

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Piper*
glabratum EM CAMUNDONGOS

LIDIANE SCHULTZ BRANQUINHO

DOURADOS MS

2016

LIDIANE SCHULTZ BRANQUINHO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Piper*
glabratum EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal da Grande
Dourados – Faculdade de Ciências da
Saúde, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Arielle Cristina Arena

Co-orientadora: Dra. Cândida
Aparecida Leite Kassuya

DOURADOS MS

2016

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ter me dado o dom da vida e me mostrar que a Sua vontade é boa, perfeita e agradável. Obrigada Senhor pelo seu cuidado diário e o seu amor demonstrado na cruz do calvário.

Aos meus pais Antônio Moreno Branquinho e Beatriz Leani Schultz por todo amor, carinho, dedicação e pela educação que me deram. Por acreditar nos meus sonhos e serem minha força e coragem para persistir. Amo vocês!

À minha madrastra, Lucineide Santos que sempre me apoiou e acreditou na minha capacidade, que orou por mim e que demonstra carinho de mãe. Sou eternamente grata!

Aos meus irmãos, em especial Vinicius Schultz Branquinho, que eu possa ser exemplo de determinação e fé na vida de vocês. Obrigada pela grande família que construímos!

À minha prima Jackeline Schultz Soares, por todo incentivo, apoio e carinho. Obrigada, prima!

À minha orientadora Dra. Arielle Cristina Arena, e à co-orientadora Dra. Cândida Kassuya, por acreditarem em meu potencial, por confiarem no meu trabalho e por todo conhecimento transmitido durante esse tempo de trabalho. Obrigada por entenderem as minhas limitações e pela dedicação e carinho que tiveram comigo!

Às amigas de uma vida! Meu sexteto amado, Ana Paula Silvestre, Fernanda Mariano, Marília Almeida, Priscila Pereira e Talita Renovato. Obrigada por todo apoio, pela amizade verdadeira que torce e se orgulha do sucesso do outro. Obrigada por compreenderem minhas ausências, meus estresses e pelos conselhos. Amo vocês!

Às colegas de mestrado, em especial Ana Claudia Piccinelli e Joyce Alencar, por todo aprendizado, paciência e amizade. Foi um prazer conhecer vocês!

Aos professores da minha banca, Dra. Aline Lima de Barros, Dr. Jonas Mota e Dr. Ubirajara Lanza Junior, pela disponibilidade e contribuição para enriquecer nosso trabalho.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências da Saúde e professores do Mestrado em Ciências da Saúde por todo suporte, conhecimento e ajuda que contribuíram para a realização deste trabalho e minha formação profissional.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Moreno Branquinho e Beatriz Leani Schultz, que sempre me apoiaram e que não mediram esforços para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos. Que me ensinaram que trabalhar no que se ama que é realização. Por terem me mostrado que com persistência, dedicação e fé o impossível pode ser alcançado.

“Se você pode sonhar, você pode fazer”.

Walt Disney

Sumário

| | |
|--|-----|
| Resumo | vii |
| Abstract | ix |
| LISTA DE ABREVIACÕES | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Plantas medicinais | 3 |
| 2.2 Gênero <i>Piper</i> | 4 |
| 2.3 Óleos essenciais de <i>Piper</i> | 5 |
| 2.4 Estudos toxicológicos | 6 |
| 2.4.1 <i>Toxicidade aguda</i> | 7 |
| 2.4.2 <i>Toxicidade subaguda</i> | 8 |
| 2.5 Dor | 9 |
| 2.5.1 <i>Dor nociceptiva</i> | 9 |
| 2.5.2 <i>Dor neuropática</i> | 11 |
| 2.6 Processo inflamatório | 11 |
| 2.6.1 <i>Processo inflamatório agudo e crônico</i> | 12 |
| 2.6.2 <i>Fármacos anti-inflamatórios</i> | 13 |
| 3. OBJETIVOS | 15 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 15 |
| 3.2 Objetivos específicos | 15 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 16 |
| 5. ARTIGO | 24 |
| 6. ANEXOS | 55 |
| 6.1 Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA / UFGD | 55 |
| 6.2 Potencial hipoglicemiante do óleo essencial de <i>Piper glabratum</i> no teste de tolerância à glicose | 56 |
| 6.2.1 <i>Metodologia</i> | 56 |
| 6.2.2 <i>Resultados e Discussão</i> | 56 |
| 6.2.3 <i>Referências Bibliográficas</i> | 57 |

Resumo

Estudos demonstram que a espécie *Piper glabratum* (Família Piperaceae) apresenta atividades diurética e anti-parasitária. No entanto, como as pesquisas que descrevem as propriedades químicas e biológicas dessa planta são escassas, objetivou-se, neste estudo, identificar os compostos químicos do óleo essencial das folhas de *P. glabratum* (OEPG), através da técnica de cromatografia gasosa e investigar seu potencial anti-inflamatório, bem como, determinar seu índice de segurança após administração aguda e subaguda em camundongos. A toxicidade aguda foi avaliada através da administração oral de doses únicas de 500, 1000, 2000 ou 5000 mg/kg de OEPG em camundongos fêmeas. Possíveis sinais clínicos de toxicidade foram observados durante 14 dias. Nos testes de toxicidade subaguda, as fêmeas receberam 500 ou 1000 mg/kg/dia (via oral) de OEPG durante 28 dias. Para investigar os efeitos anti-inflamatórios do OEPG, foram utilizados os modelos de pleurisa, edema, hiperalgesia mecânica e alodinia ao frio em pata de camundongos. Os constituintes químicos majoritários encontrados no óleo essencial foram β -pineno (12,97%), longiborneol (12,00%), α -pineno (9,67%), cariofileno (7,95 %), viridifloreno (7,34%), β -copaeno (6,55%) e β -damascenona (5,85%). No tratamento agudo, o OEPG não ocasionou alterações comportamentais ou morte dos animais, sugerindo que a DL₅₀ é maior que 5000 mg/kg. A administração via oral subaguda de OEPG não provocou alterações bioquímicas, hematológicas ou histológicas e não houve alteração na ciclicidade estral dos animais após a realização do lavado vaginal. O OEPG apresentou atividade anti-inflamatória, inibindo a migração leucocitária em todas as doses testadas (100, 300 e 700 mg/kg), e somente a maior dose inibiu o extravasamento de proteínas do exsudato pleural. Após a injeção intraplantar de carragenina, foi observado que a dose de 700 mg/kg de OEPG reduziu a formação de edema em 1, 2 e 4 h, diminuiu a sensibilidade mecânica e a duração da sensibilidade ao frio em 3 e 4 h. Assim, neste modelo experimental foi observado que o óleo essencial das folhas de *P. glabratum* possui atividade anti-inflamatória, sem causar toxicidade em camundongos fêmeas.

Palavras-chaves: *Piper glabratum*; Óleo essencial; Inflamação; Carragenina; Toxicidade.

Abstract

Although the species of the genus *Piper* exhibit interesting biological properties, studies on *Piper glabratum* are very limited. This study aimed identify the chemical compounds of the essential oil from *P. glabratum* leaves (OEPG) by gas chromatography and investigate its anti-inflammatory potential, as well, determine the safety of this oil after acute and subacute exposure in mice. The acute toxicity of OEPG was evaluated by oral administration to female mice as single doses of 500, 1000, 2000 or 5000 mg/kg/body weight. In the subacute toxicity test, females received 500 or 1000 mg/kg/body weight of OEPG for 28 days. The anti-inflammatory potential of OEPG was evaluated using the four models including pleurisy, edema, mechanical hyperalgesia and cold allodynia models in mouse paw. After gas chromatography analysis the majority compounds were β -pinene (12.97%), longiborneol (12.00%), α -pinene (9.67%), caryophyllene (7.95 %), viridiflorene (7.34%), β -copaeno (6.55%) e β -damascenone (5.85%). No clinical signs of toxicity were observed in animals after acute treatment, suggesting that the LD50 is greater than 5000 mg/kg. The subacute exposure to OEPG produced no significant changes in hematological or biochemical parameters. Similarly, the organs histology and the estrus cycle showed no marked alterations. OEPG exhibited anti-inflammatory activity, inhibiting the leukocyte migration (100, 300, 700 mg/kg) and the protein extravasation of pleural exudate (700 mg/kg). After intraplantar injection of carrageenan, it was observed that the 700 mg/kg dose of OEPG decrease edema formation, decreased the mechanical sensitivity and sensitivity to cold. These results suggest the anti-inflammatory potential of essential oil of *P. glabratum* leaves, without cause toxicity in female mice.

Keywords: *Piper glabratum*; Essential oil; Inflammation; Carrageenan; Toxicity.

LISTA DE ABREVIações

AA: Ácido Araquidônico

AIE: Anti-Inflamatório Esteroidal

AINE: Anti-Inflamatório não Esteroidal

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: Aspartato Aminotransferase

ALT: Alanina Aminotransferase

A α : Fibra Nervosa do Tipo A- α

A β : Fibra Nervosa do Tipo A- β

A δ : Fibra Nervosa do Tipo A- δ

C: Fibra Nervosa do Tipo C

COX: Ciclooxygenase

COX 1: Ciclooxygenase 1

COX 2: Ciclooxygenase 2

COX 3: Ciclooxygenase 3

DL₅₀: Dose Letal 50%

GCR: Glucocorticoid Cytosolic Receptor

GHS: The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals

H & O: Hematoxilina e Eosina

IFN: Interferon

IL: Interleucina

IL-1: Interleucina1

IL-1 β : Interleucina1 β

IL-6: Interleucina-6

LOX: Lipooxygenase

NF- κ B: Fator Nuclear kappa B

NO: Óxido Nítrico

NOD: Diabético não Obeso

OE: Óleo Essencial

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

OEPG: Óleo Essencial de *Piper glabratum*

PAF: Fator de Ativação de Plaquetas

PBS: Tampão Fosfato-Salina

PMNs: Polimorfonucleares

s.c.: Administração Via Subcutânea

SNC: Sistema Nervoso Central

TGF: Fator de Crescimento

TNF: Fator de Necrose Tumoral

WHO: World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

O uso popular de plantas medicinais representa uma opção para os cuidados primários de saúde, sobretudo para pessoas carentes, devido à fácil obtenção e a tradição no uso de plantas com fins terapêuticos (Veiga Junior *et al.*, 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), as plantas medicinais são uma alternativa para os cuidados básicos de saúde para milhões de pessoas (WHO, 2015).

Entretanto, a maioria das indicações não apresenta validação científica, por não terem sido pesquisadas ou confirmadas em ensaios pré-clínicos e clínicos. Pode-se constatar também a carência de conhecimento científico dos compostos responsáveis pela ação biológica e sobre as possíveis interações entre as moléculas ativas existentes nas plantas (Turolla e Nascimento, 2006).

A grande aceitação no uso de plantas medicinais pela população, e seus efeitos biológicos no organismo humano incentivam pesquisas científicas envolvendo múltiplas áreas, que juntas, aumentam os conhecimentos sobre a diversidade natural. Desse modo, torna-se de grande relevância estudos científicos de validação para utilização popular de plantas medicinais, em relação à sua segurança e eficácia (Silva *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2011).

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae e possui mais de 2000 espécies, representado por ervas, arbustos frequentemente epífitos ou lianas. As espécies de *Piper* são conhecidas popularmente no Brasil como “pimenta”, “pariparobacaapeba”, “falso jaborandi”, dentre outros (Kato e Furlan, 2007). Essas espécies têm sido quimicamente estudadas como fonte de metabólitos secundários com atividade antileishmania (Nakamura *et al.*, 2006), antifúngica (Nordin *et al.*, 2014), ansiolítica (Amorim *et al.*, 2007), analgésica, anti-inflamatória (Brait *et al.*, 2015), anticonvulsivante (Lucky, 2013) e antitumoral (Iwamoto *et al.*, 2015).

As pesquisas com *Piper glabratum* são escassas, considerando as propriedades químicas e biológicas das espécies de *Piper*. Dentre os poucos estudos, foram caracterizadas estruturas de nove derivados do ácido benzoico de *P. glabratum* e *P. acutifolium*. Esses derivados do ácido benzóico de *P. glabratum* têm atividade antiparasitária contra *Leishmania* spp. (metil 3,4-

dihidroxi-5-(3'-metil-2'-butenil) benzoato) e *Trypanosoma cruzi* (3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metilbutenil) benzoato; metil 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoate; metil 3,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil) benzoate) (Flores *et al.*, 2008). Já, a atividade diurética de *P. glabratum* tem sido associada à presença de amidas do isolado 2-metoxi-4,5-metilenodioxo-transcinamoil-pirrolidina (Prando *et al.*, 2014).

