

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DO
EXTRATO ETANÓLICO E DE AMIDAS DAS FOLHAS DE *Piper
amalago* EM MODELOS EXPERIMENTAIS COM ROEDORES**

JUCICLÉIA DA SILVA ARRIGO

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2017**

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO
ETANÓLICO E DE AMIDAS DAS FOLHAS DE *Piper amalago* EM MODELOS
EXPERIMENTAIS COM ROEDORES**

JUCICLÉIA DA SILVA ARRIGO

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados como norma do programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: PROF^a DR^a CÂNDIDA APARECIDA LEITE KASSUYA
Co-orientadora: PROF^a DR^a FERNANDA GRACIANI

Dourados
Mato Grosso do Sul
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A776a Arrigo, Jucicléia da Silva.

Avaliação farmacológica e toxicológica do extrato etanólico e de amidas das folhas de *Piper amalago* em modelos experimentais com roedores. / Jucicléia da Silva Arrigo. – Dourados, MS : UFGD, 2017.

143f.

Orientadora: Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya.

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) –
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. *Piper amalago*. 2. Inflamação. 3. Hiperálgia . 4. Toxicidade.
5. Ensaio de cometa. 6. Micobactéria. I. Título.

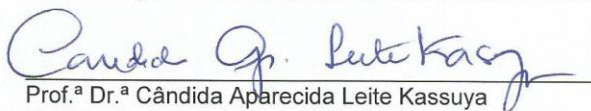
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

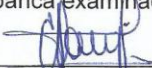


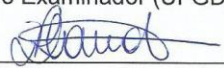
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

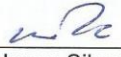
Termo de Aprovação

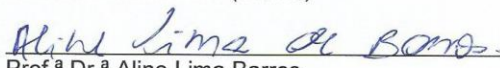
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: **“Avaliação farmacológica e toxicológica do extrato etanólico e de amidas das folhas de *Piper amalago* em modelos experimentais com roedores”**, de autoria de **Jucicléia da Silva Arrigo**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados.


Prof.^a Dr.^a Cândida Aparecida Leite Kassuya
Presidente da banca examinadora


Prof.^a Dr.^a Eliana Janet Sanjinez Argandoña
Membro Examinador (UFGD)


Prof.^a Dr.^a Raquel Donatini
Membro Examinador (UFGD)


Prof. Dr. Jonas Silva Mota
Membro Examinador (UEMS)


Prof.^a Dr.^a Aline Lima Barros
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 27 de junho de 2017.

*Dedico essa tese ao
meu doce filho, Miguel.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter proporcionado fé, coragem e força em todos os momentos dessa jornada.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Cândida Aparecida Leite Kassuya por ter oferecido essa chance valiosa e, sobretudo, pela paciência e dedicação com que transmitiu os ensinamentos. Obrigada pela confiança em mim depositada ao longo do doutorado.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Graciani, pelo respeito e instrução, colaborando com suas correções na tese.

*Ao Prof. Dr. Jonas Mota e seus alunos pelo fornecimento do extrato e compostos da *P. amalago*.*

Aos professores da FCS e FACET que contribuíram para minha formação e pelos valorosos ensinamentos passados durante as disciplinas do programa do Doutorado.

À banca examinadora, Prof^ª. Dr^ª. Eliana Janet Sanjinez Argandona sempre tão querida e prestativa, Prof^ª. Dr^ª. Raquel Donatini, Prof^ª Dr^ª Aline Lima Barros, Prof. Dr. Jonas Mota, pela participação e pelas críticas construtivas.

Aos animais, pela evidente contribuição neste trabalho, e aos funcionários do Biotério e dos laboratórios, pela prestatividade.

Às amigas de laboratório: Joyce, Ana Claudia, Lidi, Dani, Priscila, Fernanda. Obrigada pela convivência, pelo período que trabalhamos juntas, pelos momentos que me auxiliaram nos experimentos quando precisei sair de licença maternidade. Muito obrigada!

Aos amigos da Bio, Fábio, Manoel, Adriana, Lene e Thaís, que nos conhecemos há 12 anos, e às comadres Rozana, Denise e compadre Bruno, que sempre me apoiaram com toda a paciência e carinho. Amo vocês.

Aos meus queridos pais Leonardo e Marcí (in memorian) e irmão Gilmar, por terem transmitido tanto amor, carinho e estima.

Ao meu marido Renan, por participar tão intensamente da minha vida, por me ajudar a superar os obstáculos dizendo “Calma! Vai dar certo!” e sendo tão companheiro em todas as horas. Te amo!

À minha sobrinha, Larissa, e minha cunhada Renata, por terem cuidado com tanto carinho do Miguel enquanto eu passava horas no computador trabalhando na tese.

À Universidade Federal da Grande Dourados, por disponibilizar instalações e materiais para a realização deste trabalho.

À FUNDECT, CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho,

Obrigada!

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

LISTA DE ABREVIações

1 – Amida (N- [7- (3', 4' -metilenodioxifenil) -2 (Z), 4 (Z) -heptadienoil] pirrolidina.

2 – Amida N- [7- (3', 4'-metilenodioxifenil) -2 (E), 4 (E) -heptadienoil] pirrolidina.

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AIEs – Anti-inflamatórios esteroidais

AINEs – Anti-inflamatórios não-esteroidais

ANOVA – Análise de variância de uma ou duas vias

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCG – *Mycobacterium bovis*

BCG – Bacille Calmette-Guérin

BDNF – Fatores neurotróficos derivados do encéfalo

BK – Bradicininina

CFA – Adjuvante Completo de Freund

CFU – Unidade de formação de colônias

CGRP – Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

Cm – Centímetro

COX – Ciclooxigenase

CYCL – Ciclofosfamida

Dexa – Dexametasona

DRG – Gânglio da raiz dorsal

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EEPA – Extrato etanólico de *Piper amalago*

FMS – Fibromialgia crônica

GABA – Ácido Gamma-Amino Butírico

G – grama

H – Hora

HPA – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor

IFN- γ – Interferon gamma

IL-4, IL-10 e IL-13 – Interleucinas 4, 10 e 13.

I.p. – via intrapleural

ISRS – Inibidores da recaptação de serotonina

Kg – kilograma

L – Litro

LPS – Lipolissacarídeo

LTP – Potenciação a longo prazo

MCN – Micronúcleo

Mg – Miligrama

M – Mililitro

Min – Minuto

Mm – Milímetro

MTT – {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio]}

NaCl – Cloreto de sódio

NETs – Armadilhas extracelulares de neutrófilos

Nm – Nanômetro

NO – Óxido nítrico

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

PBMT – Teste de micronúcleo em sangue periférico

PBS – Tampão fosfato salino

P.o. – Via oral

PMN – Leucócito polimorfonuclear

RPMI - Roswell Park Memorial Institute, meio sintético

S.c. – Via subcutânea

SEM – Erro padrão da média

SI – Índice de macrófagos espalhados

SNC – Sistema Nervoso Central

SNI – Lesão do nervo ciático

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SSGE – Ensaio de eletroforese em gel de célula única

TB – Tuberculose

TNF – Fator de necrose tumoral

TRVP1 – Receptor potencial transitório vanilóide tipo I

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

V/v – Porcentagem em volume

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Table 1 - Frequency of damage, by the comet assay in mice male treated orally with ethanolic extract of *P amalago* at doses 17.5, 175 and 1750 mg/kg.....109

Table 2 - Frequency of micronuclei in mice treated orally with *P amalago* (EEPA).....110

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - <i>Piper amalago</i> L. (Fonte: Prof. Dr. Jonas Mota, 2015).....	8
Figura 02. Passos da resposta inflamatória. (Fonte: NOYD et al., 2016).....	11
Figura 03. Via de transdução da dor. (Fonte: GOLD e GEBHART, 2010).....	17
Figura 04. Classificação dos cometas em células de sangue periférico no ensaio SCGE. Classe 1 (A); Classe 2 (B); Classe 3 (C) e Classe 4 (D) (Fonte: FREITAS, 2007).....	32
Figura 05. Eritrócito policromático com micronúcleo (a). Eritrócito policromático sem micronúcleo (b). Eritrócito normocromático (c). (Fonte: RIBEIRO et al., 2003).....	33

ARTIGO CIENTÍFICO 01

Figure 1. Chemical compounds of the amides N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(Z),4(Z)-heptadienoyl] pyrrolidine (1) and N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(E),4(E)-heptadienoyl] pyrrolidine (2) from the leaves of <i>Piper amalago</i> (Piperaceae).....	81
Figure 2. HPLC analysis of EEPA (a), Amide 1 (b) which retention time (Rt) of 10.14 min and Amide 2 Rt ¼ 9.79 min (c).	81
Figure 3. Effects of oral administration of the EEPA at 100 mg/kg on arthritis induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA).....	82
Figure 4. Effects of the EEPA at 100 mg/kg oral administration on chronic pain-related behaviors and functional disability in the neuropathy model induced by sciatic lesion.....	83

Figure 5. Effect of the EEPA at 100 mg/kg, amide **1** at 1 mg/kg and amide **2** at 1 mg/kg on pain-related behaviors in the formalin-induced nociception model.....84

Figure 6. Effect of the EEPA at 100 mg/kg, amide **1** at 1 mg/kg and amide **2** at 1 mg/kg on carrageenan-induced paw edema in mice.....84

ARTIGO CIENTÍFICO 02

Figure 1 – Chemical structure of compound N-[7-(3', 4'-Methylenedioxyphenyl)-2(Z), 4(Z)-heptadienoyl] pyrrolidine (**1**)110

Figure 3 - Effect of oral administration of EEPA and **1** on the total number of leukocytes (A), mononuclear cells (B), neutrophils (C) and eosinophils (D) in model of pleurisy induced by *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice.....111

Figure 4 - Evaluation of phagocytic and apoptotic activities of EEPA.112

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Normas da revista científica Journal Ethnopharmacology, para qual o artigo 01 foi publicado e artigo 02 será submetido.....	114
Anexo 2. Aprovação do CEUA.....	143

RESUMO

A *Piper amalago*, também conhecida popularmente como “jaborandi” ou “pariparoba”, é utilizada na medicina popular como analgésica, anti-inflamatória e para outras fisiopatologias das vias urinárias. O objetivo desse trabalho foi avaliar as atividades antinociceptiva, anti-hiperalgesia, antiartríticas, antidepressiva anti-inflamatória, antimicobactericida do extrato etanólico de *P. amalago* (EEPA) e das amidas (N- [7- (3', 4' -metilenodioxifenil) -2 (Z), 4 (Z) -heptadienoil] pirrolidina (**1**) e cloridrato de N- [7- (3', 4'-metilenodioxifenil) -2 (E), 4 (E) -heptadienoil] pirrolidina (**2**) obtidas de *P. amalago* em roedores e os seus possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos. Os ratos ou camundongos foram tratados oralmente com EEPA (100 mg/kg) ou amidas **1** e **2** (1 ou 3 mg/kg), podendo ser dose única ou múltiplas por 20 dias, dependendo do modelo de indução de dor, que foram realizados Complete Freund's Adjuvant (CFA), lesão do nervo ciático (SNI), hiperalgisia induzida pela carragenina ou nocicepção induzida pela formalina. Também foram realizados modelo de inflamação, espraimento e produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos, pleurisia induzida por BCG, testes mutagênicos e genotóxicos como ensaio de cometa, micronúcleo, atividade fagocitária e ensaio de apoptose. Os resultados mostraram que o EEPA inibiu a hiperalgisia mecânica, edema do joelho e a hiperalgisia ao calor, mas não o comportamento depressivo induzido pela injeção intraplantar de CFA. EEPA inibiu a hiperalgisia mecânica e ao frio no modelo SNI, e as amidas **1** e **2** impediram a hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina e os efeitos antinociceptivos em ambas as fases do modelo induzido pela formalina. EEPA e **1** promoveram uma redução no espraimento e na produção de NO estimulado em macrófagos, reduziram significativamente o número total de leucócitos induzidos por BCG e EEPA não apresentou efeitos genotóxicos ou mutagênicos. Conclui-se que a *P. amalago* foi eficaz para a inibição da dor, mostrando-se um agente anti-inflamatório natural, antimicobacteriano e sem efeitos genotóxicos em cometas e micronúcleos. As amidas obtidas podem ser o (s) princípio(s) ativo presente no EEPA.

Palavras-chave: *Piper amalago*, inflamação, hiperalgisia, toxicidade, ensaio de cometa, micobactéria.

ABSTRACT

Piper amalago, also popularly known as "jaborandi" or "pariparoba", is used in folk medicine as analgesic, anti-inflammatory and for other pathophysiologicals of the urinary tract. The objective of this study was to evaluate the antinociceptive, antihyperalgesia, antiarthritic, anti-inflammatory, antimycobactericidal activities of the amalago ethanolic extract (EEPA) and amides (N- [7- (3', 4' -metilendioxifenil) -2 (Z), 4 (Z) -heptadienoyl] pirrolidina (**1**) e cloridrato de N- [7- (3', 4'-metilendioxifenil) -2 (E), 4 (E) -heptadienoyl] pirrolidina (**2**) obtained from *P. amalago* in rodents and their possible mutagenic and genotoxic effects.

The rats or mice were orally treated with EEPA (100 mg / kg) or amides **1** and **2** (1 or 3 mg/kg), and could be single or multiple doses for 20 days, depending on the pain induction model, which were performed Complete Freund's Adjuvant (CFA), sciatic nerve injury (SNI), carrageenan-induced hyperalgesia, or formalin-induced nociception. A model of inflammation, spreading and production of nitric oxide (NO) in macrophages culture, BCG induced pleurisy, mutagenic and genotoxic tests such as comet, micronucleus, phagocytic activity and assay apoptosis. The results showed that EEPA inhibited mechanical hyperalgesia, knee edema and heat hyperalgesia, but not the depressive behavior induced by intraplantar CFA injection. EEPA inhibited mechanical and cold hyperalgesia in the SNI model, and amides **1** and **2** prevented mechanical hyperalgesia induced by carrageenan and antinociceptive effects in both phases of the formalin-induced model. EEPA and **1** promoted a reduction in the spreading and in the production of NO stimulated in macrophages. They significantly reduced the total number of leukocytes induced by BCG, and EEPA did not present genotoxic or mutagenic effects. It is concluded that *P. amalago* was effective for the inhibition of pain, showing a natural anti-inflammatory agent, antimycobacterial and without genotoxic effects in comets and micronuclei. The amides obtained may be the active principle (s) present in the EEPA.

Key words: *Piper amalago*, inflammation, hyperalgesia, toxicity, comet assay, mycobacteria.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Plantas Medicinais como Fonte de Novos Fármacos.....	4
3.1.1. Família Piperaceae, gênero <i>Piper</i> e suas diferentes espécies.....	5
3.1.2. <i>Piper amalago</i>	7
3.2. Inflamação.....	9
3.2.1. Inflamação Aguda.....	10
3.2.2. Inflamação crônica.....	12
3.2.3. Anti-inflamatórios.....	13
3.3. Dor.....	15
3.3.1. Mecanismos da dor.....	16
3.3.2. Classificação da dor.....	18
3.3.3. Dor Neuropática.....	19
3.3.4. Dor e depressão.....	23
3.3.5. Controle farmacológico dor e depressão.....	24
3.4. Toxicidade.....	26
3.5. Modelos dos testes farmacológicos e toxicológicos.....	27
3.5.1. Testes para avaliar parâmetros inflamatórios em macrófagos.....	27
3.5.2. Teste para avaliar parâmetro inflamatório de pleurisia induzida por BCG	29
3.5.3. Mutagenicidade Genotoxicidade.....	31
4. BIBLIOGRAFIA.....	35
5. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	48
6. ARTIGO CIENTÍFICO 01.....	49
ANTI-NOCICEPTIVE, ANTI-HYPERALGESIC AND ANTI-ARTHRITIC ACTIVITY OF AMIDES AND EXTRACT OBTAINED FROM <i>Piper amalago</i> IN RODENTS.....	49
Abstract.....	50
1. Introduction.....	52
2. Material and methods.....	54

3. Results.....	63
4. Discussion.....	68
5. Acknowledgments.....	73
6. References.....	74
7. ARTIGO CIENTÍFICO 02.....	87
ANTI-INFLAMMATORY, ANTI-MYCOBACTERIAL AND GENOTOXICOLOGICAL ANALYSIS OF THE ETHANOLIC EXTRACT FROM <i>Piper amalago</i>	85
Abstract.....	86
1. Introduction.....	87
2. Material and methods.....	89
3. Results.....	94
4. Discussion.....	96
5. Acknowledgments.....	100
6. Conflict of Interest.....	100
7. References.....	100
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
9. ANEXOS.....	114

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde aponta que 65 a 80% da população que vive em países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas medicinais para os cuidados de saúde primários (WHO, 2002). Em países desenvolvidos, o uso se torna mais evidente naqueles aonde existem diretrizes apropriadas para o registro de fitoterápicos, como, por exemplo, Alemanha, França, Austrália e Canadá (AHMAD et al., 2016).

Estima-se que em torno de 20% das espécies da flora mundial podem ser encontradas no Brasil, estando distribuídas em diversas regiões fitogeográficas, como Floresta Atlântica, Floresta Amazônica, Pampas, Cerrado, Caatinga e Pantanal, sendo o Brasil considerado o país com maior biodiversidade do planeta (MELO et al., 2011). O Cerrado brasileiro é reconhecido como uma das 25 áreas mundiais prioritárias para conservação e como a savana mais rica do mundo em biodiversidade. Este bioma ocupa cerca de 22% do território nacional, em uma área de 2.036.448 km² e percorre 14 estados brasileiros, sendo a região Centro-Oeste a de maior predominância (SANGALLI e VIEIRA, 2003; LIMA et al., 2015).

A área de pesquisa de medicamentos fitoterápicos está aumentando e com isso a busca por novas substâncias ativas provenientes de produtos naturais está se intensificando (MARMITT et al., 2015). Há também o interesse do mercado farmacêutico que vem valorizando e ampliando o desenvolvimento de medicamentos oriundos de plantas. Esta motivação ocorre pelo fato da produção de medicamentos apresentar uma melhor relação custo/benefício quando comparada aos produtos sintéticos, sua ação biológica apresenta, em geral, baixa toxicidade e efeitos colaterais, baixo custo de produção e preço de venda mais acessíveis (JAHAN et al., 2017). Ainda cabe destacar a busca por hábitos mais saudáveis de vida e a valorização do meio ambiente pela sociedade através do consumo de produtos naturais (ASSIS et al., 2015).

Piper amalago conhecida popularmente como jaborandi ou pariparoba, é uma planta que possui vasta abrangência geográfica, podendo ser encontrada em abundância no Cerrado brasileiro. Para fins medicinais é comumente usada

pela população como um agente analgésico e anti-inflamatório, bem como para fisiopatologias das vias urinárias (ACHENBACH et al., 1986; DOMÍNGUEZ et al., 1985, PARMAR et al., 1997). A literatura relata estudos farmacológicos envolvendo a espécie *P. amalago* mostrando seus efeitos biológicos tais como: efeito esquistossomicida (CARRARA et al., 2014), atividades diurética e antilitiásica (NOVAES et al., 2014), efeito ansiolítico (LOPES et al., 2012), atividades leishmanicida e acaricida (CARRARA et al., 2013).

Considerando o potencial terapêutico descrito pelo uso popular para *P. amalago* e a falta de estudos que avaliem a ação anti-inflamatória e analgésica desta espécie, o presente trabalho teve por objetivo avaliar essas ações em dois artigos científicos. O primeiro artigo trata da avaliação da atividade comportamental anti-hiperalgésica, antinociceptiva, anti-artrítica e depressiva elucidada pelo extrato etanólico de *P. amalago* (EEPA) e pelas amidas N- [7- (3', 4'-metilenodioxifenil) -2 (Z), 4 (Z) -heptadienoil] pirrolidina (**1**) e N- [7- (3', 4'-metilenodioxifenil) -2 (E) -heptadienoil] pirrolidina (**2**) em modelos de dor. No segundo artigo, o objetivo foi avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico obtido de folhas de *P. amalago* (EEPA) e o componente isolado N- [7- (3,4-metilenodioxifenil) -2 (Z), 4 (Z) - Heptadie-noil] pirrolidina (**1**) em testes de inflamação. Além disso, verificamos também a ação antimicobacteriana e os possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos deste extrato.

2. JUSTIFICATIVA

Piper amalago é uma planta endêmica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como jaborandi, jaborandi-falso ou pariparoba. No uso popular é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias e como analgésica, na forma de chás e garrafadas (extrações alcoólicas). Devido sua eficácia como planta medicinal, e propriedades farmacológicas confirmadas na literatura, o presente estudo desenvolveu um extrato etanólico das folhas de *P. amalago*, este processo permitiu a extração de dois compostos químicos, amidas 1 e 2, que foram amplamente testados em diferenciados testes farmacológicos de inflamação, dor e toxicologia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS

Medicina tradicional é a soma dos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências de diversas nações com diferentes culturas; é utilizada na manutenção da saúde, prevenção ou tratamento de doenças (WUBETU et al., 2017). Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% da população mundial atualmente usa medicamentos à base de plantas para cuidados com a saúde; países avançados como Bélgica (31%), Austrália (48%), França (49%), Canadá (70%) e Alemanha (77%) se adaptaram à esses medicamentos (Ahmad et al., 2016).

Esse conhecimento da medicina popular é responsável por disseminar as propriedades terapêuticas das plantas e é a partir dessas indicações que muitos estudos químicos e farmacológicos são iniciados (Matias et al., 2013). Os 25% dos medicamentos usados nas últimas duas décadas são derivados de plantas, dos quais apenas 5-15% foram investigados para compostos bioativos. Pesquisas revelam o uso de fitoquímicos para o tratamento de doenças devido à toxicidade relativamente baixa e mínimos efeitos colaterais (AHMAD et al., 2016).

