hunskar and Hole, 1987). In this model, both phases of the process that leads to pain can be inhibited by morphine. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are inhibitory only in the second phase (Jorge et al., 2006; Berrocoso et al., 2013). Treatment with HXPG produced significant results only in the second phase of the test. The decrease in inflammatory pain suggests that this fraction acts only on inflammatory pain and that it does not have central effects such as those produced by opioids. The ability of formalin to induce oedema (Nucci-Martins et al., 2016) was antagonized by EEPG and HXPG, again demonstrating the similarity in the effects of the HXPG fraction and those of the crude extract. It is also possible to use the acetone test, which produces an exaggerated cooling sensation in animals sensitized by formalin (Bergeson et al., 2016). Our results indicated a significant decrease in cold sensitivity in animals treated with EEPG or with either fraction after formalin injection. These results support our other evidence for the anti-inflammatory and analgesic activity of EEPG, HXPG and HAPG.

When tested in the models of pleurisy and paw oedema induced by carrageenan and in a model of paw oedema induced by formalin, the HXPG fraction and the 300 mg/kg dose of EEPG yielded the best results. These two treatments were therefore used in the zymosan-induced joint inflammation test. In this model, it is possible to induce activation of the transcription factor NF- κ B through the activation of TLR-1, TLR-2 and TLR-6 receptors by zymosan; this favours the production of proinflammatory cytokines such as TNF, IL-1 β , IL-6,

NO and chemokines. This activation generates peripheral hypernociception at 3 h and 4 h after induction, in addition to generating an increase in vascular permeability that favours chemotaxis and cellular infiltration at 6 h after induction (Rocha et al., 2004).

EEPG and HXPG demonstrated anti-oedematogenic and antihyperalgesic effects during the evaluation of the animals' mechanical nociceptive responses. In addition, the peak of leukocyte infiltration that normally occurs 6 h after induction of the inflammatory process was attenuated by the treatments, confirming the anti-inflammatory activity of EEGP and HXPG.

The study by Oesterreich et al. (2015) demonstrated the presence of organic acids, tannins, steroids and triterpenoids in ethanolic extracts of *P. glabratum* leaves. According to our phytochemical analyses, HXPG contains a mixture of phytol, stigmasterol and β -sitosterol. Phytol is a long-chain branched diterpene that originates from chlorophyll metabolism, whereas stigmasterol and β -sitosterol are pentacyclic triterpenoids (Tatiya et al., 2017).

Studies have demonstrated that phytol compounds possess anti-inflammatory and antinociceptive activities. In a study conducted by Santos et al. (2013), an antinociceptive effect was demonstrated in the acetic acid-induced contortions test and in the formalin test; the antinociceptive effect was produced without affecting the performance of the animals. In addition, an antioxidant effect involving a reduction in the levels of hydroxylated reactive substances, nitric oxide and thiobarbituric acid has been demonstrated. Silva et al. (2014) demonstrated an anti-inflammatory action of phytol in the reduction of paw oedema induced by carrageenan and other inflammatory agents, in addition to decreased leukocyte recruitment, decreased MPO, TNF and IL-1 β activities, and an antioxidant effect. Other studies have demonstrated the anti-inflammatory effects of stigmasterol (García et al., 1999) and β -sitosterol (Gupta et al., 1980; Paniagua-Pérez et al., 2017), compounds that are also found in HXPG. Loizou et al. (2010) and Antwi et al. (2017) showed that β -sitosterol significantly inhibits monocyte binding, vascular adhesion molecule 1 expression (VCAM-1) and intracellular

adhesion molecule 1 (ICAM-1) activity in TNF-stimulated aortic endothelial cells. Decreased expression of nuclear factor κ B (NF κ B) has also been demonstrated. These results suggest that the β -sitosterol and phytol found in HXPG may also take part in the anti-inflammatory process by regulating the phosphorylation of NF κ B as well as that of IL-1 β and TNF.

In conclusion, an ethanolic extract of *P. glabratum* was shown to have antihyperalgesic, antinociceptive and anti-inflammatory activities in models of acute inflammation. The observed effects may be related to the inhibition of inflammatory mediators by phytol, stigmasterol and β -sitosterol present in the hexanic fraction of the extract.