Embora essa espécie apresente importantes compostos ativos biologicamente, poucos estudos avaliaram seu perfil toxicológico. Em um dos estudos encontrados na literatura, o extrato bruto das raízes de *P. glabratum* apresentou toxicidade nas doses de 1000 e 3000 mg/kg, via oral e intraperitoneal (Prando *et al.*, 2014), demonstrando a necessidade de mais testes toxicológicos. Assim, considerando o uso dessa espécie e a escassez de informações científicas que comprovem sua ação terapêutica, o presente estudo se propôs analisar a atividade anti-inflamatória e investigar o perfil toxicológico do óleo essencial extraído das folhas de *P. glabratum* em modelo animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Os mais antigos relatos sobre plantas medicinais são provenientes das civilizações da Mesopotâmia e do Egito, os quais eram escritos principalmente em papiros (Leite, 2009), sendo o Papiro de Ébers um dos mais relevantes. Datado de 1550 a.C., descreve mais de 7.000 substâncias medicinais presentes em mais de 800 fórmulas (Dias, 2005).

Na Grécia, Hipócrates, considerado o “pai da medicina”, fazia da natureza a principal escolha de remédios. Estabeleceu tratamentos à base de plantas, dietas e exercícios, utilizando aproximadamente 400 espécies, relacionando-as aos sintomas de cada paciente em particular. Além desses, outros registros descrevem o uso de muitas plantas medicinais (Eldin e Dunford, 2001).

A China, país com tradição na utilização de plantas medicinais, possui o primeiro manuscrito do uso de plantas como remédios, obra chinesa do Imperador ShenNung: “Pen T’são” (A Grande Fitoterapia), onde são mencionadas aproximadamente 360 espécies utilizadas na medicina alopata (Alonso, 1998; Eldin e Dunford, 2001).

No Brasil, o conhecimento sobre as plantas medicinais iniciou-se através da cultura indígena. Os pajés repassavam as informações sobre as ervas, que eram transmitidas de geração em geração (Martins *et al.*, 2000). O primeiro relato sobre o uso de plantas como remédio no Brasil foi feito por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587, onde descrevia as plantas medicinais utilizadas pelos índios. Com a carência de medicamentos utilizados na Europa, os médicos portugueses que chegaram ao Brasil compreenderam a relevância das plantas utilizadas como remédio pelos indígenas (Veiga Junior e Pinto, 2002).

No final do século XIX, o valor comercial das plantas medicinais aumentou, pois a capacidade de purificar, isolar ou sintetizar princípios ativos de plantas incentivou as pesquisas farmacêuticas (Newman, 2008). Os princípios ativos presentes nas plantas medicinais deram origem aos primeiros medicamentos com propriedades conhecidas (Calixto e Siqueira Jr, 2008).

O Brasil, considerado o país da “megadiversidade”, com 15 a 20% da biodiversidade mundial (Lewinsohn e Prado, 2002), com aproximadamente 40.989 espécies descritas (Forzza *et al.*, 2010). A flora brasileira é uma fonte de substâncias biologicamente ativas, possuindo um grande valor pela extensa riqueza biológica e pelo enorme potencial como fonte de novos fármacos (Barreiro, 2001). No entanto, é necessária atenção especial em relação ao uso de plantas medicinais, atentando para a identificação da espécie, possíveis adulterações, alergias, interações com medicamentos alopáticos e toxicidade. Em razão desses riscos, pesquisas estão sendo desenvolvidas, baseadas no uso popular das comunidades, para identificar benefícios e perigos das plantas (Reyes-García, 2010).

2.2 Gênero *Piper*

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae e possui mais de 2.000 espécies (Kato e Furlan, 2007). O Brasil possui uma variedade de espécies da família Piperaceae, sendo localizadas cerca de 500 espécies distribuídas em cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis* (Tebbs, 1989; Parmar *et al.*, 1997). Dentre as espécies brasileiras de *Piper*, predominam as de hábito arbustivo, com plantas morfológicamente semelhantes e folhas simples alternas e ramos segmentados unidos por nós grossos (Dyer e Palmer, 2004). Outra propriedade é o aroma, que é facilmente identificado quando qualquer parte da planta é danificada, ainda que superficialmente (Jaramillo e Manos, 2001).

Conhecidas popularmente como “pimenta”, “pariparobacaapeba”, “falso jaborandi”, dentre outros (Kato e Furlan, 2007), as espécies de *Piper* são comercialmente importantes para a produção de pimenta e pelo conteúdo oleífero de suas estruturas, sendo também utilizadas com finalidades medicinais, alimentícias, inseticidas, entre outras (Guimarães *et al.*, 2001; Junqueira *et al.*, 2007).

A espécie de *Piper* mais investigada é a *P. nigrum* (pimenta do reino), já que seus frutos com sabor picante são utilizados como condimento. A pimenta branca é produzida pelos frutos maduros e os frutos secos fornecem ao comércio a pimenta preta (Bezerra *et al.*, 2007). *P. nigrum* também possui

propriedades terapêuticas, demonstrando atividades analgésica e anti-inflamatória (Tasleem *et al.*, 2014).

Em Dourados – MS, as espécies de *Piper* relatadas com uso popular foram: *Piper aduncum* L., *Piper amalago* L., *Piper umbellata* (L.) Miq. A utilização dessas plantas tem finalidades analgésica, anestésica, para o tratamento de distúrbios gástricos e de queimaduras, sendo as folhas a parte empregada para o preparo dos remédios (Alves *et al.*, 2008).

Piper glabratum (Figura 1) é uma espécie que apresenta atividades diurética, devido a presença de amidas (Prando *et al.*, 2014) e anti-parasitária contra *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi* (Flores *et al.*, 2008).



Figura 1 (A e B): Folhas e ramos de *P. glabratum*.
FONTE: Autor, 2012.

2.3 Óleos essenciais de *Piper*

Os óleos essenciais (OE's) são compostos voláteis, complexos e naturais, extraídos a partir de plantas aromáticas durante o metabolismo secundário e caracterizados pelo forte odor apresentado (Machado e Junior, 2011). A caracterização química dos OE's pode ser obtida através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Por vezes, os constituintes majoritários representam 85% do óleo e outros constituintes aparecem em quantidades mínimas, no entanto, a proporção não esta

relacionada com sua relevância, podendo estes serem essenciais para o desempenho da ação farmacológica (Galindo *et al.*, 2010).

As diferentes propriedades biológicas atribuídas aos OE's apresentam vantagens quando comparado aos fármacos de origem sintética. Por serem naturais e biodegradáveis, normalmente possuem baixa toxicidade, atuando em diversas moléculas ao mesmo tempo (Figueiredo *et al.*, 2008). Seu baixo peso molecular e volatilidade dos compostos facilitam sua eliminação do organismo pelas vias metabólicas. Dessa forma, os OE's tornaram-se alvos de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos (Bandoni e Czepak, 2008).

Os OE's obtidos do gênero *Piper* apresentam diversas propriedades biológicas, como atividades leishmanicida (Do Carmo *et al.*, 2012), antifúngica (Da Silva *et al.*, 2014), antimicrobiana (Wan Salleh *et al.*, 2014), antipsicótica, anticonvulsivante (Oyemitan *et al.*, 2015), antioxidante, anti-inflamatória (Li *et al.*, 2014), antinociceptiva, gastroprotetora (Lima *et al.*, 2012), larvicida contra *Aedes aegypti* (Oliveira *et al.*, 2013) e acaricida (Ferraz *et al.*, 2010). Dentre os constituintes químicos encontrados nos OE's destacam-se os terpenóides (Capello *et al.*, 2015), sesquiterpenos e monoterpenos (Oyemitan *et al.*, 2015). Como as espécies de *Piper* são potentes produtoras de OE's (Maia *et al.*, 1997), podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos com ação biológica.

2.4 Estudos toxicológicos

Toxicidade é a característica de uma substância em relação à sua capacidade nociva aos organismos vivos. É a atividade da substância química em determinada concentração e tempo da exposição (Rand e Petrocelli, 1985). É fundamental estudar tal propriedade, pois qualquer substância pode ser tóxica de acordo com a dose, frequência da exposição ou situação patológica e fisiológica do organismo exposto. Assim, é necessário conhecer os riscos que a substância apresenta, de modo que sejam determinadas condições seguras de uso. Para isso, testes toxicológicos baseados em protocolos padronizados por agências reguladoras nacionais e internacionais são importantes para registro e comercialização de produtos (Mariz, 2007).

Os estudos pré-clínicos de toxicidade de produtos candidatos a fitoterápicos são regulamentados pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Essas organizações estabelecem diretrizes para estudos toxicológicos, esses guias são classificados de acordo com o tempo de exposição em: toxicidade aguda, subaguda e crônica (OECD, 2008a; OECD, 2008b; ANVISA, 2013).

No Brasil, a ANVISA fundamenta-se num roteiro publicado em 31 de janeiro de 2013: Guia Para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Este guia estabelece parâmetros para os testes toxicológicos de produtos naturais, padronizando os estudos de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, dentre outros (ANVISA, 2013).

2.4.1 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda tem como finalidade analisar os efeitos provocados após a administração de uma substância em uma única dose ou várias doses administradas durante 24 horas, como é caso de intoxicação acidental ou intencional (Simões *et al.*, 2004).

Para avaliação da toxicidade, vários estudos têm utilizado modelos animais, como mamíferos. Existem alguns protocolos recomendados pela OECD para a avaliação da toxicidade aguda. Em um dos protocolos, o *Guideline for testing of chemicals - acute oral toxicity 425*, pode-se estimar a DL₅₀ (dose letal mediana que mata 50% dos animais teste) com um intervalo de confiança, e os resultados permitem que a substância seja classificada de acordo com a GHS (*The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*) (OECD, 2008a).

A espécie animal de escolha é o rato, embora também possam ser utilizadas outras espécies de roedores, recomenda-se preferencialmente o uso de fêmeas, por serem mais sensíveis que os machos quanto à ação de substâncias. Os sinais de toxicidade que devem ser avaliados são alterações nos olhos, pêlos e mucosas, atividades do sistema nervoso central (SNC) e autônomo, reflexos, atividade motora, tremores, convulsões, salivação,

alterações do comportamento, entre outros. O princípio do teste de toxicidade aguda descrito pela OECD é evitar o uso de doses que sejam capazes de matar, empregando apenas doses moderadamente tóxicas (OECD, 2008a).

2.4.2 Toxicidade subaguda

O estudo da toxicidade após administração de doses repetidas tem como objetivo definir o potencial tóxico da substância testada através da administração de doses diárias, permitindo observar seus efeitos tóxicos nas funções fisiológicas, bioquímicas, hematológicas e histológicas e identificar e caracterizar os órgãos alvo (ANVISA, 2013). A administração das doses pode ocorrer por um período de 28 ou 90 dias e a via de administração deve ser aquela que se pretende administrar a droga em humanos e a espécie de escolha mais indicada é o rato (OECD, 2008b; Oga *et al.*, 2011; ANVISA, 2013).

Na toxicidade subaguda, os animais são observados diariamente e os parâmetros avaliados são: consumo de alimento e água, alterações na massa corporal, anormalidades motoras, comportamentais, morbidade e mortalidade, modificações bioquímicas, hematológicas, análises macroscópica e microscópica dos órgãos (OECD, 2008b).

Os estudos de toxicidade reprodutiva fazem parte da metodologia de determinação da segurança de diversas substâncias, complementando a avaliação toxicológica sistêmica. Como parâmetro da função hormonal de roedores é realizada a análise do clio estral, juntamente com a avaliação histológica dos órgãos sensíveis ao estrógeno (Dalsenter *et al.*, 2004).

Para a avaliação da ciclicidade estral, células epiteliais vaginais dos animais são observadas diariamente a partir de esfregaço ou lavado vaginal, em microscopia de luz, e a identificação das fases do ciclo estral é determinada conforme o tipo de células predominantes no esfregaço vaginal. As fases são classificadas em proestro, estro, metaestro e diestro (Gal *et al.*, 2014).

O ciclo é classificado regular quando é observada uma duração repetida de 4 a 5 dias, correspondentes a 1 dia de proestro, 1 ou 2 dias de estro e 2 a 3 dias de diestro. Em roedores o metaestro é considerado a fase inicial do diestro. A ovulação ocorre no início do proestro ao fim do estro

(Westwood, 2008).

2.5 Dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP - *International Association for the Study of Pain*) define dor como uma experiência desagradável, de natureza emocional e sensorial, associada a um dano tecidual (Lumley *et al.*, 2011). A percepção da dor é fundamental para a conservação da integridade do indivíduo, sendo um recurso de sinalização do organismo ao acontecimento de estímulos dolorosos. No entanto, a dor pode debilitar o paciente, provocando sintomas como depressão e ansiedade se persistir por longos períodos (Hunt e Mantyh, 2001; Lundeberg, 2015).