Os produtos naturais de plantas são fontes de novos fitoquímicos e nutracêuticos, isso devido à presença de numerosos metabólitos primários e secundários (GUPTA et al., 2017). Os primários estão envolvidos diretamente nos processos vitais da planta, tais como crescimento, desenvolvimento e reprodução; os metabólitos secundários é um grupo de fitoquímicos tais como flavonóides, terpenóides, fenólicos, glicosídeos e alcalóides, que são componentes principais no mecanismo de defesa das plantas contra insetos, pragas e para benefícios medicinais em seres humanos (GUPTA et al., 2017). Pois na maioria dos estudo que mostram ação benéfica na saúde de constituintes das plantas, são os metabólitos secundários os mais evidenciados.

Alves e colaboradores (2008) realizaram um levantamento etnobotânico de vegetais que são utilizadas como plantas medicinais em dois fragmentos florestais localizados no município de Dourados-MS e identificaram 28 famílias e 37 espécies consideradas medicinais, segundo o conhecimento empírico e/ou uso popular nessa região. Esse levantamento revelou que o maior número de famílias inerentes foram *Piperaceae* (10,8%), *Moraceae* (8,1%), *Smilacaceae* (8,1%), *Myrtaceae* (5,4%) e *Rubiaceae* (5,4%).

3.1.2. FAMÍLIA PIPERACEAE, GÊNERO *Piper* E SUAS DIFERENTES ESPÉCIES

A família Piperaceae é constituída de uma diversidade de plantas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais em ambos os hemisférios, sendo representados por, ervas, arbustos frequentemente epífitos ou lianas. As folhas são simples e o caule nodoso (SOUZA e LORENZI, 2005). Essa família possui cerca de 3.000 espécies divididas em oito gêneros (GUIMARÃES e VALENTE, 2001; DYER e PALMER, 2004). O gênero *Piper* é o mais representativo com mais de 700 espécies encontradas em todo o mundo, é utilizado para fins terapêuticos para o preparo de bebidas em diversas culturas e algumas espécies desse gênero são utilizadas comercialmente como condimento (YUNCKER, 1972; KUMAR et al, 2015).

Estudos fitoquímicos das plantas pertencentes ao gênero *Piper* mostraram a presença de muitas substância químicas como amidas (DOMÍNGUEZ et al., 1985; KIM et al., 2015), terpenos, derivados do ácido benzóico, carotenóides, hidroquinonas, assim como lignanas, neolignananas e alcalóides (BALDOQUI et al., 2009), compostos que exibem variados graus de atividade biológica (KATO e FURLAN, 2007). Farmacologicamente, as espécies de *Piper* têm sido amplamente investigadas como fontes promissoras de metabólitos secundários com propriedades antiparasitárias, anti-inflamatórias e

diuréticas (GUTIERREZ et al., 2013; MESQUITA et al., 2005; PRANDO et al., 2014).

Nesse sentido, Argondizo e colaboradores (2007) mostraram que na composição química de *P. glabratum* encontra-se um derivado de ácido benzóico prenilado, bem como um cromeno que são substâncias biologicamente ativas contra algumas espécies de fungos e contra protozoários respectivamente. *P. glabratum* também mostrou efeito leishmanicida contra três espécies de *Leishmania* (FLORES et al., 2008), propriedades diuréticas (PRANDO et al., 2014) e ação anti-inflamatória do óleo de suas folhas (BRANQUINHO et al., 2017).

Outra espécie, a *P. aduncum* apresenta ação antimicrobiana e antiparasitária contra *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania infantum* (GUTIÉRREZ et al., 2016), anti-leishmania (BERNUCI et al., 2016) e atividade seletiva contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (VILLAMIZAR et al., 2017).

A identificação por cromatografia gasosa do óleo de *P. vicosanum* evidencia a presença de β -pineno, espatulenol, E-cariofileno, óxido de cariofileno, α -pineno, α -selineno, piperitona, delta cadineno e limoneno que são substâncias químicas que apresentam propriedades biológicas como anti-inflamatória (MESQUITA et al., 2005; BRAIT et al., 2015).

A *P. umbellatum* é utilizada em vários tratamentos empíricos, tais como doenças renais, queimaduras e afecções de pele, malária e parasitoses intestinais (ROERSCH, 2010). O seu extrato mostra amplo potencial farmacológico, incluindo atividades anticancerígena, anti-inflamatória (IWAMOTO et al., 2015) e protetora gástrica (SILVA JUNIOR et al., 2016).

Relatos na literatura mostram que a espécie *P. nigrum* (pimenta do reino) comercializada desde o século XV, como condimento (YUNCKER, 1972) é empregada na medicina tradicional de vários países como analgésico, anti-inflamatório, anticonvulsivante, antioxidante e agente antidepressivo (MAO et al., 2011). O extrato metanólico dos frutos de *P. nigrum* apresenta propriedades ansiolíticas, antidepressivas e antioxidantes em modelo de ratos com a doença

de Alzheimer (HRITCU et al., 2015). Em outros estudos, foram descritas suas ações contra a dislipidemia, diabetes (PARIM et al., 2015) e atividade neuroprotetora na perda olfativa (SINAEI et al., 2017).

Kumar e colaboradores em 2015 evidenciaram propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes das espécies *P. longum* e *P. galeatum*, como uma perspectiva a partir da triagem para mecanismos moleculares. A espécie *Piper longum* também possui efeitos neuroprotetores contra a doença de Parkinson (BI et al., 2015), ação antibacteriana (TEANPAISAN et al., 2016) e antitumoral (Katchman et al., 2017; Stall e Young, 2017). O composto isolado Apigenin 7,4'-dimetil de *P. longum* apresenta atividade sobre o estresse oxidativo, nível de captação de glicose e conteúdo de gotículas de lipídeos (KRISHNA et al., 2015).

Corroborando com os estudos citados, vários outros trabalhos evidenciam as atividades biológicas das diferentes espécies do gênero *Piper*. Por exemplo, as atividades citotóxicas e leishmanicidas de extrato e do óleo essencial das folhas de *P. cernuum* (CAPELLO et al., 2015), a atividade antidiabética do extrato metanólico da flor de *P. claussonianum* (MARQUES et al., 2015), as propriedades citotóxicas de *P. cubeba* em células cancerígenas (GRAIDIST et al., 2015), o efeito anti-hipertensivo de *P. sarmentosum* em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (ZAINUDIM et al., 2015), sua ação antialérgica e anti-inflamatória (MAKCHUCHIT et al., 2017) e a atividade inibitória da *P. methysticum* em células cancerígenas do colo humano (EINBOND et al., 2017).

3.1.3. *Piper amalago* L.

P. amalago, também conhecida popularmente como “jaborandi” ou “pariparoba”, é distribuída desde o México até o Brasil (DOMÍNGUEZ et al., 1985), sendo utilizado pela população como um agente analgésico e anti-inflamatório, bem como para fisiopatologias das vias urinárias (Figura 01) (ACHENBACH et al., 1986; DOMÍNGUEZ e ALCORN, 1985; DOMÍNGUEZ et al., 1985; PARMAR et al., 1997).



Figura 01 - *Piper amalago* L. (Fonte: Prof. Dr. Jonas Mota, 2015).

A análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *P. amalago* (EEPA) mostrou a presença de amidas piperidínicas ou pirrolidínicas, flavonóides e compostos fenólicos (DOMÍNGUEZ et al., 1985; LOPES et al., 2012; NOVAES et al., 2014). No mesmo sentido, outros estudos mostram que os grupos de metabólitos detectados no extrato etanólico bruto de *P. amalago* são alcalóides, taninos condensados, flavonóides e triterpenos. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) evidenciou a presença dos metabólitos secundários vitexina e lupeol, que sugerem potencial antioxidante à espécie (ROVANI et al., 2013).

Na forma lipofílica ou óleo essencial das folhas da espécie *P. amalago* foram identificadas 53 substâncias, onde nove são majoritárias, como descrito de maneira decrescente em porcentagem: (γ) Himachaleno (25,69 %), *p*-Cimeno (9,37%), (E)-metil geranato (7,84%), Cubenol (6,17%), (α) Z- Bisaboleno (4,80%), (*neo*) Acetato de verbenol (4,78%), (α) patchouleno (3,93 %), *p*-Cimeneno (3,36%), (*cis*) Muurol-5-em-4-(α)-ol (3,22%) (SOUZA, 2010).

A literatura relata estudos farmacológicos envolvendo a espécie *P. amalago* mostrando sua atividade esquistossomicida (CARRARA et al., 2014),

diurética e antilitiásica (NOVAES et al., 2014), leishmanicida e acaricida (CARRARA et al., 2013), ansiolítica (MULLALLY et al., 2016), anti-hiperalgésica, antinociceptiva (ARRIGO et al., 2016) e antiofídica (GIOVANNINI e HOWES, 2017). Os testes com as amidas N-[7-(3',4'-Metilenedioxifenil)-2 (E), 4(E)-heptadienoil] pirrolidina, 2-metoxi-4,5-metilenedioxi-Z-cinamoil piperidida (**1**) e N-[7-(3',4'-metilenedioxifenil)-2(Z),4(Z)-heptadieno] pirrolidina (**2**) mostraram atividades antifúngica (ALÉCIO et al., 1998), antileishmania (CARRARA et al., 2013) e anti-esquistossomose (CARRARA et al., 2014).

No entanto, até o momento, somente Sosa e colaboradores em 2002, mostraram o efeito anti-inflamatório do extrato *P. amalago*, utilizando a via tópica através do modelo experimental do edema da orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Dessa maneira, mais estudos sobre essa atividade biológica da *P. amalago* podem contribuir para o avanço do conhecimento científico sobre os potenciais efeitos dessa planta medicinal.

3.2 INFLAMAÇÃO

O organismo humano possui mecanismo natural de defesa contra traumas, estímulos nocivos de origem física, química e/ou biológica, denominado inflamação (COLLINS, 1999). A palavra inflamação deriva do latim *flamma* (fogo ou chama), seu emprego decorre da associação com as características de certas lesões da pele, como calor e vermelhidão (BELIZÁRIO, 2006).

Celsus Aulus Cornelius (42 a.C. – 37 d.C), descreveu e classificou, de modo pioneiro, os quatro sinais clássicos da inflamação sendo eles: **calor** (caracterizado pelo aumento da temperatura tecidual, perceptível nas superfícies corporais, decorrente da hiperemia e do aumento do metabolismo local), **rubor** (caracterizado pela hiperemia /reflexo axônico, que resulta na diminuição de impulsos vasoconstritores), **tumor** (decorrente do aumento da permeabilidade vascular, edema, que pode determinar aumento do volume hídrico local em até 5 ou 7 vezes) e **dor** (causada pela irritação química nas terminações nervosas e pela compressão mecânica. Essa classificação permaneceu até 1858, quando

Virchow acrescentou a esses sinais, a **perda da função** do órgão acometido dessa condição fisiopatológica (COLLINS, 1999).

A inflamação é um contribuinte para uma série de doenças crônicas, como doenças neurodegenerativas, cardíacas, hepatite alcoólica, diabetes e tumores; sendo uma resposta complexa do hospedeiro em defesa da invasão de patógenos, a fim de restaurar a homeostase tecidual (YU et al., 2017). Esta reação serve para destruir ou imobilizar o agente agressor. Quando isso acontece, maior quantidade de mediadores químicos migram para essa área, provocando reações teciduais, caracterizadas pela vasodilatação local, aumento da permeabilidade dos capilares, com extravasamento de líquido para espaços intersticiais, migração de leucócitos, monócitos e pela intumescência das células (PINTO et al., 2008).

A inflamação é caracterizada como aguda ou crônica. A de forma aguda se caracteriza com uma resposta de início rápido e de curta duração (horas até duas semanas), tem predomínio de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e exibe fenômenos vasculares e exsudativos intensos. A de feição crônica possui longa duração (além de duas semanas), é caracterizada pelo influxo de leucócitos mononucleares (linfócitos e macrófagos) exibe fenômenos mais destrutivos e regenerativos do que o processo agudo (LEE et al., 2017).

3.2.1 Inflamação Aguda

É a resposta imediata e precoce a um agente nocivo. É caracterizada por três eventos principais: 1) Vasculares: alterações do calibre vascular, resultando no aumento do fluxo sanguíneo; 2) Exsudativos: alterações estruturais da microvasculatura, permitindo que as proteínas plasmáticas deixem a circulação; 3) Proliferativos: migração dos leucócitos da microcirculação e acúmulo na área da lesão (NOYD et al., 2016).

Os fenômenos vasculares são caracterizados por vasodilatação mediada por aminas vasoativas (como a histamina), óxido nítrico (NO), prostaglandinas e cininas para que haja maior concentração de sangue e, conseqüentemente,

maior número de leucócitos para o processo inflamatório e aumento da permeabilidade para auxiliar na saída de células do sistema imune. Estes são responsáveis por estimular aberturas entre as células endoteliais; pela lesão endotelial direta ou induzida por leucócitos; e pelo aumento da passagem de líquidos através do endotélio. Então, o aumento da permeabilidade vascular permite a entrada de leucócitos e proteínas plasmáticas nos locais da infecção ou da lesão do tecido (Figura 02) (KUMAR et al., 2008; YU et al., 2017).

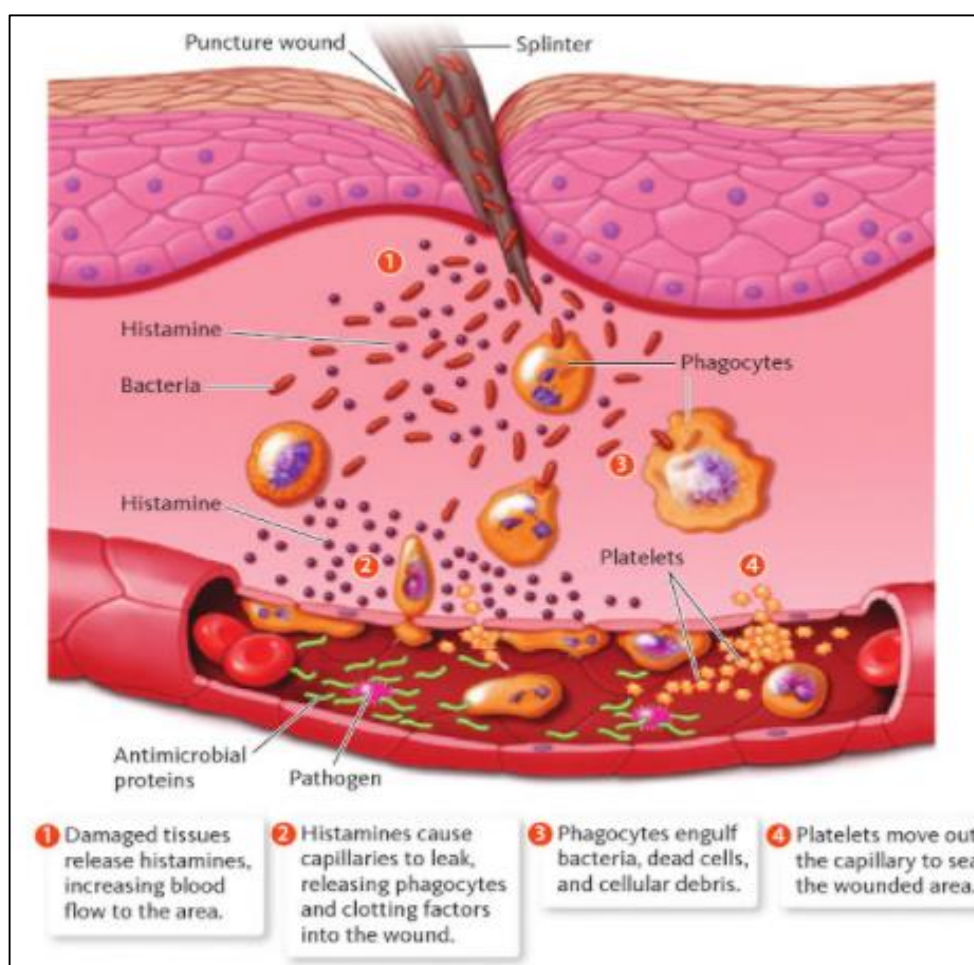


Figura 02 - Passos da resposta inflamatória. (Fonte: NOYD et al., 2016).

A partir daí, há os fenômenos exsudativos. Em consequência da hiperemia, a velocidade sanguínea diminui e favorece a marginação dos leucócitos na parede endotelial. Quando o leucócito encontra a parede do endotélio, há o processo de rolamento no qual os leucócitos se ligam a moléculas de expressão (selectinas e integrinas) e começam a rolar pelo endotélio até

encontrarem um espaço entre as células endoteliais e passarem ao processo de transmigração (diapedese) no qual o leucócito migra de dentro da parede vascular com o auxílio de mediadores como fragmentos do complemento que são responsáveis pela quimiotaxia, isto é, o direcionamento do leucócito para o agente lesivo (Figura 02) (KUMAR et al., 2008; YU et al., 2017).

No momento da transmigração, uma rede de fibrina serve de sustentação para a migração. Uma vez fora do vaso sanguíneo, o leucócito vai ao encontro do agente lesivo. Para que essa célula do sistema imune reconheça o agente lesivo, anticorpos fazem opsonização, ou seja, envolvem todo o agressor. Com isso, o leucócito se aproxima, reconhece o agente e o engloba por endocitose formando, então, uma vesícula endocítica. É dentro dessa vesícula que o leucócito fará a morte do agressor e sua digestão por enzimas lisossomais. No final ocorre a produção de mediadores, citocinas e metabólitos do ácido araquidônico, que amplificam a reação inflamatória (KUMAR et al., 2008).

3.2.2 Inflamação Crônica

É considerada de duração prolongada (semanas a meses), na qual a inflamação começa de maneira insidiosa, como uma resposta de baixo grau, latente e muitas vezes assintomática. Ela caracteriza algumas das doenças mais comuns, como asma, aterosclerose, artrite reumatóide, diabetes tipo II, tuberculose, doenças neurodegenerativas e câncer (SERHAN et al., 2007; SILVA, 2010). A inflamação crônica se caracteriza por: 1) infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos) responsáveis pelo reflexo de uma reação persistente a lesão; 2) destruição tecidual induzida principalmente pelas células inflamatórias; 3) tentativas de cicatrização por substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo, com proliferação vascular (angiogênese) e fibrose (cicatrização). O granuloma é um padrão específico da inflamação crônica na tentativa de conter uma lesão que é difícil de erradicar. Células epitelióides, ou seja, macrófagos ativados que tem sua morfologia alterada, compõem o granuloma juntamente com células gigantes e um halo

linfocítico. O tecido de granulação compreende a inflamação crônica não específica. Nesse tecido há células de defesa, fibroblastos e novos vasos sanguíneos que são responsáveis por levar mais nutrientes ao local afetado (KUMAR et al., 2008; LON et al., 2012).

3.2.3 Anti-inflamatórios

Existem dois tipos de anti-inflamatórios: esteroidais (AIEs) e não-esteroidais (AINEs).

AINEs - Segundo Rang e Dale (2012), os anti-inflamatórios não-esteroidais compõem a classe de medicamentos mais utilizada entre todos agentes terapêuticos. Os AINEs possuem algumas ações principais: anti-inflamatória, analgésica (dores moderadas), antitérmica, antitrombótica (apenas ácido acetilsalicílico) e antirreumática. Em geral, o mecanismo de ação dos AINEs está relacionado à inibição da enzima ciclooxigenase (COX), ou seja, inibição da síntese de prostaglandinas, que são substâncias endógenas intermediárias do processo inflamatório (KUMMER e COELHO, 2002).

A COX-1 está presente na maioria dos tecidos incluindo as plaquetas sanguíneas, regulando processos celulares normais como citoproteção gástrica, homeostase vascular, agregação plaquetária e função renal. A COX-2 surge nos sítios de inflamação provocando elevada produção de prostanóides, expressa em tecidos como cérebro, rins e ossos. A maioria dos AINEs inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2, são os chamados não seletivos, como exemplo ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, piroxican. Mas existem fármacos como meloxicam, nimesulida e celocoxibe que apresentam seletividade maior ao COX-2, eles apresentam menor risco de problemas gastrointestinais e não exercem efeito nas plaquetas (RANG et al., 2012).

As reações adversas mais comuns são problemas gastrointestinais, que podem variar de dispepsia a sangramentos de estômago e duodeno; problemas cardiovasculares; complicações renais onde podem induzir insuficiência renal aguda, hepáticos que ocorrem às elevações de transaminases; reações

pulmonares, como broncoespasmo e infiltrados pulmonares; hematológicos, que incluem meningite asséptica, psicose e disfunção cognitiva; e alguns problemas de pele também já foram constatados com o uso inadequado dos AINES (PAPATHEODORIDIS et al., 2006; HUERTA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2008).

AIEs – Corticosteroides endógenos (cortisol, cortisona e corticosterona) são hormônios relacionados com o metabolismo da glicose e das proteínas, além de sua função antagonista das respostas imunológicas e inflamatórias em nosso organismo. Suas concentrações na corrente circulatória apresentam-se elevadas pela manhã e baixas a noite, sendo que fatores psicológicos e certos estímulos como estresse, calor, frio ou alguma infecção, podem afetar a liberação dos mesmos (GOODMAN e GILMAN, 2003). Os medicamentos anti-inflamatórios esteroidais (também conhecidos como corticoides, corticosteroides ou glicocorticoides) são drogas que agem semelhantemente ao cortisol endógeno (glicocorticóide), tornando-se agentes importantes no tratamento de numerosos distúrbios inflamatórios, reumatológicos e alérgicos. Essa aplicação terapêutica estimulou o desenvolvimento de muitos esteroides sintéticos com atividade anti-inflamatória e imunossupressora (PINTO et al., 2008).