Acknowledgements

The authors thank CAPES, FUNDECT, and CNPq for the financial assistance.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Agrawal, P.K., 1989. Flavonoid Structure and Carbon-13 NMR Spectroscopy. *Studies in Inorganic Chemistry Carbon-13 NMR of Flavonoids* 497–514. doi:10.1016/b978-0-444-87449-8.50015-8.
- Antwi, A.O., Obiri, D.D., Osafo, N., 2017. Stigmasterol Modulates Allergic Airway Inflammation in Guinea Pig Model of Ovalbumin-Induced Asthma. *Mediators of Inflammation* 2017, 1–11. doi:10.1155/2017/2953930
- Arigoni, D., Eisenreich, W., Latzel, C., Sagner, S., Radykewicz, T., Zenk, M.H., Bacher, A., 1999. Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 1309–1314. doi:10.1073/pnas.96.4.1309
- Arrigo, J.D.S., Balen, E., Júnior, U.L., Mota, J.D.S., Iwamoto, R.D., Barison, A., Sugizaki, M.M., Kassuya, C.A.L., 2016. Anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritic activity of amides and extract obtained from Piper amalago in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 179, 101–109. doi:10.1016/j.jep.2015.12.046
- Balin, P. da Silva, Zanatta, F. C., Jorge, B. C., Leitão, M., Kassuya, R. M., Cardoso, C. A. L., Kassuya, C. A. L., Arena, A.C., 2018. Toxicological evaluation and anti-inflammatory potential of an ethanolic extract from Bromelia balansae (Bromeliaceae) fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 222, 79-86. doi: 10.1016/j.jep.2018.04.049
- Berrocoso, E., Ikeda, K., Sora, I., Uhl, G. R., Sánchez-Blázquez, P., Mico, J. A. Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 16, n. 1, p. 151-62, Feb 2013. ISSN 1469-5111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217458> >.
- Bergeson, S.E., Blanton, H., Martinez, J.M., Curtis, D.C., Sherfey, C., Seegmiller, B., Marquardt, P.C., Groot, J.A., Allison, C.L., Bezboruah, C., Guindon, J., 2016. Binge Ethanol Consumption Increases Inflammatory Pain Responses and Mechanical and

Cold Sensitivity: Tigecycline Treatment Efficacy Shows Sex Differences. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 40, 2506–2515. doi:10.1111/acer.13252

Branquinho, L.S., Santos, J.A., Cardoso, C.A.L., Mota, J.D.S., Junior, U.L., Kassuya, C.A.L., Arena, A.C., 2017. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 198, 372–378. doi:10.1016/j.jep.2017.01.008

Cabral S. J., Saraiva, S. R. G. L., Júnior, R. G. O., Almeida, J. R. G. S. 2013. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Rev. Bras. Farm.* 94 (1): 18-23

Carlino, E.; Frisaldi, E.; Benedetti, F. Pain and the context. *Nat Rev Rheumatol*, v. 10, n. 6, p. 348-55, Jun 2014. ISSN 1759-4804.

Rocha, F.A.C.D., Teixeira, M.M., Rocha, J.C.D.S., Girão, V.C.C., Bezerra, M.M., Ribeiro, R.D.A., Cunha, F.D.Q., 2004. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. *European Journal of Pharmacology* 497, 81–86. doi:10.1016/j.ejphar.2004.06.025

Decosterd, I., Woolf, C.J., 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149–158. doi:10.1016/s0304-3959(00)00276-1

Flores, N., Jiménez, I.A., Giménez, A., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Bourdy, G., Bazzocchi, I.L., 2009. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry* 70, 621–627. doi:10.1016/j.phytochem.2009.03.010

FRÔDE, T. S. Mediadores e mecanismos envolvidos na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos 2000. 209 Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

García, M.D., Sáenz, M.T., Gómez, M.A., Fernández, M.A., 1999. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute

inflammation models. *Phytotherapy Research* 13, 78–80. doi:10.1002/(sici)1099-1573(199902)13:1<78::aid-ptr384>3.0.co;2-f

Gupta, M., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., Bhargava, K., 1980. Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of β -Sitosterol. *Planta Medica* 39, 157–163. doi:10.1055/s-2008-1074919

Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114. doi:10.1016/0304-3959(87)90088-1

Iwamoto, L.H., Vendramini-Costa, D.B., Monteiro, P.A., Ruiz, A.L.T.G., Sousa, I.M.D.O., Foglio, M.A., Carvalho, J.E.D., Rodrigues, R.A.F., 2015. Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 1–8. doi:10.1155/2015/948737

Jorge, S., Parada, C. A., Ferreira, S. H., Tambeli, C. H. Interferential therapy produces antinociception during application in various models of inflammatory pain. *Phys Ther*, v. 86, n. 6, p. 800-8, Jun 2006. ISSN 0031-9023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16737405> >.

Kato, M.J., Furlan, M., 2007. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry* 79, 529–538. doi:10.1351/pac200779040529

Lapeyre-Mestre, M., Grolleau, S., Montastruc, J.-L., 2011. Adverse drug reactions associated with the use of NSAIDs: a case/noncase analysis of spontaneous reports from the French pharmacovigilance database 2002-2006. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27, 223–230. doi:10.1111/j.1472-8206.2011.00991.x

Lima, D.K., Ballico, L.J., Lapa, F.R., Gonçalves, H.P., Souza, L.M.D., Iacomini, M., Werner, M.F.D.P., Baggio, C.H., Pereira, I.T., Silva, L.M.D., Facundo, V.A., Santos, A.R.S., 2012. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 142, 274–282. doi:10.1016/j.jep.2012.05.016