A dor é uma sensação individual sendo de difícil mensuração (Sousa, 2002). Os receptores da dor ou nociceptores são os principais responsáveis por transmitir ao SNC (Sistema Nervoso Central) a percepção de que houve uma lesão tecidual (nocicepção), e que esta precisa ser restaurada (Geffeney e Goodman, 2012). Os nociceptores são terminações nervosas livres presentes na pele, tecidos, órgãos, músculos e articulações (Guyton e Hall, 2011).

É possível classificar a dor de acordo com a presença ou não de lesão tecidual em: dor nociceptiva que promove uma resposta dolorosa em tecido normal em resposta a estímulo nocivo mecânico, de frio ou calor; dor neuropática, que está relacionada a danos no sistema nervoso e dor inflamatória que envolve lesões teciduais e infiltração de células do sistema imune (Woolf, 2010). Quanto ao tempo de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada por ser passageira, provocada por lesões agudas nos tecidos e consequente ativação de nociceptores. A dor crônica persiste por longos períodos e contribui para a doença em si (Abbadie, 2005; Lumley *et al.*, 2011).

2.5.1 Dor nociceptiva

Quando um estímulo de grande intensidade promove a lesão tecidual, ocorre a ativação de nociceptores, provocando mudanças no sinal elétrico das fibras sensoriais (Coutaux *et al.*, 2005). Desse modo, as fibras aferentes são

classificadas em A α e A β , A δ ou C e variam em grau de mielinização, estrutura, diâmetro e velocidade de condução (Julius e Basbaum, 2001).

As fibras A α e A β são de grande diâmetro, mielinizadas e possuem rápida transmissão, já as fibras A δ são de médio diâmetro, pouco mielinizadas e velocidade de condução média, e as fibras tipo C não são mielinizadas, possuem pequeno diâmetro e transmissão lenta. As fibras A δ e do tipo C, de médio e pequeno diâmetro, respectivamente, originam a maior parte dos nociceptores (Julius e Basbaum, 2001; Basbaum *et al.*, 2009).

As fibras A δ possuem duas classes de nociceptores responsivas a estímulos nocivos mecânicos, porém diferem quanto à ativação por estímulos térmicos, as fibras A δ do tipo I respondem a temperaturas elevadas (< 50° C) e as do tipo II respondem a temperaturas inferiores a 40° C. As fibras tipo C também são polimodais, respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Julius e Basbaum, 2001).

A percepção de dor rápida, fina e com localização precisa é conduzida por fibras A δ , e a sensação de queimação e dor lenta, que persiste mesmo com a interrupção do estímulo danoso corresponde à ativação de fibras do tipo C. Assim, a partir das propriedades dos nociceptores podem ser modulados os sinais de dor aguda e também desenvolver a dor crônica (alodinia) (Julius e Basbaum, 2001; Geffeney e Goodman, 2012).

Na ocorrência de um estímulo nocivo, há ativação de potencial de ação nas terminações nervosas que transmitem esse sinal da periferia até o tronco cerebral ou medula espinhal. O principal neurotransmissor excitatório dos nociceptores é o glutamato, porém há outros mediadores fundamentais nas ativações sinápticas aferentes e eferentes na pele. Por fim, os neurônios inibitórios e excitatórios transmitem sinais nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal, promovendo a percepção da dor (Dubin e Patapoutian, 2010).

Portanto, na dor nociceptiva ocorre o estímulo dos nociceptores presentes no tecido afetado, surgindo após algumas doenças ou cirurgias seguida de cicatrização e inflamação. Seu mecanismo tem o objetivo de sinalizar ao organismo que está lesionado através da ativação dos nociceptores, e a principal característica é sua curta duração (Abbadie, 2005; Lumley *et al.*, 2011).

2.5.2 Dor neuropática

A dor neuropática é um tipo de dor crônica provocada pela lesão ou disfunção do sistema somatossensorial. Uma das características da dor neuropática é a ausência de nocicepção, que pode ser provocada por danos nos nervos periféricos, na medula espinhal, no tronco cerebral e encéfalo, apresentando diferentes sintomas como queimação, hiperalgesia, disestesia ou anestesia que podem acontecer continuamente ou eventualmente (Chong e Bajwa, 2003; Vargas-Espinosa *et al.*, 2012).

A classificação da dor neuropática está relacionada com a sua localização anatômica, podendo ser periférica ou central. Em longo prazo, os danos neuropáticos da periferia provocam uma atividade irregular na vias aferentes primárias, que está relacionada a variações na excitabilidade dos nociceptores, já na medula espinhal ocorre potencialização na transmissão excitatória sensorial (Taylor, 2009; Vargas-Espinosa *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012). Essas alterações levam ao aumento da expressão nociceptiva espinhal que produzem dor exagerada a estímulos inofensivos (Pitcher e Henry, 2004).

Dessa maneira, a dor neuropática é provocada pela hipersensibilidade neuronal de várias áreas do SNC, independentemente se a dor é periférica ou central. Algumas doenças como diabetes, AIDS, esclerose múltipla e danos nervosos produzem esse tipo de dor. Diante disso, há possibilidade que existam muitos indivíduos que têm seu bem-estar prejudicado pela dor neuropática (Chong e Bajwa, 2003; Vargas-Espinosa *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012).

2.6 Processo inflamatório

O processo inflamatório é uma reação fisiológica do organismo após uma infecção ou dano tecidual que desencadeia mecanismos que alteram componentes humorais e celulares. O contato com um patógeno produz substâncias quimiotáticas no local lesionado, que promove a migração de células circulantes, produzindo alterações vasculares (Cruvinel *et al.*, 2010).

Os sintomas clínicos no local inflamado são: rubor, calor, edema e dor, conhecidos também como os sinais cardinais descritos por Cornelius Celsus no

primeiro século d.C., o quinto sinal da inflamação é a perda da função, relatado por Rudolf Virchow no século XIX (Rock e Kono, 2008; Cruvinel *et al.*, 2010). Portanto, a inflamação é um processo defensor do organismo com a finalidade de remover o agente causador da lesão, além de seus fragmentos resultantes e iniciar a restauração tecidual. Para executar sua ação protetora, a inflamação neutraliza, dilui ou destrói os agentes nocivos (Ashley *et al.*, 2012).

O processo inflamatório pode ser diferenciado em agudo e crônico. A inflamação aguda tem início logo após o dano e resulta na cura, mantendo-se por um curto período de tempo. É caracterizada pela infiltração leucocitária no local inflamado eliminando o agente causador, resultado na restauração do tecido. Por outro lado, a inflamação crônica persiste por tempo indeterminado. Tem como propriedade o estímulo constante da inflamação, gerando danos e tentativa de restauração tecidual. A inflamação crônica está relacionada a algumas doenças como artrite, aterosclerose, entre outras (Maskrey *et al.*, 2011; Tabas e Glass, 2013).

2.6.1 *Processo inflamatório agudo e crônico*

Na inflamação aguda, após a lesão tecidual o sistema imune é ativado liberando neutrófilos e leucócitos polimorfonucleares (PNMs), células responsáveis por liberar citocinas e polipeptídeos, fatores que medeiam o processo inflamatório e imunológico na fase aguda, conduzindo a resposta inflamatória até o local lesionado (quimiotaxia) (Carvalho e Lemônica, 1998; Lin *et al.*, 2000). Dessa forma a fase vascular é iniciada, com vasodilatação e o aumento da permeabilidade capilar, permitindo o extravasamento protéico para o interstício (Cruvinel *et al.*, 2010).

A indução das quimiocinas por macrófagos e mastócitos estimulam a migração de monócitos e neutrófilos a fim de manter a homeostasia (Koenen e Weber, 2011). Na vasodilatação mediada por óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, também ocorre a liberação de diversas substâncias endógenas como, bradicinina, histamina, serotonina, adenosina, substância P e produtos da cascata do ácido araquidônico (AA) presentes no exsudato, aumentando a permeabilidade vascular e conseqüentemente, o edema, antecedendo a migração e adesão de leucócitos (Carvalho e Lemônica, 1998).

Para que os leucócitos penetrem no tecido lesado, os neutrófilos e macrófagos provocam um estresse oxidativo, pela liberação de radicais livres e substâncias oxidantes, que induz fatores transcricionais, como o NF-kB, sinalizando moléculas de adesão como, integrinas e selectinas, resultando na infiltração (Buerke *et al.*, 2008).

A membrana celular é constituída principalmente por fosfolipídeos e quando há uma lesão a enzima fosfolipase A2 é ativada por vários estímulos. Esta enzima degrada os fosfolipídeos presente na membrana, produzindo AA. Este pode ser metabolizado pela enzima lipooxigenase (LOX), formando os leucotrienos, ou pela enzima ciclooxigenase (COX), produzindo prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (Hilário *et al.*, 2006).

São descritas 3 isoformas da enzima COX: COX-1 é constitutiva, pois está presente na maioria dos tecidos (estômago, intestino, rins, vasos sanguíneos e plaquetas), produzindo efeitos fisiológicos, como homeostase vascular, secreção gástrica, entre outras; COX-2 é indutiva, encontrada em locais inflamados e induzida por citocinas (IL-1, IL-2 e TNF) e outros mediadores inflamatórios e a COX-3 é pouco explorada (Brunton *et al.*, 2006).

No momento em que o processo inflamatório é iniciado, o organismo produz uma resposta a fim de restaurar os danos provocados no local lesado sem deixar fragmentos desse processo, restabelecendo a homeostase. Existem mediadores resolutores da inflamação como as resolvinas, maresinas, lipoxinas dentre outras. Se a inflamação persistir, pode ocasionar efeitos negativos no tecido afetado, progredindo para o processo inflamatório crônico, onde ocorre degeneração tecidual e fibrose. Dentre algumas doenças inflamatórias crônicas, podemos mencionar a artrite reumatóide, aterosclerose e lúpus eritematoso (Carvalho e Lemônica, 1998; Viggiano *et al.*, 2008).

2.6.2 Fármacos anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), também conhecidos como glicocorticóides possuem diversas indicações terapêuticas, sendo o tratamento de doenças imunológicas ou inflamatórias suas principais indicações. Seu mecanismo de ação inicia-se quando o esteróide lipofílico atravessa a membrana celular e interage com o receptor GCR (*Glucocorticoid cytosolic*

receptor), formando o complexo GC/CR. Este complexo se liga às sequências de DNA no núcleo da célula, promovendo a produção de proteínas anti-inflamatórias (Almawi e Melemedjian, 2002). Dessa forma, os AIE's interferem na ativação de fatores de transcrição, inibindo mediadores que produzem resposta inflamatória (NF- κ B) e de outros genes de interleucinas e citocinas (IL-1, interferon- γ (IFN- γ), TNF), ativando genes anti-inflamatórios (IL-10 e lipocortina) e reprimindo genes inflamatórios (citocinas e COX-2) (Longui, 2007; Torres *et al.*, 2012).

Os AIEs podem ser utilizados no tratamento de desordens inflamatórias, como alergias, dermatite, artrite reumatóide, câncer, entre outros (De Bosscher *et al.*, 2010). No entanto, podem causar efeitos adversos, como distúrbios metabólicos, hipertensão, osteoporose, resistência à insulina, irritação gástrica, entre outros, impedindo seu uso prolongado (Rhen e Cidlowski, 2005).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente utilizados no tratamento de diversas patologias pela eficiência no controle da dor, febre, edema e sinais envolvidos na inflamação (Marnett, 2009). Essa classe de fármacos inibe as duas isoformas da enzima COX, que bloqueiam a biossíntese prostaglandinas e tromboxanos, produtos do metabolismo do AA. A redução de prostaglandinas proporciona efeitos favoráveis, porém pode haver ocorrência de efeitos adversos, como problemas gastrointestinais (Brunton *et al.*, 2012; Tarp *et al.*, 2012).

A maior parte dos AINEs exerce seus efeitos bloqueadores tanto em COX-1 quanto em COX-2, portanto são não seletivos. Além de inibir a enzima COX-2, inibe também a enzima constitutiva COX-1, que executa funções fisiológicas no organismo, dentre elas a proteção da mucosa do estômago contra a acidez do suco gástrico (Ferreira, 2002). Já os inibidores seletivos de COX-2 inibem principalmente a atividade de COX-2, presente nos músculos e articulações a fim de impedir os distúrbios gastrointestinais (Sostres *et al.*, 2010).

Em virtude das poucas informações de atividades biológicas do óleo essencial de *P. glabratum* nativas do Mato Grosso do Sul, objetivamos analisar seu potencial terapêutico e possíveis efeitos tóxicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Analisar a toxicidade e a atividade anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *P. glabratum* em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os compostos do óleo essencial de *P. glabratum* através da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas;
- Investigar o potencial tóxico do óleo essencial de *P. glabratum* através do teste de toxicidade aguda e subaguda.
- Investigar o potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *P. glabratum* através dos testes de edema de pata e pleurisia;
- Determinar o potencial antinociceptivo do óleo essencial de *P. glabratum* na dor inflamatória;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADIE, C. Chemokines, chemokine receptors and pain. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 10, p. 529-534, 2005.