Dexametasona é um glicocorticoide sintético que apresenta potente atividade farmacológica anti-inflamatória e imunossupressora atuando no controle da velocidade de síntese de proteínas. Este fármaco atua inibindo a transcrição de genes, os quais, após a tradução, originam receptores, proteínas que suprimem as citocinas e também proteínas que controlam a ativação, migração, adesão e recrutamento celular (CAVAGNI et al., 2005). Como consequência ocorre inibição periférica da proliferação dos linfócitos T, acompanhada por inibição da migração celular para sítios inflamatórios e controle da recirculação de leucócitos. A dose de dexametasona administrada por via oral é variável e com posologia individualizada, de acordo com a gravidade da doença e a resposta do paciente. Em situações agudas em que é urgente um alívio rápido são permitidas altas doses, as quais podem ser mesmo exigidas, por um curto período de tempo (PINTO et al., 2008). Quando os

sintomas forem adequadamente suprimidos, a posologia deve ser mantida ao nível mínimo capaz de promover o alívio da dor, sem efeitos hormonais excessivos. Elevadas doses de dexametasona podem causar elevação da pressão arterial, retenção de sal e água, e aumento da excreção de potássio (JARREAU et al., 2009).

A retirada abrupta de corticosteroides, subsequente ao uso por um período prolongado pode provocar febre, mialgia, insuficiência suprarrenal aguda, hipotensão ou até óbito. Outros efeitos adversos do uso em longo prazo incluem inibição do crescimento em crianças, distúrbios do balanço hidreletrolítico (levando a edema, hipertensão e hipopotassemia), afinamento da pele, osteoporose, glaucoma, miopatia e úlcera péptica. Altas doses podem causar também necrólise avascular do colo femoral e síndrome de Cushing, a qual é caracterizada por face de lua, estrias e acne (CHEN et al., 2008).

3.3 DOR

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial desagradável que pode estar relacionada a uma lesão. A sensação de dor tem um papel fisiológico importante ao constituir um sinal de alerta na detecção de algo que ameace a integridade física do organismo. Porém, quando persistente, dor deixa de desempenhar suas funções primordiais e passa a provocar reações emocionais negativas, tornando-se debilitante e causadora de sofrimento (LUIZ et al., 2015).

3.3.1 Mecanismos da dor

A percepção de um estímulo nociceptivo se dá por estruturas específicas denominadas nociceptores (ou receptores da dor), situadas principalmente nas terminações nervosas de uma parcela das fibras sensoriais aferentes primárias, chamadas de fibras nociceptivas. Estes neurônios periféricos estão amplamente distribuídos na pele, vasos sanguíneos, músculos, articulações e vísceras,

sendo sensíveis a estímulos nocivos ou potencialmente danosos ao organismo (GOLD e GEBHART, 2010).

As fibras aferentes de primeira ordem são classificadas em termos de estrutura, diâmetro e velocidade de condução. As fibras $A\alpha$ e $A\beta$ são mielinizadas, com diâmetro maior que $40\ \mu\text{m}$ e velocidade de condução de 30-100 m/s. As fibras aferentes $A\delta$ são pouco mielinizadas, variando em seu diâmetro entre $2,0\text{-}6,0\ \mu\text{m}$ e têm velocidade de transmissão de 12-30 m/s. Fibras não mielinizadas do tipo C possuem diâmetro entre $0,4\text{-}1,2\ \mu\text{m}$ e mostram uma velocidade de condução de 0,5-2,0 m/s (COSTIGAN e WOOLF, 2000). Quando um dano inicial ativa os nociceptores locais, as fibras nervosas $A\delta$ e C ficam sensibilizadas e assumem limiares de ativação mais baixos. Estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida, fina e bem localizada em geral refletem a ativação de fibras $A\delta$ (que conduzem a designada dor primária), já a nocicepção difusa e lenta (em queimação) é conduzida por fibras C (dor secundária) (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os nociceptores chegam de maneira altamente organizada no corno dorsal da medula espinhal, com as fibras mielinizadas $A\delta$ terminando principalmente nas lâminas I e V e as fibras C, não mielinizadas, na lâmina II. A partir destas regiões, são acionados neurônios de projeção e neurônios de segunda ordem na medula espinhal. Esta conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como o glutamato e a substância P, que são responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, respectivamente (Figura 03-A) (GOLD e GEBHART, 2010).

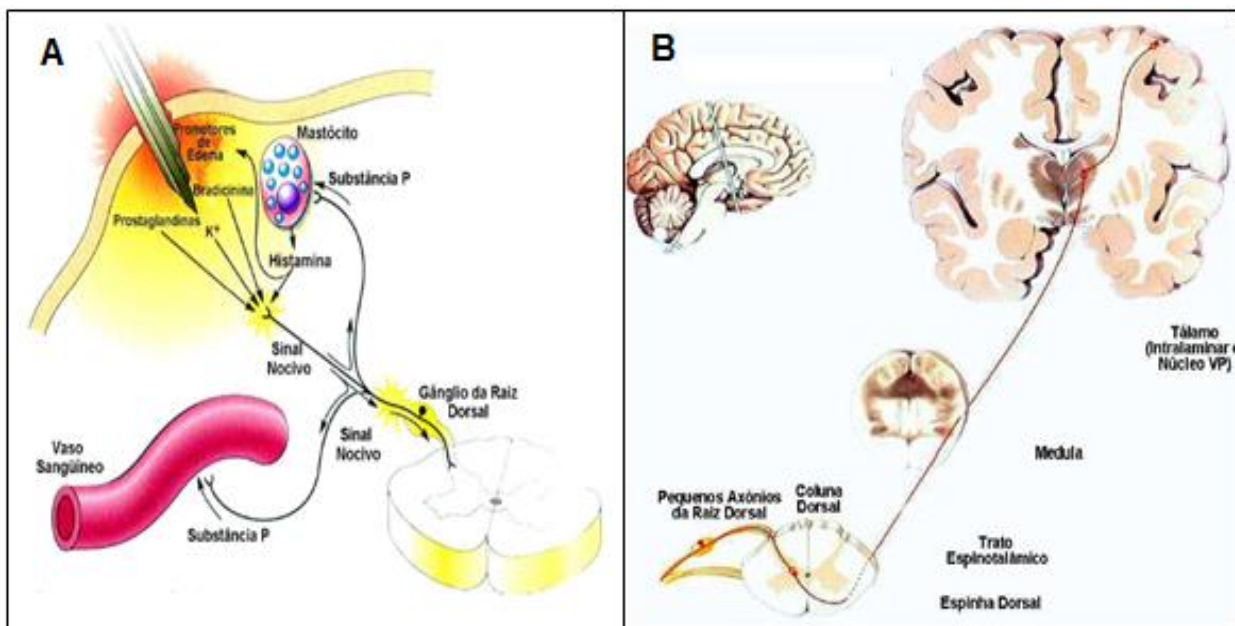


Figura 03 - Via de transdução da dor. (Fonte: GOLD e GEBHART, 2010).

Após a interação direta ou indireta com neurônios de projeção no corno dorsal, os axônios de neurônios de segunda ordem formam tratos aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas do tronco cerebral e diencefalo, incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, região parabraquial, formação reticular da medula, complexo amigdalóide, núcleo septal e hipotálamo, entre outras (Figura 03-B) (ALMEIDA et al., 2004).

As vias polissinápticas ascendentes da dor, possuem uma estação relé de neurônios de segunda ordem antes de projetarem aos centros cerebrais superiores, sendo estas as vias pós-sináptica da coluna dorsal e do trato espinocervical (SPIEGEL et al., 2015). O tálamo desempenha um papel fundamental como região responsável pela integração do impulso de dor. A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem impulsos para o córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor, ele está envolvido na recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo (FURST, 1999).

O controle da transmissão da dor também está sujeito à modulação pelas vias descendentes originadas no tronco cerebral. Um circuito modulador endógeno descendente conectando a substância cinzenta periaquedutal,

incluindo o núcleo magno da rafe e estruturas adjacentes da medula rostral ventromedial e o corno dorsal da coluna é responsável pela ativação de conexões que promovem inibição ou facilitação da nocicepção (LUIZ et al., 2015). O sistema de modulação endógeno é constituído de interneurônios nas camadas superficiais da medula espinhal na qual há participação de peptídeos endógenos (endorfinas, encefalinas, dinorfinas), cuja função é modular as sinapses nociceptivas, bloqueando a liberação de neurotransmissores excitatórios pelo terminal pré-sináptico e hiperpolarizando a membrana pós sináptica. Todos esses peptídeos endógenos são encontrados na substância cinzenta periaquedutal, nos núcleos da rafe e no corno dorsal da medula (SANDKUHLER, 2009).

3.3.2 Classificação da dor

A dor pode ser dividida em duas principais categorias: a dor aguda e a dor crônica. A dor aguda é caracterizada por uma rápida sensação desagradável, que alerta o organismo de alguma ameaçada física. Esta dor geralmente responde bem ao tratamento com analgésicos opióides ou anti-inflamatórios não esteroidais (MELKINOVA, 2010). A literatura não relata um limite preciso e bem estabelecido para sua duração, podendo variar de horas a algumas semanas. Pode ser decorrente das mais variáveis situações, incluindo causas inflamatórias, traumáticas, infecciosas, pós-operatórios e procedimentos médicos em geral (PARK e VASKO, 2005).

Já a dor crônica não tem papel fisiológico, uma vez que ela deixa de constituir apenas um sintoma para tornar-se parte da doença, com duração maior que três meses (AFILALO e MORLION, 2013). Tanto a dor inflamatória quanto a dor neuropática são subtipos da dor crônica. A dor inflamatória, também chamada de nociceptiva, está associada a um processo inflamatório devido à ativação de nociceptores, sua intensidade reflete a resposta fisiológica do organismo e sua capacidade de resolução da lesão (SPIEGEL et al., 2015). Na segunda, a dor é deflagrada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso

periférico (SNP) ou central (SNC) que, por vezes, pode ser decorrente de uma dor originalmente inflamatória. Geralmente as dores crônicas não respondem bem à terapia com AINES. Na maioria dos casos, pacientes que sofrem de dor crônica apresentam quadros de hipersensibilidade, como hiperalgesia (aumento da sensibilidade à dor) ou alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente inócuos) (LUIZ et al., 2015).

3.3.3 Dor Neuropática

A dor neuropática é definida pela IASP como “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso” (AFILALO e MORLION, 2013). Ela geralmente se apresenta como uma dor persistente, associada a sensações de queimação e alfinetadas, acompanhada frequentemente por hiperalgesia (resposta aumentada à dor após um estímulo nocivo) e/ou alodinia (sensação de dor devido à estimulação não nociva, como um toque leve ou calor/frio inócuo) (LISI et al., 2015). Além disso, a dor pode ter instalação tardia após a lesão inicial e, assim, estar presente na ausência de uma lesão detectável, dificultando o diagnóstico e o tratamento. Em adição, a dor neuropática pode espalhar-se além dos limites da distribuição cutânea dos nervos lesados e manifestar-se bilateralmente, o que sugere o envolvimento de mecanismos centrais (WANG & WANG, 2003).

As principais causas de dor neuropática são: lesões traumáticas de nervos, infecção por *Herpes zoster*, diabetes, radioterapia, quimioterapia, álcool, AIDS, doenças auto-imunes (esclerose múltipla, mielopatias infecciosas e degenerativas), deficiência de vitamina do complexo B, lesões isquêmicas, compressão neural, tumores, degeneração distal e doença de Parkinson (ATTAL e FINNERUP, 2010).

Com relação aos mecanismos exatos de como a dor neuropática ocorre, a literatura sugere que o desenvolvimento da dor crônica após lesão de nervo deva-se à ocorrência de alguns processos na medula espinhal: excitabilidade aumentada, inibição diminuída, reestruturação organizacional das células e,

eventualmente, mudança de fenótipo; essas alterações no equilíbrio do SNC podem resultar em atividade neuronal excessiva (REY et al., 2012). Esses eventos prolongam a ativação dos nociceptores e os impulsos contínuos transmitidos pelos mesmos influenciam os circuitos espinhais, levando à sensibilização central e manutenção do estado de dor crônica. Além dessas mudanças, a perpetuação do próprio processo inflamatório que circunda o local de lesão também resulta em sensibilização central, que tem papel fundamental na progressão para cronicidade, mesmo após eliminação da causa primária (COUTAUX et al., 2005).

3.3.3.1. Excitabilidade - A sensibilização central representa o estado de sensibilidade aumentada dos neurônios do corno dorsal, de modo que seus limiares de ativação estão reduzidos e as suas respostas aos impulsos sinápticos, aumentada (WOOLF, 2004). As características eletrofisiológicas de neurônios do corno dorsal da medula de ratos após constrição do nervo ciático e observaram que dez dias após indução da neuropatia muitos neurônios mostraram características anormais, como: resposta à estimulação tátil inócua, ausência de campos receptores na periferia e atividade espontânea muito alta. Em alguns casos, as respostas ao estímulo mecânico duraram muito tempo (10 min) (WANG & WANG, 2003).

As fibras C também podem ser sensibilizadas por estimulação repetitiva, resultando em uma prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal. Este fenômeno é conhecido como *wind up*, que é caracterizado pelo aumento progressivo no número de potenciais de ação de neurônios do corno dorsal evocados por estímulo (LISI et al., 2015). Episódios de *wind up* podem levar à potenciação de longo prazo (*Long-Term Potentiation*, LTP), que consiste em reforço persistente da eficiência da transmissão sináptica, e seu surgimento parece decorrer do aumento na expressão de canais de sódio dependentes de voltagem e da diminuição na expressão de canais de potássio que ocorre em resposta à lesão neural (AFILALO e MORLION, 2013).

Outro evento que contribui para o aumento da sensibilização é a mudança na expressão de canais de sódio dependentes da voltagem, que parecem estar envolvidos com os disparos ectópicos espontâneos, que são um sinal característico de nervos lesados (ANDERSON et al. 2003). Os canais de sódio dependentes de voltagem expressos no sistema nervoso são divididos em dois grupos de acordo com sua sensibilidade à tetrodotoxina, sendo assim classificados como canais de sódio sensíveis ou resistentes à tetrodotoxina. Os primeiros são expressos preferencialmente por fibras de diâmetro médio a grande, enquanto que os últimos são encontrados principalmente em fibras C, e ambos têm sua expressão alterada após a lesão de nervos ou axotomia. Ambos os canais parecem ser os principais responsáveis pela geração dos disparos ectópicos, que contribuem para a dor espontânea e sensibilização de neurônios periféricos e centrais (LIU et al., 2000).

3.3.3.2. Inibição - Enquanto os neurotransmissores excitatórios parecem ter papel fundamental na sensibilização central, é importante notar que outros neurotransmissores e receptores inibitórios podem também estar envolvidos. A diminuição dos níveis de GABA (Gamma-AminoButyric Acid), um importante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, contribui para o desenvolvimento e manutenção do estado de dor crônica (JENSEN et al., 2011). Em modelos de dor crônica em ratos, há uma perda na imunorreatividade GABAérgica, indicando uma redução do tônus inibitório. O sistema GABAérgico na coluna dorsal regula os neurônios do corno dorsal, uma vez que o bloqueio dos receptores GABAérgicos nessa região produz hipersensibilidade de neurônios do corno dorsal. Além disso, administração intratecal de agonistas GABAérgicos bloqueiam a hiperalgesia e a alodinia induzidas por ligação de nervo espinhal, enquanto antagonistas de receptores GABA produzem alodinia tátil, demonstrando que a perda do tônus inibitório na coluna dorsal é suficiente para causar alodinia por reduzir os limiares de ativação (KATSURA et al., 2006). Moore *et al.* (2002) conduziram um estudo que mostrou que a lesão de nervo também reduz a inibição no corno dorsal superficial com uma perda seletiva de correntes sinápticas GABAérgicas inibitórias devida à indução da apoptose dos

mesmos. Isso resulta em uma perda de função que contribui para sensibilidade anormal à dor (WOOLF, 2004).

3.3.3.3. Mudança de Fenótipo - Após a lesão de nervo periférico, há uma mudança drástica nos níveis de transcrição de certas substâncias, várias centenas de genes estão ativados ou inibidos. Incluindo genes associados à regeneração, fatores de sobrevivência e muitos genes que determinam ou não o funcionamento dos neurônios (LUIZ et al., 2015). Como consequência, surgem alterações na excitabilidade dos neurônios, bem como em suas capacidades de transmissão e transdução e também modificações no fenótipo dos neurônios. Por exemplo, neuromoduladores como o fator de crescimento derivado do encéfalo e a substância P são normalmente expressos apenas em fibras C normalmente, mas após a lesão de nervo, começam a ser expressos também em fibras A (KRAYCHETE et al., 2008).

A expressão gênica dos receptores nociceptivos mostra-se predominante nas fibras nervosas de pequeno diâmetro e quando estimulados revertem a hiperalgesia térmica e mecânica após uma lesão neural. Isso fortalece a hipótese de que a dor neuropática está relacionada com o trauma do aferente primário, lesionado ou não (CARLINO et al., 2014). Na vigência da lesão do aferente primário, ocorre a ativação de macrófagos em resposta à inflamação e aumento da expressão de receptores TRVP1 (receptor potencial transitório vanilóide tipo I), fatores neurotróficos derivados do encéfalo (BDNF) e neurotransmissores excitatórios, como o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) é observado (TREEDE et al., 2008). As fibras C adjacentes e intactas, por pertencerem a um mesmo nervo ou fascículo das lesionadas, desenvolvem aumento de sensibilidade a catecolaminas e da expressão de canais para o sódio. Assim, Treede e colaboradores em 2008, sugeriram que a atividade espontânea da fibra A δ inicia a sensibilização central e altera a expressão fenotípica do aferente primário (fibras C).

3.3.4 Dor e depressão

A prevalência de depressão em pacientes com dor crônica varia de 50 a 80%, dependendo da etiologia da dor (CAHILL et al., 2017). A Organização Mundial da Saúde estima que 350 milhões de pessoas sofram de depressão e mais de 800.000 pessoas morrem por suicídio a cada ano. A relevância desta co-morbidade é realçada pelo fato de que a dor crônica é a segunda maior causa de suicídio entre todas as doenças médicas. De acordo com o *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*, o diagnóstico de um transtorno depressivo requer a presença de sintomas como humor deprimido, distúrbios do ciclo do sono, fadiga e fraca concentração de pelo menos 2 semanas, causando desconforto clinicamente significativo no funcionamento social (ZIS et al., 2017).

O termo depressão é empregado para designar um comportamento afetivo normal (tristeza), um sintoma ou fisiopatologia do Sistema Nervoso Central (SNC) (ELVEMO et al., 2015). A tristeza constitui-se na resposta humana universal às situações de perda, derrota, desapontamento e outras adversidades. Enquanto sintoma, a depressão pode apresentar variados quadros clínicos, como transtorno de estresse pós-traumático, demência e esquizofrenia. Pode ainda ocorrer como resposta a situações estressantes, ou a circunstâncias sociais e econômicas adversas. Enquanto síndrome, a depressão inclui disfunções cognitivas, psicomotoras e vegetativas como alterações no sono e apetite (LYTHE et al., 2012; ZIS et al., 2017).

Estudos realizados com pacientes acometidos de fibromialgia crônica (FMS), caracterizada por dor disseminada e fadiga, afetando o tecido conjuntivo e sistema locomotor, mostraram que 40% dos pacientes com FMS apresentam distúrbios psicológicos e diminuição na atividade cerebral caracterizada pela depressão (ELVEMO et al., 2015; SEVIMLI et al., 2015).

Os pacientes com depressão apresentam sintomas físicos dolorosos inexplicáveis como fadiga, dores musculares e dores de cabeça, demonstrando dessa forma como a dor e as depressões estão interligadas (WANG et al., 2011). A coexistência de ambas as patologias envolve principalmente vias neurobiológicas como alguns neurotransmissores (glutamato, serotonina, norepinefrina, dopamina, fator neurotrópico e ácido gama-aminobutírico), os

quais são presentes tanto na dor, quanto na depressão (RIJAVEC e GRUBIC, 2012). A literatura relata que pacientes com depressão, apresentam anormalidades neuro-hormonais e imunológicas, bem como, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, alterações funcionais no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), além de mudanças nos mecanismos de estresse oxidativo de natureza progressiva durante essa fisiopatologia (HEPGUL et al., 2013).

Tem sido proposto que os processos inflamatórios em depressão induzem alterações da regulação imune no SNC. Os níveis elevados de corticosterona e aumento da expressão de citocinas que são transportados para o SNC podem levar à estimulação da microglia e de astrócitos, que por sua vez produzem mais citocinas através de um mecanismo de *feedback* (CAHILL et al., 2017). Esta ativação pode promover então a supressão de neurogenese e a neuroplasticidade, aumentando ainda mais o desenvolvimento de sintomas da depressão, sugerindo que uma inflamação pode definir a base para o aparecimento da depressão. Uma vez que a dor crônica e a depressão coexistem com essa alta prevalência, é racional a hipótese de que mecanismos patogênicos subjacentes comuns possam existir (ZIS et al., 2017).

3.3.5 Controle farmacológico dor e depressão

As dores neuropáticas geralmente são de difícil controle e tratamento, devido aos seus diferentes subtipos e da variabilidade individual. Dessa maneira, os fatores sociais, psicológicos e contextuais, bem como experiências prévias experimentadas pelo indivíduo, podem modular a resposta à farmacoterapia (CARLINO et al., 2014).