- Loizou, S., Lekakis, I., Chrousos, G.P., Moutsatsou, P., 2010. β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research* 54, 551–558. doi:10.1002/mnfr.200900012
- Melos, J.L.R., Silva, L.B., Peres, M.T.L.P., Mapeli, A.M., Faccenda, O., Anjos, H.H., Torres, T.G., Tiviroli, S.C., Batista, A.L., Almeida, F.G.N., Flauzino, N.S., Tibana, L.A., Hess, S.C., Honda, N.K., 2007. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae). *Química Nova* 30, 292–297. doi:10.1590/s0100-40422007000200010
- Moore, N., Pollack, C., Butkerait, P., 2015. Adverse drug reactions and drug–drug interactions with over-the-counter NSAIDs. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 1061. doi:10.2147/tcrm.s79135
- NOAH, A. T.; ZACHARY, W. M.; RANDY, N. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. 2012. *Annual Review of Ecology*, v. 43, p. 385-406.
- Nucci-Martins, C., Nascimento, L.F., Venzke, D., Brethanha, L.C., Sako, A.V., Oliveira, A.S., Brighente, I.M., Micke, G.A., Pizzolatti, M.G., Santos, A.R., 2016. Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract and isoflavone isolated from *Polygala molluginifolia* in mice: evidence for the involvement of opioid receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. *Phytomedicine* 23, 429–440. doi:10.1016/j.phymed.2016.02.002
- Oesterreich, S. A.; Traesel, G. K.; Piccinelli, A. C.; Aquino, D. F. S.; Kassuya, C. A. L.; Mota, J. S.; Estanislau, C. 2015. Antidepressant and anxiolytic effects of ethanol extracts from four piper species. 2015, *SaBios Revista de Saude e Biologia*. v. 10, n. 1, p. 9, 2015-07-31.
- Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O., Morales-González, J.A., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., 2016. Evaluation Of The Anti-Inflammatory Capacity Of Beta-Sitosterol In Rodent Assays. *African Journal of Traditional*,

Complementary and Alternative medicines 14, 123–130.
doi:10.21010/ajtcam.v14i1.13

- Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G., 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology* 142, 331–338. doi:10.1038/sj.bjp.0705650
- Prando, T. B.; Baciquete, T. F.; Vieira, J. A. C.; Bressan, J.; Gasparotto, F. M.; Jesus, D. R.; Junior, E. L. C.; Lourenço, E. L. B.; Junior, A. G. 2014. AMIDES from Piper as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of Piper glabratum Kunth. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2014, p. 615109. ISSN 1741-427X
- Santos, C. C. M. P., Salvadori, M. S., Mota, V. G., Costa, L. M., Almeida, M. A. C., Oliveira, G.A. L., Costa, J. P., Sousa, D. P., Freitas, R. M., Almeida, R. N. 2013. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models. *Neurosci J*, v. 2013, p. 949452. ISSN 2314-4262.
- Silva, R.O., Sousa, F.B.M., Damasceno, S.R., Carvalho, N.S., Silva, V.G., Oliveira, F.R.M., Sousa, D.P., Aragão, K.S., Barbosa, A.L., Freitas, R.M., Medeiros, J.V.R., 2013. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 28, 455–464. doi:10.1111/fcp.12049
- Subhadhirasakul, S.; Pharkphoom, P. A. 2005. terpenoid and two steroids from the lowers of *Mammea siamensis*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27 (2)
- Tatiya, A.U., Saluja, A.K., Kalaskar, M.G., Surana, S.J., Patil, P.H., 2017. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Bridelia retusa* (Spreng) bark. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7, 441–451. doi:10.1016/j.jtcme.2016.12.009

- Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., 1973. Some Quantitative Temporal Characteristics of Carrageenin-Induced Pleurisy in the Rat. *Experimental Biology and Medicine* 143, 711–714. doi:10.3181/00379727-143-37397
- Vivancos, G., Jr., W.V., Cunha, T., Schivo, I., Parada, C., Cunha, F., Ferreira, S., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 391–399. doi:10.1590/s0100-879x2004000300017
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Experimental Biology and Medicine* 111, 544–547. doi:10.3181/00379727-111-27849
- Yamada, A.N., Grespan, R., Yamada, Á.T., Silva, E.L., Silva-Filho, S.E., Damião, M.J., Dalalio, M.M.D.O., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K.N., 2013. Anti-inflammatory Activity of *Ocimum americanum* L. Essential Oil in Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis. *The American Journal of Chinese Medicine* 41, 913–926. doi:10.1142/s0192415x13500614
- ZHANG, J. M.; AN, J. 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, v. 45, n. 2, p. 27-37. ISSN 0020-5907.