ALMAWI, W.; MELEMEDJIAN, O. Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 2, p. 69-78, 2002.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires, Argentina: ISIS Ediciones S. R. L.: 350-354 p. 1998.

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

AMORIM, M. F. D. et al. 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.

ANVISA. **Guia para condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília 2013.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.

BANDONI, A.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Edufes, 2008.

BARREIRO, E. J. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. ArTmed, 2001.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BEZERRA, D. P. et al. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2007.

BRAIT, D. R. H. et al. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 699-705, 2015.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J.; PARKER, K. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. **McGrawHill, New York**, v. 11, p. 737-8, 2006.

BUERKE, U. et al. Sodium/hydrogen exchange inhibition with cariporide reduces leukocyte adhesion via P-selectin suppression during inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 8, p. 1678-1685, 2008.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 78, p. 98-106, 2008.

CAPELLO, T. M. et al. Chemical composition and in vitro cytotoxic and antileishmanial activities of extract and essential oil from leaves of *Piper cernuum*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 2, p. 285-288, 2015.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. Salvador. v. 48, p. 137-158, 1998.

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, n. 5, p. S4-S11, 2003.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DA SILVA, J. K. R. et al. Antifungal activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* infection in black pepper. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17926-17942, 2014.

DALSENTER, P. R. et al. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 18, n. 6, p. 819-823, 2004.

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. 1035-1042, 2010.

DIAS, J. P. S. A Farmácia e a História: Uma introdução à História da Farmácia, da Farmacologia e da Terapêutica. **Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa**, 2005.

DO CARMO, D. F. M. et al. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of *Piper* species. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1819-1819, 2012.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010.

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

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia: na atenção primária à saúde**. Editora Manole Ltda, 2001.

FERRAZ, A. et al. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 243-8, 2010.

FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. **International Journal of Clinical Practice**, n. 128, p. 2-10, 2002.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FLORES, N. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1538-43, 2008.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2, p. 828, 2010.

GAL, A. et al. Vaginal fold histology reduces the variability introduced by vaginal exfoliative cytology in the classification of mouse estrous cycle stages. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 8, p. 1212-20, 2014.

GALINDO, L. A.; DE MORAES PULTRINI, A.; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 436-441, 2010.

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. 609-619, 2012.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica - 12ª Ed.** Elsevier/Medicina Nacionais, 2011.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. S206-S212, 2006.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature**, v. 2, n. 2, p. 83-91, 2001.

IWAMOTO, L. H. et al. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 948737, 2015.

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.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JUNQUEIRA, A. P. F. et al. Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an *in vivo* mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 656-663, 2007.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529-538, 2007.

KOENEN, R. R.; WEBER, C. Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, n. 12, p. 713-725, 2011.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. Atheneu, 2009.

LEWINSOHN, T.; PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. Editora Contexto São Paulo, 2002.

LI, R. et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of the stem and leaf essential oils from *Piper flaviflorum* from Xishuangbanna, SW China. **Natural Product Communications**, v. 9, p. 1011-1014, 2014.

LIMA, D. K. et al. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **Journal Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 274-282, 2012.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

LONGUI, C. A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. S163-S171, 2007.

LUCKY, O. Evaluation of anticonvulsant activity of aqueous extract and partitioned chloroform fraction of *Piper umbellatum* Linn (Piperaceae) leaves Okunrobo, Uwaya O. John, Ching Poh. Fidelis, Oloton Enosakhare. **West African Journal of Pharmacy**, v. 24, n. 1, p. 43-48, 2013.

LUMLEY, M. A. et al. Pain and emotion: a biopsychosocial review of recent research. **Journal of Clinical Psychology**, v. 67, n. 9, p. 942-968, 2011.

LUNDEBERG, S. Pain in children—are we accomplishing the optimal pain treatment? **Pediatric Anesthesia**, v. 25, n. 1, p. 83-92, 2015.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MAIA, J. et al. Banco de dados das Plantas Aromáticas da Amazônia: Inventário das Espécies de *Piper*. **Banco de dados das Plantas Aromáticas da Amazônia: Inventário das Espécies de Piper**, 1997.

MARIZ, S. R. Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 265-290, 2009.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MASKREY, B. H. et al. Mechanisms of Resolution of Inflammation A Focus on Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 1001-1006, 2011.

MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 365-359, 2011.

NAKAMURA, C. V. et al. 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.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589-99, 2008.

OECDa. **Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. OECD Publishing, 2008.

OECDb. **Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**. OECD Publishing, 2008.

OGA, S.; CARVALHO, M.; BATISTUZZO, J. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu; 2008.

OLIVEIRA, G. L. et al. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L.(Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1227-1234, 2013.

OYEMITAN, I. A. et al. Psychoneuropharmacological activities and chemical composition of essential oil of fresh fruits of *Piper guineense* (Piperaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 166, p. 240-249, 2015.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PITCHER, G. M.; HENRY, J. L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. **Experimental Neurology**, v. 186, n. 2, p. 173-197, 2004.

PRANDO, T. B. L. et al. Amides from *Piper* as a diuretic: behind the ethnopharmacological uses of *Piper glabratum* Kunth. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. FMC Corp., Princeton, NJ. 1985

REYES-GARCÍA, V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, p. 32, 2010.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

SILVA, L. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 830-835, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SOSTRES, C. et al. 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. 121-132, 2010.

SOUSA, F. A. E. F. Dor: o quinto sinal vital. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 10, n. 3, p. 446-447, 2002.

TABAS, I.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 166-172, 2013.

TARP, S. et al. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the C-reactive protein level in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Arthritis & Rheumatology**, v. 64, n. 11, p. 3511-3521, 2012.

TASLEEM, F. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7S1, p. S461-8, 2014.

TAYLOR, B. K. Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain. **Current Pain and Headache Reports**, v. 13, n. 3, p. 208-214, 2009.

TEBBS, M. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the new world. I: Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. **Bulletin of the British Museum. Natural History. Botany**, v. 19, p. 117-158, 1989.

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.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

VARGAS-ESPINOSA, et al. Antiepileptic drugs for the treatment of neuropathic pain: a systematic review. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 17, n. 5, p. e786-e793, 2012.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VIGGIANO, D. P. et al. Prevalence of thyroid autoimmune disease in patients with systemic lupus erythematosus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 531-536, 2008.

WAN SALLEH, W. M.; AHMAD, F.; YEN, K. H. Chemical compositions and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper abbreviatum*, *P. erecticaule* and *P. lanatum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v. 9, n. 12, p. 1795-1798, 2014.

WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 375-384, 2008.

WHO traditional medicine strategy 2014–2023. 2013. **Geneva: World Health Organization**, 2015.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742-3744, 2010.

XU, B. et al. Translational investigation and treatment of neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012.

5. ARTIGO

Este trabalho deu origem ao artigo “**Avaliação da toxicidade e da atividade anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *Piper glabratum***”, que após versado para o inglês, será submetido ao periódico “Journal of Ethnopharmacology” (fator de impacto 3.055).

Author's Accepted Manuscript

Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves

Lidiane Schultz Branquinho, Joyce Alencar Santos, Claudia Andrea Lima Cardoso, Jonas da Silva Mota, Ubirajara Lanza Junior, Cândida Aparecida Leite Kassuya, Arielle Cristina Arena



PII: S0378-8741(16)30644-4
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.008>
Reference: JEP10655

To appear in: *Journal of Ethnopharmacology*

Received date: 8 September 2016
Revised date: 6 January 2017
Accepted date: 6 January 2017

Cite this article as: Lidiane Schultz Branquinho, Joyce Alencar Santos, Claudia Andrea Lima Cardoso, Jonas da Silva Mota, Ubirajara Lanza Junior, Cândida Aparecida Leite Kassuya and Arielle Cristina Arena, Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.008>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting galley proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain

Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper****glabratum* leaves**

Lidiane Schultz Branquinho^a, Joyce Alencar Santos^a, Claudia Andrea Lima Cardoso^b,
Jonas da Silva Mota^b, Ubirajara Lanza Junior^a, Cândida Aparecida Leite Kassuya^a,
Arielle Cristina Arena^{a,c*}

^aSchool of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil

^bMato Grosso do Sul State University (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil

^cDepartment of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP – Univ. Estadual Paulista - Botucatu, São Paulo State, Brazil

lid.schultz@gmail.com

joycynha_as@hotmail.com

claudia@uems.br

jonas@uems.br

lanzafarmacologia@gmail.com

candida2005@gmail.com

ariellearena@ibb.unesp.br

*Corresponding author at: Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubião Junior, s/n, Caixa Postal – 510; CEP: 18618970; Botucatu – SP. Tel.: +55 14 38800495.

Abstract**Ethnopharmacological relevance**

Although some of the species of the genus *Piper* exhibit interesting biological properties, studies on *Piper glabratum* Kunth are very limited.

Aim of the study

This study investigated the anti-inflammatory activity and the toxicological profile of the essential oil from *P. glabratum* leaves (OEPG) in mice.

Materials and Methods

The acute toxicity of OEPG was evaluated by oral administration to female mice as single doses of 500, 1000, 2000 or 5000 mg/kg/body weight. In the subacute toxicity test, the females received 500 or 1000 mg/kg/body weight of OEPG for 28 days. The anti-inflammatory potential of OEPG was evaluated using four models including pleurisy, edema, mechanical hyperalgesia and cold allodynia models in mouse paws.

Results

No clinical signs of toxicity were observed in animals after acute treatment, which suggested that the LD₅₀ is greater than 5000 mg/kg. The subacute exposure to OEPG produced no significant changes in the hematological or biochemical parameters. Similarly, the histology of the organs and the estrus cycle displayed no marked alterations. OEPG exhibited anti-inflammatory activity as indicated by inhibition of the leukocyte migration (100, 300, 700 mg/kg) and the protein extravasation into the pleural exudates (700 mg/kg). After intraplantar injection of carrageenan, it was observed that the 700 mg/kg dose of OEPG reduced edema formation and decreased the sensitivity to mechanical stimulation and cold.

Conclusions

These results demonstrate the anti-inflammatory potential of the essential oil of *P. glabratum* leaves in the absence of toxicity in female mice.

Keywords

Piper glabratum; Essential oil; Inflammation; Carrageenan; Toxicity

1. Introduction

Various species of plants used in folk medicine can be new sources of bioactive molecules with pharmacological relevance (de Melo et al., 2011). However, the popular knowledge should be scientifically validated through clinical and experimental studies to prove the efficacy and safety of these species (TrivellatoGrassi et al., 2013).

The genus *Piper* (Piperaceae family), traditionally known as “pepper,” “pariparoba caapeba” and “false jaborandi” (Kato and Furlan, 2007), includes approximately 2000 species that are distributed in tropical and subtropical regions. This genus is used for different purposes such as preparation of drinks in different cultures, condiment and for the treatment of several diseases, including, among others, digestive disorders, inflammation, loss of appetite (Bezerra et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Gogosz et al., 2014).

Chemical and pharmacological evaluations have revealed that many species of the *Piper* genus possess secondary metabolites with important therapeutic activities, including antiparasitic (Nakamura et al., 2006), antifungal (Nordin et al., 2014), anxiolytic (Amorim et al., 2007), analgesic, anti-inflammatory (Brait et al., 2015), anticonvulsant, (Lucky, 2013), and antitumoral (Iwamoto et al., 2015), as well as other activities.

Few studies are available in the literature regarding the chemical and biological properties of the species *Piper glabratum* Kunth. In one of the studies found, Flores et al. (2008) elucidated and characterized a set of benzoic acid-derived structures from *P. glabratum* that showed antiparasitic activity against *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. Furthermore, Prando et al. (2014) demonstrated that a methanol extract of *P. glabratum* roots caused liver toxicity and high mortality in high doses (1000 and 3000 mg/kg, intraperitoneal route). The same authors have shown that the diuretic activity of

P. glabratum that is the basis for its use in folk medicine is associated with the presence of amides of the isolated 2-methoxy-4,5-methylenedioxy-transcinamoil-pyrrolidine.

Considering the biological potential and the limited scientific information about this species, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory activity and the toxicological profile of the essential oil extracted from the leaves of *P. glabratum* in an animal model.

2. Materials And Methods

2.1. Plant material, preparation and isolation of essential oil

Piper glabratum Kunth leaves were collected (latitude 22°12'37", 7" south and longitude 54°55'03", 2" west) in November 2014. A voucher specimen was identified by Dr. Elsie Franklin Guimarães and deposited (DDMS 4412) in the DDMS herbarium of the Federal University of Grande Dourados (UFGD).