Atualmente, duas classes de fármacos são recomendadas para tratamento de dor neuropática, como primeira escolha: a) os antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, nortriptilina e desipramina) e inibidores da recaptação de serotonina ou de noradrenalina (ISRS; duloxetina e venlafaxina); e b) os antiepiléticos (gabapentina e pregabalina). Para pacientes com dor localizada

recomenda-se ainda a utilização tópica de lidocaína e capsaicina, embora sua eficácia seja modesta em estudos que o comparam com placebo (O'CONNOR e DWORKIN, 2009). Já para crises de dores neuropáticas aconselha-se a utilização de analgésicos opióides, como morfina, oxicodona, metadona, levorfanol ou tramadol. Apesar do aumento recente nos estudos e debates sobre a utilização continuada de opióides no alívio de dores neuropáticas, o emprego crônico destes fármacos não é recomendado por causa dos seus efeitos colaterais, que incluem constipação intestinal, dependência física e tolerância farmacodinâmica (ATTAL e FINNERUP, 2010). Novos fármacos para utilização na dor neuropática vêm sendo testados, entre os quais se destacam os “patches” de capsaicina, a toxina botulínica A e os agonistas de receptores canabinóides (LUIZ et al., 2015).

As altas taxas de abuso de opiáceos terapêuticos têm alimentado um forte debate sobre as práticas de seu uso em tratamentos prescritos e se a dor é um fator importante na susceptibilidade ao vício. Estudos pré-clínicos mostram que os opióides são auto-administrados apenas em doses que revertem hipersensibilidade mecânica em um modelo de dor neuropática e que os anti-inflamatórios reduzem o consumo de opióides em um modelo de dor inflamatória crônica. Contudo, outros argumentam que o uso indevido de opióides e o comportamento anormal relacionado com drogas em pacientes com dor crônica variam de 21 a 29% e o vício iatrogênico (induzido por médico) pode ser tão alto quanto 26% (CAHILL et al., 2017).

Para a depressão, em geral, os ISRS são tolerados melhor do que os outros fármacos, no entanto, aumentam o risco de hemorragias gastrointestinais, acidente vascular cerebral hemorrágico, devendo serem usados com cautela. Os inibidores seletivos da recaptção da norepinefrina, como a duloxetina, demonstraram ser eficaz tanto como antidepressivo como para dor crônica. Como antidepressivos tricíclicos, a amitriptilina, clomipramina e nortriptilina são os mais usuais. Na categoria de noradrenérgicos e antidepressivos serotoninérgicos específicos, a mirtazapina é o antidepressivo representante. Bupropion é inibidor da recaptção da norepinefrina-dopamina

usado principalmente como um antidepressivo e ajuda à cessação do tabagismo. Por fim, como antagonista da serotonina e inibidores da receptação, a trazodona é o antidepressivo mais comumente utilizado nesta categoria (ZIS et al., 2017).

3.4 TOXICIDADE

Atualmente, com os elevados índices de tumores e casos de mutagênese resultando em carcinogênese nas populações (AOKI, 2017), constantes pesquisas por compostos que possam reduzir a frequência de mutações no DNA vêm sendo realizadas, com estudos que mostram a possibilidade de redução de danos genéticos e a minimização da toxicidade dos agentes antineoplásicos utilizados em protocolos clínicos (SCHNEIDER et al., 2016).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou normas para a regulamentação destes medicamentos. A portaria nº 6 de 1995 estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos; a portaria nº 18 de 2004 dispõe sobre os registros de medicamentos fitoterápicos e o guia publicado em 2013 trata de diversos testes pré-clínicos a serem realizados para o desenvolvimento de medicamentos; e a portaria nº 26 de 2014 é a resolução que define as categorias de medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, estabelecendo os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro e notificação de produto tradicional fitoterápico (ANVISA, 1995; 2004; 2013; 2014).

A preocupação das autoridades regulatórias com a normatização de medicamentos fitoterápicos permite a avaliação de pontos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. O uso tradicional de plantas medicinais baseado em conhecimento popular, aliado à crença de que produtos, quando naturais, não causam reações tóxicas, fez com que poucas plantas

fossem de fato avaliadas através de estudos pré-clínicos (TUROLLA e SOUZA, 2006).

A genotoxicidade é uma especialidade que se situa entre a toxicologia e a genética, sendo chamada, também, de genética toxicológica ou toxicogenética. Ela avalia os potenciais efeitos genotóxicos de uma substância através de testes que são categorizados pelos indicadores biológicos, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA (QUEIROZ et al., 2013).

A toxicidade da espécie *P. amalago* foi avaliada por Lopes et al, em 2012, com o teste de toxicidade aguda. Foram administradas diferentes concentrações de *P. amalago*, de 500mg/kg à 2000 mg/kg e os ratos avaliados por 14 dias. Os resultados indicaram que não houve toxicidade aguda e a DL50 foi estimada em 2,545 mg/kg.

3.5 MODELOS DOS TESTES FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS

3.5.1. Testes para avaliar parâmetros inflamatórios em macrófagos

O processo inflamatório está envolvido com a ativação de várias células imunes, incluindo macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Em particular, o macrófago desempenha um papel importante na inflamação, induzindo a expressão de uma série de citocinas e mediadores inflamatórios (YU et al., 2017).

Os macrófagos desempenham um papel importante na primeira linha de defesa contra patógenos invasores (KAVANOVÁ et al., 2017). Logo após a lesão, macrófagos do fenótipo M1 produzem citocinas, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina seis (IL-6) e enzimas pró-inflamatórias (COX-2) e liberam NO que, em conjunto com as citocinas, podem ampliar o dano tecidual. Depois de 48 horas, macrófagos do fenótipo M2 são ativados em particular pelas citocinas IL-4, IL-10 e IL-13. M1 é o estado ativado clássico que é mais associado com pró-inflamação, enquanto M2 é mais protetora e associada com anti-inflamação (SOUZA et al., 2014). Recentemente, mostraram que a hipotermia apresenta

efeitos neuroprotetores em parte devido a uma mudança das células de microglia do tipo M1 para M2 (LEE et al., 2017). A mudança no fenótipo dos macrófagos de M1 para M2 é um evento chave na regeneração muscular e coincide com a mudança do estágio proliferativo para a fase de diferenciação inicial da miogênese. Ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular têm o objetivo de testar a atividade citotóxica de vários tipos de compostos, soluções e materiais em diferentes tipos celulares (ZOR et al., 2017).

3.5.1.1. Espriamento

O teste de difusão de macrófagos, também chamado de espiamento, foi descrito pela primeira vez por Rabinovitch e seus colaboradores (1977). Esse teste reflete o estado de estimulação de macrófagos e se fundamenta na propriedade que essas células têm de se aderirem ao vidro e apresentarem espiamento quando estimuladas (MONTEIRO et al., 2008). O espiamento dos macrófagos representa um estado de ativação nos quais as células emitem pseudópodos e pode então contactar um agente estranho, e a subsequente a fagocitose que impedem a multiplicação em demasia de um microrganismo no organismo hospedeiro; em uma segunda instância os peptídeos originados da fagocitose e digestão do microrganismo serão apresentados aos linfócitos T auxiliares através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II, originando uma resposta imune adaptativa (PETRICEVICH, 2002; NUNES et al., 2011).

3.5.1.2. Óxido nítrico (NO)

A produção de NO por macrófagos é determinada pelo acúmulo de nitrito nos sobrenadantes de cultura celular, que é medida pelo método de Griess. A absorbância é determinada pelo teste de ELISA e os valores da concentração de nitrito são calculados a partir de uma curva de calibração construída utilizando nitrito de sódio como padrão e expressa em $\mu\text{M NO}^{-2}$ (CARLOS et al., 2005). NO

é um mediador pró-inflamatório envolvido em vários eventos fisiológicos e sua produção é extremamente importante para defender o corpo. No entanto, sua superprodução pode levar a danos nos tecidos e ativação de mediadores pró-inflamatórios associados à inflamação aguda e crônica (NJOYA et al., 2017).

3.5.2. Teste para avaliar parâmetro inflamatório de pleurisia induzida por BCG

Em 1882, Robert Koch descobriu o agente causador da tuberculose (TB), uma doença infecciosa transmitida pelo ar causada por organismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Atualmente, a tuberculose continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade, com cerca de 10,4 milhões de novos casos, principalmente em países de baixa renda (PAI E FURIN, 2017).

O desenvolvimento da TB depende da capacidade do hospedeiro para provocar uma potente resposta imunitária mediada por células, resultando na ativação de macrófagos. A infecção começa quando *Mycobacterium tuberculosis* entra nos pulmões por inalação, atinge o espaço alveolar e encontra os macrófagos alveolares residentes. *M. tuberculosis* invade o tecido intersticial pulmonar, através das bactérias que infectam diretamente o epitélio ou pelos macrófagos alveolares infectados migrando para o parênquima pulmonar (XIONG et al., 2016).

No modelo de pleurisia induzida por *Mycobacterium bovis* (BCG) em camundongos ocorre acúmulo bifásico de leucócitos após 24 h e 15 dias de infecção, caracterizado principalmente por aumento no número de neutrófilos e células mononucleares. Os neutrófilos foram observados em maior número na cavidade pleural em 4 h e células mononucleares e eosinófilos apresentaram acúmulo 24 h injeção de micobactérias (PLESSIS et al., 2016). Na resposta inflamatória na infecção os neutrófilos são as primeiras células a aparecerem no exsudato tuberculoso, muito embora a tuberculose seja caracterizada por predominante migração de células do sistema monócito/macrófago. Por serem fagócitos profissionais, os neutrófilos são capazes de rapidamente fagocitar os

bacilos e liberar potentes mediadores inflamatórios, indicando que estas células podem iniciar a resposta inflamatória ao bacilo tuberculoso, liberando quimiocinas que atraem monócitos e outras células para o sítio inflamatório (PLESSIS et al., 2016; BIZARRO, 2006).

O tratamento geralmente requer um curso prolongado de vários antimicrobianos. Existem barreiras como custos e registros para que os pacientes tenham acesso adequado aos medicamentos existentes e que novos medicamentos contra a tuberculose cheguem ao mercado, como a lenta incorporação de fármacos por parte de programas nacionais de TB, agências reguladoras e provedores clínicos (PAI E FURIN, 2017). A vacina Bacille Calmette-Guérin (BCG), aplicada pela primeira vez em seres humanos em 1921, ainda é utilizada globalmente, embora tenha sido em grande parte ineficaz no controle da epidemia de TB. Pois na maioria dos países, ela é administrada uma vez, ao nascer, e sua proteção é improvável que se estenda de forma consistente até a adolescência e fase adulta, quando ocorre a maioria dos casos de doença transmissível. Assim, estão em curso esforços para desenvolver novas vacinas com eficácia melhorada, bem como a implementação e financiamento de programas necessários para acabar com a epidemia global de tuberculose (PAI et al., 2016).

3.5.3. Testes de Mutagenicidade e Genotoxicidade

Ensaio de mutagenicidade e genotoxicidade são recomendados pela agência reguladora internacional Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), guia para testes químicos 474 e 489, para a qualidade e segurança dos compostos terapêuticos naturais (AL-FAIFI et al., 2017). Há alguns mecanismos diferentes pelos quais os compostos podem impedir a ação mutagênica de afetar o DNA. Os compostos podem interagir diretamente com a mutação ou interferir em sua ativação metabólica. Outras substâncias fazem a reparação do DNA após o dano já ter ocorrido, inibindo a replicação propensa a

erros ou suprimindo o crescimento e a replicação de células com DNA danificado. Assim, dependendo do tipo de tratamento, é possível sugerir diferentes mecanismos de ação a um composto em teste (LIMA et al., 2017).

3.5.3.1. Ensaio de cometa

Sendo um método sensível, rápido e de baixo custo, o ensaio de cometa está se tornando popular na determinação da antigenotoxicidade de extratos de plantas *in vitro* (ZOR et al., 2017). Também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única (SSGE), o método consiste em medir rupturas de uma ou duas vertentes DNA. Sua sensibilidade permite detectar o dano no nível de célula individual e tem a capacidade de medir quantitativamente o potencial genotóxico em células procarióticas e eucarióticas (AL-FAIFI et al., 2017).

O teste cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são ainda passíveis de correção, possibilitando o uso do teste para, também, estudos de reparo do DNA. Esta técnica pode ser aplicada praticamente em qualquer órgão ou tecido, em diversos tipos de organismos alvo, necessitando apenas uma pequena quantidade de células individualizadas para a análise (TUROLLA e SOUZA, 2006).

O comportamento do DNA leva em consideração sua organização dentro do núcleo. Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas e suas proteínas nucleares extraídas, o DNA ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula. Esse espaço denomina-se nucleóide. Caso existam quebras (lesões) na molécula de DNA, os fragmentos clivados podem ser observados após a aplicação de uma corrente elétrica. Os fragmentos que são transportados para fora da nucleóide, pela eletroforese, resultam em uma imagem que remete a um cometa, com cabeça e cauda, originando assim o termo ensaio cometa (Figura 04) (FREITAS, 2007).

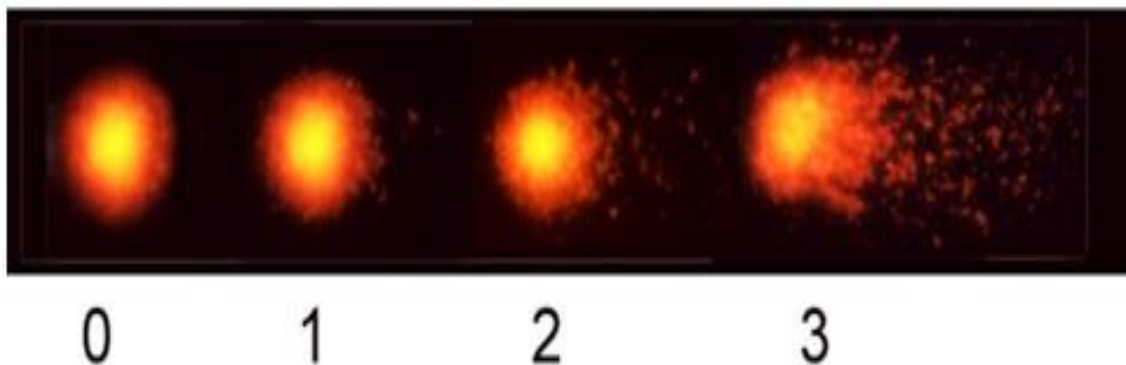


Figura 04 - Classificação dos cometas em células de sangue periférico no ensaio SCGE. Classe 0; Classe 1; Classe 2 e Classe 3 (Fonte: KOBAYASHI et al., 2005).

Eles são classificados por análise visual em: classe 0 – nucleóides sem danos e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho ente 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Nucleóides de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados (FEDATO e MAISTRO, 2014).

3.5.3.2. Teste de micronúcleo

O teste de micronúcleo é amplamente utilizado em pesquisas toxicogênicas para detectar algumas formas de mutações cromossômicas, avaliando a capacidade cancerígena de um composto (AOKI, 2017). É um ensaio biológico realizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). A presença de micronúcleos representa a perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho

mitótico, sendo considerados como mutações que são transmitidas às células (CHEQUER et al., 2015).

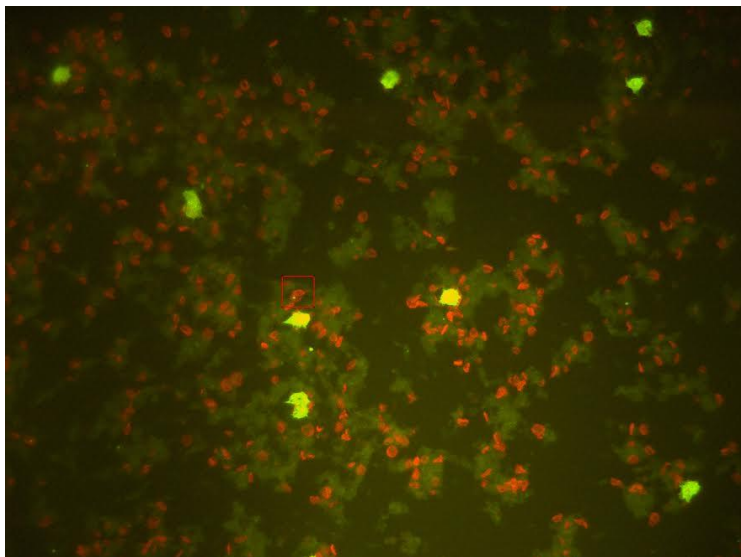


Figura 05 - Eritrócito policromático com micronúcleo (Fonte: BRAIT et al., 2015).

O micronúcleo (MCN) se constitui de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal (Figura 05). Os MCNs são formados durante a telófase, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos que não foram incluídos no núcleo. Representam perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico (RIBEIRO et al., 2003).

Durante a maturação celular, o eritroblasto presente na medula converte-se em eritrócito policromático. Neste processo, o núcleo da célula é expulso, mas qualquer MCN que tenha sido formado pode permanecer no citoplasma, possibilitando assim a sua visualização. Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos com MCN é indicativo de dano cromossômico induzido (OECD, 1997).

3.5.3.3. Fagocitose

O baço é o maior órgão linfóide do corpo humano, ele age primordialmente na produção de linfócitos e monócitos, na fagocitose de partículas estranhas, bactérias, vírus e leucócitos (MEBIUS e KRAAL, 2005). Cerca de 2% de todas as hemácias do organismo são removidas diariamente pelos fagócitos, sendo 50% dessa remoção feita pelo baço. Este órgão também é considerado um dos principais órgãos do sistema imunológico assim como uma importante fonte de células hematopoiéticas, especialmente em casos de anemia grave (SCHNEIDER et al., 2016).

3.5.3.4. Apoptose

A morte celular programada é uma forma fisiológica responsável pelo balanceamento da proliferação celular e manutenção das células que sofrem constantemente renovação celular, funciona também como um mecanismo de defesa em que as células lesadas podem ser eliminadas para o bem do organismo como um todo. A técnica de Rovozzo e Burke (1973) foi readaptada por Navarro et al., (2014) para utilização em experimentos *in vivo* a fim de identificar células apoptóticas por meio de análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear a partir de coloração com Alaranjado de Acridina (SCHNEIDER et al., 2016).

BIBLIOGRAFIA

ACHENBACH, H.; FIETZ, W.; WORTH, J.; WAIBEL, R.; PORTECOP, J.; Constituents of tropical medicinal plants, IXX1 GC/MS-investigations of the constituents of *Piper amalago* – 30 new amides of the niperine-type. *Plant Medic*, v. 52, p. 12–18, 1986.

AFILALO, M.; MORLION, B. Efficacy of tapentadol ER for managing moderate to severe chronic pain. *Pain Physician*, v. 16, p. 27-40, 2013.

AHMAD, R.; AHMAD, N.; NAQVI, A. A.; SHEHZAD, A.; AL-GHAMDI M.S. Role of traditional islamic and arabic plants in cancer therapy. *J Tradit Complement Med*. v. 7, p. 195-204, 2016.

ALÉCIO, A. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *Journ Nat Produc*, v. 61, p. 637-639, 1998.

AL-FAIFI, Z. I.; MASRAHI, Y. S.; ALY, M. S.; AL-TURKI, T. A.; DARDEER, T. Evaluation of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Euphorbia Triaculeata Forssk. Extract. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 18, p. 771-777, 2017.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.*, v. 10, p. 40-56, 2004.

ALVES, E. O.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S.; VIERIA, M. C.; SILVA, C. B. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciênc Agrotec*, v. 32, p. 651-658, 2008.

ANDERSON, L. C.; VAKOULA, A.; VEINOTE, R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Arch Oral Biol*; v. 48, p. 161-169, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6. Brasília, 31 de janeiro de 1995.

ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Resolução - RE nº 90. Brasília, 16 de março de 2004.

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

AOKI, Y. Evaluation of in vivo mutagenesis for assessing the health risk of air pollutants. *Genes Environ*, v. 39, p. 16-27, 2017.

ARGONDIZO, F.; OLIVEIRA, A. J. A.; KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. Constituintes químicos de *Piper glabratum* Kunth (Piperaceae). *25ª Reun An Socied Bras Quím – SBQ*, 2007.

ARRIGO, J. S.; BALEN, E.; JÚNIOR, U. L.; MOTA, J. S.; IWAMOTO, R. D.; BARISON, A.; SUGIZAKI, M. M.; KASSUYA, C. A. L. Anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritic activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents. *Journ Ethnopharm*, v.179, p. 101-109, 2016.

ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, F. V.; PIMENTA, F. P. Grupos de pesquisa e produção científica em plantas medicinais no Rio de Janeiro. *Rev. Fitoter*, v. 9, p. 70-72, 2015.

ATTAL, N.; FINNERUP, N. B. Pharmacological management of neuropathic pain. *Pain: Clin Updat*, v. 17, p. 1031-1043, 2010.

BALDOQUI, C. D.; BOLZANI, S. V.; FURLAN, M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (PIPERACEAE). *Quím Nov*, v. 32, p. 1107–1109, 2009.

BELIZÁRIO, J. E. Citocinas, os guias da defesa do organismo. *Ciência Hoje*, v. 38, p. 36-43, 2006.

BERNUCI, K. Z.; IWANAGA, C. C.; FERNANDEZ-ANDRADE, C. M.; LORENZETTI, F. B.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. D.; GONÇALVES, J. E.; AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; SCODRO, R. B.; CARDOSO, R. F.; BALDIN, V. P.; CORTEZ, D. A. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of Piper Species. *Molec*, v. 12, p. 21-26, 2016.