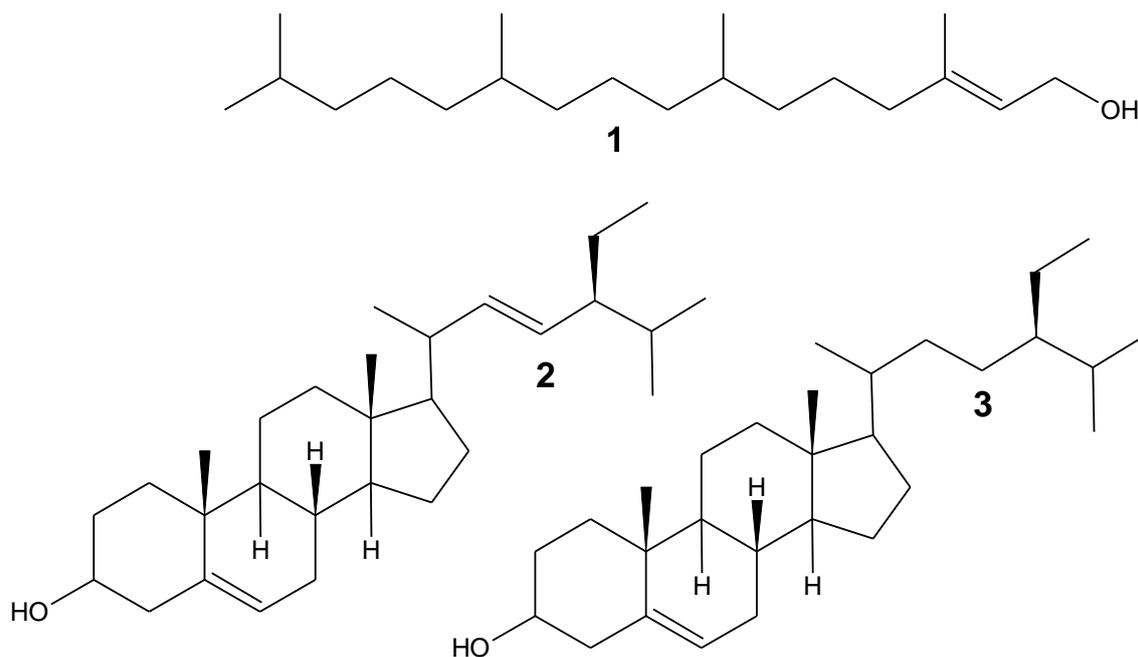
Figures and legends

Figure 1. Isolated and identified chemical compounds of the hexane fraction of *Piper glabratum* after chromatographic to silica gel column eluted with increasing concentrations of AcOEt in hexane, and preparative thin layer chromatography eluted in 95% hexane and 5% acetate system. The compounds were identified by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (RMN) 1D and 2D. Fitol (1), stigmasterol (2) and β -sitosterol (3) in a mixture.

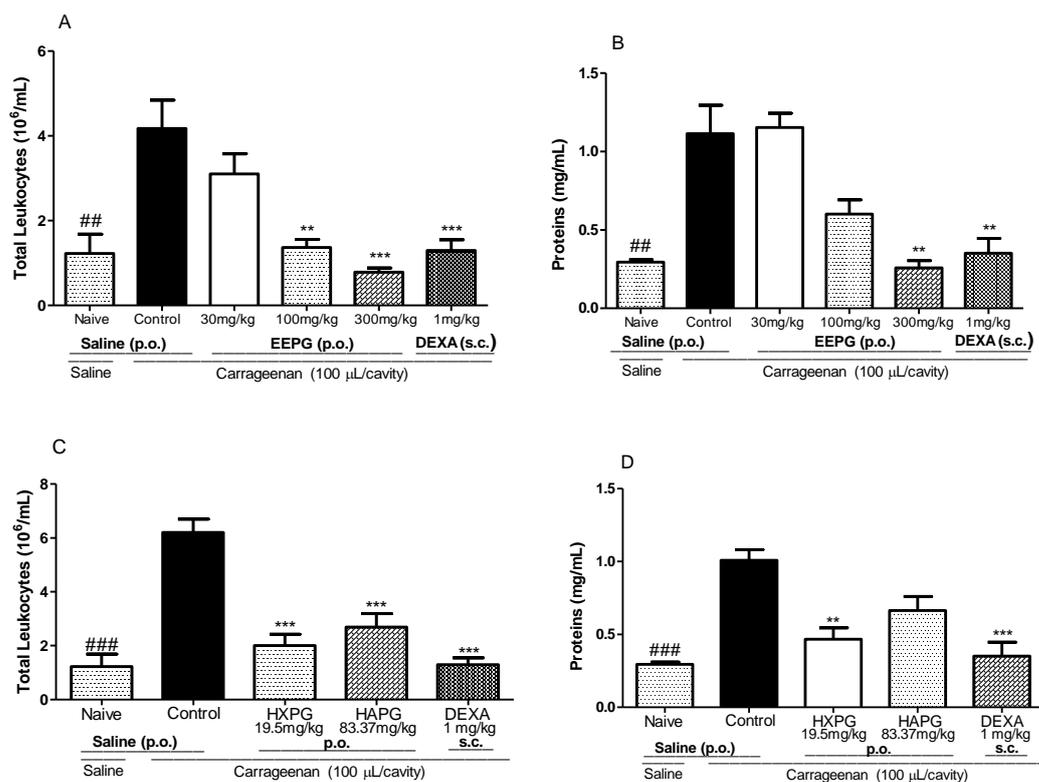


Figure 2. Effect of ethanolic extract (EEPG) (Figure A and B), hexane fraction (HXPG) and hydroalcoholic fraction (HAPG) (Figure C and D) on carrageenan-induced pleurisy in mice. The animals received EEPG (30, 100 and 300 mg/kg, p.o.), HXPG (19.5 mg/kg), HAPG (83.37 mg/kg) and control group (vehicle, p.o.) or dexamethasone 1 mg/kg, subcutaneous (s.c.) (DEXA). After 1 h, 100 μ L of carrageenan (Cg) 1% was injected into the pleural cavity of each animal. In the naive animals, (## indicates a statistically significant difference from the control group) same amount of 0.9% saline solution was injected. The animals were sacrificed 4 h after Cg injection and leukocyte migration and protein extravasation were analyzed. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 6 animals. Asterisks indicate levels of significance: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ### $p < 0.001$ compared to the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