The sample was analyzed by gas chromatography using a GC-2010 Plus instrument (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with an autoinjector split/splitless. The chromatographic separation was performed on a DB-5 column 5% phenyl-dimethylpolysiloxane (30 m long x 0.25 mm diameter x 0.23 mm of film thickness) under the following conditions: carrier gas helium (99.999%) at a flow rate of 1 mL/min; 1 μ L of injection volume with split ratio (1:20). The temperature program on the first column started at 50 °C for 5 min and heating at 3 °C/min till 250 °C. The injector transfer line and detector temperature used were maintained at 250°C. The MS scan parameters included electron impact ionization voltage at 70 eV, a mass range from 45 to 600 Daltons and a scan interval of 0.3 s. Temperature-programmed retention indexes were calculated using a mixture of normal alkanes (C6-C30) as external references. Identification of compounds was performed using retention index by comparing and interpreting the mass spectra of unknown components with the ones of

the Wiley mass spectra library Wiley MS 6th Edition and literature Adams (2001).

Relative area percent for each chromatographic peak was employed as abundance approach to evaluate the contribution of each compound area to the total area for comparison between the samples. The sum of all areas was considered 100% of the sample and for each peak a percentage corresponding to its area was assigned.

2.2. Animals

Adult male and female Swiss mice (50 days old, 20-30 g, n = 88) were provided by the UFGD. The animals were maintained under controlled temperature (23 °C), with a constant 12 h light-dark cycle and free access to food and water. The experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation at the UFGD (Protocol number 024/2014).

2.3. Toxicity studies

All procedures were carried out using the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) - Guidelines 425 and 407 (OECD, 2008a, 2008b). Although the preferred rodent species is the rat, other rodent species may be used. The mouse is smaller than the rat and has been shown to be a good model for toxicological and pharmacological studies (Alamgeer et al., 2016; Kandhare et al., 2016). The toxicity tests were performed only in females because the literature indicates that females are generally slightly more sensitive (OECD, 2008a). The maximum volume of the essential oil administered did not exceed 1 mL/100g/body weight in all tests.

2.3.1. Acute oral toxicity

The essential oil from *P. glabratum* leaves (OEPG) was administered by gavage at a dose of 500 mg/kg to one female following fasting for 8 hours. Sequentially, at intervals of 48 hours, a second animal received 1000 mg/kg, a third animal a dose of

2000 mg/kg, and a fourth received 5000 mg/kg. Because none of the animals died, another 4 animals received a dose of 5000 mg/kg. Another parallel group was treated with the vehicle (0.9% saline solution) to establish a comparative negative control group.

The animals were observed periodically during the first 24 hours after treatment and then daily for a total of 14 days. The five parameters of the Hippocratic screening (Malone and Robichaud, 1962) were analyzed as described previously (Traesel et al., 2014). Daily water and feed intakes and body weight were also measured (OECD, 2008a).

At the end of the observation period, all animals were anesthetized (Isoflurane, 1.5%), and the organs (heart, spleen, liver) were removed, weighed and examined macroscopically.

2.3.2. *Subacute oral toxicity*

The females were divided into three experimental groups (n=6 animals/group). Two different doses of OEPG (500 or 1000 mg/kg) were administered per group, orally (gavage), daily for 28 consecutive days. The control group received only the vehicle (saline solution, 0.9%). The doses were chosen based on Guideline 407 from the OECD (Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents) (OECD, 2008b). The doses were chosen based on the evaluation of the anti-inflammatory activity because the low effective dose is 100 mg/kg. Thus, the doses chosen can be considered safe, since they are 5 and 10 times greater than the therapeutic dose. We understand that the guideline suggest at least one dose level of at least 1000 mg/kg body weight/day (OECD, 2008b).

During treatment, daily body weight, food and water intakes, and possible signs of toxicity were observed and recorded, following the Hippocratic screening. At the end of the observation period, all animals were anesthetized (Isoflurane, 1.5%). Blood

samples were collected from the renal vein with and without anticoagulant (Heparin 5.000 UI/mL, Heparin® - Cristália) for subsequent hematological and biochemical analysis.

The biochemical parameters urea, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were analyzed with a Bioplus Bio200 instrument using commercial kits (Gold Analise). The hematological analysis measured total and differential leukocyte counts, erythrocytes and platelets, as well as the levels of hemoglobin, hematocrit and red cell distribution width using the XT-4000i instrument (Sysmex).

After collecting blood, the vital organs (heart, lung, kidney, liver, and spleen) and reproductive organs (uterus and ovaries) were weighed. The tissues were buffered formalin-fixed, embedded in paraffin and sectioned at 5 µm. The sections were stained with hematoxylin and eosin and observed by light microscopy for general histopathological examination (degeneration, necrosis, apoptosis, leukocyte infiltration, congestion, extravasation of blood and fibrosis) (Cunha et al., 2009; Martey et al., 2010).

2.3.2.1. *Estrous cycle determination*

Vaginal smears were taken to provide information on estrous cyclicity during the subacute toxicity study. The estrous cycle was assessed during the 6 days before and 14 days during the test, for 20 consecutive days. For this evaluation, 20 µL of saline was deposited and aspirated from the vagina with the aid of a pipette, and the cell suspension was expelled onto a glass slide. The material was examined under a light microscope, and the estrous cycle phases were classified as diestrus, proestrus, estrous and metestrus.

The proestrus phase consists of a predominance of nucleated epithelial cells, and the estrous consists of anucleated cornified cells. The metestrus phase consists of the

same proportion of leukocytes, cornified, and nucleated epithelial cells, and the diestrus phase primarily consists of a predominance of leukocytes (Marcondes et al., 2002). The estrous cycle duration was calculated as the number of days between one estrous phase to the next.

2.4. Anti-inflammatory activity

2.4.1. Carrageenan-induced pleurisy

Separate groups of male mice ($n = 6/\text{group}$) were orally treated with a single dose of OEPG (10, 100, 300, and 700 mg/kg), or vehicle (saline solution). In the positive control group, dexamethasone was administered at dose of 1 mg/kg subcutaneously. Pleurisy was induced in experimental groups by intrapleural injection of 100 μL of 1% carrageenan suspension according to Velo et al. (1973). The naive group was treated with 100 μL of sterile saline by intrapleural injection (Vinegar et al., 1973). After four hours, the mice were killed with overdose of Isoflurane (1.5%) and the pleural exudate were obtained after rinsing with 1 mL of phosphate buffered saline (PBS). Fifty μL of pleural exudate was diluted with 1000 μL Turk's solution to count the total leukocytes in a Neubauer chamber. About 950 μL of exudate were centrifugated and the protein (to verify protein extravasation) was dosed by Bradford method (Bradford, 1976).

2.4.2. Carrageenan-induced mice paw edema

Male mice ($n = 6/\text{group}$) were treated by oral route with OEPG (10, 100, 300, and 700 mg/kg) or the vehicle (saline solution). This dose was selected based on the results of OEPG in pleurisy model. Different groups were treated by subcutaneous route with positive control, dexamethasone (1 mg/kg). After 1 h, edema was induced by injection of a solution of 50 μL of carrageenan (300 $\mu\text{g}/\text{paw}$) in the right paw. The left paw received injection of sterile 0.9% saline. The paw oedema were evaluated after 0.5,

1, 2 and 4 h after the carrageenan injection with plethysmometer. The results were expressed as μL according to Kassuya et al. (2005).

2.4.3. Mechanical hyperalgesia

Separate groups of animals ($n = 6/\text{group}$) were orally treated with a saline solution, OEPG (10, 100, 300, and 700 mg/kg) or injected with dexamethasone (1 mg/kg; s.c.). After 1 h from respective treatment, an intraplantar injection of a solution containing carrageenan (300 $\mu\text{g}/\text{paw}$) was performed for each animal in the right paw while in the left paw an injection of saline was made. After carrageenan treatment, mice were housed in suspended platform to analyze the mechanical hyperalgesia. A analgesymeter (Insight $\text{\textcircled{R}}$ -EFF 301 -Digital analgesymeter -von Frey) was used to test mechanical response 3 and 4 h after carrageenan administration.

2.4.4. Cold sensitivity

Cold response was evaluated after the acetone drop test as described by Decosterd and Woolf (2000). Male mice ($n = 6/\text{group}$) were treated by oral route with OEPG (10, 100, 300, and 700 mg/kg), saline solution or dexamethasone (1 mg/kg; s.c.). The animals were housed in suspended platform and acetone (20 μL) was distributed in the skin of plantar surface of the right hind paw. The cold sensitivity reaction as indicated by paw licking, shaking or rubbing the paw was observed and recorded. The duration of the testing was 30 s.

2.5. Statistical analyses

The data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences among the groups were evaluated using analyses of variance (one-way ANOVA) followed by Newman-Keuls tests. The statistical differences were considered

to be significant at $p < 0.05$. The graphs were produced using GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A).

3. Results

The yield of the oil obtained was 0.37% (w/w). The main compounds found in the OEPG were β -pinene (12.97%), longiborneol (12.00%), α -pinene (9.67%), caryophyllene (7.95%), viridiflorene (7.34%), β -copaene (6.55%) and β -damascenone (5.85 %) (Table 1).

OEPG did not cause death or signs of toxicity either immediately after or during the post-treatment period after the single exposure. Furthermore, water and food consumption did not differ among the experimental groups. There were no significant differences in the body weight and/or the weight of the organs among the groups (data not shown).

Similarly, after the subacute exposure, the animals did not exhibit any signs of toxicity. The body weights and the weights of the organs analyzed were similar among groups (Table 2). The macroscopic and histological analyses revealed no changes such as necrosis, apoptosis or any abnormalities in the organs (data not shown). The hematological and biochemical parameters were also similar among the groups (Table 3). The duration of the estrous cycle and the number of cycles were not altered during the period of evaluation (20 days) (Table 4).

OEPG (except for the low dose of 10 mg/kg) significantly inhibited the leukocyte migration at doses of 100, 300 and 700 mg/kg with a maximal inhibition of $92 \pm 1\%$ at the 700 mg/kg dose. However, only the highest dose (700 mg/kg) significantly inhibited the protein extravasation (Figure 1).

No anti-edematogenic effects of OEPG were observed during the first 30 min after carrageenan administration. However, 1 h, 2 h, and 4 h after the carrageenan injection, the 700 mg/kg dose were the most efficient with $43 \pm 13\%$, $44\% \pm 16\%$, and $39.4 \pm 9\%$ inhibition, respectively, while the dose of 100 and 300 mg/kg presented significant anti-inflammatory effects after 2 and 4 h from carrageenan injection (Figure 2). Dexamethasone (positive control) produced inhibition of $80 \pm 5\%$ at 1 h, $68 \pm 9\%$ at 2 h and $57 \pm 14\%$ at 4 h (Figure 2).

OEPG produced significant antihyperalgesic effects compared to the control group. It was found that oral administration of OEPG at a dose of 700 mg/kg reduced the mechanical hyperalgesia in the carrageenan-treated animals by 100% at 3 and 4 h after injection, similar to that observed following treatment with dexamethasone (positive control). Moreover, the dose of 300 mg/kg showed significant efficacy in reduction of mechanical sensitivity in mice (Figure 3). OEPG (700 mg/kg) significantly attenuated the duration of cold nociception at 3 and 4 h after carrageenan injection with a maximum inhibition of $36 \pm 2\%$ and $23 \pm 2\%$, respectively (Figure 4). The dose of 300 mg/kg of OEPG also reduced significantly the cold response to acetone in mice after 3 h from carrageenan injection.

4. Discussion

Recently, studies have demonstrated that species belonging to the *Piper* genus possess an important therapeutic potential (Brait et al., 2015, Oesterreich et al., 2015). However, few of the species of this genus have been investigated with respect to their medicinal effects and toxicity profiles. This study may represent the first investigation to demonstrate the anti-inflammatory activity of the essential oil from *P. glabratum* leaves.

Because many medicinal species produce toxic effects, it is important to conduct studies that assess their safety before evaluating their therapeutic potential (de Melo et al., 2011). The methanolic extract of *P. glabratum* exhibited liver toxicity and a high mortality after intraperitoneal administration of 3000 mg/kg in female rats. Moreover, this extract may induce acute toxicity (Prando et al., 2014). In this study, the essential oil of *P. glabratum*, unlike its methanol extract, showed a low acute oral toxicity in mice, on the basis that none of the doses resulted in death or changes in the behavioral parameters that were observed. It is therefore suggested that the oral LD50 for female mice is greater than 5000 mg/kg, and this oil can be classified as a low-toxicity oil according to the OECD (2008a).

Regulatory agencies require biochemical, hematological and histopathological evaluations to characterize the toxicological potential of any substance to which repeated exposures are intended (OECD, 2008b). In the subacute toxicity test, OEPG produced no changes in any of the parameters evaluated. Similarly, the essential oil of another species belonging to the *Piper* genus, *Piper aduncum* (1000, 2000, 2350, 2500, 2700 and 3000 mg/kg), also demonstrated low toxicity after single or repeated administration (Sousa et al., 2008), which supports the hypothesis that the essential oil of this species is also a low-toxicity oil.

The regularity of the estrous cycle is essential for ovulation and maintenance of pregnancy and is regulated by the action of progesterone and estrogen. Any alterations in plasma concentrations of these hormones can affect the estrous cyclicity of animals and thus impair fertility (Lewis et al., 1978). In this regard, oral administration of the methanol extract of *Piper betel* (500, 1000 and 1500 mg/kg) showed anti-estrogenic activity and resulted in infertility in mice (Biswal, 2014). This result demonstrated the need for evaluations of the female reproductive parameters after exposure to species of

the genus *Piper*. The results from the present study indicated that OEPG at doses of 500 and 1000 mg/kg did not alter the duration of the estrous cycle and the frequency of each phase. However, other fertility tests should be conducted to confirm the safety of use of OEPG with respect to reproductive parameters.

Male mice are more used for inflammation and pain because there is no variation in the estrous cycle but the females mice are also considered for the tests of pain and inflammation (Long et al., 2016). Since the fluctuation of hormones influences the inflammatory parameters, we prefer to use males for these tests. To evaluate the anti-inflammatory effects of OEPG, the carrageenan-induced pleurisy model was used. In this classical test to assess acute inflammation, the exudate formation in the pleural cavity is characterized by infiltration of polymorphonuclear leukocytes and release of chemical mediators of inflammatory processes (Oliveira et al., 2012). The acute inflammatory process can be inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as indomethacin or by corticosteroids (e.g., dexamethasone). These drugs can be used as positive controls in inflammatory tests because they inhibit leukocyte migration and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression after carrageenan administration (Nantel et al., 1999).

OEPG decreased the total leukocyte migration in the pleural cavity following carrageenan induction, which suggested that it might have an anti-inflammatory activity. The protein extravasation was also inhibited, which showed that OEPG modulated vasodilation. Similarly, studies performed by our research group have shown that doses of 100 and 300 mg/kg of the essential oil of *Piper vicosanum* significantly decreased the volume of the pleural exudate and the leukocyte recruitment into the pleural cavity, as well as reduced the paw edema induced by carrageenan (Brait et al., 2015).

Carrageenan-induced paw edema is associated with an acute inflammatory process that produces the cardinal signs of inflammation (Morris, 2003). This model is considered to be biphasic with multiple mediators that act in sequence to produce an inflammatory response. In the acute phase (1-2 h), histamine, serotonin and kinins are released, whereas the next phase (3-6 h) of the inflammatory response is characterized by increases in prostaglandin production, COX-2 activation, and release of nitric oxid (NO) (Di Rosa et al., 1971, Posadas et al., 2004). According to the results of this study, OEPG reduced edema formation within 4 h, which may suggest that the components of this essential oil affect prostaglandin production. The effects of all doses tested were similar to those of dexamethasone, the drug used as a positive control, which confirmed the anti-edematogenic potential of OEPG. Similarly, the dichloromethane extract of *Piper umbellatum* decreased the paw edema formation for up to 4.5 h (Iwamoto et al., 2015), which supports the hypothesis that this species interferes with the formation of arachidonic acid metabolites.

After tissue injury, peripheral sensitization is triggered by mediators including the cytokines TNF and IL-1 β , which promote the synthesis of other mediators including NO, chemokines, and kinins, among others. The increase in the pain sensitivity is a common characteristic of the inflammatory response that involves a reduction in the type C nerve fiber activation that is induced by mechanical stimuli, which promotes allodynia (Curfs et al., 1997, Zhang and An, 2007). Treatment with OEPG decreased the paw withdrawal threshold, reducing the carrageenan-induced hyperalgesia by 100%. This result was statistically similar to that of dexamethasone. In the nociception caused by acetone, OEPG attenuated the duration of cold sensitivity, which demonstrated its anti-hyperalgesic and antinociceptive potentials. Our research group has shown that the ethanol extract of *Piper amalago* has anti-hyperalgesic, anti-nociceptive and anti-

arthritic activities in an acute and chronic pain model induced by formalin (Arrigo et al., 2016). In this same pain model, the essential oil of *Piper aleyreanum* also showed a significant analgesic effect (Lima et al., 2012), which is consistent with the results obtained in the present study.

Assis et al. (2013) identified the sesquiterpenes (caryophyllene, 14.6% and longiborneol, 12.0%) as the main components found in the essential oil of *P. glabratum* leaves. In this study, the major constituents found in OEPG were monoterpenes, sesquiterpenes and carotenoids, all of which are compounds that have shown interesting biological properties. Studies have shown that α -pinene has anti-inflammatory and analgesic activities that result from the inhibition of COX-2 (Li et al., 2016). High concentrations of α -pinene and β -pinene produce an anti-edematogenic response in the first phase in an experimental model of paw edema (Franco et al., 2011). Thus, these compounds may be related to the therapeutic effects found in this study.

The essential oil from the *P. glabratum* leaves showed anti-inflammatory, anti-edematogenic and antinociceptive activities in mice without causing acute or subacute toxicity. Other studies should be conducted to evaluate the mechanisms of action and to identify the compound responsible for the anti-inflammatory activity, as well as other aspects of toxicity.

Authors' contributions

All authors participated in the design, interpretation of the studies, analysis of the data and review of the manuscript; LSB and JAS conducted the experiments; CALC and JSM were involved in the preparation and isolation of essential oil; ULJ performed the anti-inflammatory assays; CALK and ACA performed data analyses and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

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

References

- Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed.
- Alamgeer, Naz, H., Rasool, S., Raza, S.A., Ahmad, T., Ahsan, H., Mushtaq, M.N., Asif, H., Khan, Z., Noor, N., Utra, A.M., Umme-Habiba-Hassan., 2016. Anti-Inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the aqueous methanolic extract of *Berberis calliobotrys* in albino mice. *Acta Pol. Pharm.* 73(3), 717-723.
- Amorim, M.F., Diniz, M.F., Araújo, M.S., Pita, J.C., Dantas, J.G., Ramalho, J.A., Xavier A.L., Palomaro, T.V., Júnior, N.L.B., 2007. The controvertible role of Kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 448-454.
- Arrigo, J.S., Balen, E., Júnior, U.L., da Silva Mota, J., 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. *J. Ethnopharmacol.* 179, 101-109.
- Assis, A., Brito, V., Bittencourt, M., Silva, L., Oliveira, F., Oliveira, R., 2013. Essential oils composition of four *Piper* Species from Brazil. *J. Essent. Oil Res.* 25, 3: 203-209.

- Bezerra, D.P., Militão, G.C., de Castro, F.O., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Silveira, E.R., et al., 2007. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicol. In Vitro*. 21(1):1-8.
- Biswal, S., 2014. Phytochemical analysis and a study on the antiestrogenic antifertility effect of leaves of *Piper betel* in female albino rat. *Anc. Sci. Life*. 34:1, 16-22.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.
- Brait, D.R.H., Vaz, M.S.M., Arrigo, J. da S., de Carvalho, L.N.B., de Araújo, F H.S., Vani, J.M., Mota, J. da S., Cardoso, C.A.L., Oliveira, R.J., Negrão, F.J., Kassuya, C.A.L., Arena, A.C., 2015. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. *Regul. Toxicol. Pharm.* 73, 699-705.
- Cunha, L.C., Azeredo, F.S., Mendonca, A.C.V., Vieira, M.S., Pucci, L.L., Valadares, M.C., et al., 2009. Acute and subacute toxicity studies of the latex and of the ethanolic extract of the leaves of *Synadenium umbellatum* Pax in rats. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 403-411.
- Curfs, J.H., Meis, J.F., Hoogkamp-Korstanje, J.A., 1997. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin. Microbiol. Ver.* 10, 742-780.
- Decosterd, I., Woolf C.J., 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 87:2, 149-158.
- de Melo, J.G., Santos, A.G., de Amorim, E.L.C., Nascimento, S.C.D., de Albuquerque, U.P., 2011. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2011, 365359.

- Di Rosa, M.L., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104:1, 15-29.
- Flores, N., Jiménez, I.A., Giménez, A., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Bourdy, G., Bazzocchi, I.L., 2008. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. *J. Nat. Prod.* 71:9, 1538-1543.
- Franco, C.R., Antonioli, A.R., Guimarães, A.G., Andrade, D.M., Jesus, H.C., Alves, P.B., Bannet, L.E., Patrus, A.H., Azevedo, E.G., Queiroz, D.B., Quintans-Júnior, L. J., Botelho, M.A., 2011. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*. *Phyther. Res.* 25:11, 1693-1699.
- Gogosz, A.M., Boeger, M.R.T., Negrelle, R.R.B., Bergo, C., 2014. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). *Rodriguésia.* 63(2): 405-417.
- Iwamoto, L.H., Vendramini-Costa, D.B., Monteiro, P.A., Ruiz, A.L.T.G., Sousa, I.M.D.O., Foglio, M.A., de Carvalho J.E., Rodrigues, R.A.F., 2015. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 948737.
- Kandhare, A.D., L., Mohan, V., Thakurdesai, P.A., 2016. Acute and repeated doses (28 days) oral toxicity study of Vicenin-1, a flavonoid glycoside isolated from fenugreek seeds in laboratory mice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 81, 522-531.
- Kassuya, C.A.L., Leite, D.F., de Melo, L.V., Rehder, V.L.G., Calixto, J.B., 2005. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. *Planta Med.* 71:8, 721-726.

- Kato, M.J., Furlan, M., 2007. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure Appl. Chem.* 79:4, 529-538.
- Lewis, G.S., Jenkins, P.E., Fogwell, R.L., Inskeep, E.K., 1978. Concentrations of prostaglandins e and f α and their relationship to luteal function in early pregnant ewes. *J. Anim. Sci.* 47:6, 1314-1323.
- Li, X.J., Yang, Y.J., Li, Y.S., Zhang, W.K., Tang, H.B., 2016. α -pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. *J. Ethnopharmacol.* 179, 22-26.
- Lima, D.K., Ballico, L.J., Lapa, F.R., Gonçalves, H.P., de Souza, L.M., Iacomini, M., Werner M.F., Baggio C.H., Pereira, I.T., da Silva, L.M., Facundo, V.A., Santos A.R., 2012. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.Dc in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 142:1, 274-282.
- Long, C.C., Sadler, K.E., Kolber, B.J., 2016. Hormonal and molecular effects of restraint stress on formalin-induced pain-like behavior in male and female mice. *Physiol. Behav.* 165, 278-285.
- Lucky, O., 2013. Evaluation of anticonvulsant activity of aqueous extract and partitioned chloroform fraction of *Piper umbellatum* Linn (Piperaceae) Leaves Okunrobo, Uwaya O. John, Ching Poh. Fidelis, Oloton Enosakhare. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 24:1, 43-48.
- Malone, M.H., Robichaud. R.C., 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia.* 25, 320-331.
- Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A.P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62, 606-614.

- Martey, O.N., Armah, G., Okine, L.K.N., 2010. Absence of organ specific toxicity in rats treated with Tonica, an aqueous herbal haematinic preparation. *Afr. J. Trad. Complement. Alternat. Med.* 7, 231-240.
- Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Inflammation Protocols.* 115-121.
- Nakamura, C.V., Santos, A.O., Vendrametto, M.C., Luize, O.S., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A., Ueda-Nakamura, T., 2006. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 61-66.
- Nantel, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M., Metters, K.M., Chan, C.C., 1999. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 128:4, 853-859.
- Nordin, M.A.F., Harun, W.H.A.W., Razak, F.A., Musa, M.Y., 2014. Growth inhibitory response and ultrastructural modification of oral-associated candidal reference strains (ATCC) by *Piper betle* L. extract. *Int. J. Oral Sci.* 6:1, 15-21.
- Oesterreich, S.A., Traesel, G.K., Piccinelli, A.C., Aquino, D.F.S., Mota, J., Estanislau, C., Kassuya, C.A.L., 2015. Antidepressant and anxiolytic effects of ethanol extracts from four Piper species. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.* 10:1, 34-42.
- Oliveira, A.M., Conserva, L.M., Ferro, J.N.S., Brito, F.A., Lemos, R.P.L., Barreto, E., 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of octacosanol from the leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2), 1598e1611.
- Oliveira, F.C.S., Barros, R.F.M., Moita, Neto J.M., 2010. Medicinal plants used in rural communities from Oeiras Municipality, in the semi-arid region of Piauí State (PI), Brazil. *Rev. Bras. Plantas Med.* 12(3): 282-301.

- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2008a. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425. Acute Oral Toxicity-up-and-down procedure (UDP) (Paris).
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2008b. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 407. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents (UDP) (Paris).
- 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. *Br. J. Pharmacol.* 142:2, 331-338.
- Prando, T.B.L., Baciquete, T.D.F., Vieira, J.A.C., Bressan, J., Gasparotto, F.M., Jesus, D.R., Cardozo Junior, E.L., Lourenço, E.L.B., Gasparotto Junior, A., 2014. Amides from *Piper* as a diuretic: behind the ethnopharmacological uses of *Piper glabratum* Kunth. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014,615109.
- Sousa, P.J.D.C., Barros, C.A.L., Rocha, J.C.D.S., Lira, D.S., Monteiro, G.M., Maia, J. G.S., 2008. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18:2, 217-221.
- Traesel, G.K., de Souza, J.C., de Barros, A.L., Souza, M.A., Schmitz, W.O., Muzzi, R.M., Oesterreich, S.A., Arena, A.C., 2014. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food Chem. Toxicol.* 74, 320-325.
- TrivellatoGrassi, L., Malheiros, A., Meyre-Silva, C., Buss Zda, S., Monguilhott, E.D., Fröde, T.S., da Silva, K.A., de Souza, M.M., 2013. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and

healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. J. Ethnopharmacol. 145(1):127-138.

Velo, G.P., Dunn, C.J., Giroud, J.P., Timsit, J., Willoughby, D.A., 1973. Distribution of prostaglandins in inflammatory exudate. J. Pathol. 111:3, 149-158.

Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., 1973. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143:3, 711-714.

Zhang, J.M., An, J., 2007. Cytokines, inflammation and pain. Int. Anesthesiol. Clin. 45:2, 27.

Legends of Figures

Figure 1. Effects of oral administration of OEPG on the inhibition of leukocyte migration (A) and protein extravasation (B) in the pleurisy test. The animals received OEPG (100, 300 or 700 mg/kg, v.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.), and 1 h later, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was administered. The naïve group (# indicates a statistically significant difference from the vehicle group) received an intrapleural injection of sterile saline instead of carrageenan and was also treated with saline solution. Each bar represents the mean ± SEM of 6 animals. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, #p< 0.001 compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figure 2. Effect of oral administration of OEPG on the carrageenan-induced paw edema in mice. The animals received OEPG (700 mg/kg, v.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.), and 1 h later, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was administered. Graphs (A), (B), (C) and (D) represent the evaluation of the paw edema at 0.5, 1, 2, and 4 h, respectively, after carrageenan injection. Each bar represents the mean ± SEM of 6 animals. *p<0.05, **p<0.01 compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

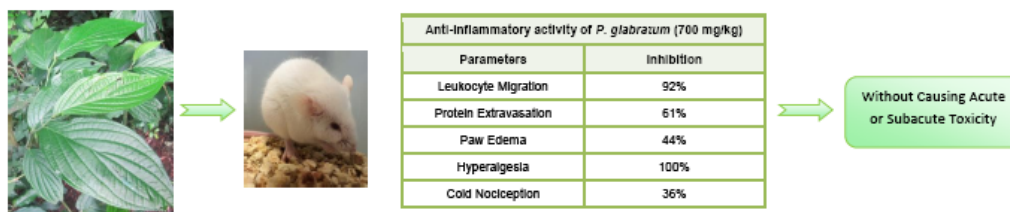
Figure 3. Effect of oral administration of OEPG on the mechanical hyperalgesia in mice. The animals received OEPG (700 mg/kg, v.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.). The mechanical hyperalgesia was measured with a digital analgesymeter 3 and 4 h after carrageenan administration. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.001$ when compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Figure 4. Effect of oral administration of OEPG on the cold sensitivity induced by acetone in mice. The animals received OEPG (700 mg/kg, v.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.). The cold sensitivity was measured 3 and 4 h after carrageenan administration. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with the control group One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Graphical Abstract

Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of *Piper glabratum*

Lidiane Schultz Branquinho, Joyce Alencar Santos, Claudia Andrea Lima Cardoso, Jonas da Silva Mota, Ubirajara Lanza Junior, Cândida Aparecida Leite Kassuya, Arielle Cristina Arena.



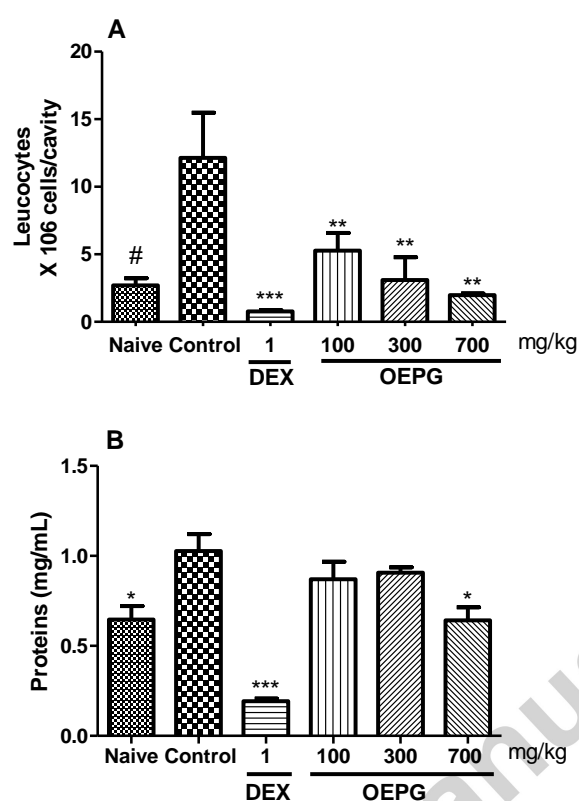


Figure 1. Effects of oral administration of OEPG on the inhibition of leukocyte migration (A) and protein extravasation (B) in the pleurisy test. The animals received OEPG (100, 300 or 700 mg/kg, v.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.), and 1 h later, an intraplantar injection of carrageenan (300 μ g/paw) was administered. The naïve group (# indicates a statistically significant difference from the vehicle group) received an intrapleural injection of sterile saline instead of carrageenan and was also treated with saline solution. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, # p < 0.001 compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

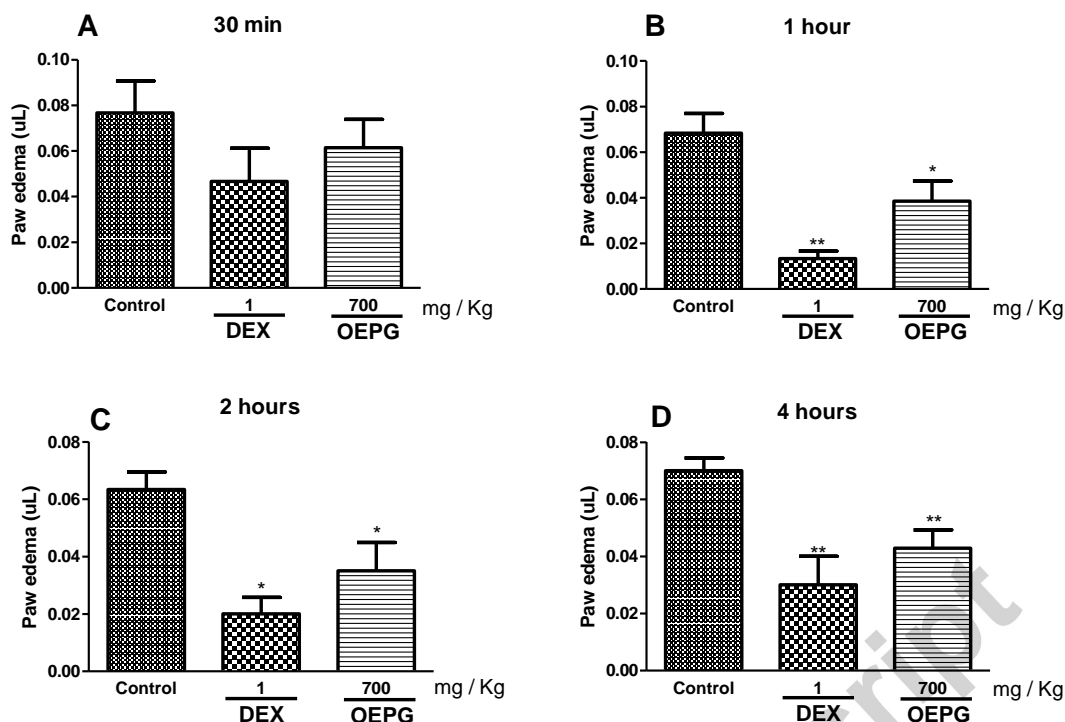


Figure 2. Effect of oral administration of OEPG on the carrageenan-induced paw edema in mice. The animals received OEPG (700 mg/kg, v.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.), and 1 h later, an intraplantar injection of carrageenan (300 μ g/paw) was administered. Graphs (A), (B), (C) and (D) represent the evaluation of the paw edema at 0.5, 1, 2, and 4 h, respectively, after carrageenan injection. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals. * p <0.05, ** p <0.01 compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

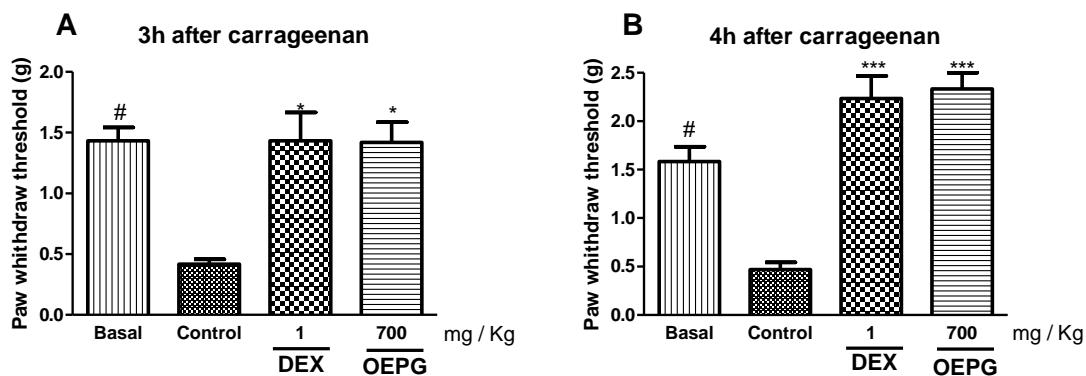


Figure 3. Effect of oral administration of OEPG on the mechanical hyperalgesia in mice. The animals received OEPG (700 mg/kg, v.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.). The mechanical hyperalgesia was measured with a digital analgesymeter 3 and 4 h after carrageenan administration. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals. * p < 0.05, *** p < 0.001, # p < 0.001 when compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

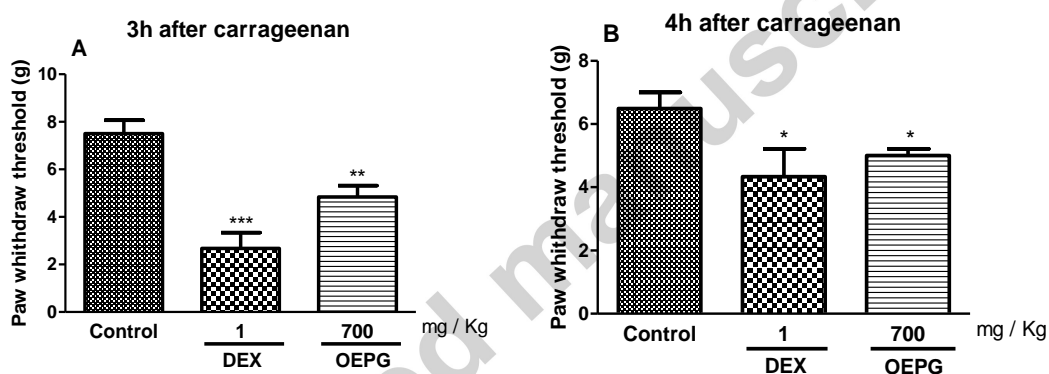


Figure 4. Effect of oral administration of OEPG on the cold sensitivity induced by acetone in mice. The animals received OEPG (700 mg/kg, v.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.). The cold sensitivity was measured 3 and 4 h after carrageenan administration. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

Table 1. Chemical composition of the essential oil of *Piper glabratum* leaves.

| Compound | RT | RI ^c | RI ^d | % |
|-----------------------------|--------|-----------------|-----------------|-------|
| α -thujene | 7.369 | 924 | 924 | 0.14 |
| α -pinene | 7.615 | 933 | 932 | 9.67 |
| Canphene | 8.125 | 946 | 946 | 0.05 |
| Sabinene | 9.013 | 970 | 969 | 0.05 |
| β -pinene | 9.150 | 975 | 974 | 12.79 |
| Myrcene | 9.642 | 989 | 988 | 0.56 |
| α -Phellandrene | 10.172 | 1005 | 1002 | 0.02 |
| α -terpinene | 10.658 | 1015 | 1014 | 0.07 |
| O-cymene | 10.980 | 1022 | 1022 | 0.03 |
| Sylvestrene | 11.150 | 1025 | 1025 | 1.61 |
| 1,8-cineol | 11.263 | 1027 | 1026 | 0.11 |
| (Z)- β -ocimene | 11.522 | 1033 | 1032 | 0.41 |
| (E)- β -ocimene | 11.954 | 1044 | 1044 | 0.14 |
| γ -terpinene | 12.412 | 1055 | 1054 | 0.19 |
| Terpinolene | 13.687 | 1087 | 1086 | 0.09 |
| Linalool | 14.159 | 1096 | 1095 | 0.43 |
| Terpinen-4-ol | 17.651 | 1175 | 1174 | 0.19 |
| α -terpineolacid | 18.254 | 1187 | 1186 | 0.23 |
| Methyl geranate | 24.170 | 1322 | 1322 | 0.02 |
| Myrtenyl acetate | 24.264 | 1324 | 1324 | 0.04 |
| O-cubebene | 25.285 | 1345 | 1345 | 0.41 |
| Cyclosativene | 25.974 | 1368 | 1369 | 0.65 |
| α -ylangene | 26.236 | 1373 | 1373 | 0.02 |
| α -copaene | 26.438 | 1375 | 1374 | 0.09 |
| β -damascenone | 26.810 | 1383 | 1383 | 5.85 |
| β -cubebene | 27.045 | 1388 | 1387 | 0.05 |
| Sibirene | 27.274 | 1399 | 1400 | 0.13 |
| α -gurjunene | 27.876 | 1409 | 1409 | 0.99 |
| α -cadrene | 28.085 | 1411 | 1410 | 0.04 |
| (E)-caryophyllene | 28.300 | 1424 | 1417 | 7.95 |
| β -copaene | 28.698 | 1431 | 1430 | 6.55 |
| β -humulene | 28.925 | 1436 | 1436 | 1.07 |
| Aromadendrene | 29.091 | 1439 | 1439 | 1.83 |
| E-Isoeugenol | 29.384 | 1448 | 1448 | 0.18 |
| α -Humulene | 29.630 | 1452 | 1452 | 1.73 |
| Geranylacetone | 29.698 | 1453 | 1453 | 1.13 |
| allo-aromadendrene | 29.988 | 1458 | 1458 | 0.11 |
| 4,5-di-epi-aristolochene | 30.336 | 1471 | 1471 | 0.19 |
| γ -muurolene | 30.639 | 1478 | 1478 | 1.68 |
| α -amorphene | 30.804 | 1483 | 1483 | 0.30 |
| Trans-muurola-4(14),5-diene | 31.265 | 1493 | 1493 | 4.81 |
| Viridiflorene | 31.405 | 1496 | 1496 | 7.34 |
| α -muurolene | 31.606 | 1500 | 1500 | 3.56 |
| α -farnesene | 31.857 | 1505 | 1505 | 0.59 |
| γ -cadinene | 32.150 | 1513 | 1513 | 0.88 |
| 7-epi- α salinene | 32.301 | 1519 | 1520 | 0.07 |

| | | | | |
|--|--------|------|------|-------|
| δ -cadinene | 32.519 | 1523 | 1522 | 3.02 |
| Trans-cadina-1,4-diene | 32.857 | 1533 | 1533 | 0.40 |
| α -cadinene | 33.063 | 1542 | 1537 | 0.05 |
| Longiborneol | 34.072 | 1568 | 1562 | 12.00 |
| Caryophyllene oxide | 34.532 | 1582 | 1582 | 1.39 |
| Gleenol | 34.980 | 1586 | 1586 | 3.40 |
| Globulol | 35.201 | 1591 | 1590 | 0.10 |
| Guaiol | 35.409 | 1600 | 1600 | 0.03 |
| β -atlantol | 35.659 | 1607 | 1608 | 0.24 |
| HumuleneepoxideII | 35.874 | 1608 | 1608 | 0.86 |
| Junenol | 36.179 | 1618 | 1618 | 0.05 |
| Trans-isolongifolanone | 36.369 | 1625 | 1625 | 0.04 |
| 1-epi-cubenol | 36.460 | 1627 | 1627 | 0.10 |
| β -cedren-9-one | 36.566 | 1629 | 1630 | 0.44 |
| Capillin | 36.720 | 1636 | 1637 | 0.15 |
| Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 β -ol | 36.874 | 1638 | 1639 | 0.21 |
| Epi- α -muurolol | 37.082 | 1641 | 1640 | 0.60 |
| α -muurolol | 37.237 | 1645 | 1644 | 0.74 |
| Exalatacin | 37.571 | 1655 | 1655 | 0.39 |
| Allohimachalol | 37.543 | 1660 | 1660 | 0.48 |
| Apiole | 38.145 | 1677 | 1677 | 0.27 |

Compounds are listed in order of their elution from a DB-5 column. RT, retention time (min); RI^c, retention indices from a DB-5 column; RI^d, retention indices from the literature.

Table 2. Body weights and relative organ weights (g/100 g of body weight) of females treated orally with OEPG in the subacute toxicity study.

| Parameter | Control | OEPG 500 mg/kg | OEPG 1000 mg/kg |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Body weight (g) | 32.03 \pm 0.38 | 29.33 \pm 1.15 | 29.57 \pm 2.83 |
| Heart(g/100 g) | 0.42 \pm 0.01 | 0.38 \pm 0.08 | 0.46 \pm 0.04 |
| Lung (g/100 g) | 0.59 \pm 0.04 | 0.58 \pm 0.11 | 0.78 \pm 0.08 |
| Liver(g/100 g) | 4.42 \pm 0.20 | 4.55 \pm 0.63 | 4.92 \pm 0.37 |
| Spleen (g/100 g) | 0.49 \pm 0.02 | 0.48 \pm 0.06 | 0.55 \pm 0.02 |
| Kidney(g/100 g) | 0.52 \pm 0.03 | 0.53 \pm 0.09 | 0.62 \pm 0.03 |
| Uterus(g/100 g) | 0.48 \pm 0.02 | 0.39 \pm 0.01 | 0.40 \pm 0.06 |

Values are expressed as the mean \pm SEM, n=5 animals/group. *p< 0.05 compared to the control group. ANOVA/Newman-Keuls.

Table 3. Biochemical and hematological parameters of females treated orally with OEPG in the subacute toxicity study.

| Parameter | Control | OEPG 500 mg/kg | OEPG 1000 mg/kg |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Leukocytes (x10 ³ / μ L) | 7.98 \pm 0.34 | 7.10 \pm 1.12 | 7.27 \pm 1.30 |

| | | | |
|--|------------------|--------------------|--------------------|
| Erythrocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$) | 7.14 ± 0.20 | 7.94 ± 0.09 | 8.60 ± 0.25 |
| Hemoglobin (g/dL) | 12.17 ± 0.33 | 13.05 ± 0.17 | 13.67 ± 0.46 |
| Hematocrit (%) | 40.22 ± 0.40 | 46.20 ± 2.50 | 49.47 ± 2.11 |
| Urea (mg/dL) | 47.93 ± 2.55 | 68.26 ± 5.34 | 63.10 ± 0.07 |
| AST (U/L) | 99.85 ± 9.21 | 103.30 ± 16.90 | 112.70 ± 11.40 |
| ALT (U/L) | 19.90 ± 2.20 | 22.70 ± 2.20 | 23.40 ± 3.90 |

Values are expressed as the mean \pm SEM, n=5 animals/group. $p > 0.05$, ANOVA.

Table 4. Estrous cyclicity of females treated orally with OEPG.

| | Number of estrus cycle | Estrous cycle length (days) | | | |
|------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | Proestrus | Estrus | Metaestrus | Diestrus |
| Control | 5.10 ± 0.25 | 4.75 ± 0.25 | 4.75 ± 0.25 | 4.75 ± 0.25 | 4.50 ± 0.28 |
| OEPG 500 mg/kg | 4.50 ± 0.64 | 3.75 ± 0.47 | 4.75 ± 0.85 | 6.00 ± 0.70 | 6.00 ± 0.41 |
| OEPG 1000 mg/kg | 4.20 ± 0.48 | 5.40 ± 0.24 | 3.75 ± 0.20 | 5.50 ± 0.28 | 5.75 ± 0.47 |

Values are expressed as the mean \pm SEM, n=5 animals/group. $p > 0.05$, ANOVA.

6. ANEXOS

6.1 Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA / UFGD



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, 6 de abril de 2017.

Senhor Pesquisador:

Cândida Aparecida Leite Kassuya

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **024/2014 – CEUA/UFGD** - intitulado "**Avaliação da atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e toxicológica do óleo de *Piper vicosanum* e *Piper glabratum***" foi integralmente **APROVADO** e poderá ser conduzido.

Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio de notificação à CEUA sobre o término do projeto.

A handwritten signature in black ink that reads 'Melissa Negrão Sepulvida'.

Melissa Negrão Sepulvida

Coordenadora CEUA

6.2 Potencial hipoglicemiante do óleo essencial de *Piper glabratum* no teste de tolerância à glicose.

6.2.1 Metodologia

Foram utilizados dois grupos de camundongos fêmeas NOD (diabéticos não obeso) ($n= 5/\text{grupo}$). Os animais ficaram em jejum 8 h antes do experimento e receberam via oral OEPG (500 mg/kg) e solução salina 0,9%, a solução de glicose (2 g/kg) foi aplicada intraperitonealmente. Os níveis de glicose sanguíneos foram medidos em amostras do sangue retiradas da cauda dos animais nos tempos 0 (basal), 30, 60, 90 e 120 min após a injeção de glicose, utilizando-se glicosímetro (OptiumXced, Abbott, São Paulo, SP) (Andrikopoulos et al., 2008).

6.2.2 Resultados e Discussão

No teste de tolerância a glicose, os animais NOD que receberam OEPG (500 mg/kg) não apresentaram redução dos níveis glicêmicos (dados não mostrados).

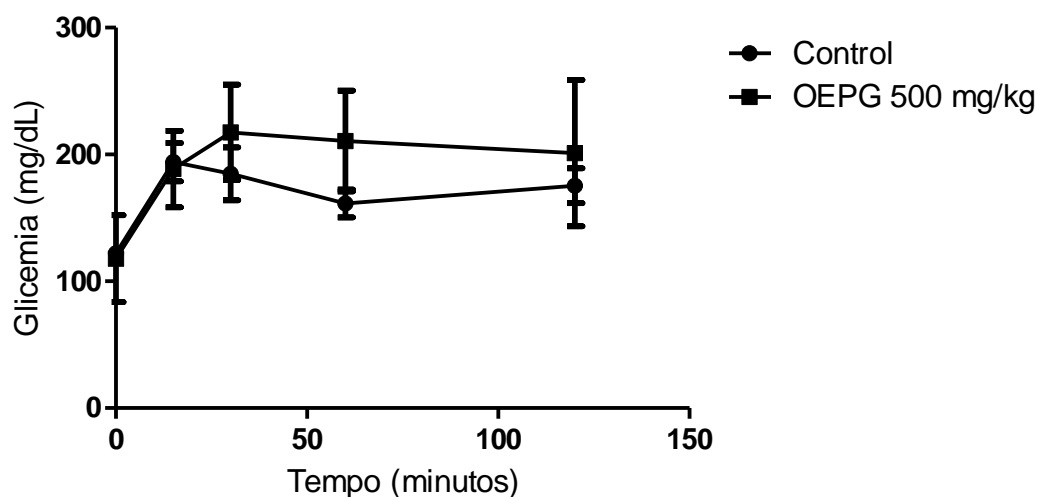


Figura 5. Avaliação do OEPG 500 mg/ Kg sobre o índice glicêmico após a administração de 2 g/Kg de glicose via intraperitoneal, $n = 5/\text{grupo}$. As diferenças entre grupos foram analisadas através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

O teste de tolerância à glicose em camundongos NOD é um dos modelos mais estudados de doença espontânea auto-imune órgão específico (Homo-Delarche, 2004). Neste modelo, observou-se que o OEPG não atua como hipoglicemiante. Porém, estudos com *P. nigrum* em modelos de diabetes induzido por aloxano constatou atividade hipoglicemiante (Atal et al. 2012). Da mesma forma, o extrato metanólico das flores de *P. claussonianum* apresentou propriedade hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Marques et al. 2015), o que demonstra a relevância de estudos em outros modelos.

6.2.3 Referências Bibliográficas

ANDRIKOPOULOS, Sofianos et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 6, p. E1323-E1332, 2008.

ATAL, Shubham et al. Evaluation of the effect of piperine per se on blood glucose level in alloxan-induced diabetic mice. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 69, n. 5, p. 965-969, 2012.

HOMO-DELARCHE, Françoise. Neuroendocrine immuno-ontogeny of the pathogenesis of autoimmune diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse. **ILAR Journal**, v. 45, n. 3, p. 237-258, 2004.

MARQUES, A. M. et al. Hypoglycemic Effect of the Methanol flower Extract of Piper Claussenianum and the Major Constituent 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone in Streptozotocin Diabetic Rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 2, p. 237, 2015.