BI, Y., QU, P. C., WANG, Q. S., ZHENG, L., LIU, H. L., LUO, R., CHEN, X. Q., BA, Y. Y., WU, X., YANG, H. Neuroprotective effects of alkaloids from *Piper longum* in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Pharmac Bio*, v. 10, p. 1-9, 2015.

BIZARRO, H. D. S. *Infecção aguda experimental por Mycobacterium bovis e Trypanosoma cruzi: avaliação morfológica e funcional de corpúsculos lipídicos em leucócitos e macrófagos in vivo e in vitro*. Dissertação (Doutorado). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

BRAIT, D. R. H.; VAZ, M. S. M.; ARRIGO, J. S.; CARVALHO, L. N. B.; ARAÚJO, F. H. S.; VANI, J. M.; MOTA, J. S.; CARDOSO, C. A.; OLIVEIRA, R. J.; NEGRÃO, F. J.; KASSUYA, C. A.; ARENA, A. C. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 73, p. 699-705, 2015.

BRANQUINHO, L. S.; SANTOS, J. A.; CARDOSO, C. A.; MOTA, J. D.; JUNIOR, U. L.; KASSUYA, C. A. L.; ARENA, A. C. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *Journ Ethnopharm*, v. 198, p. 372-378, 2017.

CAHILL, C. M.; TAYLOR, A. M. Neuroinflammation-a co-occurring phenomenon linking chronic pain and opioid dependence. *Curr Opin Behav Sci*, v. 13, p. 171-177, 2017.

CAPELLO, T. M.; MARTINS, E. G.; FARIAS, C. F.; FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; PASSERO, L. F.; OLIVEIRA-SILVA, D.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. Chemical composition and in vitro cytotoxic and antileishmanial activities of extract and essential oil from leaves of *Piper cernuum*. *Nat Prod Commun*, v. 10, p. 285-288, 2015.

CARLINO, E., FRISALDI, E., BENEDETTI, F. Pain and the context. *Nat Rev Rheumat*, v. 10, p. 17-25, 2014.

CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO, C. M. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica*

- St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. *Rev Bras Farmacogn*, v. 15, p. 44-50, 2005.
- CARRARA, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, E. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; CORRÊA, A. G.; MONTEIRO, J. L.; DEMARCHI, I. G.; LONARDONI, M. V. C.; CORTEZ, D. A. G. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. *Braz Journ of Pharmac*, v. 23, p. 3-7, 2013.
- CARRARA, V. S.; VIEIRA, S. C.; DE PAULA, R. G.; RODRIGUES, V.; MAGALHÃES, L. G.; CORTEZ, D. A.; DA SILVA FILHO, A. A. *In vitro* schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of Piper species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). *Journ of Helminthol*, v. 3, p. 321-326, 2014.
- CAVAGNI, J.; SOLETTI, A. C.; GAIO, E. J.; RÖSING, C. K. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Braz Oral Res*, v. 19, p. 290-294, 2005.
- CHEN, Y. F.; JOBANPUTRA, P.; BARTON, P.; BRYAN, S.; FRY-SMITH, A.; HARRIS, G.; TAYLOR, R. S. Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, v. 12, p. 271-278, 2008.
- CHEQUER, F. M.; LIZIER, T. M.; FELÍCIO, R.; ZANONI, M. V.; DEBONSI, H. M.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, D. P. The azo dye Disperse Red 13 and its oxidation and reduction products showed mutagenic potential. *Toxicol In Vitro*, v. 7, p. 75-84, 2015.
- COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T. (Eds.). *Robbins pathologic basis of disease*. 6ª edição. Philadelphia, v. 3, p. 50-88, 1999.
- COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. *J Pain*, v. 1, p. 35-44, 2000.
- COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J. C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spi*, v. 72, p. 359-371, 2005.
- CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. *Brittonia*, v. 34, p. 268-270, 1982.
- DOMÍNGUEZ, X. A.; ALCORN, J. B. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of northeastern Mexico. *Journ Ethnopharm*, v. 13, p. 139-156, 1985.
- DOMÍNGUEZ, X. A.; VERDE, J. S.; SUCAR, S.; TREVIÑO, R. Two amides from *Piper amalago*. *Phytochem*, v. 25, p. 239-240, 1985.

- DYER, L. A.; PALMER, A. N. Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution. *Kluw Academ Plen*, New York, 2004.
- EINBOND, L. S.; NEGRIN, A.; KULAKOWSKI, D. M.; WU, H. A.; ANTONETTI, V.; JALEES, F.; LAW, W.; ROLLER, M.; REDENTI, S.; KENNELLY, E. J.; BALICK, M. J. Traditional preparations of kava (*Piper methysticum*) inhibit the growth of human colon cancer cells *in vitro*. *Phytomed*, v. 24, p. 1-13, 2017.
- ELVEMO, N. A.; LANDRØ, N. I.; BORCHGREVINK, P. C.; HÅBERG, A. A particular effect of sleep, but not pain or depression, on the blood-oxygen-level dependent response during working memory tasks in patients with chronic pain. *Journ Pain Res*, v. 8, p. 335–346, 2015.
- FEDATO, R. P.; MAISTRO, E. L. Absence of genotoxic effects of the coumarin derivative 4-methylesculetin *in vivo* and its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. *J Appl Toxicol*, v. 34, p. 33-39, 2014.
- FLORES, N.; JIMÉNEZ, A. I.; GIMÉNEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, L. I. Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Antiparasitic Activity. *Journ Nat Prod*, v. 71, p. 1538-1543, 2008.
- FREITAS, P. S. *Investigação do Potencial Mutagênico do extrato de frutos de Vacciniumcorymbosum (Mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos Swiss in vivo*. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano - Alfenas, Minas Gerais, 2007.
- FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull*, v. 48, p. 129-41, 1999.
- GIOVANNINI, P.; HOWES, M. R. Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journ Ethnopharm*, v. 182, p. 41-49, 2017.
- GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. Focus in pain. *Nat. Med*, v. 16, p. 1248-1257, 2010.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As bases farmacologicas da terapeutica. *Mc-Grau Hill*, 10ª edição, Rio de Janeiro, v. 3, p. 341-354, 2003.
- GRAIDIST, P.; MARTLA, M.; SUKPONDMA, Y. Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. *Nutr*, v. 7, p. 2707-2718, 2015.
- GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. Piperaceae - Piper. In: Reitz, R. (ed.). Flora ilustrada catarinense. *Herb Barb Rodrig*, Itajaí, 2001.
- GUPTA, O. P.; KARKUTE, S. G.; BANERJEE, S.; MEENA, N. L.; DAHUJA, A. Contemporary Understanding of miRNA-Based Regulation of Secondary Metabolites Biosynthesis in Plants. *Front Plant Sci*, v. 8, p. 374-382, 2017.

GUTIERREZ, P. M. R.; GONZALEZ, N. M. A.; VADILLO, H. C. Alkaloids from *Piper*. A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. *Rev Med Chem*, v. 13, p. 163–183, 2013.

GUTIÉRREZ, Y.; MONTES, R.; SCULL, R.; SÁNCHEZ, A.; COS, P.; MONZOTE, L.; SETZER, W. N. Chemodiversity Associated with Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. *Chem Biodivers*, v. 12, p. 1715-1719, 2016.

HEPGUL, N.; CATTANEO, A.; ZUNSZAIN, P. A.; PARIANTE, C. M. Depression pathogenesis and treatment: what can we learn from blood mRNA expression? *BMC Med*, v. 5, p.11-28, 2013.

HRITCU, L.; NOUMEDEM, J. A.; CIOANCA, O.; HANCIANU, M.; POSTU, P.; MIHASAN, M. Anxiolytic and antidepressant profile of the methanolic extract of *Piper nigrum* fruits in beta-amyloid (1–42) rat model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Funct*, v. 11, p. 13-19, 2015.

HUERTA, C.; CASTELLSAGUE, J.; VARAS-LORENZO, C.; GARCIA RODRIGUEZ, L. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ARF in the general population. *Am J Kidney Dis*, v. 3, p. 531-539, 2005.

IWAMOTO, L. H.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; MONTEIRO, P. A.; RUIZ, A. L.; SOUSA, I. M.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; RODRIGUES, R. A. Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. *Evid Bas Complem Alternat Med*, v. 4, p. 87-95, 2015.

JAHAN, S.; KUMAR, D.; CHATURVEDI, S.; RASHID, M.; WAHAJUDDIN, M.; KHAN, Y. A.; GOYAL, S. N.; PATIL, C. R.; MOHANRAJ, R.; SUBRAMANYA, S.; OJHA, S. Therapeutic Targeting of NLRP3 Inflammasomes by Natural Products and Pharmaceuticals: A Novel Mechanistic Approach for Inflammatory Diseases. *Curr Med Chem*, v.12, p. 16-19, 2017.

JARREAU, P. H.; FAYON, M.; BAUD, O.; AUTRET-LECA, E.; DANAN, M.; VERDELHAN, A.; CASTOT, A. The use of postnatal corticosteroid therapy in premature infants to prevent or treat bronchopulmonary dysplasia: current situation and recommendations. *Arch Pediatr*. v. 17, p. 1480-1487, 2010.

JENSEN, T. S.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M.; KALSO, E.; LOESER, J. D.; RICE, A. S. C.; TREEDE, R. D. A new definition of neuropathic pain. *Pain*, v. 15, p. 2204-2205, 2011.

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

KAVANOVÁ, L.; MATIAŠKOVÁ, K.; LEVÁ, L.; ŠTĚPÁNOVÁ, H.; NEDBALCOVÁ, K.; MATIAŠOVIC, J.; FALDYNA, M.; SALÁT, J. Concurrent infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Haemophilus parasuis* in two types of porcine macrophages: apoptosis,

production of ROS and formation of multinucleated giant cells. *Vet Res*, v. 48, p. 28-33, 2017.

KATO, J. M.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pur App Chem*, v. 79, p. 529–538, 2007.

KATSURA, H.; OBATA, K.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; SAKAGAMI, M.; NOGUCHI, K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Experim Neurol*, v. 20, p. 112–123, 2006.

KIM, E. S.; CHO, H.; LIM, C.; LEE, J. Y.; LEE, D. I.; KIM, S.; MOON, A. A natural piper-amide-like compound NED-135 exhibits a potent inhibitory effect on the invasive breast cancer cells. *Chem Biolog Interac*, v. 23, p. 58-65, 2015.

KRAYCHETE, A. C., GOZZANI, J. L., KRAYCHETE, D. C. Neuropathic pain-neurochemical aspects. *Rev Bras Anest*, v. 58, p. 492-505, 2008.

KRISHNA, S. M.; JOY, B.; SUNDARESAN, A. Effect on oxidative stress, glucose uptake level and lipid droplet content by Apigenin 7, 4'-dimethyl ether isolated from *Piper longum* L. *Journ Food Scien Techn*, v. 52, p. 3561-3570, 2015.

KUMAR, S.; MALHOTRA, S.; PRASAD, A. K.; VAN DER EYCKEN, E. V.; BRACKE, M. E.; STETLER-STEVENSON, W. G.; PARMAR, V. S.; GHOSH, B. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Piper* species: a perspective from screening to molecular mechanisms. *Cur Top Med Chem*, v. 15, p. 886-893, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran: Bases Patológicas das Doenças. *Elsevier*, 8ª edição, Rio de Janeiro, 2008.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Rev Bras Anestesiologia*, v. 52, p. 498-512, 2002.

LEE, J. H.; ZHANG, J.; YU, S. P. Neuroprotective mechanisms and translational potential of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke. *Neural Regen Res*, v. 12, p. 341-350, 2017.

LIMA, D. C.; VALE, C. R.; VÉRAS, J. H.; BERNARDES, A.; PÉREZ, C. N.; CHEN-CHEN, L. Absence of genotoxic effects of the chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-prop-2-en-1-one and its potential chemoprevention against DNA damage using in vitro and in vivo assays. *Plos One*, v.12, p. 17-26, 2017.

LIMA, P. C.; SANTOS, M. G.; CALABRESE, K. S.; SILVA, A. L. A.; ALMEIDA, F. Avaliação da capacidade Leishmanicida de espécies vegetais do Cerrado. *Rev Patol Trop*, v. 44, p. 45-55, 2015.

LISI, L.; ACETO, P.; NAVARRA, P.; RUSSO, C.D. mTOR Kinase: A Possible Pharmacological Target in the Management of Chronic Pain. *Bio Med Res Intern*, v. 3, p. 94-99, 2015.

LIU, C. N.; MICHAELIS, M.; AMIR, R.; DEVOR, M. Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. *Journ Neuroph*, v. 84, p. 205-215, 2000.

LON, H. K., LIU, D., JUSKO, W. J. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. *Critic Rev in Biomed Engin*, v. 40, p. 295-312, 2012.

LOPES, J. J.; MARX, C.; INGRASSIA, R.; PICADA, J.N.; PEREIRA, P.; FERRAZ, A. B. F. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of Piper genus. *Experim and Toxicol Pathol*, v. 64, p. 9–14, 2012.

LUIZ, A. P.; KOPACH, O.; SANTANA-VARELA, S.; WOOD, J. N. The role of Nav1.9 channel in the development of neuropathic orofacial pain associated with trigeminal neuralgia. *Mol Pain*, v. 25, p. 72-80, 2015.

LYTHE, K. E.; WILLIAMS, S. C. R.; ANDERSON, C.; LIBRI, V.; MEHTA, M. A. Frontal and parietal activity after sleep deprivation is dependent on task difficulty and can be predicted by the fMRI response after normal sleep. *Behav Brain Res*, v. 23, p. 62–70, 2012.

MAKCHUCHIT, S.; RATTAROM, R.; ITHARAT, A. The anti-allergic and anti-inflammatory effects of Benjakul extract (a Thai traditional medicine), its constituent plants and its some pure constituents using in vitro experiments. *Biom Pharmac*, v. 89, p. 1018-1026, 2017.

MAO, Q. Q.; XIAN, Y. F.; IP, S. P.; CHE, C. T. Involvement of serotonergic system in the antidepressant-like effect of piperine. *Prog Neuro-Psychopharm Bio Psych*, v. 35, p. 1144–1147, 2011.

MARMITT, D. J. M.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; SILVA, A. C. Revisão sistemática sobre a produção científica de plantas medicinais da Renisus voltadas ao *Diabetes mellitus*. *Cad pedag*, v. 12, p. 87-99, 2015.

MARQUES, A. M.; PEREIRA, S. L.; PAIVA, R. A.; CAVALCANTE, C. V.; SUDO, S. Z.; TINOCO, L. W.; MOREIRA, D. L.; GUIMARAES, E. F.; SUDO, R. T.; KAPLAN, M. A.; SUDO, G. Z. Hypoglycemic Effect of the Methanol flower Extract of *Piper Claussenianum* and the Major Constituent 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone in Streptozotocin Diabetic Rats. *Ind Journ Pharmac Scien*, v. 77, p. 237-243, 2015.

MELBIUS, R.E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immun*, v. 5, p. 606-616, 2005.

MELKINOVA, I. Pain Market. *Nat Rev Drug Discov*, v. 9, p. 589-594, 2010.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L.; NASCIMENTO, S. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Ev-Based Compl Alt Med*, v. 2011, p. 14, 2011.

MESQUITA, J. M. O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A. P.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Rev Bras Farmac*, v. 15, p. 6-12, 2005.

MOORE, A.W.; JAN, L.Y.; JAN, Y.N. Hamlet, a binary genetic switch between single- and multiple- dendrite neuron morphology. *Scien*, v. 297, p. 1355-1358, 2002.

MONTEIRO, D. A.; CARLOS, I. Z.; PINTO, F. G. Diazepam, em dose única, inibe a migração celular, a estimulação macrofágica e a atividade de TNF- α na reação inflamatória aguda induzida por LPS em camundongos. *Rev Bras Ciên Farmac*, v. 44, p. 613-620, 2008.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os Anti-inflamatórios não Esteroidais (AINEs). *Rev Tem Reumatol Clín*, v. 09, p. 53-63, 2008.

MOTA, J.S. Professor Doutor em Química na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

MULLALLY, M.; CAYER, C.; MUHAMMAD, A.; WALSHE-ROUSSEL, B.; AHMED, F.; SANCHEZ-VINDAS, P. E.; ROJAS, M. O.; MERALI, Z.; CAL, V.; DURST, T.; TRUDEAU, V. L.; ARNASON, J. T. Anxiolytic activity and active principles of *Piper amalago* (Piperaceae), a medicinal plant used by the Q'eqchi' Maya to treat susto, a culture-bound illness. *Journ Ethnopharm*, v. 185, p. 147-154, 2016.

NAVARRO, S. D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI J. R.; GOMES, R. D. S.; KARAZIACK, C. B.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; ROMÃO, W.; JUNIOR, W. L.; MAURO, M. O.; OLIVEIRA, R. J. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3Hisobenzofuran- 1-one: Evaluation of toxicology and ability topotentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Europ Journ Med Chem*, v. 75, p. 132-142, 2014.

NOVAES, A. S.; MOTA, J. S.; BARISON, A.; VEBER, C. L.; NEGRÃO, F. J.; KASSUYA, C. A. L.; BARROS, M. E. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). *Phytomed*, v. 21, p. 523-528, 2014.

NOYD, R. K.; KRUEGER, J. A.; HILL, K. M. Biology: Organisms and Adaptations. *Cengage Learning*, Bonton, v. 3, p. 332-335, 2016.

NUNES, C. R.; FREITAS, W. R.; VENTURA, T. L. B.; KANASHIRO, M. M.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. Inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico de extrato aquoso de *Annona muricata* L. *Ciên Biológic Saúd*, v. 1, p. 25-29, 2011.

O'CONNOR, A.B. E DWORKIN, R.H. Treatment of Neuropathic pain: An overview of recent guidelines. *Am. J. Med.*, v. 10, p.22-32, 2009.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 474, in: OECD (Ed.), Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Paris, 1997.

PAI, M.; FURIN, J. Tuberculosis innovations mean little if they cannot save lives. *Elife*, v. 2, p.65-69, 2017.

PAI, M.; BEHR, M. A.; DOWDY, D.; DHEDA, K.; DIVANGAHI, M.; BOEHME, C. C.; GINSBERG, A.; SWAMINATHAN, S.; SPIGELMAN, M.; GETAHUN, H.; MENZIES, D.; RAVIGLIONE, M. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*, v. 2, p. 01-23, 2016.

PAPATHEODORIDIS, G. V.; SOUGIOULTZIS, S.; ARCHIMANDRITIS, A. J. Effects of *Helicobacter pylori* and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Peptic Ulcer Disease: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. v. 4, p. 130-142, 2006.

PARIM, B.; HARISHANKAR, N.; BALAJI, M.; POTHANA, S.; SAJJALAGUDDAM, R. R. Effects of *Piper nigrum* extracts: Restorative perspectives of high-fat diet-induced changes on lipid profile, body composition, and hormones in Sprague-Dawley rats. *Pharmac Bio*, v. 9, p. 1-11, 2015.

PARK, K. A.; VASKO, M. R. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. *Trend Pharmacol Scienc*, v. 11, p. 571-577, 2005.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochem*, v. 46, p. 597–603, 1997.

PETRICEVICH, V.L. Effect of Tityus serrulatus venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. *Mediators Inflamm*, v. 11, p. 23-31, 2002.

PINTO, S. A. H.; PINTO, L. M.; GUEDES, M. A.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antinociceptive effect of triterpenoid alpha,beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomed*, v. 15, p. 630-634, 2008.

PLESSIS, W. J.; KLEYNHANS, L.; PLESSIS, N.; STANLEY, K.; MALHERBE, S. T.; MAASDORP, E.; RONACHER, K.; CHEGOU, N. N.; WALZL, G.; LOXTON, A. G. The Functional Response of B Cells to Antigenic Stimulation: A Preliminary Report of Latent Tuberculosis. *Plos One*, v. 11, p. 15-27, 2016.

PRANDO, T. B. L.; BACIQUETE, T. F.; VIEIRA, J. A. C.; BRESSAN, J.; GASPAROTTO, F. M.; JESUS, D. R.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; LOURENÇO, E. L. B., GASPAROTTO JUNIOR, A. Amides from Piper as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of *Piper glabratum* Kunth. *Evid Bas Complem Altern Med*, v. 20, p. 14-19, 2014.

QUEIROZ, F. M.; MATIAS, K. W. O.; CUNHA, M. M. F.; SCHWARZ, A. Evaluation of (anti) genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow. *Braz J Pharm Sci*, v. 49, p. 63-71, 2013.

RABINOVITCH, M.; MANEJAS, R. E.; RUSSO, M.; ABBEY, E.E. Increased spreading of macrophages from mice treated with interferon inducers macrophage spreading in vitro. *Cell. Immunol.*, v.29, p.86-95, 1977.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R. J., HENDERSON, G. Rang & Dale Farmacologia. *Elsevier*, 7ª edição, Rio de Janeiro, 2012.

REY, A.; APKARIAN, A. V.; MARTINA, M.; BESEDOVSKY, H. O. Chronic neuropathic pain-like behavior and brain-borne IL-1 β . *Ann New York Acad Sci*, v. 12, p. 101-107, 2012.

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

RIJAVEC, N; GRUBIC, N. V. Depression and pain: often together but still a clinical challenge: a review. *Psych Danub Med Nakl*, v. 24, p. 346-352, 2012.

ROERSCH, C.M.F.B. *Piper umbellatum* L.: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. *Journ Ethnoph*, v.131, p.522-537, 2010.

ROVANI, G. T.; SANTOS, V. L. P.; MIGUEL, O. G.; BUDEL, J. M.; CAMPOS, R. Antioxidant and phytochemical investigation of the aerial vegetative *Piper amalago* L. *Cad Esc Saú Cur*, v. 2, p. 164-177, 2013.