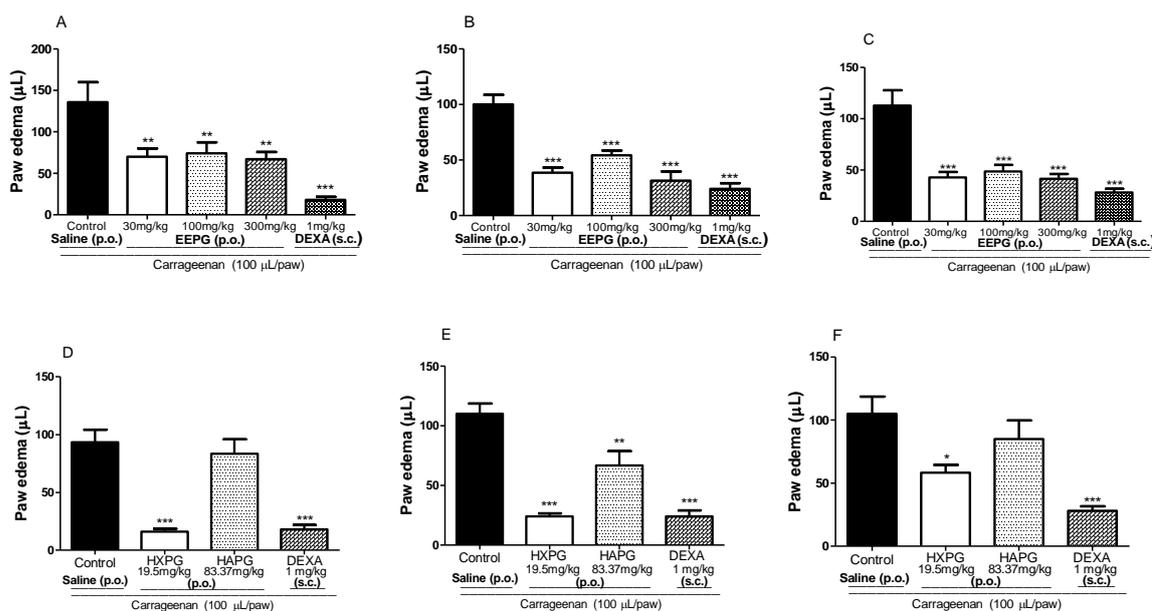


Figure 3. Effect of ethanolic extract (EEPG) (Figure A-C), hexane fraction (HXPG) and hydroalcoholic fraction (HAPG) (Figure D-F) on carrageenan induced paw edema in mice. Animals received EEPG (30, 100 and 300 mg/kg), HXPG (19.5 mg/kg), HAPG (83.37 mg/kg) and control group (vehicle, p.o.) or dexamethasone 1 mg/kg, subcutaneous (s.c.) (DEXA). After 1 h, 100 µL of 1% carrageenan was injected into the right hind paw of each animal. The figures represent the analysis of paw edema 1 h (Figure A and D), 2 h (Figure B and E) and 4 h (Figure C and F) after carrageenan injection, respectively. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 6 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

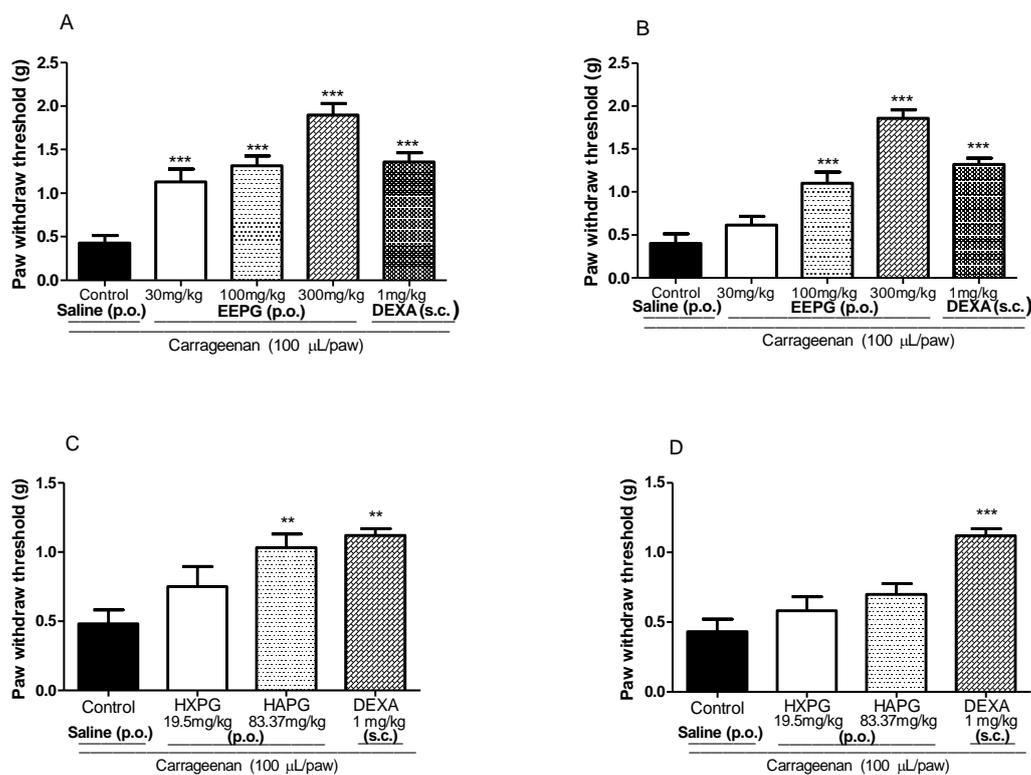


Figure 4. Effect of ethanolic extract (EEPG), hexane fraction (HXPG) and hydroalcoholic fraction (HAPG) on mechanical hyperalgesia in carrageenan-induced paw edema in mice. Animals received EEFG (30, 100 and 300 mg/kg), HXPG (19.5 mg/kg), HAPG (83.37 mg/kg) and control group (vehicle, p.o.) or dexamethasone 1 mg/kg, subcutaneous (s.c.) (DEXA). After 1 h, 100 μ L of 1% carrageenan was injected into the right hind paw of each animal. Figures A and C, B and D, represent the analysis of mechanical hyperalgesia 3 h and 4 h after carrageenan injection, respectively. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 6 animals. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

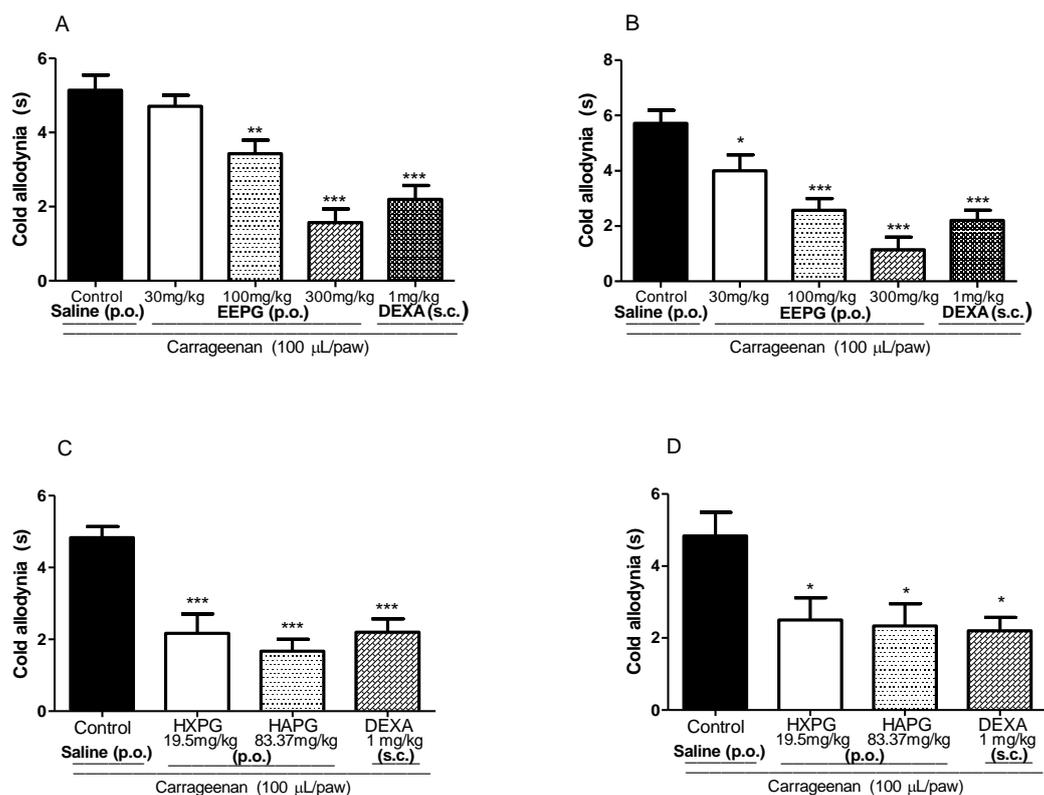


Figure 5. Effect of ethanolic extract (EEPG), hexane fraction (HXPG) and hydroalcoholic fraction (HAPG) on the cold nociceptive response to carrageenan induced paw edema in mice. Animals received EEPG (30, 100 and 300 mg/kg), HXPG (19.5 mg/kg), HAPG (83.37 mg/kg) and control group (vehicle, p.o.) or dexamethasone 1 mg/kg, subcutaneous (s.c.) (DEXA). After 1 h, 100 μ L of 1% carrageenan was injected into the right hind paw of each animal. Figures A and C, B and D, represent the analysis of cold allodynia 3 h and 4 h after carrageenan injection, respectively. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 6 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