ROVOZZO, G. C.; BURKE, C. N. A manual of basic virological techniques. *New Jersey Prent Hall*, v. 2, p. 159, 1973.

SANDKUHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*, v. 89, p. 58-77, 2009.

SANGALLI, A.; VIEIRA, M. C. Plantas medicinais utilizadas por parte da população de Dourados-MS. *Cerrados*. v. 6, p.17-20, 2003.

SCHNEIDER, B. U.; MEZA, A.; BEATRIZ, A.; PESARINI, J. R.; CARVALHO, P. C.; MAURO, M. O.; KARAZIACK, C. B.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C.; MATUO, R.; LIMA, D. P.; OLIVEIRA, R. J. Cardanol: toxicogenetic assessment its effects when combined with cyclophosphamide. *Genet Mol Biol*, v. 39, p. 279-89, 2016.

SERHAN, C. N., BRAIN, S. D., BUCKLEY, C. D., GILROY, D. W., HASLETT, C., O'NEILL, L. A. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB Journ*, v. 21, p. 325-332, 2007.

SEVIMLI, D.; KOZANOGLU, E.; GUZEL, R.; DOGANAY, A. The effects of aquatic, isometric strength-stretching and aerobic exercise on physical and

psychological parameters of female patients with fibromyalgia syndrome. *Journ Phyc Ther Scien*, v. 27, p. 1781-1786, 2015.

SILVA, P. Farmacologia. *Guanabara Koogan*, 8ª edição, Rio de Janeiro, v. 5, p. 146-153, 2010.

SILVA JUNIOR, I. F.; BALOGUN, S. O.; OLIVEIRA, R. G.; DAMAZO, A. S.; MARTINS, D. T. *Piper umbellatum* L.: A medicinal plant with gastric-ulcer protective and ulcer healing effects in experimental rodent models. *Journ Ethnopharm*, v. 192, p. 123-131, 2016.

SINAEI, F.; EMAMI, S. A.; SAHEBKAR, A.; JAVADI, B. Olfactory loss management in view of Avicenna: Focus on neuroprotective plants. *Curr Pharm Des*, v. 4, p. 13-18, 2017.

SOSA, S.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R. G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBARO, A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journ Ethnopharm*, v. 81, p. 211-215, 2002.

SOUZA, N. H. C.; FERRARI, R. A. M.; SILVA, D. F. T.; NUNES, F. D.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Braz J Phys Ther*, v. 18, p. 308-314, 2014.

SOUZA, S. D. *Estudo químico do óleo essencial das espécies Piper amalago e Peperomia obtusifolia e biológico de Piper amalago*. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005.

SPIEGEL, D. R.; CHATTERJEE, A.; MCCROSKEY, A. L.; AHMADI, T.; SIMMELINK, D.; OLDFIELD, E. C.; PRYOR, C. R.; FASCHAN, M.; RAULLI, O. A Review of Select Centralized Pain Syndromes: Relationship With Childhood Sexual Abuse, Opiate Prescribing, and Treatment Implications for the Primary Care Physician. *Health Serv Res Manag Epidemiol*, v. 26, p. 23-30, 2015.

TEANPAISAN, R.; KAWSUD, P.; PAHUMUNTO, N.; PURIPATTANAVONG, J. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journ Tradit Complem Med*, v. 7, p. 172-177, 2016.

TREEDE, R. D.; JENSEN, T. S.; CAMPBELL, J. N.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY, J. O.; GRIFFIN, J. W.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T.; SERRA, J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurol*, v. 70, p. 1630-1635, 2008.

TUROLLA, M. S. R.; SOUZA, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Braz J Phar Sci*, v. 42, p. 26-32, 2006.

VILLAMIZAR, L. H.; CARDOSO, M. D.; ANDRADE, J.; TEIXEIRA, M. L.; SOARES, M. J. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 112, p. 131-139, 2017.

XIONG, W.; DONG, H.; WANG, J.; ZOU, X.; WEN, Q.; LUO, W.; LIU, S.; HE, J.; CAI, S.; MA, L. Analysis of Plasma Cytokine and Chemokine Profiles in Patients with and without Tuberculosis by Liquid Array-Based Multiplexed Immunoassays. *Plos One*, v. 11, p. 14-18, 2016.

WANG, J.; GOFFER, Y.; XU, D.; TUKEY, D. S.; SHAMIR, D. B.; EBERLE, S. E.; ZOU, A. H.; BLANCK, T. J.; ZIFF, E. B. A single sub-anesthetic DOSE of ketamine relieves depression-like behaviors induced by neuropathic pain in rats. *Anesthesiol*, v. 115, p. 812-819, 2011.

WANG, L. X.; WANG, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 55, p. 949-956, 2003.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Lif Scien*, v. 74, p. 26-36, 2004.

WHO - World Health Organization. *WHO Tradit Med Strat*. Geneva, 2002.

YU, W.; ZHANG, X.; WU, H.; ZHOU, Q.; WANG, Z.; LIU, R.; LIU, J.; WANG, X.; HAI, C. HO-1 Is Essential for Tetrahydroxystilbene Glucoside Mediated Mitochondrial Biogenesis and Anti-Inflammation Process in LPS-Treated RAW264.7 Macrophages. *Oxid Med Cell Longev*, v. 10, p.11-14, 2017.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil-I: Piper-group I,II,III,IV. *Inst de Bot*, 1972.

WUBETU, M.; ABULA, T.; DEJENU, G. Ethnopharmacologic survey of medicinal plants used to treat human diseases by traditional medical practitioners in Dega Damot district, Amhara, Northwestern Ethiopia. *BMC Res Not*, v. 10, p. 157-164, 2017.

ZAINUDIM, M., M.; ZAKARIA, Z.; NORDIN, M. M. A. N. The use of *Piper sarmentosum* leaves aqueous extract (Kadukmy™) as antihypertensive agent in spontaneous hypertensive rats. *BMC Complem Alternat Med*, v. 15, p. 54-62, 2015.

ZIS, P.; DASKALAKI, A.; BOUNTOUNI, I.; SYKIOTI, P.; VARRASSI, G.; PALADINI, A. Depression and chronic pain in the elderly: links and management challenges. *Clin Interv Aging*, v. 12, p. 709-720, 2017.

ZOR, M.; AYDIN, S.; GÜNER, N. D.; BAŞARAN, N.; BAŞARAN, A. A. Antigenotoxic properties of *Paliurus spina-christi* Mill fruits and their active compounds. *BMC Complement Altern Med*, v. 17, p. 229-236, 2017.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

No presente estudo, nosso principal objetivo avaliar os efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato etanólico e de amidas das folhas de *Piper amalago* em modelos experimentais com roedores.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito antiartrítico do EEPA em modelos experimentais de hiperalgesia induzido por CFA em camundongos black.
- Avaliar a ação antidepressiva do EEPA no modelo de neuropatia induzida por CFA em camundongos black.
- Avaliar a ação antihiperalgésica do EEPA em modelos de neuropatia induzida pela contração do nervo SNI em ratos.

- Avaliar a ação antidepressiva do EEPA no modelo de neuropatia induzida por contração do nervo SNI em ratos.
- Avaliar a ação antinociceptiva do EEPA e das amidas **1** e **2** em modelos experimentais de nocicepção induzida pela formalina em camundongos.
- Avaliar a ação antihiperálgica do EEPA e das amidas **1** e **2** em modelos experimentais de hiperálgia induzida pela carragenina em camundongos.
- Avaliar a ação antimicobacteriana do EEPA e da amida **1** em testes *in vivo* de pleurisia induzida por *Mycobacterium bovis* (BCG) em camundongos.
- Avaliar a ação mutagênica e genotóxica do EEPA em testes toxicológicos como ensaio de cometas e teste de micronúcleos com sangue periférico de camundongos.

5. ARTIGO CIENTÍFICO 01

Artigo publicado em janeiro de 2016 na revista Journal Ethnopharmacology.



Anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritic activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents



Jucicléia da Silva Arrigo^a, Eloise Balen^a, Ubirajara Lanza Júnior^a, Jonas da Silva Mota^b, Renan Donomae Iwamoto^c, Andersson Barison^d, Mario Mateus Sugizaki^e, Cândida Aparecida Leite Kassuya^{a,*}

^a College of Health Science, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Chemistry Department, State University of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), 13084-971 Campinas, SP, Brazil

^d Department of Chemistry, Polytechnic Center, Federal University of Paraná Federal University, Curitiba, PR, Brazil

^e Institute of Health Science, Federal University of Mato Grosso, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2015

Received in revised form

22 December 2015

Accepted 22 December 2015

Available online 23 December 2015

Keywords:

Piper amalago

Piperaceae

Hyperalgesia

Amides

Chronic inflammation

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Piper amalago* (Piperaceae) has been used in folk medicine as an analgesic. This study aimed to evaluate the pharmacological effects of extract and pure amides obtained from *P. amalago* on pain to provide a pharmacological basis for their use in traditional medicine.

Aim of the study: This study evaluated the anti-nociceptive, anti-hyperalgesic, anti-arthritic and anti-depressive activities of the ethanolic extract of *P. amalago* (EEPA) and the amides N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(Z),4(Z)-heptadienyl] pyrrolidine (**1**) and N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(E),4(E)-heptadienyl] pyrrolidine (**2**) obtained from *P. amalago* in animal models.

Materials and methods: Mice treated daily with EEPA (100 mg/kg, p.o.) were assayed for 20 days for knee edema (micrometer measurement), mechanical hyperalgesia (analgesimeter analysis), heat sensitivity and immobility (forced swim test) in the Complete Freund's Adjuvant (CFA) model. Cold (acetone test) and mechanical hyperalgesia (electronic von Frey analysis) responses were evaluated for 15 days in rats treated with oral EEPA (100 mg/kg) in the spared nerve injury (SNI) model. Meanwhile, mice were evaluated for carrageenan-induced edema and mechanical hyperalgesia and for nociception using the formalin model after a single administration of EEPA (100 mg/kg) or amides **1** and **2** (1 mg/kg).

Results: Amides (**1**) and (**2**) were detected and isolated from the EEPA. The EEPA inhibited mechanical hyperalgesia, knee edema, and heat hyperalgesia, but not depressive-like behavior, induced by the intraperitoneal injection of CFA. When subjected to the SNI model, the EEPA inhibited mechanical and cold

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Piper amalago* (Piperaceae) has been used in folk medicine as an analgesic.

Aim of the study: This study evaluated the anti-nociceptive, anti-hyperalgesic, anti-arthritic and anti-depressive activities of the ethanolic extract of *Piper*

amalago (EEPA) and the amides (N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(Z),4(Z)-heptadienoyl] pyrrolidine **(1)** and N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(E),4(E)-heptadienoyl] pyrrolidine **(2)**) obtained from *P. amalago* in animal models.

Materials and methods: Mice treated daily with EEPA (100 mg/kg, p.o.) were assayed up to 20 days for knee edema (micrometer measurement), mechanical hyperalgesia (analgesiometer analysis), heat sensitivity and immobility analysis (forced swim test) in the Complete Freund's Adjuvant (CFA) model. Cold (acetone test) and mechanical hyperalgesia (electronic von Frey analysis) responses were evaluated (up to 15 days) in orally EEPA (100 mg/kg) treated rats in the spared nerve injury (SNI) model. Meanwhile, mice were evaluated for carrageenan-induced edema and mechanical hyperalgesia and for the formalin model (nociception) after a single administration of EEPA (100 mg/kg) or amides **1** and **2** (1 mg/kg).

Results: The amides **(1)** and **(2)** were detected and isolated from the EEPA. The EEPA inhibited the mechanical hyperalgesia, knee edema, and heat hyperalgesia, but not the depressive-like behavior, induced by the intraplantar injection of CFA. When evaluated in the SNI model, the EEPA inhibited the mechanical and cold hyperalgesia. The EEPA, **1** and **2** prevented the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan and the anti-nociceptive effects in both formalin phases of nociception. The EEPA did not induce alterations in the open field test.

Conclusion: The EEPA was effective for inhibition of pain and arthritic parameters, but not against depressive-like behavior, without altering locomotor activity. The amides obtained seemed to be the active principle(s) present in the

EEPA because they proved to be anti-nociceptive and anti-hyperalgesic in models of acute pain. Considering that few drugs are currently available for the treatment of chronic pain, especially of the neuropathic type, the present results may have clinical relevance and open new possibilities for the development of new anti-hyperalgesic and anti-arthritic agents from *P. amalago*.

Key-words: *Piper amalago*, nociception, hyperalgesia, nerve injury, chronic inflammation.

1. INTRODUCTION

Neuropathic or inflammatory pain is a result of an illness or injury that affects the somatosensory system, activating the nociceptive pathways that

respond abnormally to innocuous stimuli (allodynia) or to noxious stimuli (hyperalgesia) (Jensen et al. 2011; Lisi et al., 2015).

Pharmacological treatments for chronic pain, especially neuropathic pain, are partially effective (Lisi et al., 2015) because the pathophysiology is poorly understood. Opioids, analgesics, antidepressants and other medications are used, but specific treatment is needed (Attal and Finnerup, 2010; Carlino et al., 2014). Thus, evaluating the potential of medicinal plants to find a painkiller that has a potent effect and shows little adverse reaction is still very important. Among the species of plants used in Brazil, there are several candidates for the development of new drugs showing anti-inflammatory and analgesic activity when used in folk medicine, with *Piper amalago* being one of them.

In Brazil, *Piper amalago* L., commonly known as “pariparoba” or “jaborandi,” is used as an analgesic and anti-inflammatory agent for renal disturbances, such as renal stones (Achenbach *et al.*, 1986; Domínguez and Alcorn, 1985; Domínguez *et al.*, 1986, Parmar *et al.*, 1997). The phytochemical analysis of the ethanolic extract from the leaves of *P. amalago* (EEPA) showed the presence of pyrrolidide amides as well as chalcones and flavonol (Novaes *et al.*, 2014), and our group has shown the diuretic activity of the EEPA in rats. Other studies revealed that *P. amalago* L. root content consists mainly of sesquiterpenes, pyrrolidines and isobutylamides (Heckel, 1897; Achenbach *et al.*, 1986; Domínguez & Alcorn, 1985; Domínguez *et al.*, 1986) and of monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons (de Ferraz *et al.*, 2010).

As far as we know, only one study of Sosa *et al.* (2002) reported the anti-inflammatory effect of *P. amalago* extract by topical administration; however, the

anti-inflammatory effect was assessed only topically, using the experimental model of ear edema induced with croton oil in mice. The pharmacological activities of *P. amalago* exhibited a schistosomicidal effect (Carrara *et al.*, 2014), diuretic and antilithiasic activities (Novaes *et al.*, 2014), an anxiolytic effect without any genotoxic or mutagenic effect (Lopes *et al.*, 2012), anti-leishmania activity (Carrara *et al.*, 2013), and acaricidal activity. In addition, the chemical composition of the essential oil from *P. amalago* was elucidated (Ferraz *et al.*, 2010). The compounds from the leaves of *P. amalago* were poorly explored and pointed toward anti-fungal (Alecio *et al.*, 1998), anti-leishmania (Carrara *et al.*, 2013) and anti-schistosomiasis activities (Carrara *et al.*, 2014).

In this context, the objective of this study was to evaluate the anti-hyperalgesic, antinociceptive, anti-arthritic and depressive-like behavioral activity elucidated by the ethanol extract of *P. amalago* (EEPA) and by the amides N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(Z),4(Z)-heptadienoyl] pyrrolidine (**1**) and N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(E),4(E)-heptadienoyl] pyrrolidine (**2**) in models of pain.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material

Leaves from *Piper amalago* L., Piperaceae were collected in January 2014 in Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil (22°14'S and 54°49'W.Gr). The plant was identified by Prof. Dr. Elsie Franklin Guimarães from Jardim Botânico Research Institute of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. A voucher specimen (DDMS 4410) was deposited in the herbarium of the Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil.

2.2. Extraction and isolation

The preparation of the ethanolic extract of *Piper amalago* (**EEPA**) and the phytochemical study led to the isolation of the amides N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(Z),4(Z)-heptadienoyl] pyrrolidine (**1**) and N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(E),4(E)-heptadienoyl] pyrrolidine (**2**) (Fig. 1) from the leaves of *P. amalago*, and their spectral data were described in a previous report from our research group (Novaes *et al.*, 2014). The EEPA and the obtained fractions were dissolved in distilled water with Tween 80 as vehicle just before administration. The percentage of amides in the EEPA was approximately 1 %. Compounds **1** and **2** were identified by ¹H and ¹³C NMR. NMR data were acquired on a Bruker AVANCE III 400 NMR spectro- meter operating at 9.4 T, observing ¹H and ¹³C nuclei at 400 and 100 MHz, respectively.

N-[7-(3',4'-Methylenedioxyphenyl)-2(Z),4(Z)-heptadienoyl] pyrrolidine(1).

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.84–1.95 (m, H2'', H3'' 4H); 2.42–2.46 (m, H6; 2H); 2.64–2.67 (m, H7; 2H); 3.44 (t, J '/4 6.6 Hz, H1'' 2H); 3.52 (t, J '/4 6.6 Hz, H4'' 2H); 5.78 (d, J '/4 10.0 Hz, H2; 1H); 5.91 (s, H1''' 2H); 5.92–5.99 (m, H5; 1H); 6.38 (t, J '/4 10 Hz, H3; 1H); 6.61 (dd, J '/4 1.6; 8.0 Hz, H6' 1H); 6.66 (d, J '/4 1.8 Hz, H2' 1H); 6.71 (d, J '/4 8.0 Hz, H5' 1H); 7.33–7.38 (m, H4; 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 24.36 (C3''); 26.21 (C2''); 34.91 (C6); 35.05 (C7); 45.55 (C1''); 46.98 (C4''); 100.74 (C1'''); 108.14 (C2'); 108.87 (C5'); 118.08 (C2); 121.13 (C6'); 127.87 (C4); 135.42 (C1'); 140.51 (C3); 141.67 (C5); 145.65 (C3'); 147.53 (C4'); 165.66 (C1).

N-[7-(3',4'-Methylenedioxyphenyl)-2(E),4(E)-heptadienoyl] pyrrolidine(2).

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.82–1.93 (m, H3'' 2H); 1.93– 2.00 (m, H2'' 2H); 2.14–2.46 (m, H6; 2H); 2.65–2.69 (m, H7; 2H); 3.50–3.54 (m, H1'' 2H); 3.52–3.56 (m, H4'' 2H); 5.90 (s, H1''' 2H); 6.08 (d, J '/4 15.0 Hz, H2; 1H); 6.08 (dd, J '/4 6.6, 15.0 Hz, H5, 1H); 6.17 (dd, J '/4 10.5, 15.0 Hz, H4; 1H); 6.61 (dd, J '/4 1.6; 7.8 Hz, H6' 1H); 6.67 (d, J '/4 1.8 Hz, H2' 1H); 6.73 (d, J '/4 7.8 Hz, H5' 1H); 7.26 (dd, J '/4 10.5, 15.0 Hz, H3; 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 24.25 (C3''); 26.03 (C2''); 34.86 (C7); 34.95 (C6); 45.85 (C4''); 46.52 (C1''); 100.68 (C1'''); 108.03 (C5'); 108.74 (C2'); 120.19 (C2); 121.06 (C6'); 129.22 (C4); 135.03 (C1'); 141.49 (C5); 141.87 (C3); 145.58 (C3'); 147.51 (C4'); 165.01 (C1).

2.3. HPLC analysis

The ethanolic extract and compounds **1** and **2** were analyzed using a Shimadzu LC-10AD VP liquid chromatograph with a photodiode array detector (200–800 nm with detection at 254 nm). The chromatography column was a Thermo Hypersil C-18 (150 x 4.5 i.d), particle size 5 µm, and a pre-column (25 mm x 3 mm) with the same phase as the column. Elution was performed using a water (A)/CAN (B, each one containing 1% Acetic Acid, v/v) gradient: 0 min 95% A, 5% B; 5 min 40% A 60% B; 15 min 100% B, 20 min 100% B, with a flow of 1 mL/min and an injection volume of 5 mL. The extract was prepared at 10 mg/mL and the compounds at 2mg/mL, dissolved in MeOH (HPLC industry, TEDIA Brazil) at a temperature of 25 °C. The samples were filtered with a micro-filter (Millipore) of 0.45 µm. The chromatographic analyses were performed in ultra-purified water, equipment Master System MS2000, manufactured by GEHAKA (SãoPaulo, Brazil).

2.4. Animals

Adult *Wistar* rats (200-250 g), *Swiss* mice (20-25 g) and C57BL/6 mice (20-25 g), all male, were obtained from the Federal University of Grande Dourados (UFGD) biotherium. The animals were housed under controlled temperature ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity (45-65 %) and light (12 hours light/12 hours dark, lights on at 6:00 a.m.) and received food and water *ad libitum*. All

procedures were approved by the Ethics Research Committee for Animal Experimentation of the UFGD under protocol number 004/2014.

2.5. Materials and reagents

Carrageenan and Complete Freund's Adjuvant (CFA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). Other drugs and reagents were of analytical grade.

The extract and compounds were dissolved in a solution of Tween 0.2% with 0.9 % saline for oral administration. The EEPA was tested at 10, 30, and 100 mg/kg by the oral route in an experimental model of inflammation (data not shown), and because the 100 mg/kg dose was the most effective, the tests were conducted with this dose in all models of inflammation.

2.6. Mechanical and heat hyperalgesia, depressive like-behavior and knee edema induced by the Complete Freund's Adjuvant (CFA) model

Experiments were conducted using male C57BL/6 mice. Animals were subjected to induction of peripheral inflammation by administration of 20 µl of CFA into the right paw (Oliveira *et al.*, 2011).

CFA-treated groups - The CFA model was carried out using 21 animals (n = 7 per group) treated daily with a single treatment for 20 days: (i) the CFA (control) group, which received vehicle (Tween 0.2% in 0.9 % saline p.o.), (ii) the group that received the EEPA (100 mg/kg p.o.), and (iii) the animals that received dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) as a positive control.

All animals had their behavior assessed over the course of 20 days post-injection. The basal values of mechanical sensitivity were determined before CFA injection. Mechanical sensitivity (analyzed every day after CFA injection), heat sensitivity (observed at 2 and 15 days after CFA injection), and forced swim behavior (performed at 7 and 19 days after CFA injection) were examined in each animal. Finally, on the 20th day after CFA injection, knee swelling in the mice was quantified using a micrometer.

Mechanical hyperalgesia - Mechanical sensitivity of the hind paw was measured by determination of withdrawal thresholds. Nociceptive thresholds (g) were estimated using an electronic version of the von Frey test. A constantly increasing pressure was applied to the right hind paw until the mice vocalized or withdrew their hind paws. This indicated the level of mechanical sensitivity induced by the sensitization (Ito, Okuda-Ashitaka and Minami, 2001). The analgesiometer was applied perpendicularly to the plantar surface of the paw with an upward force just sufficient to bend the apparatus.

Heat-induced hyperalgesia - The test was conducted using the method of Ankier (1974). Animals were placed on an aluminum plate heated at a fixed temperature ($55 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$), and the response to heat latency time was assessed by measuring the time it took to the animal to withdraw its hind paw from the hot

plate and lick it. Minimal and maximal cut-offs were assigned at 0.5 and 30 seconds, respectively.

Forced swim test (FST) - The test was conducted using the method of Porsolt *et al.* (1977) with modifications. Animals were individually forced to swim in an open cylindrical container of water at $25 \pm 1^\circ\text{C}$; the total duration of immobility during a 5-minute test was observed.

2.7. Mechanical and cold hyperalgesia and depressive-like behavior induced by the Sciatic Nerve Injury (SNI) model

Experiments were conducted using male *Wistar* rats. Animals were anesthetized using ketamine hydrochloride (60 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg i.p.). An incision was made through the biceps femoralis muscle, and the right sciatic nerve was exposed at the level of its trifurcation into the sural, tibial, and common peroneal nerves. Each of the tibial and common peroneal nerves was tightly ligated by two knots 4 mm apart using 6.0 silk and was then completely severed in between the knots, leaving the sural nerve intact (Decosterd and Woolf, 2000; Piccinelli *et al.*, 2014). After transection, the muscle fascia and the skin were sutured. The SNI model was performed in 21 animals. Seven additional animals were used as sham controls, in which the sciatic nerve was exposed but not manipulated.

SNI-treated groups - The following groups were treated daily for 15 days after surgery: (i) the control group, which received vehicle (Tween 0.2% in physiological saline p.o.), (ii) the SNI group that received the EEPA (100 mg/kg p.o.), and (iii) the SNI animals that received only ketamine (10 mg/kg, i.p.) as a positive control.

All operated animals (SNI, SNI plus-treated groups, and sham rats) had their behavior assessed at 3, 5, 7, 10 and 15 days post-surgery. The basal values of mechanical sensitivity (described above) were determined before surgery. Mechanical and cold sensitivities (every day after the SNI procedures), forced swim behavior (described above) and open-field test (10 and 15 days after the SNI procedures) were examined in all animals at all time points.

Cold hyperalgesia - Cold sensitivity was assessed by the acetone drop test as described by Decosterd and Woolf (2000). A blunt needle connected to a syringe was used to drop 30 μ l of acetone on the paw, and the duration (in seconds) of the paw withdrawal was recorded. Minimal and maximal cut-offs were assigned at 0.5 and 20 seconds, respectively.

Open-field test - On test days, rats were positioned in the center of the open-field apparatus, which consisted of a white square arena (80x80 cm) surrounded by walls (40 cm high) with its floor divided by lines into 16 squares (20x20 cm). Locomotor activity was determined by the number of squares crossed during 5 minutes.

2.8. Spontaneous pain induced by formalin

The procedure was performed, with minor modification, as described by Dubuisson and Dennis (1977) and Hunskar and Hole (1987). The spontaneous nociceptive behavior, the mobility in the open field test, and cold sensitivity were observed in this model. For the treatments, the Swiss mice received an intraplantar injection of 1% formalin solution (20 μ l) into the right hind paw. After one hour, the animals were individually placed in transparent observation platforms, and nociceptive behavior was associated with the time that the animal remained licking the paw injected with formalin within 30 min. This model allows the assessment of pain sensitivity at two phases: phase I, which occurs during the first 5 min after formalin injection, characterized by direct stimulation of formalin on nociceptors (neurogenic origin pain), and phase II, which we consider to occur between 15 and 30 min after formalin and is the tonic pain response, accompanied by an inflammatory response.

One hour before the experiment, extract, compounds, vehicle or positive control were administered to the animals in the following groups: (i) the control group, which received vehicle (Tween 0.2% in physiological saline p.o.), (ii) the group that received the EEPA (100 mg/kg p.o.), (iii) the group that received amide **1** (1 mg/kg p.o.), (iv) the group that received amide **2** (1 mg/kg p.o.), and (v) the animals that received morphine (10 mg/kg, s.c.) as a positive control.

2.9. Mechanical hyperalgesia induced by carrageenan

One hour after the treatments, the *Swiss* mice received a solution of 50 μ l carrageenan injection (300 μ g/paw) into the right hind paw. The other paw received the same volume of sterile 0.9% saline. One hour or 15 minutes before the experiment, extract, compounds, vehicle or positive control were administered to the animals in the following groups: (i) the control group, which received vehicle (Tween 0.2% in physiological saline p.o.), (ii) the group that received the EEPA at 100 mg/kg dose by the oral route, (iii) the group that received amide **1** at a dose of 30 μ g in the paw by the intraplantar route, (iv) the group that received amide **2** at 30 μ g in the paw by the intraplantar route, and (v) the animals that received dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) as a positive control by the subcutaneous route.

The mechanical hyperalgesia was assessed using an electronic version of the von Frey test at 3 and 4 h after the carrageenan injection (Ferreira *et al.*, 1997).

2.10. Statistical analysis

The results were presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The data were compared by one- and two-way analysis of variance

(ANOVA), followed by Student-Newman Keuls or Bonferroni tests. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicating significance.

3. RESULTS

3.1. Phytochemical analysis

The EEPA analyzed by HPLC (Fig. 2A) showed the presence of flavonols with the retention time between 5.2 and 5.6 min, Characteristic UV spectra of flavonols (Dourado and Ladeira, 2008). The HPLC analysis showed also the presence of Amide 1 Rt 10.14 and Amide 2 Rt 9.79 (Fig. 2B and C).

3.2. EEPA reduced mechanical and heat hyperalgesia and knee edema, but not depressive-like behavior, induced by CFA

Mechanical hyperalgesia was evaluated for 20 days after CFA injection. Fig. 3A showed that mechanical hyperalgesia can be detected all days post-injection in the CFA group, and this group showed significantly increased sensitivity to a mechanical stimulus compared to the basal value (4.0 g).

Furthermore, following treatment with the EEPA at 100 mg/kg, given once a day for 20 days after CFA, the maximal prevention of induction of mechanical hyperalgesia was $76 \pm 2 \%$. Treatment with dexamethasone was able to reduce mechanical hyperalgesia induced by CFA with a maximal activity of $81 \pm 2 \%$ (Fig. 3A).

The oral administration of the EEPA significantly increased the latency to heat with a maximal activity of $88 \pm 2 \%$ on day 2 after CFA injection (Fig. 3B) and $83 \pm 5\%$ on day 15 after injection (Fig. 3C) compared with controls. Treatment with dexamethasone was able to reduce the heat sensitivity induced by CFA (Fig. 3B and 3C).

The measurement of the knees of animals from the CFA model on day 20 post-injection showed that the treatment with the EEPA significantly inhibited knee edema with an inhibition of $75 \pm 6 \%$ compared to controls. Administration of dexamethasone was able to reduce the edema induced by CFA to $89 \pm 3 \%$ compared to control (Fig. 3D). The results from the forced swim test showed that the EEPA (100 mg/kg) administered by the oral route (once/day for 20 days) did not present any significant difference compared with the control group (treated only with vehicle) on the 7th and 19th days after treatment (results not shown).

3.3. The EEPA prevented SNI-induced mechanical and cold sensitivity in rats

The development of mechanical hyperalgesia was evaluated at 3, 5, 7, 10 and 15 days after surgery. The treatment with the EEPA at 100 mg/kg significantly prevented the reduction of threshold mechanical sensitivity at all time points evaluated, with a maximum reduction of $81 \pm 5\%$ ($P < 0.001$) compared to controls (SNI) (Fig. 4A). The EEPA group showed values between 16 and 18 g, which were similar to those in the sham group (non-operated), between 18 and 19 g, and the ketamine (a drug used as a positive control) group, between 19 and 20 g. This value was also close to the baseline, 22 g, measured before the injury to the sciatic nerve (Fig. 4A).

The development of cold sensitivity was evaluated at 3, 5, 7, 10 and 15 days after surgery. Fig. 4B shows that cold sensitivity could be detected, that sensitivity to a cold stimulus was increased approximately eight-fold and that the SNI-operated group differed significantly from the sham-operated group. On the 10th day of daily oral treatment with the EEPA at 100 mg/kg, the SNI-induced increase in sensitivity to a cold stimulus was significantly reduced, with a maximal inhibition of $75 \pm 3\%$ compared with the control group. Treatment with ketamine significantly inhibited the cold sensitivity induced by SNI by $88 \pm 6\%$ (Fig. 4B).

Oral administration of the EEPA also showed an increase, but not a decrease, in mobility in the open field test. There was an increase in mobility of 35% ($P < 0.05$) on day 10 and 82% ($P < 0.001$) on day 15 after SNI compared with controls (results not shown).

In the forced swim test, there was no significant difference between the EEPA and control groups, while ketamine significantly increased the result by approximately 90% compared to the control (results not shown).

3.4. The EEPA and amides 1 and 2 reduced nociceptive spontaneous behavior in the formalin model

The development of nociceptive activity induced by formalin was observed in phase I, which occurs during the first 5 min after formalin injection and also in the second phase, observed between 15 and 30 min after injection. Fig. 5A and 5B show that pain sensitivity can be detected in the two phases post-injection in the control group (formalin) and that in the formalin group, the pain sensitivity to stimulus is significantly higher compared with the other groups.

Furthermore, treatment with the EEPA at 100 mg/kg and compounds **1** and **2** at 1 mg/kg prevented the formalin-induced spontaneous nociceptive behavior in Phase I (Fig. 5A), with inhibition levels of the EEPA reaching 66 ± 4 %, **1** reaching 65 ± 6 % and **2** reaching 67 ± 4 % ($P < 0.001$). During the inflammatory phase, the inhibitions were 72 ± 2 % for the EEPA, 78 ± 1 % for **1** and 80 ± 4 % for **2** compared with controls (Fig. 5B). Treatment with morphine was able to reduce the chemical sensitivity induced by formalin by 90 ± 2 % in phase I (Fig. 5A) and 93 ± 3 % in phase II (Fig. 5B).

3.5. The EEPA and amides 1 and 2 reduced carrageenan-induced hyperalgesia in a mouse model

It was observed that the EEPA, **1** and **2** caused a reduction in paw edema induced by carrageenan compared to controls (vehicle). The EEPA (100 mg/kg) and compounds **1** and **2** (1 mg/kg) significantly reduced the edema of the hind paw, with maximal inhibition of $58 \pm 3 \%$, $60 \pm 11 \%$, and $87 \pm 2 \%$ ($P < 0.001$), respectively, after 3 h. After 4 h, it was observed that the groups treated with doses leading to maximal inhibition for the EEPA ($74 \pm 2 \%$), **1** ($87 \pm 6 \%$) and **2** ($93 \pm 2 \%$) showed a statistically significant reduction ($P < 0.001$) compared to the control. Administration of dexamethasone was able to reduce the edema induced by carrageenan by $72 \pm 3 \%$ and $84 \pm 4 \%$ (results not shown).

The treatment with the EEPA, **1** and **2** significantly prevented the reduction of threshold mechanical sensitivity after 3 h, with a maximum reduction for the EEPA of $60 \pm 4 \%$, **1** of $82 \pm 6 \%$ and **2** of $86 \pm 3 \%$ ($P < 0.001$) compared with controls (Fig. 6A). The same result occurred when the sensitivity was assessed 4 h after carrageenan, with maximal inhibition for the EEPA of $71 \pm 2 \%$, **1** of $93 \pm 3 \%$ and **2** of $93 \pm 6 \%$ ($P < 0.001$) compared with controls (Fig. 6B). Treatment with dexamethasone was able to reduce the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan by $91 \pm 6 \%$ (Fig. 6A) and $91 \pm 2 \%$ (Fig. 6B).

4. DISCUSSION

The present study showed, for the first time, that oral treatment with ethanolic extract obtained from *Piper amalago* leaves (EEPA) possesses antihyperalgesic activity in persistent and acute models of pain as well as antinociceptive action against formalin-induced nociception. The EEPA also significantly reduced CFA-induced knee edema and cold- and hot-hypersensitivity, but not depression, without a decrease in locomotor activity (open field test) or a change in the forced swim test. The phytochemical analysis of the EEPA revealed the presence of N-[7-(3', 4'-metilendioxfenil)-2 (Z), 4 (Z)-heptadienoyl] pyrrolidine (**1**) and N-[7-(3', 4'-metilendioxfenil)-2 (E), 4 (E)-heptadienoyl] pyrrolidine (**2**), and inhibition of spontaneous pain was observed in acute models of nociception and hyperalgesia with these two pure compounds. All data could contribute, at least in part, to validating the popular use of *P. amalago* against chest pain (Domínguez and Alcorn, 1985; Domínguez *et al.*, 1986, Carrara *et al.*, 2013).

Piper amalago is used as an anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic agent in Mexico (Domínguez and Alcorn, 1985; Domínguez *et al.*, 1986, Carrara *et al.*, 2013) and in Brazil, especially in our region of Mato Grosso do Sul State. Pharmacological studies also indicate other activities, such as antileishmanial activity (Carrera *et al.*, 2013), schistosomicidal activity (Carrera *et al.*, 2014), acaricidal (Ferraaz 2010), topical anti-inflammatory activity (Sosa *et al.*, 2002), and central effects, such as anxiogenic (Lopes *et al.*, 2012), of this plant, but no data were published to validate the popular use of this plant as an analgesic. When the EEPA was assayed at a dose of 100 mg/kg (a dose chosen previously by Iwamoto *et al.*, unpublished results) once a day, the sustained anti-

hyperalgesic activity was observed in persistent SNI and CFA models. As CFA is an inflammatory and immunogenic agent, the intraplantar injection into the hindpaw is able to induce sustained hyperalgesia to thermal and mechanical stimuli as well as the development of other parameters in relationship to arthritis, such as knee edema. Monocytes, macrophages, and glial cells produce IL-1 β and TNF- α , which in turn induce the production of other inflammatory mediators involved in cell recruitment, fever, release of proteins, increased vascular permeability and hyperalgesia (Oliveira et al., 2011). Inflammatory mediators are involved in the inflammatory sensitization to mechanical and heat stimuli induced by CFA injection in the hindpaw; for example, Woolf et al. showed that COX2, TNF- α , and IL-1 β play a role in the induction of hyperalgesia. The trpV1 channel interacts to induce thermal and mechanical hyperalgesia induced by CFA (Negri et al., 2006). The significant persistent reduction of CFA-induced knee edema and cold- and hot-hypersensitivity could indicate the potential of the EEPA as anti-arthritic agent. Similar results were obtained with dexamethasone, as described by De Oliveira et al. (2011). CFA also induces depression-like behavior (Maciel et al., 2013), but the EEPA did not alter the response of mice treated with CFA. Another important parameter analyzed in the CFA model was the open field test: the EEPA did not decrease the locomotor activity, indicating that the anti-hyperalgesic activity was not influenced by a possible muscle relaxant effect. There is no specific medicine for the treatment of neuropathic pain, which thus requires a continuous search for new analgesics with fewer side effects. The EEPA anti-hyperalgesic properties were also observed in the SNI model, inhibiting mechanical hyperalgesia and cold sensitivity during the 15 days of

treatment. As expected, the sham group had no observable effect on paw withdrawal thresholds. As reported in the literature, animals randomized to the SNI group demonstrated a significant increase of hypersensitivity in the paw 3 days after the injury when not treated, which was maintained until the end of the 15th day after surgery (Tilley et al., 2014). The animals of the SNI + EEPA group showed a marked reduction in withdrawal threshold starting on day 3, which was maintained throughout the study. Additionally, we observed a statistically significant difference in the effect of the EEPA on cold allodynia when testing using the acetone method. He et al. (2014) showed that the antinociceptive action in the inflammatory/neuropathic pain behavior models is associated with neuroinflammation modulation of the spinal cord by lowering the levels of NF- κ B and proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Studies have shown that after a peripheral injury occurs, significant increases in the expression of proinflammatory cytokines near the site of injury of the sciatic nerve occur in relation to sham control animals. In the SNI + EEPA group, down-regulation of TNF- α and IL-6 in both the sciatic nerve and DRG shows that the EEPA could decrease the expression of pro-inflammatory cytokines in lesions. The EEPA also promoted no significant differences in the forced swim test in the SNI model, suggesting a lack of antidepressant activity. It was observed that the hyperalgesia induced by SNI did not change locomotor activity in the open-field test, nor did the EEPA. Piccinelli *et al.* (2014) showed in their work increased immobility in the SNI group compared with the sham group, which was not induced by a decrease in locomotor activity resulting in hyperalgesia. Our work could contribute to an explanation of the use of *P. amalago* in folk medicine for pain disease. To our

knowledge, these experimental trials to evaluate the anti-hyperalgesic activity in a persistent model of pain using extracts of *P. amalago* are the first reported in the literature.

The phytochemical analysis of the ethanolic extract from the leaves of *P. amalago* revealed the presence of abundant amide (**1**) and of amide (**2**) as well as chalcones and a flavonol (Novaes et al., 2014). The presence of abundant quantities of amides led us to isolate and purify compounds **1** and **2**. To test the EEPA and compounds **1** and **2**, the formalin test was chosen because it is a model of acute neurogenic and inflammatory nociception, and it was possible to obtain only a small amount of amides. Similar to morphine, the EEPA exhibited anti-nociceptive action against the neurogenic and inflammatory phase induced by intraplantar formalin injection. As a 100-mg/kg dose of the EEPA was effective, the amides were tested at a 1-mg/kg dose because the yields from the EEPA were approximately 1%. The compounds **1** and **2** were effective at inhibiting the nociceptive behavior induced by formalin. According to Staurengo Ferrari et al., (2014), the possible anti-nociceptive mechanisms could be related to inhibiting the production of pro-nociceptive cytokines, oxidative balance and activation of nitric oxide in the formalin model in mice. Our data indicate that the EEPA and amides **1** and **2** may act similarly to opioids, a class commonly used against pain, to effectively block the nociceptive behavior of the formalin first phase physiological response and thermal sensitivity (Hunskar, Hole 1987). Studies have reported the isolation of amides from *Piper amalago* since 1986 (Dominguez et al.), wherein spectra showed very similar chemical structures, suggesting that these are isomers; however, although they are very similar, amides **1** and **2** differ

in the *cis* and *trans*, respectively (Dominguez et al., 1986). The anti-nociceptive of the amides N-[7-(3', 4'-metilenodioxifenil)-2 (Z), 4 (Z)-heptadienoyl] pyrrolidine (**1**) and N-[7-(3', 4'-metilenodioxifenil)-2 (E), 4 (E)-heptadienoyl] pyrrolidine could contribute, at least in part, to the anti-nociceptive and analgesic action of the EEPA.

Our research group has previously (Iwamoto et al., unpublished results) demonstrated the anti-inflammatory properties of the EEPA when administered orally in the carrageenan-induced model. These observations led us to confirm the anti-hyperalgesic action of the EEPA (Figure 5) and amides **1** and **2** by the oral route (results not shown). The amides **1** and **2** were applied directly to the paw in the model induced by carrageenan with the objective of showing that it was these compounds or other metabolites that influenced the analgesic effects. The direct administration (15 minutes before carrageenan) of compounds **1** and **2** effectively reduced mechanical hyperalgesia, suggesting that these compounds directly mediate the anti-hyperalgesic effects. When inflammation occurs, the nociceptive fibers can be activated by various mediators, such as bradykinin (BK), cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF) and interleukin-1 β (IL-1 β), prostaglandins and sympathetic amines (Souza et al., 2015). The carrageenan-induced edema, in the same manner as hyperalgesia, also depends on the release of these inflammatory mediators. These results suggest that the EEPA, **1** and **2** act by blocking the synthesis or release of these mediators following their effects at the site of inflammation, showing their anti-hyperalgesic properties.

In conclusion, our study showed, for the first time, that the ethanol extract of *Piper amalago* and its amides **1** and **2** have anti-hyperalgesic, anti-nociceptive

and anti-arthritic activity in models of acute and chronic pain in rodents. Future studies will be conducted to investigate the conduction mechanisms of the anti-inflammatory and antinociceptive actions in pain conditions by the EEPA and its amides. Thus, although there are several medications available to relieve pain, this work has successfully considered a possible new choice for the treatment of pain.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to CAPES, CNPq, and FUNDECT for the financial support.

6. REFERENCES

- Achenbach, H., Fietz, W., Worth, J., Waibel, R., Portecop, J., 1986. Constituents of tropical medicinal plants, IXX1 GC/MS-investigations of the constituents of Piper amalago – 30 new amides of the niperine-type. *Planta Medica* 52, 12–18.
- Alécio, A.C., Bolzani, V.S, Young, M.C.M, Kato, M.J, Furlan, M., 1998. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products*

61, 637-639.

Ankier, S.I., 1974. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic-antagonist activities. *European Journal of Pharmacology* 27, 1-4.

Attal, N., Finnerup, N.B., 2010. Pharmacological Management of Neuropathic Pain. *Pain Clinical Updates* 18, 9.

Carlino, E., Frisaldi, E., Benedetti, F., 2014. Pain and the context. *Nature Reviews Rheumatology* 17.

Carrara, V.S., Vieira, S.C., de Paula, R.G., Rodrigues, V., Magalhães, L.G., Cortez, D.A., da Silva Filho, A. A., 2014. In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of Piper species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). *Journal of Helminthology* 3, 321-6.

Carrara, V.S., Cunha-Júnior, E.F., Torres-Santos, E.C., Corrêa, A.G., Monteiro, J.L., Demarchi, I.G., Lonardoni, M.V.C., Cortez, D.A.G., 2013. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23, 3.

De Oliveira, C.M., Nonato, F.R., de Lima, F.O., Couto, R.D., David, J.P., David, J.M., Soares, M.B., Villarreal, C.F., 2011. Antinociceptive properties of bergenin *Journal of Natural Products* 74, 2062-8.

Decosterd, I., Woolf, C.J., 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149–58.

Domínguez, X.A., Alcorn, J.B., 1985. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of northeastern Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 13, 139–156.

- Domínguez, X.A., Verde, J.S., Sucar, S., Treviño, R., 1986. Two amides from Piper amalago. *Phytochemistry* 25, 239–240.
- Dourado, R.S., Ladeira, Â.M., 2008. Identificação de flavonóides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). *Rev. Bras. Bot.* 31(4), 611–620.
- Dubuisson, D, Dennis, S.G., 1977. Formalin test – quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain-stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-174.
- Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Lorenzetti, B.B., Michelin, M.A., Perretti, M., Flower R.J., Poole S., 1997. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of Dexamethasone *British Journal of Pharmacology*. 121, 883-888.
- He, Z.W., Wei, W., Li, S.P., Ling, Q., Liao, K.J., Wang, X., 2014. Anti-allodynic effects of obtusifolin and gluco-obtusifolin against inflammatory and neuropathic pain: possible mechanism for neuroinflammation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 37(10): 1606-16.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103-14.
- Ito, S., Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., 2001. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neuroscience Research* 41, 299–332.
- Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S.C., Treede, R.D., 2011. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152, 2204-05.
- Lisi L., Aceto, P., Navarra, P., Russo, C.D., 2015. mTOR Kinase: A Possible Pharmacological Target in the Management of Chronic Pain. *BioMed Research International* 394257.

- Lopes, J.J., Marx, C., Ingrassia, R., Picada, J.N., Pereira, P., de BF Ferraz, A., 2012. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of Piper genus. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 9-14.
- Maciel, I.S., Silva, R.B, Morrone, F.B., Calixto, J.B., Campos, M.M., 2013. Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. *PLoS One* 8, 77227.
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Colucci, M., Margheriti, F., Melchiorri, P., Vellani, V., Tian, H., de Felice, M., Porreca, F., 2006. Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *The Journal of Neuroscience* 26, 6716-27.
- Novaes, A.S., Mota, J.S., Barison, A., Veber, C.L., Negrão, F.J., Kassuya, C.A., Barros, M.E., 2014. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from Piper amalago (Piperaceae). *Phytomedicine* 21, 523-8.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E., Boll, P.M., 1997. Phytochemistry of the genus Piper *Phytochemistry*. 46, 597–673.
- Piccinelli, A.C., Santos, J.A., Konkiewitz, E.C., Oesterreich, S.A., Formagio, A.S.N., Croda, J., Ziff, E.B., Kassuya, C.A.L., 2015. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Neuroscience* 18(5), 217-224.
- Porsolt, R., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 229, 327.
- Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altinier, G., Tubaro, A., 2002. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 211-5.

Souza, G.V., Simas, A.S., Bastos-Pereira, A.L., Frois, G.R.A., Ribas, J.L.C., Verdán, M.H, Kassuya, C.A.L., Stefanello, M.E., Zampronio, A.R., 2015. Antinociceptive Activity of the Ethanolic Extract, Fractions, and Aggregatin D Isolated from *Sinningia aggregata* Tubers. PLoS ONE 10, 2.

Staurengo-Ferrari, L., Mizokami, S.S., Fattori, V., Silva, J.J., Zanichelli, P.G., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., da França, L.G., Pavanelli, W.R., Casagrande, R., Verri Jr, W.A., 2014. The ruthenium nitric oxide donor, [Ru(HEDTA)NO], inhibits acute nociception in mice by modulating oxidative stress, cytokine production and activating the cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 387, 1053-1068.

Tilley, D.M., Vallejo, R., Kelley, C.A., Benyamin, R., Cedeño, D.L., 2015. A Continuous Spinal Cord Stimulation Model Attenuates Pain-Related Behavior In Vivo Following Induction of a Peripheral Nerve Injury. Neuromodulation 12280.

Legends to figures

Fig. 1. Chemical compounds of the amides N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(Z),4(Z)-heptadienoyl] pyrrolidine (**1**) and N-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(E),4(E)-heptadienoyl] pyrrolidine (**2**) from the leaves of *Piper amalago* (Piperaceae).

Fig. 2. HPLC analysis of EEPA (a), Amide 1 (b) which retention time (Rt) of 10.14 min and Amide 2 Rt $\frac{1}{4}$ 9.79 min (c).

Fig. 3. Effects of oral administration of the EEPA at 100 mg/kg on arthritis induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA). **(A)** Mechanical hyperalgesia was assessed using von Frey filaments before (baseline) and 20 days after CFA injection. The EEPA significantly prevented reduction in the mechanical threshold of sensitivity at all time points. **(B)** Assessment of thermal hypernociception through the hot plate model on the 2nd day after CFA injection, where the EEPA treatment increased the resistance of the animals. **(C)** Assessment of thermal hypernociception through the hot plate model on the 15th day after CFA injection, where the EEPA treatment increased the resistance of the animals. **(D)** Effect of administration of the EEPA on inhibition of knee edema on the 20th day after CFA injection. The results are presented as the mean \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with the vehicle group (CFA). Differences between groups were analyzed by analysis of variance (two-way ANOVA) followed by the Bonferroni test (A) and (one-way ANOVA) followed by the Newman–Keuls test (B), (C), (D).

Fig. 4. Effects of the EEPA at 100 mg/kg oral administration on chronic pain-related behaviors and functional disability in the neuropathy model induced by sciatic lesion. **(A)** Mechanical hyperalgesia was assessed using von Frey filaments before (baseline) and 15 days after SNI; the oral administration of the EEPA significantly prevented the reduction in the mechanical sensitivity threshold on all days compared with the control (SNI) (P <0.001). **(B)** Treatment with the

EEPA significantly inhibited the cold sensitivity induced by SNI on all days compared with the control (SNI). The results are presented as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group (SNI). Differences between groups were analyzed by analysis of variance (two-way ANOVA) followed by the Bonferroni test.

Fig. 5. Effect of the EEPA at 100 mg/kg, amide **1** at 1 mg/kg and amide **2** at 1 mg/kg on pain-related behaviors in the formalin-induced nociception model. **(A)** Administration of the EEPA, **1** and **2** significantly decreased pain in phase I (neurogenic origin pain). **(B)** Administration of the EEPA, **1** and **2** significantly decreased pain in phase II (inflammatory response). The results are presented as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group (vehicle). Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman–Keuls test.

Fig. 6. Effect of the EEPA at 100 mg/kg, amide **1** at 1 mg/kg and amide **2** at 1 mg/kg on carrageenan-induced paw edema in mice. **(A)** Administration of the EEPA, **1** and **2** significantly prevented the reduction in mechanical sensitivity threshold after 3 h of induction by carrageenan ($P < 0.001$). **(B)** Administration of the EEPA, **1** and **2** significantly prevented the reduction in mechanical sensitivity threshold after 4 h of induction by carrageenan. The results are presented as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group

(vehicle). Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman–Keuls test.

Figures

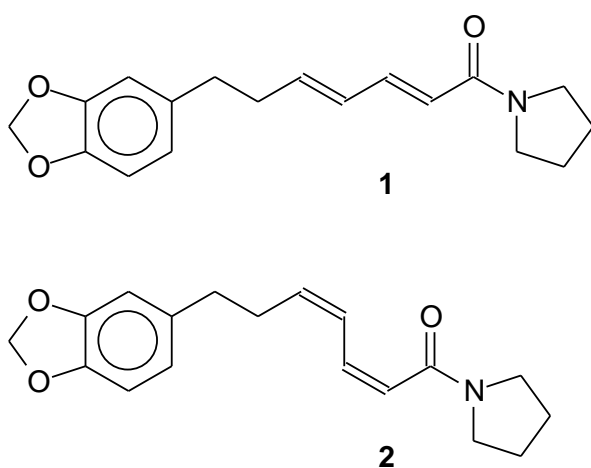


Fig. 1.

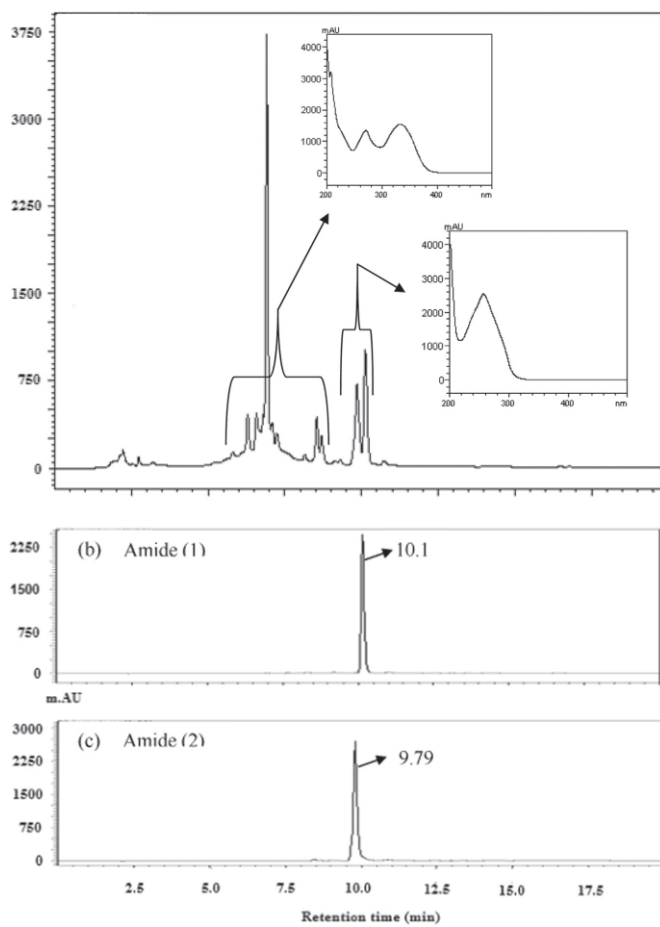


Fig. 2.

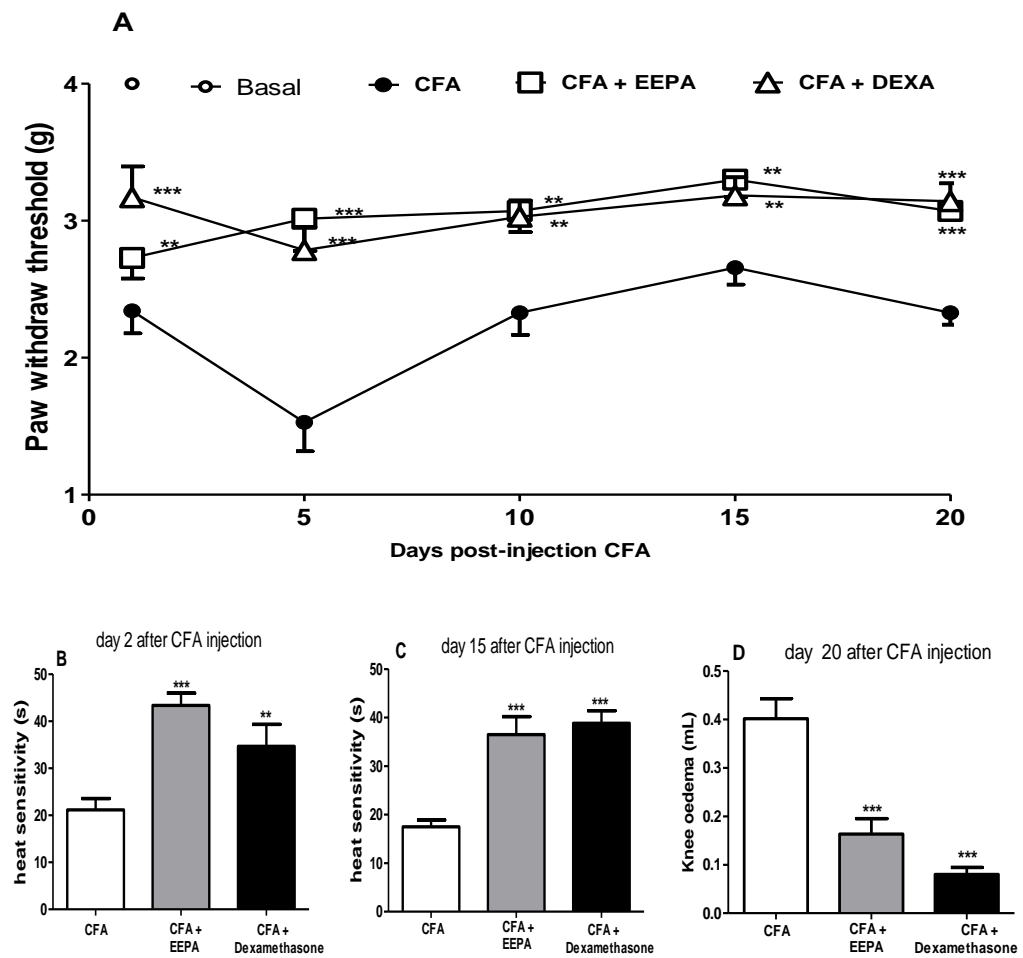


Fig. 3.

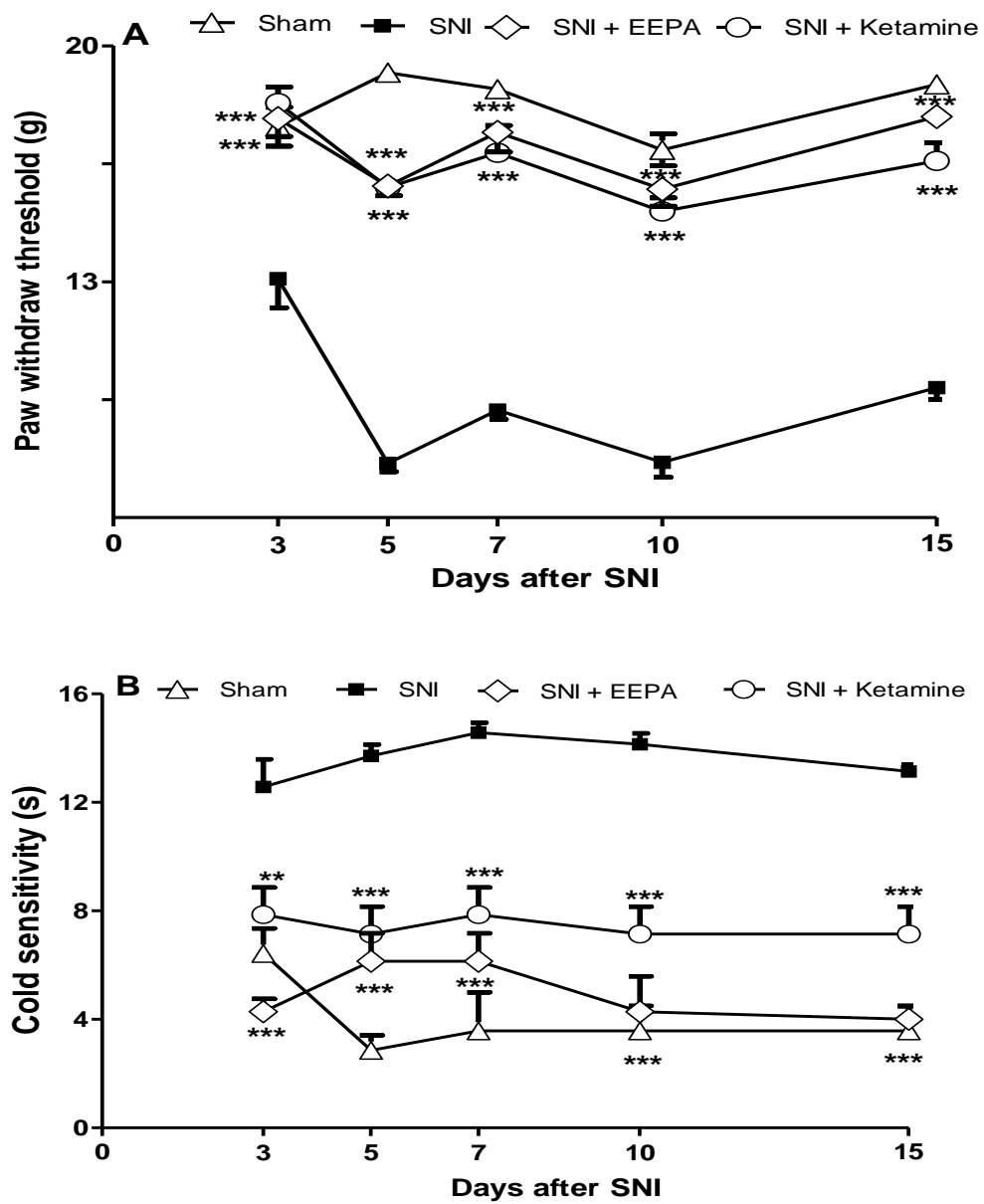


Fig. 4.

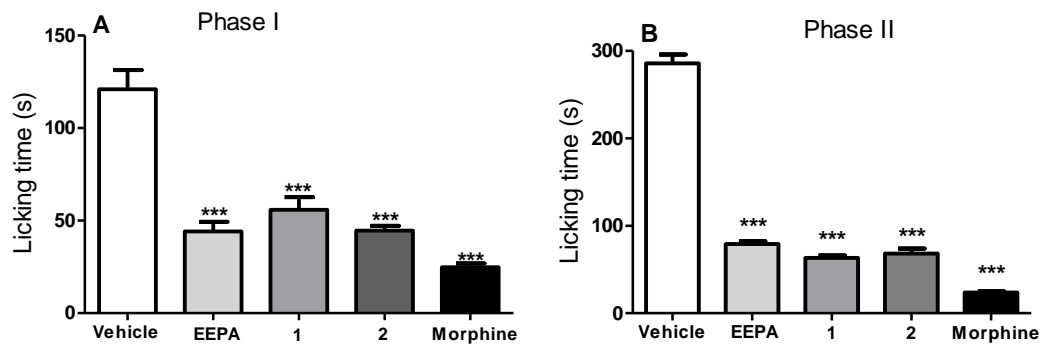


Fig. 5.

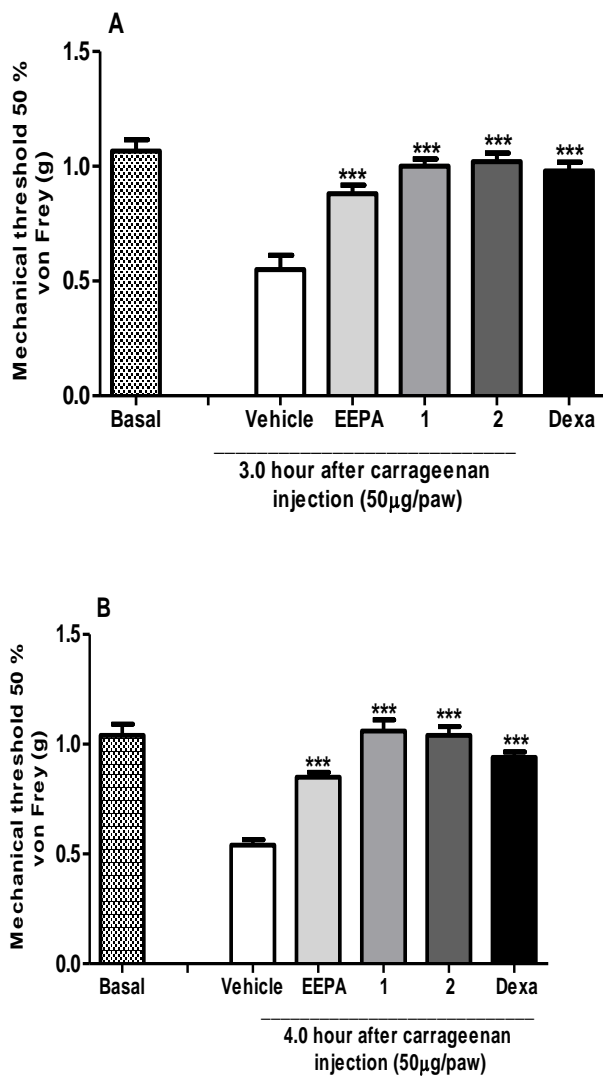


Fig. 6.



A pedido da autora o Capítulo 7 foi retirado do pdf.