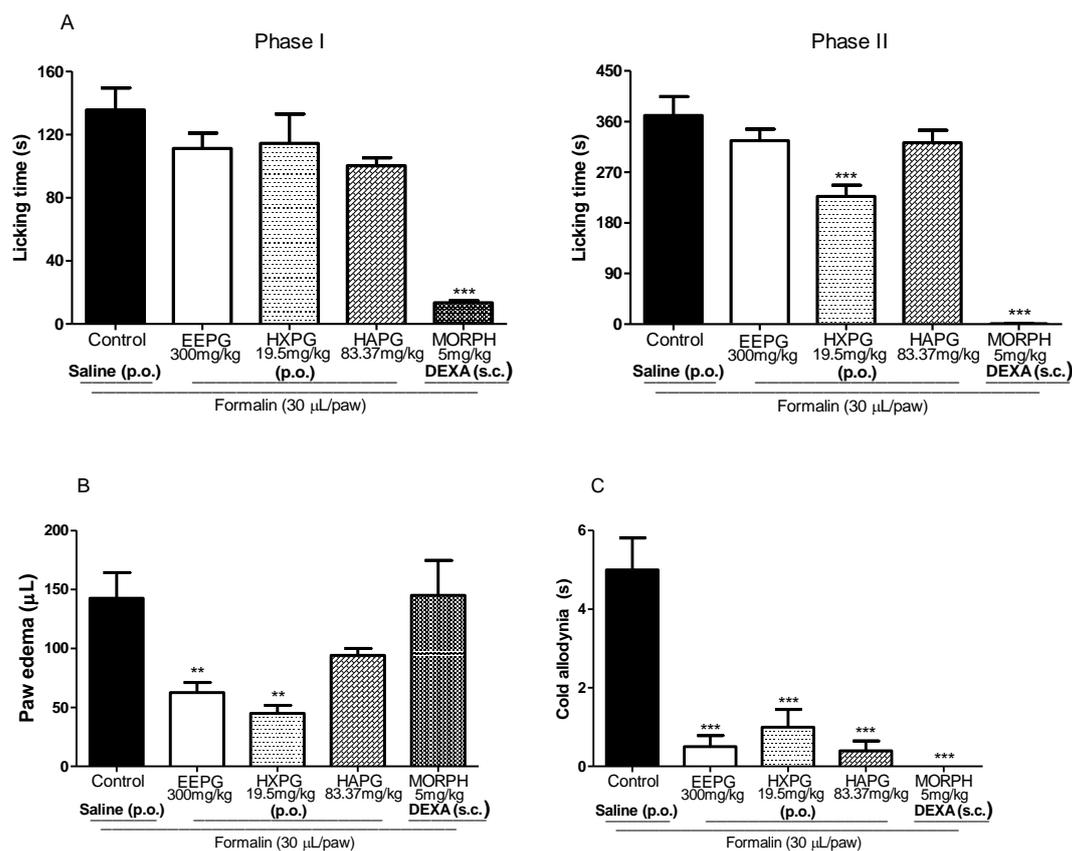


Figure 6. Effect of ethanolic extract (EEPG), hexane fraction (HXPG) and hydroalcoholic fraction (HAPG) on formalin-induced paw licking or biting in mice and on formalin-induced cold sensitivity and edema induced by formalin. Animals received EEGP (300 mg/kg), HXPG (19.5 mg/kg), HAPG (83.37 mg/kg) and control group (vehicle, p.o.) or Morphine (MORPH) (5 mg/kg, subcutaneous (s.c.)). Antinociceptive effects in phase I and II test (Figure A). Edema induced by formalin 1 h after treatment (Figure B). Cold sensitivity 30 min after treatment (Figure C). Each bar represents mean \pm S.E.M. of 6 animals. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

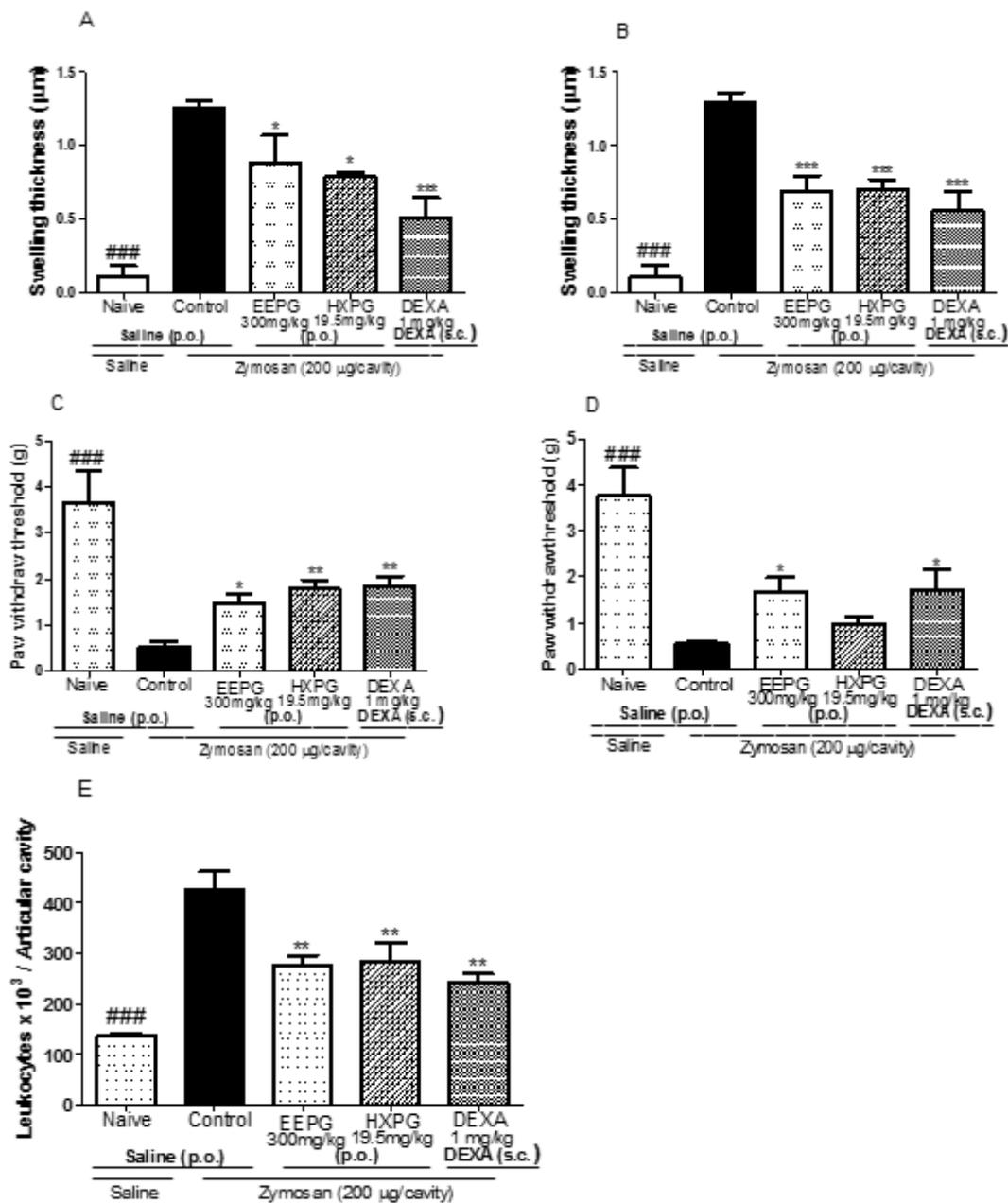


Figure 7. Effect of ethanolic extract (EEPG) and hexane fraction (HXPG) on oedema, mechanical hyperalgesia and leukocyte recruitment in zymosan-induced articular inflammation test in mice. Animals received EEGP (300 mg/kg), HXPG (19.5 mg/kg) and control group (vehicle, p.o.) or dexamethasone 1 mg/kg, subcutaneous (s.c.) (DEXA). After 1 h, 200 µg of zymosan was injected into the left knee of each animal. In the naive animals, (### indicates a statistically significant difference from the vehicle group) same amount of 0.9% saline solution was injected. Figures A and B, represent the analysis of oedema in 4 h and 6h after injection, respectively. Figures C and D, represent the analysis of mechanical hyperalgesia in 3 h and 4 h after injection, respectively. Figure E represent the analysis of leukocyte recruitment 6 h after injection. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 5 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

6 CONCLUSÕES

Pela primeira vez foi evidenciado os efeitos anti-inflamatórios e anti-hiperalgésicos do extrato etanólico e frações do extrato obtidas a partir das folhas de *P. glabratum*. Pode-se concluir que o extrato etanólico de *Piper glabratum* e as frações hexânica e hidroalcoólica obtidas a partir do extrato, determinam efeitos anti-inflamatórios e alívio da sensação dolorosa nas doses testadas. De acordo com a análise fitoquímica das frações, evidenciou-se a presença de compostos fitol, estigmasterol e β -sitosterol que são relacionados na literatura a efeitos anti-inflamatórios e analgésicas, pela modulação de moléculas de adesão celular e regulação de NFkB, importantes vias de indução inflamatória. Sendo assim, atribuímos os efeitos farmacológicos da planta a estes compostos presentes em sua composição. Os ensaio toxicológicos demonstraram uma DL50 superior a 2000 mg/kg, ausência de genotoxicidade e uma possível ação quimiopreventiva do extrato etanólico frente a agentes indutores de dano ao DNA.

7 ANEXOS

7.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 1 de agosto de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Análise toxicológica e estudo do efeito antidepressivo, anti-hiperalgésico (analgésico) e antiinflamatório de compostos e/ou óleos obtidos de Piper vicosanum, Piper glabratum e de Ocimum kilimandscharicum"**, registrada sob o protocolo de nº

26/2016, sob a responsabilidade de Cândida Aparecida Leite Kassuya e Maicon Matos Leitão – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 06/05/2016.

Finalidade	(X) Ensino () Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/08/2016 a 25/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Mus musculus/ Swiss e C57Bl/6 e Rattus norvegicus/ Wistar
Nº de animais	263
Peso/idade	20-30 g camundongos e 250-350 g ratos
Sexo	120 machos Swiss, 75 fêmeas C57Bl/6 e 48 machos e 20 fêmeas Wistar
Origem	Biotério Central da UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA