

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DAS  
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS  
DE *Piper vicosanum***

DÉBORA REGINA HOFF BRAIT

**DOURADOS - MS  
2015**

DÉBORA REGINA HOFF BRAIT

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DAS  
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA  
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Piper vicosanum***

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ARIELLE  
CRISTINA ARENA

Coorientador: Prof. Dr. FÁBIO  
JULIANO NEGRÃO

**DOURADOS  
2015**

## **Dedicatória**

*Aos meus amados pais “Nelson de Oliveira Brait e Maria Amélia Hoff Brait” que são as pessoas mais importantes da minha vida.*

## **Agradecimentos**

*A Deus em primeiro lugar, pois me deu a vida e a oportunidade de estar onde estou, rodeada das pessoas que amo e que são especiais em minha vida. Aos meus queridos pais “Nelson e Maria Amélia” que nunca deixaram de acreditar em mim e na minha força de vontade de crescer. A eles agradeço do fundo do meu coração ao amor mais sincero. À minha querida orientadora “Prof.<sup>a</sup>D.<sup>r</sup><sup>a</sup>Arielle Arena”, que mesmo morando em outra cidade se fez presente em meu trabalho, me auxiliando, apoiando e me guiando. Agradeço sua paciência e dedicação nesses dois anos de trabalho. À “Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Cândida Kassuya”, um exemplo de pessoa, amiga e pesquisadora, que nos momentos mais difíceis me incentivou e ajudou, sem ela com certeza não teria alcançado meus objetivos no presente trabalho. Agradeço às minhas queridas amigas e companheiras de mestrado, em especial Luciana Carvalho e Márcia Vaz que estiveram comigo em todos os momentos do experimento, agradeço a paciência, amizade, persistência e companheirismo “amo vocês”. Minha família, cunhadas, sobrinhas (as) e meus irmãos Nelson Eduardo Hoff Brait, Arthur Marcelo Hoff Brait e Raphael Luiz Hoff Brait que são as pessoas que mais amo e tenho orgulho nesse mundo. Aos meus colegas de trabalho “técnicos e Professores” da Faculdade de Ciências da Saúde - UFGD. Amigas especiais que fiz durante o mestrado: Lais, Maisa, Kesia, Luana, Patricia, Flora, Nani, Adriana, Chaiane. Amigas do coração: Bárbara Falcão e Priscilla Ely, me apoiaram e estavam sempre presentes. Minha querida peluda “Babi” que quando estava desanimada e cansada se dedicava em me dar carinho e atenção (entre uma lambida e outra).*

*Analia Gomes da Cruz, técnica e grande amiga que me ajudou juntamente com o Prof. Dr. Jonas (UEMS) na coleta o das folhas de Piper vicosanum.*

*Flávio, Juliana e Claudia (UFMS), me auxiliaram nos testes de Cometa e Micronúcleo juntamente com o Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (UFMS).*

## Sumário

ABSTRACT

### RESUMO

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Índice de Abreviatura e Siglas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
1INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Plantas medicinais e familia Piperaceae.....	5
2.2 Processo inflamatório.....	8
2.2.1Processo Inflamatório Agudo e Crônico.....	9
2.2.2Anti-inflamatórios não esteróidese Plantas Medicinais.....	12
2.3.Patologias e Resistência Bacteriana.....	13
2.3.1Concentração Inibitória Mínima-CIM.....	15
2.4Estudos Toxicológicos.....	17
2.4.1 Toxicidade aguda.....	18
2.5 Ensaio de Genotoxicidade.....	19
2.5.1Ensaio Cometa-Single Cell Electrophoresis (SCGE).....	19
2.5.2 Teste Micronúcleo (MC).....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. REFERÊNCIAS.....	23
ARTIGO 1.....	31
ANEXOS.....	52

## Índice de Abreviaturas e Siglas

<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios não-esteroidais
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	<i>Clinical Laboratories Standards Institute</i>
<b>CONCEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> de adesão difusa
<b>DL</b>	Dose Letal
<b>EaggEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente
<b>NF-kB</b>	Fator Nuclear Kappa B
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>OECD</b>	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPV</b>	<i>Piper vicosanum</i> Via Oral
<b>PAF</b>	Fator de Ativação de Plaquetas
<b>PNMs</b>	Polimorfonucleares
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator $\alpha$ de Necrose Tumoral

## Índices de Figuras

<b>Figura 1 A e B</b> folhas de <i>Piper vicosanum</i> .....	09
<b>Figura 2</b> Folhas e pimentas brancas representando os frutos da <i>Piper vicosanum</i> .....	10

## RESUMO

*Piper vicosanum* (Piperaceae) é uma espécie tradicionalmente utilizada na terapia popular para o tratamento de dor, febre e inflamação. Entretanto, até o momento, há poucos estudos que comprovem cientificamente esses efeitos. Dessa forma, objetivou-se neste estudo avaliar as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas de *P. vicosanum* (OPV) e determinar o potencial toxicológico desta planta através de testes de toxicidade aguda, genotóxicos e mutagênicos. Para os testes de toxicidade aguda, ratas fêmeas foram tratadas oralmente (gavage) com 0 ou 2000 mg/kg/massa corporal de OPV. Sinais clínicos de toxicidade foram avaliados durante 14 dias. Para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico, camundongos fêmeas foram divididas em cinco grupos: grupo I: controle negativo; grupo II: controle positivo; grupo III: 500 mg/kg de OPV; grupo IV: 1000 mg/kg de OPV; grupo V: 2000 mg/kg de OPV. O sangue periférico foi coletado para o ensaio cometa e para o teste de micronúcleo. A atividade anti-inflamatória de OPV foi avaliada através do teste de pleurisia e de edema de pata induzidos por carragenina. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi analisada pelo teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Nenhum sinal de toxicidade foi observado nos animais expostos, indicando que a DL<sub>50</sub> do óleo é maior que 2000 mg/kg. Os dados do ensaio cometa demonstraram que o OPV não aumentou a frequência ou a taxa de danos ao DNA nos grupos tratados com as doses avaliadas em comparação com o grupo controle negativo. No teste de micronúcleo, os animais tratados não apresentaram nenhuma alteração mutagênica ou citotóxica em eritrócitos do sangue periférico. O óleo da folha de *P. vicosanum* apresentou atividade anti-inflamatória nas duas doses testadas (100 e 300 mg/kg) através dos testes de edema de pata e pleurisia, sendo que para o teste de edema de pata, o melhor resultado foi obtido na terceira hora após a aplicação da carragenina. Além disso, o óleo essencial mostrou uma atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, e *C. albicans*, com valor de CIM  $\geq 500$  ug/mL; *P. aeruginosa*  $\geq 1000$  ug/mL e *Salmonella sp.*  $\geq 250$  ug/mL. Conclui-se que o óleo essencial das folhas de *P. vicosanum* apresenta atividades anti-inflamatória e antimicrobiana, sem causar toxicidade aguda ou genotoxicidade.

**Palavras-chaves:** Plantas medicinais; *Piper vicosanum*; toxicidade aguda; genotoxicidade; mutagenicidade; inflamação; edema de pata; atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

*Piper vicosanum* (Piperaceae) is a species traditionally used in folk medicine for the treatment of various diseases such as pain, fever and inflammation. However, there is little scientific evidence of these effects. Thus, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antimicrobial effects of the essential oil from *P. vicosanum* leaves (OPV) and determined the toxicological potential of this oil through acute toxicity, genotoxicity and mutagenicity tests. The acute toxicity of OPV was evaluated by oral administration to female rats as single doses of 2000 mg/kg/body weight. General behavior and toxic symptoms were observed for 14 days. To evaluate the genotoxic and mutagenic potential, female mice were divided into five groups: group I: negative control; group II: positive control; group III: 500 mg/kg of OPV; group IV: 1000 mg/kg of OPV; group V: 2000 mg/kg of OPV. Peripheral blood was collected for the comet assay and the micronucleus test. The anti-inflammatory activity of essential oil was evaluated in carrageenan-induced pleurisy and paw edema in rats. The antimicrobial activity of OPV was analyzed by the Minimum Inhibitory Concentration test (MIC) against strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. No signs of acute toxicity were observed, indicating that the LD50 of this oil is greater than 2000 mg/kg. The comet assay data demonstrated that OPV did not increase the frequency or rate of DNA damage in groups treated with any of the doses assessed compared to that in the negative control group. In the micronucleus test, the animals treated did not exhibit any cytotoxic or mutagenic changes in peripheral blood erythrocytes. OPV (100 and 300 mg/kg) significantly reduced edema formation and inhibited leukocyte migration analysed in carrageenan induced oedema and pleurisy. Moreover, OPV presented antimicrobial activity against all tested microorganisms, with MIC ranging from 250 to 100 µg/mL. The present study shows that essential oil of *P. Vicosanum* leaves has anti-inflammatory and antimicrobial potential without causing acute toxicity or genotoxicity.

**Keywords:** Medicinal plants; *Piper vicosanum*; Acute toxicity, genotoxicity; mutagenicity; inflammation; paw edema; antimicrobial activity.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 60 a 80% da população mundial, principalmente de países em desenvolvimento, recorrem ao uso de plantas como tratamento alternativo contra diversas doenças. Isso ocorre, entre outras coisas, em virtude da limitada disponibilidade de serviços de saúde, o que faz com que os denominados “remédios naturais” fiquem em uma ótima posição nos dias atuais. Fatores como baixo custo, segurança e eficácia dessas substâncias estão ganhando espaço entre as pessoas, tanto das áreas urbanas como das rurais [1].

Tendo em vista a grande aceitação do uso de plantas medicinais pela população, torna-se de grande importância estudos científicos de validação da utilização popular dessas espécies em relação à sua eficácia e segurança [1]. As plantas produzem substâncias químicas que podem atuar benéficamente ou agirem de forma tóxica sobre o organismo. Portanto, para que o homem possa fazer uso medicinal de uma espécie vegetal com segurança, é necessário que a mesma seja estudada sob o ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico [2]. Assim, não basta o conhecimento popular da planta medicinal, os aspectos toxicológicos são fundamentais para que a população possa utilizar os medicamentos naturais de forma segura e eficaz [3, 4].

Nos últimos anos, o uso de medicamentos naturais para dor, inflamação e patologias infecciosas tem aumentado significativamente, tornando-se uma forma acessível de cuidados à saúde da população. No entanto, é fundamental avaliar a toxicidade de um produto ou substância natural antes de sua utilização terapêutica. Neste sentido, agências reguladoras, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vêm estabelecendo normas para a utilização de fitoterápicos, estipulando prazos para que a indústria farmacêutica apresente dados da eficácia e segurança destes medicamentos [5].

Alves e colaboradores [6] fizeram um levantamento etnobotânico das espécies 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 uso popular na região. Destas, as que apresentaram maior número de espécies foram Piperaceae (10,8%), Moraceae (8,1%), Smilacaceae (8,1%), Myrtaceae (5,4%) e Rubiaceae (5,4%).

A família *Piperaceae* possui cerca de 2.515 espécies, distribuídas em oito gêneros [7, 8]. É representada como ervas, arbustos frequentemente epífitos ou lianas. As folhas são simples e o caule nodoso [9]. As espécies dessa família encontram-se por toda América, e no Brasil, estão presentes cinco gêneros de 500 espécies, geralmente na mata atlântica [10].

Entre as diversas espécies conhecidas, destaca-se a *P. vicosanum*. A primeira coleta de *P. vicosanum* foi em Viçosa, zona da mata mineira, por Y. Mexia, em 1930. Até hoje, são poucos os estudos que abordam seus aspectos biológicos e farmacológicos [11, 12]. Em um dos poucos estudos realizados com *P. vicosanum*, foi observado que esta espécie possui óleos voláteis com importantes atividades biológicas, tais como, limoleno (45,5%),  $\alpha$ -pineno (5,1%), piperitona (3,4%), E-cariofileno (1,4%),  $\alpha$ -selineno (3,2%), delta-cadineno (2,2%), espatulenol (0,3%), óxido de cariofileno (0,4%), B-pineno (0,2%) e vestígios de Linalol e Germacreno D, demonstrando a necessidade de mais estudos com essa espécie [12].

Em virtude da escassez de trabalhos na literatura utilizando a espécie *Piper*, o presente estudo se propôs a fazer análises *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial extraído das folhas de *P. vicosanum*, testando suas atividades anti-inflamatória e antimicrobiana e seu perfil toxicológico. Essa pesquisa tem como um dos objetivos a descoberta de novos agentes terapêuticos provenientes de óleos vegetais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais e família Piperaceae

As espécies vegetais se tornaram parte da cultura popular por conta das suas propriedades curativas, através de observação e experimentação pelos povos [13]. Assim, o uso de plantas medicinais para o tratamento e cura de doenças vem sendo utilizado desde o início da civilização, onde o homem começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação destes recursos em seu benefício [14].

De acordo com a OMS, 80% da população de países em desenvolvimento utilizam tratamento tradicional nos seus cuidados básicos de saúde e 60-80% recorrem ao uso de plantas medicinais [15, 16]. Mesmo com esse aumento do uso de plantas pela população, muitas delas ainda não foram estudadas química ou farmacologicamente. Assim, sérios problemas podem ser ocasionados, principalmente, se o material não for cuidadosamente identificado, tendo certeza de que aquela é, realmente, a planta em questão e se estão sendo utilizadas em dosagens inadequadas [17]. Devido a estes possíveis riscos, estão sendo conduzidas pesquisas a partir do conhecimento etnobotânico das comunidades, para que sejam identificados seus benefícios e riscos [18, 19].

Atualmente, a área de pesquisa de medicamentos fitoterápicos está aumentando e com isso, a busca de novas substâncias ativas provenientes de produtos naturais está se intensificando [20]. Neste sentido, uma pesquisa realizada no período de fevereiro de 2007 a maio de 2008, em 21 comunidades rurais do município de Oeiras, Piauí, localizadas em área de transição vegetacional Caatinga/Cerrado, teve como objetivo conhecer as plantas tradicionalmente utilizadas pela população, sendo identificadas 167 espécies, distribuídas em 59 famílias botânicas e 143 gêneros, sendo 65,9% nativas. As famílias com maior representatividade de espécies foram Leguminosae e Euphorbiaceae. Salienta-se a elevada frequência de usos terapêuticos destas espécies, concentradas no tratamento de transtornos respiratórios (56 espécies), doenças infecciosas intestinais, hepáticas e helmintíases (65 espécies) [21].

Alves e colaboradores [6] fizeram um levantamento etnobotânico das espécies 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 uso popular na região. Destas, as que apresentaram maior número de espécies foram Piperaceae (10,8%), Moraceae (8,1%), Smilacaceae (8,1%), Myrtaceae (5,4%) e Rubiaceae (5,4%).

O gênero *Piper*, pertencente à família Piperaceae, é utilizado para fins terapêuticos e para o preparo de bebidas em diversas culturas [22]. Além disso, algumas espécies desta família são utilizadas comercialmente, como é o caso da *P. nigrum* L (pimenta do reino), comercializada desde o século XV, cujos frutos de sabor picante, são utilizados como condimento. O potencial medicinal desta espécie é conhecido por muitos povos para solução de problemas estomacais, diurese e falta de apetite [23]. Seus frutos maduros produzem a pimenta branca, enquanto frutos colhidos verdes, secos, produzem a pimenta preta do comércio [24].

Apesar de um grande desafio taxonômico, há um grande interesse medicinal nas espécies de *Piper*. A dificuldade de estudos com a planta se deve provavelmente pelo diminuto tamanho das partes florais. Um estudo comparou folhas de nove espécies: *P. aduncum* Vell, *P. cermaan* Vell, *P. dilatatum* Rich, *P. gaudichaudianon* Kunth, *P. hispidinervum* C. DC, *P. lindbergii* C. DC, *P. solmsianum* C. DC, e *P. umbellatum* Jacq, com o objetivo de avaliar o potencial dos caracteres anatômicos para a separação da espécie e concluiu-se que todas as espécies são hipoestomáticas (possuem estômatos localizados na epiderme inferior da folhas) exceto *P. hispidinervum*. Em geral, a análise de agrupamento identificou três grupos distintos entre as espécies, com base nas características anatômicas estudadas [25]. A primeira coleta da *P. vicosanum* foi em Viçosa, zona da mata mineira, por Y. Mexia, em 1930. Nesta ocasião, acreditava-se que a família Piperaceae possuía aproximadamente 2.000 espécies, distribuídas em 10 gêneros, sendo representados nas florestas brasileiras por 265 espécies [26]. No entanto, após alguns anos, evidenciou-se que o Brasil possui 500 espécies distribuídas em 5 gêneros, os quais são representados por *Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis* [27].

Algumas plantas do gênero *Piper* são conhecidas popularmente como "falso Jaborandi", "pariparoba" ou "jaborandi" e são utilizadas na terapia popular na região de Dourados-MS, como analgésicos, anestésicos, para o tratamento de queimaduras e de problemas gástricos [6]. No entanto, ainda são poucos os estudos científicos sobre espécies desse gênero, sendo de suma importância pesquisas para a comprovação de suas potencialidades terapêuticas. Abaixo, serão descritos estudos encontrados na literatura

sobre algumas espécies desse gênero, que tiveram seus efeitos terapêuticos comprovados cientificamente.

A espécie *P. amalago* ou popularmente conhecida como “Jaborandi”, é distribuída desde o México até o Brasil e utilizada pela população para o tratamento da inflamação e da dor, agindo como anti-inflamatório natural [28]. Uma pesquisa realizada em ratos sugere que *P. amalago* atua no sistema nervoso, possuindo efeito ansiogênico [29]. Alguns compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória foram identificados nas raízes desta espécie, tais como amidas, piperina e sesquiterpenos [30]. Em outro estudo, foram isoladas e caracterizadas duas amidas piperidínicas ou pirrolidínicas, com atividade antibacteriana de extratos obtidos das folhas de *P. amalago* [31].

*P. aduncum* é outra espécie de interesse medicinal. Além dos efeitos anti-inflamatórios observados, esta planta apresentou efeitos antimicrobianos. Estudos demonstraram que essa espécie possui atividade inibitória contra microrganismos relacionados com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, tais como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Mycobacterium intracellulare* [32]. Além disso, inibiu 98% do crescimento de *Leishmania amazonensis in vitro*, apresentando uma ação moluscicida e bactericida [33, 34].

Em estudo da composição química de *P. glabratum*, foi demonstrado a ocorrência de um derivado de ácido benzoico prenilado, bem como um cromeno [35]. Até os dias atuais, há poucos estudos e trabalhos que abordem os aspectos ecológicos e farmacológicos desta espécie [36], no entanto, em estudo desenvolvido por Flores e colaboradores [37], algumas substâncias encontradas na *P. glabratum* mostraram efeito leishmanicida contra três espécies de *Leishmania*, e outros compostos apresentaram significativa atividade tripanocida, demonstrando a necessidade de mais testes farmacológicos.

*P. umbellatum*, encontrada no México, América Central, América do Sul e Ilhas das Índias Ocidentais, é uma espécie utilizada em vários tratamentos, como doença renal, diarreia, afecções de pele, queimaduras, reumatismo, malária, parasitoses intestinais, inflamação e febre. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de terpenos, alcaloides, flavonoides, esteróis e outras classes de metabólitos secundários. O extrato e composto puro mostrou amplo potencial farmacológico, incluindo atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas, anti-oxidantes, citotóxicas, antimaláricas, leishmanicidas e atividade antitripanosomal [38].

Outra espécie de interesse terapêutico é a *P.vicosanum* (Figura 1), a qual é um arbusto de 1 a 3 m de altura, com crescimento monopodial. As folhas e os ramos são glabros e as espigas são curtas e eretas, as flores são aclamídeas, bissexuadas, com ovário súpero (ovário acima do plano do receptáculo) e uniovular; os frutos são drupáceos. É uma espécie que costuma ser observada na margem das trilhas em locais sombreados [39]. O óleo essencial da *P. vicosanum* é composto por hidrocarbonetos monoterpênicos em composição, com predominância de monoterpênicos. A identificação por cromatografia gasosa do óleo mostrou a presença de  $\beta$ -pineno, espatulenol, E-cariofileno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -selineno, piperitona, delta cadineno e limoneno [13]. Em decorrência dos poucos estudos científicos relacionados à *P.vicosanum*, objetivou-se avaliá-la em relação ao seu potencial terapêutico e toxicológico.



**Figura 1 (A e B):** Folhas e ramos de *P. vicosanum*.  
**FONTE:** Brait, 2014.

## 2.2 Processo Inflamatório

A reação inflamatória desempenha um importante papel fisiológico benéfico, pois é uma resposta complexa do hospedeiro em defesa da invasão de patógenos ou, de uma substância nociva, limitando os efeitos da agressão desses microrganismos. Pode ocorrer a partir de qualquer agente lesivo, sendo ele físico (queimadura, trauma), biológico (patógenos, como bactérias, vírus, alérgenos) ou químico (substância ácida ou cáustica) [40-42].

Esta resposta geralmente é acompanhada por uma cascata complexa de eventos bioquímicos e celulares, como o extravasamento de fluidos ricos em proteínas de alto peso

molecular, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores químicos, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e resolução; e também por alguns sinais clínicos clássicos, resultantes desses eventos: aumento do fluxo sanguíneo e dilatação dos pequenos vasos, aumento da permeabilidade vascular (permitindo que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação e se acumulem no local da inflamação), aumento da temperatura, dor e, às vezes, perda da função do local afetado. Esses sinais foram nomeados de sinais cardinais e foram resumidos em rubor, edema, calor, dor e perda da função [41- 43].

Esse processo é a base de várias doenças e pode ser dividido, conforme sua duração e características, em agudo e crônico. O primeiro, geralmente, tem uma duração de algumas horas até poucos dias, apresentando edema, exsudato com migração de células (primeiramente neutrófilos), como, por exemplo, na anafilaxia. Já o segundo, pode durar vários dias, semanas e até meses, como é o caso da asma, da aterosclerose e da artrite reumatoide. Na reação aguda, pode ocorrer uma resposta inata, não-adaptativa, que é ativada logo após uma infecção ou lesão e, a resposta imunológica adaptativa, que somente é desencadeada após o sistema imunológico inato reconhecer o patógeno, ativando a imunidade humoral e celular [40, 44].

### **2.2.1 Processo Inflamatório Agudo e Crônico**

Na fase aguda ocorre extravasamento de líquido extracelular com liberação de mediadores. Com o reconhecimento do patógeno, o sistema imune é ativado, levando a liberação de macrófagos (neutrófilos fora da corrente sanguínea) e leucócitos polimorfonucleares (PNMs), que são responsáveis por liberar fatores que regulam a resposta inflamatória e imunológica na fase aguda, chamados de citocinas, polipeptídeos produzidos por células do sistema imune, que direcionam a resposta inflamatória até o local afetado (quimiotaxia) [42, 45, 46]. As citocinas se ligam a receptores celulares específicos, que resultam na ativação de vias de sinalização intracelular. Por este mecanismo, elas regulam a produção e a atividade de outras citocinas, o que pode aumentar (ação pró-inflamatória) ou diminuir (ação anti-inflamatória) a resposta inflamatória. Dentre as principais, encontram-se a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) [45-47].



A IL-1 é produzida pelos macrófagos ativados e células endoteliais e, possui ação pró-inflamatória. Tem meia-vida na circulação de, aproximadamente, seis minutos e, pode ser dividida em IL-1- $\alpha$  e IL-1- $\beta$ . É o principal mediador da resposta de fase aguda. O TNF- $\alpha$  é derivado das plaquetas, possui ações tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, ativam a coagulação, promovendo a expressão ou a liberação de moléculas de adesão, a prostaglandina E2, fator de ativação de plaquetas (PAF), glicocorticoides e, eicosanoides. É um dos primeiros mediadores a ser liberado, tendo uma vida útil de cerca de 20 minutos [46, 48, 49]. No caso da IL-6, ela é produzida por diversos tipos celulares (monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, entre outros). São liberadas através de estímulos, principalmente, de vírus e bactérias, devido ao lipopolissacarídeo bacteriano [46].

Com a vasodilatação, que é mediada basicamente por óxido nítrico (ON) e prostaglandinas vasodilatadoras, ocorre a liberação, além desses mediadores, de outras substâncias endógenas como, histamina, bradicinina, serotonina, produtos da cascata do ácido araquidônico, adenosina e substância P. Todos eles estão contidos no exsudato e promovem o aumento da permeabilidade vascular, ocorrendo assim, o edema, que vem acompanhado pela marginação, adesão e migração leucocitária [45].

Depois disso, os macrófagos e neutrófilos liberam radicais livres, além de várias substâncias oxidantes derivadas do oxigênio e do nitrogênio, criando um estresse oxidativo e nitrosativo, promovendo a indução de um grande número de fatores transcricionais, como o NF- $\kappa$ B, que atua como um mensageiro para a expressão de moléculas de adesão intracelular, tais como as selectinas (L-selectina, P-selectina, E-selectina) e integrinas. Isso resultará na infiltração de leucócitos no tecido lesionado [51, 52].

O ácido araquidônico sofre uma cascata de metabolização provocada pela enzima cicloxigenase (COX). Essa reação resulta em vários compostos, como prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas, que são liberados no processo inflamatório. Atualmente, são conhecidas três isoformas desta enzima – COX-1, COX-2 e COX-3, sendo esta última ainda pouco conhecida. Os anti-inflamatórios não-esteroides [43] agem inibindo essa enzima, evitando assim a liberação dos mediadores inflamatórios [52].

A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada, está presente nas células em condições fisiológicas, e tem relação com ações nos vasos sanguíneos, estômago e rins. A COX-2 é induzida em células que sofreram exposição de agentes pró-inflamatórios [52].

Tipicamente, ao dar início a um evento inflamatório, o objetivo de uma resposta inflamatória é o de reparar os locais afetados, e permitir retorno à homeostase sem deixar sinais ou vestígios desse processo. Se a resolução do processo não está completa, ocorre a progressão para a inflamação crônica e, até mesmo fibrose tecidual, onde os mecanismos patológicos são mais complicados e os resultados são muitas vezes mais duradouros e prejudiciais. Muitas doenças são consideradas como processos inflamatórios crônicos, tais como obesidade, diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas e câncer [42, 53].

### 2.2.2 Anti-inflamatórios Não Esteroides e Plantas Medicinais

Existem três grupos principais de anti-inflamatórios, que são os anti-inflamatórios não-esteroides [43], os fármacos anti-reumatóides e os glicocorticoides [40].

A classe de anti-inflamatórios não-esteroides está entre as mais utilizadas, pois possui como principais propriedades: ser anti-inflamatório propriamente dito, analgésico e antipirético. Temos como exemplos dessa classe a aspirina, o diclofenaco, o ibuprofeno, o piroxicam e o celecoxibe [40].

Estas substâncias promovem o bloqueio da síntese de prostaglandinas por inibição da COX, produzindo assim os efeitos desejados e reduzindo os sinais cardinais da inflamação. No entanto, a maioria das substâncias existentes hoje no mercado, possui a capacidade de inibir tanto a COX-1 quanto a COX-2. Isso acarreta muitos efeitos colaterais, já que os efeitos terapêuticos (analgésicos e anti-inflamatórios) estão relacionados somente a inibição da COX-2 [45, 53].

Além das drogas sintéticas, vários extratos extraídos de plantas já mostraram atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antipirética em modelos experimentais. Dentre estes, podemos citar: o extrato metanólico de *Cariniana rubra* (Jequitibá-vermelho) [54], o extrato hidroalcoólico de *Officinali sambilanica* [55], o óleo essencial de *Tagetes minuta* (planta da família do Girassol), dentre outros.

A piperina (composto alcalóide de *Piper nigrum*), além das suas propriedades antioxidantes, pode exercer um efeito protetor através do mecanismo anti-apoptótico e anti-inflamatório [56]. Estudo mostrou que este composto inibiu a apoptose das células neuronais, demonstrando que a piperina age em marcadores anti-inflamatórios TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em ratos 6-OHDA-induzido por *Parkinson*. Assim, esse composto pode tornar-se um forte candidato para o desenvolvimento de fármacos com atividade anti-inflamatória.

### 2.3 Patologias Infecciosas e Resistência Bacteriana

As bactérias são microrganismos procarióticos pertencentes ao Reino Monera, com tamanho de aproximadamente 0,2 a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento. Podem se apresentar de diferentes formas, como cocos, bacilos, espirilos e vibriões. Apresentam na sua estrutura cápsula (camada mucosa), parede celular, membrana celular, citoplasma, inclusões, ribossomos, cromossomos, plasmídeos, fimbrias e flagelos [57].

Bactérias como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.*, entre outras, são responsáveis por várias doenças em seres humanos. Enquanto as bactérias citadas podem ser patogênicas, outras estão presentes na microbiota natural dos seres humanos, sendo importantes para o bom funcionamento e proteção de alguns órgãos [58].

As infecções bacterianas têm sido umas das principais causas de doenças ao longo da história da humanidade. Com a descoberta e introdução de antibióticos, este problema tendeu a desaparecer. No entanto, atualmente, os microrganismos têm desenvolvido mecanismos de resistência que contrariam os avanços alcançados nos tratamentos das infecções [52].

O primeiro caso de resistência bacteriana a antibióticos foi publicado em 1947, quando foi relatado o isolamento de *S. pyogenes* (atualmente *S. aureus*) resistente à penicilina em 38 de 100 pacientes com infecções estafilocócicas na Inglaterra [59]. Em 1961, cepas de *S. aureus* resistentes a metilina e outras penicilinas semissintéticas também foram isoladas [60]. Em 2003, foi relatada que a ocorrência de *S. aureus* metilina resistente (MRSA) isolado de *swab* nasal de indivíduos saudáveis, foi de 91% na Coreia [61] e 82,1% na Alemanha [62].

Existem dois tipos de resistência aos antimicrobianos, a natural e a adquirida. Na resistência natural, qualquer indivíduo isolado da espécie, independentemente de onde foi isolado, apresenta resistência. É uma característica intrínseca de um microrganismo, que ocorre sem a exposição ao antibiótico [57]. Já na adquirida, apenas algumas cepas apresentam, justamente porque desenvolveram ao longo do tempo. Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antibióticos que são: alteração da permeabilidade, alteração do local de ação, a bomba de efluxo e o mecanismo enzimático, que altera a estrutura química do antibiótico [52].

A resistência das bactérias aos antimicrobianos varia de local para local, de região, de país e tem relação com a terapia antimicrobiana mais frequentemente utilizada pelos profissionais de saúde [57]. Para auxiliar no controle de desenvolvimento da resistência é preciso traçar os perfis dos locais de hospitais e instituições de modo a conhecer a tendência de comportamento e desta forma viabilizar formas eficientes de controle. Sabe-se da dificuldade de eliminar por completo o fenômeno da resistência bacteriana em ambientes hospitalares, em virtude do mecanismo de disseminação, portanto é fundamental a análise e controle deste processo, uma vez que essas cepas multirresistentes colocam em risco toda a população [62,63]. Como o problema da resistência a droga continua aumentando, torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos úteis ou novas formas de tratar o microrganismo resistente [64]. Uma nova forma de terapia que está sendo utilizada é a combinação de terapia antimicrobiana sinérgica entre agentes antimicrobianos conhecidos e extratos de plantas naturais. Estudos sugerem que a terapia da combinação entre extratos de plantas e antibióticos pode expandir o espectro antimicrobiano, evitando o aparecimento da resistência mutante e minimizando a toxicidade [65].

Extratos de diversas plantas têm apresentado, além de propriedades antibacterianas, a capacidade de interferir na atividade antibiótica e uma forte tendência na potencialização de antibióticos. Esta interação positiva já foi demonstrada em vários estudos, com muitos resultados promissores [65].

Assim, estudos de novos agentes antimicrobianos em plantas são de grande importância e é crucial em diversos setores de empresas farmacêuticas. Além disso, as plantas são fortes candidatos em estudos de bioprospecção, atuando nas descobertas da atividade farmacológica de novos agentes antimicrobianos, especialmente em países como o Brasil, que oferece uma biodiversidade a ser estudada e analisada [66].

### **2.3.1 Concentração Inibitória Mínima - CIM**

Utilizam-se os testes de diluição em caldo ou em ágar para determinar a sensibilidade de um microrganismo *in vitro* a um agente microbiano. Pelo CIM (ou MIC) determina-se a concentração inibitória mínima de um antimicrobiano, ou seja, a menor concentração de antimicrobiano que inibe o crescimento de um microrganismo [67].

Em alguns casos, tanto a concentração mínima bactericida quanto a bacteriostática tem sido denominada CIM [68]. Alguns autores descreveram concentração bacteriostática e bactericida como a menor concentração na qual a bactéria deixa de crescer em caldo, mas desenvolve quando o caldo é repicado para outro meio de cultura ou não desenvolve quando repicada, respectivamente [69].

Os antibióticos são classificados em bactericidas e bacteriostáticos. Os bactericidas provocam alterações incompatíveis com a sobrevivência bacteriana. Os bacteriostáticos inibem o crescimento e a reprodução bacteriana sem provocar sua morte imediata [63]. A CIM obtida no teste de diluição pode dizer a concentração de agente antimicrobiano necessário no local da infecção para inibir o organismo infectante [67].

Os termos utilizados no resultado da CIM são: a) susceptível, significando que os microrganismos isolados são inibidos pelas concentrações normalmente realizáveis de agente antimicrobiano; b) intermediário, inclui isolados com agente antimicrobiano em concentrações inibitórias mínimas que se aproximam dos níveis sanguíneos e de tecidos geralmente atingíveis e para a qual, as taxas de respostas podem ser menores do que para os isolados sensíveis; c) resistente, implica que os isolados não são inibidos pelas concentrações realizáveis do agente com esquemas de dosagens normais e/ou em que as concentrações inibitórias mínimas demonstram que caem no intervalo no qual os mecanismos específicos de resistência microbiana [67].

Os testes de CIM realizados neste estudo utilizaram cepas ATCC de bactérias como *Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva), *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. (gram-negativas), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa não fermentadora) e *Candida albicans* (levedura).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. A principal espécie deste gênero é o *S. aureus*, que tem a forma esférica (são cocos), cerca de 1µm de diâmetro, e formam grupos com aspecto de cachos de uvas. Este microorganismo é um importante patógeno envolvido na etiologia das infecções humanas, sendo encontrado, como microbiota normal, nas fossas nasais, virilha e axilas. É responsável por diferentes tipos de infecções, a maioria infecções ligeiras da pele e tecidos moles, mas também é agente etiológico de formas graves de pneumonia, endocardites e sepses [70]. Qualquer sistema de órgãos é propenso à infecção por *S. aureus*, as infecções mais importantes são a bacteremia, endocardites e infecções do trato respiratório [71].

*Escherichia coli* é uma Enterobactéria (gram-negativa) que compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie (O, K e H). Não são todas as cepas de *E. coli* provenientes do intestino humano ou de qualquer outro lugar do organismo que apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo [57]. É uma espécie podendo ser comensal e que pode causar infecções intestinais, urinárias, septicemias, meningites, entre outros. As estirpes de *E. coli* enteropatogênicas são classificadas em seis grupos: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) [72].

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbio Gram-negativo não fermentador de açúcar, pertencente à família Pseudomonaceae. Patógeno oportunista presente em infecções hospitalares, urinárias e sepse, estando mais suscetíveis em pacientes com queimaduras, possui alta mortalidade, podendo chegar a 33% em pacientes imunodeprimidos [73]. A umidade é um fator crítico em reservatórios hospitalares de *P. aeruginosa*, como: equipamentos de ventilação mecânica, soluções de limpeza, desinfetantes, pias e panos de chão, sendo altamente resistentes à variação de temperatura [73].

O gênero *Candida*, representados por leveduras, atuam como patógenos oportunistas, desencadeando doenças em indivíduos com fatores adversos, essencialmente os imunocomprometidos [74]. Por compor a microbiota, fazendo parte das mucosas digestivas e genital dos seres humanos e de muitos mamíferos, *C. albicans* é a espécie mais comumente envolvida em infecções [75]. No hospedeiro, a proteção contra infecções fúngicas ocorre em primeiro momento pelas barreiras físicas, como pele, mucosas, secreções e pH, e pelo sistema imunológico [76].

As salmonelas são divididas em duas espécies: *S. entérica*, que é dividida em seis subespécies, e *S. bongori* [77]. Uma terceira espécie foi descrita e isolada de um sedimento de regiões aquíferas, denominada *S. subterrânea* [78]. Microrganismos pertencentes à família das enterobactérias, as Salmonellas são imóveis (com exceção da *S. pullorum* e *S. gallinarum*), anaeróbios facultativos e crescem a uma temperatura entre 5 a 45° C. Podem crescer em pH baixo e quase sempre são sensíveis ao aumento da concentração salina [78].

Algumas espécies de *Salmonella sp.* são mais virulentas, como *S. typhi* e *S. paratyphi*, que são causadoras de febres tifoides e paratífoides. A *S. typhimurium* é uma

das principais bactérias causadoras de uma doença gastrointestinal menos grave nos animais e no homem em todo o mundo. No Brasil, cepas de *S. typhimurium* foram isoladas de alimentos para o consumo humano. A multirresistência dessas cepas a diversos antimicrobianos ocorre devido ao uso indiscriminado de antibióticos em produtos agrícolas e no tratamento de pacientes [79].

## **2.4 Estudos toxicológicos**

Com a oferta de novas drogas e de novos compostos, bem como o aumento dos casos de intoxicação, a toxicologia torna-se uma importante ferramenta para se avaliar a segurança e o risco no emprego de tais agentes. Assim, para obter-se segurança no uso de qualquer substância, devem ser feitos estudos não clínicos, nos quais incluem estudos de toxicidade aguda (dose única), toxicidade subaguda ou crônica (doses repetidas), toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, e alguns outros testes dependendo do objetivo do estudo [80].

Estudos de toxicidade aguda devem ser feitos primeiro para selecionar a dose adequada para os estudos posteriores (subagudo e crônico). No entanto, a avaliação dos efeitos adversos da administração de doses repetidas em animais pode ser mais relevante para a determinação da toxicidade geral da preparação vegetal [81, 83].

Após esses testes feitos em animais, conseguem-se diretrizes para a escolha de uma dose que possa ser usada com “segurança” em seres humanos, já que os resultados relacionados, principalmente, com a parte hematológica, gastrointestinal, cardiovascular e efeitos adversos obtidos nos animais podem ser correlacionados com o homem. Além disso, é muito difícil determinar certos efeitos adversos em animais, tais como dor de cabeça, dor abdominal, tonturas e distúrbios visuais [84].

### **2.4.1 Toxicidade Aguda**

O guia desenvolvido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária [85] traz a definição deste tipo de estudo: “Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma droga quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração”.

Este tipo de estudo deve ser realizado com uma espécie de animais mamíferos adultos (de 8 a 12 semanas de idade), de preferência roedores, que não sejam geneticamente modificados, utilizando-se machos e fêmeas, no mínimo de seis animais de cada sexo por grupo de teste. A via de administração escolhida deve ser a proposta para o uso da substância em questão, testando-se doses suficientes para que possa ser determinada a DL50 (dose letal 50%), dose que mata 50% dos animais e que possa ser observado os possíveis efeitos adversos provocados pelo produto. Caso não apareça nenhum tipo de efeito adverso, deve ser utilizada a dose máxima possível. A observação após o tratamento deve ser feita para identificar sinais de toxicidade, tais como: variações de peso corporal e no consumo de ração e água, sinais clínicos (piloereção, contorções, tremores, convulsões, cianose, ataxia e diarreia), tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade desses sintomas, anotando-se o maior número de parâmetros possíveis [81, 82].

Além dos ensaios de toxicidade aguda e subaguda, a OECD e normativas da ANVISA também sugerem estudos de genotoxicidade, quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado da planta por humanos.

## **2.5 Ensaios de Genotoxicidade**

A genotoxicidade é uma modalidade/especialidade que se situa entre a toxicologia e a genética, [86] avaliando os potenciais e efeitos genotóxicos de uma substância [87, 88], através de ensaios que são categorizados pelos indicadores biológicos, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA [89].

Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* utilizados para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas, lesões gênicas e alterações cromossômicas [5], visto que tais eventos são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer [89]. A genotoxicidade não é uma medida de carcinogenicidade, mas é frequentemente utilizada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese [89].

Testes de genotoxicidade são rotineiramente utilizados para uma avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos, plantas e medicamentos. Os ensaios comumente utilizados para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de substâncias são



o teste do micronúcleo e o ensaio cometa. São testes rápidos, simples e sensíveis na avaliação de vários tipos de danos genéticos e citogenéticos [89].

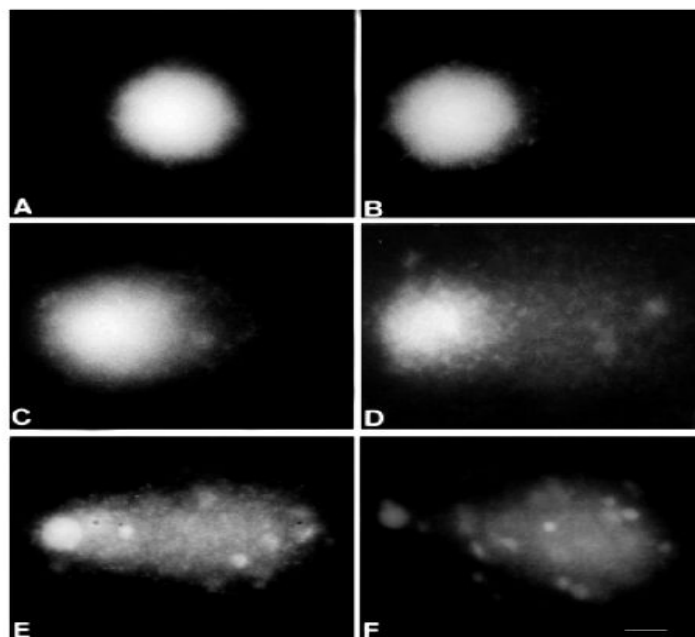
### **2.5.1 Ensaio Cometa - *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)**

O teste cometa é uma técnica rápida, sensível e simples, de baixo custo com finalidade de detectar e analisar lesões no DNA [89, 90]. Este teste pode ser considerado um biomonitoramento a níveis crônicos de exposição, podendo ser utilizado em inúmeras análises onde se podem avaliar células viáveis [91].

O teste cometa se difere de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas [92].

O Ensaio Cometa ou “*single cell gel electrophoresis*” (SCGE) introduzido por Singh *et al.*, [93] e modificado por Speit e Hartman [94] é realizado um ensaio com células sanguíneas de um tratado (*in vivo* ou *in vitro*) com as substâncias teste em análise. O sangue coletado é misturado com agarose de baixo ponto de fusão no momento que a agarose solidifica. Após a solidificação, as células são lisadas em solução detergente, por pelo menos uma hora, e então as lâminas são colocadas em câmara de eletroforese com solução alcalina, permitindo o desenrolar do DNA. Quando a substância ou composto em análise provoca alguma modificação no material genético, isso resulta na migração de pequenos fragmentos do DNA através do gel de agarose na eletroforese, caracterizando imagens de nucleóides como cometas (cabeça e cauda), que, quando corados pelo brometo de etídio, podem ser observados em microscópio de fluorescência [92].

O cometa é classificado em quatro categorias (Figura 2), distribuídos desde a classe zero, em que as células não apresentam cauda (dano mínimo), até a classe quatro, em que as células apresentam tamanho da cauda superior a duas vezes mais o tamanho da cabeça (dano máximo). Cometas sem cabeça ou com caudas muito extensas são consideradas células apoptóticas (células mortas) [94, 95].



**Figura 2.** Classificação dos cometas em células de sangue periférico no ensaio SCGE. Classe 0 (A); Classe 1 (B); Classe 2 (C); Classe 3 (D); Classe 4 (E); Classe 5 (F) apoptose.

**FONTE:** Freitas, 2007.

O teste cometa é utilizado para detectar lesões genômicas, que, após serem processadas podem resultar em mutação. As lesões detectadas pelo ensaio são passíveis de correção, possibilitando o uso do teste para estudos de reparo no DNA [96].

### 2.5.2 Teste do Micronúcleo

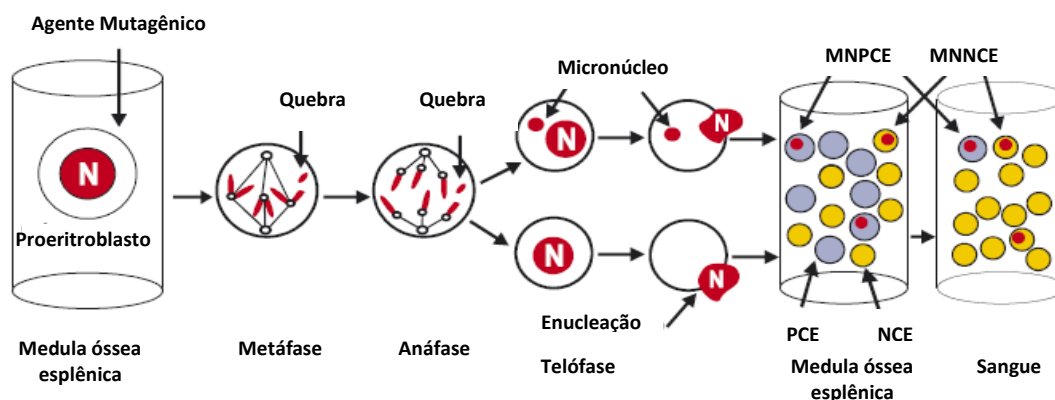
O micronúcleo se constitui de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Eles são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Portanto o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência do dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico [96].

Fragmentos cromossômicos também denominados micronúcleos são pedaços que resultam de quebras de cromossomos, ou de cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase, e podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a divisão celular. O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina de testes de genética

toxicológica dos agentes químicos e radiações *in vivo* e *in vitro*. O ensaio pode ser analisado em eritrócitos, células da mucosa oral ou linfócitos para estimativa de dano genético induzido *in vivo* [97].

O ensaio do Micronúcleo detecta agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) [98, 99]. O objetivo do ensaio é a detecção de danos induzidos pelo composto testado nos cromossomos ou no aparelho de eritroblastos [100].

Durante o processo de divisão celular na medula óssea (Figura 3), os eritrócitos sofrem duplicação final dos cromossomos, diferenciando-se em eritrócitos policromáticos. Eritrócitos jovens são ricos em ribossomos, justamente por isso são facilmente corados, diferenciando-se em eritrócitos maduros ou normocromáticos que não contem ribossomos. Na presença de agentes clastogênicos e de agentes aneugênicos, os fragmentos cromossômicos resultantes das quebras do material genético podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose, originando o micronúcleo. Este, por sua vez, permanece no citoplasma e pode ser facilmente visualizado em eritrócitos policromáticos (tempo de vida relativamente curto). Assim, qualquer micronúcleo que ele contenha, tem grande possibilidade de ter sido gerado como aberrações cromossômicas induzidas recentemente, na presença da substância que causou esse dano [101].



**Figura 3.** Eritropoiese *in vivo*. Formação de eritrócitos policromáticos, normocromáticos e micronúcleos. N: Núcleo. PCE: eritrócito policromático. NCE: eritrócito normocromático. MNPCE: Eritrócito policromático micronucleado

**FONTE:** Adaptado de Krishna e Hayashi, 2000.

Segundo o protocolo original de Heddle [102] e Schmid [103], os micronúcleos são encontrados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expõem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são

facilmente reconhecíveis. Se forem contados os micronúcleos apenas nesse tipo de célula, haverá a segurança de que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. O período entre a última divisão e a formação de eritrócitos policromático é de 8 a 12 horas, é óbvio que só serão encontrados micronúcleos induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo no qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração do estágio policromático entre 10 a 24 horas.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil toxicológico e genotóxico e as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *P. vicosanum*.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Investigar o potencial anti-inflamatório do óleo essencial das folhas de *P. vicosanum* em ratos, por meio dos testes de edema de pata e pleurisia;
- Investigar o potencial antimicrobiano *in vitro* do óleo essencial das folhas de *P. vicosanum* frente às cepas ATCCs de fungos e bactérias, através do teste de Concentração Inibitória Mínima;
- Investigar o potencial tóxico do óleo essencial das folhas de *P. vicosanum*, através do teste de toxicidade aguda em ratos;
- Avaliar os possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos do óleo essencial das folhas de *P. vicosanum* em camundongos, pelo teste de micronúcleo e ensaio cometa.

## 4 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2002 - 2005. Geneva: WHO, 2002.
2. Ritter MR, Sobierajski GR, Schenkel EP, Mentz LA. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2002; 12(2):51-62.
3. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2007.
4. Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Sousa FC. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006;16(4):455-62.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília: ANVISA, 2013.
6. Alves EO, Mota JH, Soares TS, Vieira MC, Silva CB. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciênc Agrotec*. 2008;32(2):651-58.
7. Machado NSO. Estudo da anatomia foliar de espécies do gênero *Piper* L. (Piperaceae) no estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007.
8. Guimarães EF, Valente MC. 2001. Piperaceae –Piper. In: Reitz, R. (ed.). *Flora ilustrada catarinense*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí.
9. Souza VC, Lorenzi H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
10. Cronquist A. *An integrated system of classification of flowering plants*: Columbia University Press, 1981.
11. Thies W, Kalko EKV. Phenology of Neotropical pepper plant (Piperaceae) and their association with their main dispersers, two short-tailed fruit bats, *Carollia perspicillata* and *C. catanea* (Phyllostomidae). *Oikos*. 2004;104(2): 362-76.
12. Mesquita JMO, Cavaleiro C, Cunha AP, Lombardi JA, Oliveira AB. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2005;15(1): 6-12.

13. Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum*L. Asian Pac J Trop Med. 2014;7S1:461-68.
14. Ko RJ. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. Clin Toxicology. 1999;37(6):697-708.
15. Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova. 2005;28(3): 519-28.
16. Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007;17(1): 114-40.
17. Rosa C, Câmara SG, Béria JU. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. Ciências & Saúde Coletiva. 2011;16(1): 311-18.
18. Taufner CF, Ferrão EB, Ribeiro LF. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. Natureza on line. 2006;4(1): 30-39.
19. Lima MS, Oliveira Neto AR, Pinto MA, Silva IR, Moraes SC, Gomes ML. Etnofarmacologia: o uso terapêutico de *Origanum vulgare* na medicina popular, Bragança - Pará. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu - MG, 2007.
20. Reyes-García V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. Journal of ethnobiology and ethnomedicine. 2010;6(32):1-12.
21. Matta CBB, Souza ÉT, Queiroz AC, Lira DP, Araújo MV, Cavalcante-Silva LHA, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. Marine Drugs. 2011;9(3): 307-18.
22. Oliveira FCS, Barros RFM, Moita Neto JM. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. Rev bras plantas med. 2010;12(3):282-301.
23. Bezerra DP, Militão GC, de Castro FO, Pessoa C, de Moraes MO, Silveira ER, et al. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. Toxicol In Vitro. 2007;21(1):1-8.
24. Gogosz AM, Boeger MRT, Negrelle RRB, Bergo C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). Rodriguésia. 2014;63(2): 405-17.
25. Yuncker TG. The Piperaceae of Brazil-I: Piper-group I,II,III,IV. Inst de Botânica, 1972.

26. Teixeira SD. Estudo fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* e sua interação com morcegos frugívoros. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Paraná. 2003.
27. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, *et al.* Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*. 1997;46(4):597-673.
28. Achenbach H, Fietez W, Worth J, Waibel R, Portecop J. Constituents of tropical medicinal plants, IX[X.sup.1] GC/MS -investigations of the constituents of Piper amalago-30 new amides of the piperine-type. 1986;52(1):12-18.
29. Domínguez XA, Verde JS, Sucar S, Treviño R. Two amides from Piper amalago. *Phytochemistry*. 1985;25(1):239-40.
30. Argondizo F, Oliveira AJA, Kitamura ROS, Romoff P, Kato MJ, LAGO JHG. Constituintes químicos de Piper glabratum Kunth (Piperaceae). Sociedade Brasileira de Química. 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ. 2007.
31. Okunade AL, Hufford CD, Clarck AM, Lentz D. Antimicrobial Properties of the Constituents of *Piper aduncum*. *Phytotherapy Research*. 1997; 11(2):142-44.
32. Orjala J, Erdelmeier CA, Wright AD, Rali T, Sticher O. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Med*. 1993;59(6):546-51.
33. Orjala J, Wright AD, Rali T, Sticher O. Three new prenylated benzoic acid derivatives and molluscicidal sesquiterpenoids from *Piper aduncum* leaves. *Planta Med*. 1992;58(1):714.
34. Carvalho-Okano RM, Alves SAM. Piperaceae C. Agardh da Estação Experimental Mata do Paraíso, Viçosa, MG. *Acta Bot Bras*. 1998;12(3): 497-513.
35. Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, *et al.* Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. *J Nat Prod*. 2008;71(9):1538-43.
36. Roersch CM. Piper umbellatum L.: a comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. *J Ethnopharmacol*. 2010;131(3):522-37.
37. Pio Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Imprensa Nacional. Rio de Janeiro, 1984.
38. Joly AB. Conheça a vegetação brasileira. 1.ed. São Paulo: Editora Polígono, 1970.
39. Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. *Piper arborescens* contra leukemia linfocítica. *Cancer Chemotherapy Reports*. 1972.



40. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Rang & Dale Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
41. Dunder RJ, Quaglio AEV, Maciel RP, Luiz-Ferreira A, Almeida ACA, Takayama C, *et al.* Anti-inflammatory and analgesic potential of hydrolyzed extract of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., Asparagaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010;20(3):376-81.
42. Lon HK, Liu D, Jusko WJ. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012; 40(4):295-312.
43. Nabb MT, Kimber L, Haines A, McCourt C. Does regular massage from late pregnancy to birth decrease maternal pain perception during labour and birth?-- A feasibility study to investigate a programme of massage, controlled breathing and visualization, from 36 weeks of pregnancy until birth. *Complement Ther Clin Pract*. 2006;12(3):222-31.
44. Silva P. Farmacologia. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
45. Carvalho WA, Lemônica L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 1998;48(2): 137-58.
46. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*. 2000;127(2):117-26.
47. Diosa-Toro MA, Jaimes BFA, Rugeles LMT, Velilla HPA. [Cells with immunoregulatory properties and their impact in the pathogenesis of sepsis]. *Rev Chilena Infectol*. 2011;28(6): 572-78.
48. Stimpel M, Proksch A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infect Immun*. 1984;46(3):845-49.
49. Gomez-Mejiba SE, Ramirez DC. Comment on: Kim *et al.* Deficiency for costimulatory receptor 4-1BB protects against obesity-induced inflammation and metabolic disorders. *Diabetes*. 2011;60(1):3159-68.
50. Giraldo B, Hernández MM, Ângulo P, Fuertes C. Actividad antinitrosativa y antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *Uncaria tomentosa* Willd. D.C. (Uña de gato). *Rev Soc Quím Perú*. 2003;69(4):229-42.
51. Buerke U, Pruefer D, Carter JM, Russ M, Schlitt A, Prondzinsky R, *et al.* Sodium/hydrogen exchange inhibition with cariporide reduces leukocyte adhesion via P-selectin suppression during inflammation. *Br J Pharmacol*. 2008;153(8):1678-85.
52. Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

53. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, *et al.* L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. 2007;21(2):325-32.
54. Santos EN, Lima JCS, Noldin VF, Cechinel-Filho V, Rao VSN, Lima EF. Anti-inflammatory, antinociceptive, and antipyretic effects of methanol extract of *Cariniana rubra* stem bark in animal models. *An Acad Bras Cienc.* 2011;83(2):557-66.
55. Golechha M, Sarangal V, Ojha S, Bhatia J, Arya DS. Anti-Inflammatory effect of *emblica officinalis* in rodent models of acute and chronic inflammation: involvement of possible mechanisms. *Int J Inflamm.* 2014;(2014): 1-6.
56. Shrivastava P, Vaibhav K, Tabassum R, Khan A, Ishrat T, Khan MM, *et al.* Anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of Piperine on 6-OHDA induced Parkinson's rat model. *J Nutr Biochem.* 2013;24(4):680-87.
57. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia.* 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
58. Koneman EW. *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido.* 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabaran, 2001.
59. Barber M. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strains. *Br Med J.* 1947;2(4534):863-65.
60. Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. *British Medical Journal.* 1961; 1(5219):124-25.
61. Jeong DH, Kim KB, Kim MJ, Kang BK, Ahn DH, Anti-inflammatory activity of methanol extract and n-hexane fraction *mojabanchromanol b* from *Myagropsis myagroides*. *Life Sci.* 2014; 114(1):12-19.
62. Fluegge K, Adams B, Volksbeck UL, Serr A, Henneke P, Berner R. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a South Western region of Germany. *European journal of pediatrics.* 2006;165(10):688-90.
63. Tavares W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos* 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
64. Negi BS, Dave BP, Agarwal YK. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bauhinia purpurea* Leaves Under In Vitro Conditions. *Indian J Microbiol.* 2012;52(3)360-65.
65. Chanda S, Rakholiya K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.* 2011;1(13):520-29.

66. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(2):197-201.
67. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard Eighth edition. 2009; 29(2):1-68.
68. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications inn foods- a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3);223-53.
69. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Food Microbiol*. 1998;26(2):118-22.
70. Menegotto FR, Picoli SU. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. *Ver Bras Anal Clin*. 2007;39(2);147-50.
71. Kanafani ZA, Fowler Jr VG. Infecciones por *Staphylococcus aureus*: nuevos retos para um viejo patogeno. *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica*.2006;24(3):182-93.
72. Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, *et al.* A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*. 2000;122(4):1119-27.
73. Marra AR, Bar K, Bearman GM, Wenzel RP, Edmond MB. Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial blood of infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of infection*. 2006;53(1): 30-35.
74. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. 9, 591-596.
75. Silva ER, Diedrich D, Bolzan RC, Giacomelli SR. Toxicological and pharmacological evaluation of *Discaria Americana* Gillies & Hook (Rhamnaceae) in mice. *Braz J Phar Sci*. 2012;48(2):273-80.
76. Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. *Current Opinion in Immunology*. 2006 18(1):465-72.
77. Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR. Isolation, characterization, end U(VI)-reducing potencial of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate and U(VI)- contaminated surface sediment and description of *Salmonellasubterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(5):2959-65.
78. Bhunia AK. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. Springer: 2008.

79. Pereira CS, Medeiros LM, Costa RG, Festivo ML, Reis EMF, Seki LM, *et al.* Phage typing and multidrug resistance profile in *S. Typhimurium* isolated from different sources in Brazil from 1999 to 2004. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007;38(2):385-90.
80. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília:ANVISA, 2010.
81. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Brasília: ANVISA, 2004.
82. OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425, in: OECD (Ed.), Acute Oral Toxicity-Up-and-down-procedure (UDP), Paris, 2008b.
83. Ha H, Lee JK, Lee HY, Koh WS, Seo CS, Lee MY, *et al.* Safety evaluation of *Yukmijihwang-tang*: Assessment of acute and subchronic toxicity in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011(1):1-8.
84. Rhiouani H, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2008;118(3):378-86.
85. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n.10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília: ANVISA, 2010.
86. Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. Genética Toxicológica. Rio Grande do Sul: Editora Alcance, 2003.
87. Gardner EJ. Principles of Genetics. 5.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1977.
88. Queiroz FM, Matias KWO, Cunha MMF, Schwarz A. Evaluation of (anti)genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow. *Braz J Pharm Sci*. 2013;49(1):135-48.
89. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Mutagênese ambiental. 1. ed. Rio Grande do Sul: ULBRA Editora, 2003.
90. Hartmann A, Speit G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat Res*. 1995;246(1):49-56.
91. Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. Alkaline single-cell electrophoresis (comet assay) to environmental *in vivo* biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*. 2000;23(1):241-45.

92. Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research*. 1998;415(3):165-84.
93. Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*. 1997;375(2):183-93.
94. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.
95. Speit G, Hartmann A. *DNA Repair Protocols, Methods in Molecular Biology, The comet assay (single-cell gel test)*, 1999.
96. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*. 1995;336(1):69-77.
97. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora Ulbra, 2003.
98. Hayashi M, Sofuni T, Ishidate Jr M. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res*. 1983;120(1):241-47.
99. Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Blakey DH, Dertinger SD, Abramsson-Zetterberg L, *et al.* *In vivo* Micronucleus Assay Working Group, *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutat Res*. 2007;627(1):10-30.
100. Hayashi M, Sofuni T, Morita T. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat Res*. 1991;252(3):281-87.
101. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Guidelines for Testing of Chemical*. OECD: Paris, 1997.
102. Heddle JA. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1973;18(2):187-90.
103. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*. 1975;31(1):9-15.

**5 ARTIGO****Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves**

Débora Regina Hoff Brait<sup>1</sup>, Fábio Juliano Negrão<sup>1</sup>, Jonas da Silva Mota<sup>2</sup>, Claudia Andrea Lima Cardoso<sup>2</sup>, Jucicléia da Silva Arrigo<sup>1</sup>, Flávio Henrique Souza de Araújo<sup>3</sup>, Juliana Miron Vani<sup>3</sup>, Luciana Noia Borges de Carvalho<sup>1</sup>, Márcia Soares Mattos Vaz<sup>1</sup>, Rodrigo Juliano Oliveira<sup>3</sup>, Cândida Aparecida Leite Kassuya<sup>1</sup>, Arielle Cristina Arena<sup>1,4\*</sup>.

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

<sup>2</sup>Mato Grosso do Sul State University (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil.

<sup>3</sup>Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil

<sup>4</sup>Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP – Univ. Estadual Paulista - Botucatu, São Paulo State, Brazil.

\*Corresponding author.

Arielle Cristina Arena

Address: Department of Morphology, Institute of Biosciences,

São Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubião Junior, s/n, Caixa Postal – 510;

CEP: 18618970; Botucatu – SP.

Tel: + 55 14 38800495

E-mail address: [ariellearena@ibb.unesp.br](mailto:ariellearena@ibb.unesp.br) (A. C. Arena)

**Short Title:** Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of *Piper vicosanum*

## ABSTRACT

*Piper vicosanum* (Piperaceae) is a species traditionally used in folk medicine for the treatment of various diseases such as pain, fever and inflammation. However, there is little scientific evidence of these effects. This study assessed the anti-inflammatory effects of the essential oil from *P. vicosanum* leaves (OPV) and determined the toxicological potential of this oil through acute toxicity, genotoxicity and mutagenicity tests. The acute toxicity of OPV was evaluated by oral administration to female rats as single dose of 2000 mg/kg/body weight. General behavior and toxic symptoms were observed for 14 days. To evaluate the genotoxic and mutagenic potential, female mice were divided into five groups: group I: negative control; group II: positive control; group III: 500 mg/kg of OPV; group IV: 1000 mg/kg of OPV; group V: 2000 mg/kg of OPV. Peripheral blood was collected for the comet assay and the micronucleus test. The anti-inflammatory activity of essential oil was evaluated in carrageenan-induced pleurisy and paw edema in rats. No signs of acute toxicity were observed, indicating that the LD<sub>50</sub> of this oil is greater than 2000 mg/kg. The comet assay data demonstrated that OPV did not increase the frequency or rate of DNA damage in groups treated with any of the doses assessed compared to that in the negative control group. In the micronucleus test, the animals treated did not exhibit any cytotoxic or mutagenic changes in peripheral blood erythrocytes. OPV (100 and 300 mg/kg) significantly reduced edema formation and inhibited leukocyte migration analyzed in carrageenan induced oedema and pleurisy. The present study shows that essential oil of *P. Vicosanum* leaves has anti-inflammatory potential without causing acute toxicity or genotoxicity.

**Keywords:** Essential oil, Piperaceae, *Piper vicosanum*, acute toxicity, genotoxicity, inflammation

## 1 INTRODUCTION

There is considerable interest in identifying new therapeutic agents obtained from plants used in popular medicine. One of the reasons of this interest is that drugs currently available have a number of adverse effects and new strategies are needed to improve treatment [1].

The genus *Piper* (Piperaceae family) comprises about 700 species distributed in the tropical and subtropical regions. *Piper* species have been widely used in folk medicine for the treatment of various diseases such as pain, fever and inflammation, and in the preparation of ceremonial drinks [2,3]. Phytochemical analyses of this genus have demonstrated the occurrence of alkaloids, amides, propenylphenols, lignans, neolignans, steroids, pyrones, chalcones, dihydrochalcones, flavones and terpenoids [3,4].

Although little information is available in the literature on the therapeutic or toxic effects of this plant, studies have shown that extracts obtained from some species of Piper, such as *P. amalago*, *P. Nigrum*, *P.cubeba*, *P. abbreviatum*, *P. erecticaule*, *P. lanatum* present therapeutic properties, such as anti-inflammatory and antimicrobial activities, hepatoprotective effects, among others [5-7]. The especially well-studied species regarding their therapeutic activities, the fruits of *P. Nigrum* L., possesses potent analgesic and anti-inflammatory activities, at doses of 10 and 15 mg/kg and these activities were attributed to piperine, its major alkaloid constituent [7].

*P. vicosanum* Yuncker is a shrub that occurs in the Brazilian Atlantic Forest. The study carried out by Mesquita *et al.* [8], revealed that this species possesses volatile oils with valuable biological activities, such as limonene (45.5%),  $\alpha$ -pinene (6.1%), piperitone (3.4%), E-caryophyllene (1.4%), a-selinene (3.2%), d-cadinene (2.2%), spathulenol (0.3%), caryophylleneoxide (0.4%), b-pinene (0.2%) and linalool and germacrene D traces, demonstrating the need for further studies about this species [8]. Thus, due to the lack of studies in the literature using the Piper species, this study evaluated the anti-inflammatory effects of the essential oil extracted from *P. vicosanum* leaves (OPV) and determined the toxicological potential of this oil through acute toxicity, genotoxicity and mutagenicity tests.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plant Material, Preparation and Isolation of Essential Oil

*Piper vicosanum* leaves (5 kg) were collected (latitude 22°12'37", 7 "south and longitude 54°55'03", 2" west) in August 2014. A voucher specimen was identified by Dr. Elsie Franklin Guimarães and deposited (register: 4412) in the DDMS herbarium of the Federal University of Grande Dourados (UFGD).

The OPV were obtained by hydrodistillation, using Clevenger type apparatus for 4 h. At the end of each hydrodistillation, the oils were collected, dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and transferred to glass vials.

The analyses were performed employing a gas chromatograph (GC-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan), mass spectrometer detector (GC-MS 2010 Ultra) using a fused silica capillary column DB-5 (60 m length x 0.25 mm internal diameter x 0.25 mm thick film). The temperatures of the injector, detector and the transfer line were 250, 280 and



300 °C, respectively. The analysis conditions were: injection volume of 1 µL, 1:20 split injection, heating ramp of 50 °C initial temperature reached 280 °C at 3°C min<sup>-1</sup> and remained in the final temperature for 10 minutes. The mass spectrometer scan parameters included electron impact ionization voltage of 70 eV, the mass range of 45-650 m/z with 0.5s sweep range. The identification was carried out using the calculated retention indexes using the same mixture of linear alkane (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>) as external reference [9] associated index reported in the literature [10] and analysis of the mass spectra of the samples compared to the databases (NIST21 and WILEY229).

## 2.2 Animals

Adult male Wistar rats (90 days old, weighing approximately 340 g, n = 45) and females (60 days old, weighing approximately 300g, n=9) were used in the acute toxicity and inflammation study. Female Swiss mice (60 days old, weighing approximately 30g, n=50) were used in genotoxicity and mutagenicity studies. All animals used in the experiments were provided by the UFGD. The animals were maintained under controlled temperature (23°C), with a constant 12 h light-dark cycle and free access to food and water. The experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation at the UFGD (Protocol number 024/2014).

## 2.3 Acute Oral Toxicity

Acute toxicity studies were carried out using the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) - Guidelines 425 and ANVISA guidelines (Brazilian Health Surveillance Agency) [11, 12].

OPV was administered by gavage, at a dose of 2000 mg/kg, to one female rat after 8 h of fasting. Sequentially, at intervals of 48 h, the same dose was administered to four female rats, totaling five treated animals. Under the same conditions, five females were treated with vehicle (saline) in order to establish a comparative negative control group [13].

The animals were observed periodically during the first 24 h after administering the essential oil and then once a day for 14 days. The five parameters of the Hippocratic screening [14] were analyzed: conscious state (general activity); activity and coordination of motor system and muscle toning (response to tail touch and grip, straightening, strength

to grab); reflexes (corneal and headset); activities on the central nervous system (tremors, convulsions, straub, sedation, anesthesia and ataxia) and activities on the autonomic nervous system (lacrimation, cyanosis, ptosis, salivation and piloerection). The water and feed consumption and body weight were also recorded daily [13].

At the end of the observation period, all animals were anesthetized (Ketamine and xylazine, 25 and 10 mg/kg, respectively), afterwards euthanasia was performed with decapitation and organs (heart, lung, spleen, liver, kidney) were removed, weighed and examined macroscopically.

#### **2.4 Comet assay and Micronucleus Test With Peripheral Blood**

Animals were divided into five groups (n=10/group). Three groups received OPV, at doses of 500 (group III), 1000 (group IV), or 2000 (group V) mg/kg body weight by oral route (gavage) [15]. The negative control animals (group I) were exposed to sunflower oil (vehicle), by gavage and to saline (0.1 mL/10 g body weight, i.p). The positive control animals (group II) were treated intraperitoneally with cyclophosphamide (Fosfaseron, Filaxis) at a dose of 100 mg/kg [16]. The OPV dosages were based on our determination of the LD50, which was higher than 2000 mg/kg. The treatment was performed once, and OPV was dissolved in sunflower oil and cyclophosphamide was dissolved in saline before administration. Cyclophosphamide was used to induce DNA damage, which has already demonstrated *in vivo* and *in vitro* genotoxicity activity in mouse bone marrow cells and peripheral blood [17].

For the Comet assay, 24 h after treatment with OPV, 20  $\mu$ L of blood was collected from each animal of each group. Slides were pre-coated with 5% agarose, and 20  $\mu$ L of blood of each individual with 120  $\mu$ L of agarose LPM (1.5%) at 37 °C were placed on the slide.

The coverslips were removed and the slides immersed in freshly prepared lysis solution with 89 mL of lysis stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10 adjusted with NaOH, 89 mL of distilled water and 1% of sodium lauroylsarcosine), 1 mL of Triton X – 100 and 10 mL of DMSO, for 1 h at 4 °C in the dark. The slides were placed on an electrophoresis chamber filled with buffer pH > 13 (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, prepared with a stock solution of 10 N NaOH and EDTA 200 mM, pH 10) at 4 °C for 20 min for DNA denaturation. Electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA (1.25 V/cm). The slides were then neutralized with buffer pH 7.5 (0.4 M Tris–

HCl) for three 5-min cycles, air dried, fixed with 100% ethanol for 10 min. The slides were stained with 100  $\mu$ L of ethidium bromide (20  $\mu$ g/mL) and covered with a coverslip. The material was examined with a fluorescence microscope, equipped with an excitation filter of 515-560 nm and a barrier filter of 520 nm at 40 X magnification.

Each slide was identified and analyzed in a blind test. The cells (200 per animal; 100 for each time-point) were analyzed randomly. The comet findings were classified as follows: class 0 (no damage); class 1 (comet tail shorter than the diameter of the nucleoid); class 2 (comet tail once or twice the diameter of the nucleoid); and class 3 (comet tail more than twice the size of the nucleoid). Comets with a turbid aspect or a head that was too small were excluded from the analyses, as they could represent dead cells [18]. A total damage score was determined by multiplying the number of cells assigned to each class of damage by the numeric value of the class and summing all resulting values.

The micronucleus test with peripheral blood was conducted according to Hayashi *et al.* (1990) [19]. Blood was collected from the tail of animals from all groups at 24, 48, and 72 h after treatment. Slides were previously prepared with 20  $\mu$ L of acridine orange, and 20  $\mu$ L of peripheral blood was added in the center of the prepared slides. Slides were slip covered and stored in a freezer. The slides were examined using blue light fluorescence microscope (488 nm), an orange barrier filter, and magnification of 100X. Two thousand cells per animal (two slides per animal/ treatment) were examined and micronucleated cells was counted. The micronuclei frequency was examined at 24 h, 48 h, and 72 h after treatment.

## **2.5 Carrageenan-induced Rat Pleurisy**

Different groups of rats were orally treated with OPV (100 and 300 mg/kg) or vehicle (0.9% saline – control group). The positive control group received a dose of 1 mg/kg of dexamethasone subcutaneously. Pleurisy was induced in experimental groups by intrapleural injection of 100  $\mu$ L of 1% carrageenan diluted in saline, as previously described [20]. The naive group received 100  $\mu$ L of sterile saline by intrapleural injection. After 4 h, the animals were euthanized and the pleural cavity was rinsed with 1 mL phosphate buffer-saline (PBS). An aliquot of 20  $\mu$ L of lavage (exudate) was collected from the pleural cavity, and diluted with Turck (1:20) and used for total leukocyte count in a Neubauer chamber [20, 21].

## 2.6 Carrageenan-induced Rat Paw Edema

Different groups of rats were orally treated with OPV (100 and 300 mg/kg) or vehicle. Another group was treated subcutaneously with dexamethasone (1 mg/kg). After 1 h, the animals received a solution of 50  $\mu$ L carrageenan injection (300  $\mu$ g/paw) in one of the hind paws. The other paw received the same volume of sterile 0.9% saline. A plethysmometer was used to measure the thickness of the paw edema, before the treatment and at 1; 2; 3 and 4 h after the carrageenan. Results were expressed as  $\mu$ m and the difference between basal and post-injection values were quantified as edema [21, 22].

## 2.7 Statistical Analyses

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Difference among groups was evaluated by analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test. Statistical differences were considered to be significant at  $p < 0.05$ . Graphs were performed using GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A).

## 3 RESULTS

The gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) analysis identified 60 compounds in the OPV. Most of the compounds were  $\gamma$ -Elemene (14.16 %),  $\alpha$ -Alaskene (13.44%) and Limonene (9.10%) (Table 1).

It was observed that after the acute toxicity test OPV did not cause death or signs of toxicity either immediately after or during the post-treatment period. In addition, water and food consumption did not differ between experimental groups (data not shown). There was no statistical difference for body weight and for the relative weight of the organs between groups (Table 2).

Table 3 presents the overall frequency of damaged cells, the division between the classes of damage and score  $\pm$  SEM for the comet assay. These results showed that the groups treated with different doses of OPV did not exhibit increase in the frequency of genotoxic damage, when compared with the negative control group. Conversely, these parameters were significantly different to those observed in the positive control group.

With regards to the micronuclei frequency (Table 4), the results indicated that groups treated with OPV exhibited similar averages (at all time-points) to those observed in the negative control group, and that these differed from those observed in the positive

control group. This showed that exposure to OPV did not alter the number of micronucleated polychromatic erythrocytes.

One hour after the carrageenan-induced inflammation, the control group continued to show edema, whereas the groups treated with OPV at doses of 100 and 300 mg/kg showed a significant decrease in edema compared to the group control (Figure 1A) with inhibitions of  $78 \pm 2 \%$  and  $75 \pm 3 \%$  at 2 h and  $80 \pm 2 \%$  and  $86 \pm 3 \%$  after 4 h, respectively. For positive control the inhibitions was  $93 \pm 7 \%$  at 2 h and  $85 \pm 5 \%$  after 4 h. This reduction continued after the second, third and fourth hour of observation (Figures 1B, 1C and 1D). Additionally, the oral administration of OPV significantly inhibited the leukocyte migration at all doses tested (100 and 300 mg/kg), with inhibitions of  $70 \pm 3 \%$  and  $85 \pm 2 \%$ , respectively, and higher inhibition at a dose of 300 mg/kg (Figure 2). For the positive control the inhibition was  $91 \pm 2 \%$ .

## DISCUSSION

Species belonging to the Piperaceae family are well known due to their therapeutic properties in folk medicine [23], however, evidenced-based information is limited. To our knowledge, the present study may represent the first research that demonstrates the anti-inflammatory activity of the essential oil of *Piper vicosanum* leaves without causing toxic effects.

In this study, the results indicate that acute administration of OPV has low oral toxicity in rats, since no mortality or clinical signs were observed, which are characteristic of intoxication after administration of 2000 mg/kg. Thus, it is suggested that the oral lethal dose ( $LD_{50}$ ) of OPV is  $> 2000$  mg/kg, and can be classified as a low-toxicity oil according to OECD [13]. Similar results were found by Rodrigues *et al.* and da Silva *et al.* [24, 25], that after the acute toxicity analysis of other species of Piper (*P. ovatum* and *P. umbellatum*) did not observe toxicity signs at doses of 5000 mg/kg or 2000 mg/kg, respectively [24, 26].

Despite the therapeutic properties, several medicinal plants have genotoxic or mutagenic effects [27, 28], demonstrating the need to assess the genotoxic potential of herbal preparations [29]. In the present study, the genotoxic effects of OPV were evaluated using the comet assay, which detects DNA damage produced by chemical and physical

agents [30]. The OPV treatment did not increase the incidence of comets in all doses tested, indicating lack of genotoxicity of this oil.

In addition, the mutagenic effects of OPV were evaluated using the micronucleus test in peripheral blood, where changes in DNA and/or damage to the spindle can be detected [31]. Moreover, in the present study OPV did not exhibit any mutagenic effects 24, 48 or 72 h after oral administration to mice.

The carrageenan-induced paw edema is a widely used method to evaluate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Anti-inflammatory drugs initially inhibit the cyclooxygenase enzyme, which is involved in prostaglandin synthesis [7]. Some species of the Piper genus have been tested for their anti-inflammatory activity, showing satisfactory results [7, 32]. The *P. Nigrum* species presented anti-inflammatory activity through the paw edema method and this effect was attributed to presence of piperine [7]. In our study, reduced carrageenan-induced paw edema was observed in both doses tested, in which after 2, 3 and 4 h of induction, this reduction was dose-dependent.

The anti-inflammatory activity of OPV also was evaluated using the carrageenan-induced pleurisy model, which can confirm the results obtained by the paw edema test [33, 34]. This is a classical test to assess this type of inflammation, forming an exudate in the pleural cavity characterized by infiltration of polymorphonuclear leukocytes, and the release of various chemical mediators important in the inflammatory process [35].

Anti-inflammatory drugs such as dexamethasone and indomethacin inhibit leukocyte migration between 3 and 6 hours after carrageenan administration. Studies performed with the oil of *P. aleyreanum* (1-100 mg/kg, p.o.) in rodents have shown that this oil decreased the total leukocytes count, neutrophils and mononuclear cells, through pleurisy tests, demonstrating the therapeutic potential of this plant [36]. Similarly, *P. marginatum* extract (0.5 and 1 g/kg) reduced the paw edema in rats by 80 to 90% in relation to the control group, but had a minor effect on the exudate volume and leukocytes migration in carrageenan-induced pleurisy [28]. However, in another study, Rodrigues Silva *et al.* [24], found no anti-inflammatory activity in the hydroethanolic extract of *P. ovatum* leaves (500 mg/kg), since this did not reduce the pleural exudate volume [24].

In the present study, the treatment with OPV was able to significantly decrease the pleural exudate volume and the leukocyte recruitment in the pleural cavity at the two doses tested, and this effect was dose-dependent. These results, together with the paw edema test, reinforce the anti-inflammatory potential of this species.

Essential volatile oils, characteristic of most species of this genus, have also been object of several studies, revealing valuable biological activities and interesting compositions with monoterpenoids, sesquiterpenoids and seldom phenyl- and arylpropanoids [8]. According to Mesquita *et al.* [8], the composition of *P.vicosanum* leaves, was dominated by monoterpenoids, with limonene and 1.8-cineole as major compounds. These data corroborate the results obtained in this study, in which the predominance of monoterpenoids (Limonene) was identified in the OPV, in addition to sesquiterpenoids ( $\gamma$ -Elemene and  $\alpha$ -Alaskene). It has been shown that d-limonene has immunomodulatory activity and inhibits the proinflammatory activities of CD4 + and CD8 + T lymphocytes [37] and exhibits antimicrobial effects, while  $\beta$ -elemene has potent anti-proliferation effects on some types of cancer cells [38]. Thus, for these therapeutic properties, these compounds may be responsible for the effects found in this study.

The essential oil of *P. vicosanum* leaves showed anti-inflammatory activity which may be associated with the presence of most of the compounds identified in this study, such as Limonene,  $\gamma$ -Elemene and  $\alpha$ -Alaskene. Furthermore, OPV did not cause acute toxicity, genotoxicity or mutagenicity. More studies should be carried out to assess the exact mechanism of action responsible for the anti-inflammatory activity, as well as other aspects of toxicity.

### **Acknowledgements**

The authors thank CAPES for the financial assistance.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **REFERENCES**

1. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001; 39:603-13.
2. Mesquita JMO, Cavaleiro C, Cunha AP, Lombardi JA, Oliveira AB. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Rev bras farmacogn*. 2005;15(1):6-12.

3. Sengupta S, Ray AB. The chemistry of Piper species: a review. *Fitoterapia*. 1987;63(3):147-66.
4. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, *et al.* Phytochemistry of the genus Piper. Pergamon. 1997;46(4):597-673.
5. Vassallo A, De Tommasi N, Merfort I, Sanogo R, Severino L, Pelin M, *et al.* Steroids with anti-inflammatory activity from *Vernonia nigritiana* Oliv. & Hiern. *Phytochemistry*. 2013;96:288-98.
6. Salleh WM, Ahmad F, Yen KH, Sirat HM. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper officinarum* (Piperaceae). *Nat Prod Commun*. 2012;7:1659-62.
7. Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7S1:S461-8.
8. Mesquita JMO, Oliveira AB, Braga FC, Lombardi JA, Cunha AP, Salgueiro L, Cavaleiro, C. Essential oil Constituents of *Piper vicosanum* Yuncker from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Essential Oil Research*. 2006;18(4):392-5.
9. Van den Dool H, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr*. 1963;11: 463-71.
10. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. 2001.
11. OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 474, in: OECD (Ed.), Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Paris, 1997.
12. ANVISA, National Health Surveillance Agency, 2004. Resolution RE-90 Guide for conducting pre-clinical studies of herbal toxicity. disponível em <http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-9-34-2004-03-16-90>. Data de acesso: 01 de jun. de 2014.
13. OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425, in: OECD (Ed.), Acute Oral Toxicity-Up-and-down-procedure (UDP), Paris, 2008b.
14. Malone MH, Robichaud RC. A Hippocratic screen for purê or crude drug materials. *Llordya*. 1962;25: 320-32.
15. Hollenbach CB, Santos MF, Mello FPS, Osório LG, Schuch TL, Silva LM, *et al.* Avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em ratos *Wistar* por meio do teste de micronúcleos. *R. bras. Bioci*. 2014;12(2):66-71.



16. Navarro SD, Beatriz A, Meza A, Pesarini JR, Gomes RaS, Karaziack CB, *et al.* A new synthetic resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur J Med Chem.* 2014;75(1):132-42.
17. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.*1999;428(1):271-83.
18. Silva CJS, Santos JE, Takahashi CS. An evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of the anti-obesity drugs sibutramine and fenproporex. *Hum Exp Toxicol.*2010;29(1):187-97.
19. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 1990;245(1):245-49.
20. Kassuya CA, Cremonese A, Barros LF, Simas AS, Lapa FR, Mello-Silva R, *et al.* Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *J Ethnopharmacol.* 2009; 124(3): 369-76.
21. Santos JA, Arruda A, Silva MA, Cardoso CA, Vieira MoC, Kassuya CA, *et al.* Anti-inflammatory effects and acute toxicity of hydroethanolic extract of *Jacaranda decurrens* roots in adult male rats. *J Ethnopharmacol.* 2012;144:802-5.
22. Kassuya CA, Leite DF, de Melo LV, Rehder VL, Calixto JB. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. *Planta Med.* 2005;71(8): 721-6.
23. Alves EM, Mota JH, Soares TS, Vieira MC, Silva CB. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciênc. agrotec.* 2008; 32(2):651-8.
24. Rodrigues SD, Baroni S, Svidzinski AE, Bersani-Amado CA, Cortez DA. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). *J Ethnopharmacol.* 2008;116:569-73.
25. da Silva IF, de Oliveira RG, Mendes Soares I, da Costa Alvim T, Donizeti Ascêncio S, de Oliveira Martins DT. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. *J Ethnopharmacol.* 2014;151:137-43.
26. da Silva JK, Silva JR, Nascimento SB, da Luz SF, Meireles EN, Alves CN, *et al.* Antifungal Activity and Computational Study of Constituents from *Piper divaricatum* Essential Oil against *Fusarium* Infection in Black Pepper. *Molecules.* 2014;19:17926-42.

27. de Almeida PM, de Sousa Araújo S, Marin-Morales MA, Benko-Iseppon AM, Brasileiro-Vidal AC. Genotoxic potential of the latex from cotton-leaf physicnut (*Jatropha gossypifolia* L.). *Genet Mol Biol*. 2015;38(1):93-100.
28. Hong CE, Lyu SY. Genotoxicity detection of five medicinal in Nigeria. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2011;36(1):87-93.
29. Kelber O, Wegener T, Steinhoff B, Staiger C, Wiesner J, Knöss W, *et al*. Assessment of genotoxicity of herbal medicinal products: application of the "bracketing and matrixing" concept using the example of *Valerianae radix* (valerian root). *Phytomedicine*. 2014;21(1):1124-29.
30. Ribeiro, LR, Salvadori, DMFf, Marques, EK (org.) (2003) *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ed. da Ulbra,2003.
31. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000;455:81-95.
32. de Queiroz AC, Alves HS, Cavalcante-Silva LH, Dias TL, Santos MS, Melo GM, *et al*. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. *Nat Prod Res*. 2014;28:403-6.
33. Almeida AP, Bayer BM, Horakova Z, Beaven MA. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980; 214(1): 74-79.
34. Vinegar R, Truax JF, Selph JL. Some quantitative temporal characteristic of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)*. 1973; 143: 711-4.
35. de Oliveira ADL, Rodrigue FFG, Coutinho HDM, da Costa JGM, de Menezes IRA. Chemical Composition, Modulatory Bacterial Resistance and Antimicrobial Activity of Essential Oil the *Hyptis martiusii* Benth by Direct and Gaseous Contact. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2014; 9(3):e13521.
36. Lima DK, Ballico LJ, Rocha LF, Gonçalves HP, de Souza LM, Iacomini M, *et al*. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2012;142(1):274-82.
37. Lappas CM, Lappas NT. D-Limonene modulates T lymphocyte activity and viability. *Cell Immunol*. 2012;279(1):30-41.
38. Lu JJ, Dang YY, Huang M, Xu WS, Chen XP, Wang YT. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curcumae*--a review. *J Ethnopharmacol*. 2012;143(1):406-11.

**Table 1.**Composition of the essential oil of *P. vicosanum*.

Retention time (min)	Compound	RI <sub>a</sub>	RI <sub>b</sub>	%
7.675	$\alpha$ -Pinene	934	932	1.11
8.165	Camphene	948	946	0.04
9.225	$\beta$ -Pinene	979	974	1.74
11.033	Limonene	1026	1024	9.10
11.293	Sylvestrene	1032	1030	3.18
11.625	(E)- $\beta$ - Ocimene	1040	1044	1.22
24.815	Silphinene	1341	1345	0.58
25.349	$\alpha$ -Longipinene	1354	1350	0.53
26.144	Longicyclene	1372	1371	0.81
26.321	$\alpha$ -Copaene	1376	1374	0.26
26.607	2-epi- $\alpha$ -Funebrene	1383	1380	2.98
26.906	$\beta$ -Bourbonene	1390	1387	0.54
27.294	$\alpha$ -Chamipinene	1399	1396	3.35
27.893	Caryophyllene	1413	1417	2.51
28.724	$\gamma$ -Elemene	1434	1434	14.16
28.899	$\alpha$ -Guaiene	1438	1437	1.33
29.021	6,9-Guaiadiene	1441	1442	0.47
29.319	cis-Muurolo-3,5-diene	1448	1448	2.14
29.399	$\alpha$ -Himachalene	1450	1449	0.10
28.899	$\alpha$ -Guaiene	1438	1437	1.33
29.021	6,9-Guaiadiene	1441	1442	0.47
29.319	cis-Muurolo-3,5-diene	1448	1448	2.14
29.399	$\alpha$ -Himachalene	1450	1449	0.10
29.876	$\alpha$ -Acoradiene	1463	1464	1.85
30.141	$\beta$ -Acoradiene	1268	1469	1.03
31.055	cis- $\beta$ -Guaiene	1491	1492	0.84
31.233	cis-Cadine-1,4-diene	1495	1495	1.94
31.362	$\alpha$ -Selineno	1498	1498	1.50
31.870	$\alpha$ -Alaskene	1511	1512	13.44

32.129	GAMA-cadineno	1518	1513	1.73
32.432	Delta-cadineno	1524	1522	2.10
32.825	$\alpha$ -Cadinene	1536	1537	4.12
33.052	Cuprenene – gama	1542	1542	0.23
33.233	Hedycaryol	1546	1546	0.28
33.444	$\beta$ - vetivenene	1553	1554	0.25
34.038	Palustrol	1567	1567	1.18
34.357	Spathulenol	1575	1577	2.90
34.961	CaryophylleneOxide	1586	1582	1.51
35.164	Viridiflorol	1596	1592	1.66
35.431	Ledol	1603	1602	1.19
36.357	1-epi-Cubenol	1628	1627	0.14
36.490	Eudesmol-gama	1631	1630	0.31
36.696	cis-Cadin-4-en-7-ol	1636	1935	0.14
36.842	epi- $\alpha$ -Muurolol	1641	1640	1.74
37.272	$\alpha$ -Cadinol	1653	1652	0.43
37.413	Valerionol	1656	1656	0.69
37.583	Allohimachalol	1661	1661	2.13
37.803	Intermedol	1666	1665	0.40
38.321	5-neo-Cedranol	1682	1684	0.11
38.854	Z-Apritone	1690	1689	0.17
39.376	1,4-hydroxy-4,5-dihydro-Caryophyllene	1710	1706	0.53
42.448	(Z)- $\alpha$ -trans-Bergamotolacetate	1798	1794	0.19
42.913	Vetivenicacid	1812	1811	0.38
43.607	Cyclopentadecanolide	1832	1832	0.36
43.844	Eudesm-7(11)-en-4-olacetate	1839	1839	0.61
44.246	o-methyl $\beta$ -Pipitzol	1851	1853	0.21
44.752	(E)- $\beta$ - Santalolacetate	1866	1867	0.15

46.022	Evodione	1904	1904	0.35
46.614	Totarene	1922	1922	0.33
47.514	Columellarin	1951	1952	0.36
48.409	Bifloratriene	1979	1977	0.31
50.124	(Z)-Falcarinol	2034	2035	0.14
51.231	(Z)- Isoeugenylbenzylether	2071	2072	0.67
53.529	Abienol	2148	2149	1.21

RI, retention index.

**Table 2.** Body weight gain and relative organ weight (g/100g of body weight) of females treated orally with *P.vicosanum* (OPV) in the acute toxicity study.

Parameter	Control	2000mg/kg OPV
Initial weight (g)	204.75 ± 3.38	207.25 ± 5.78
Final weight (g)	227.87 ± 3.59	228.47 ± 5.69
Body weight gain (%)	23.12	21.22
Liver (g)	4.76 ± 0.55	4.92 ± 0.73
Lung (g)	0.55 ± 0.12	0.71 ± 0.17
Kidney (g)	0.41 ± 0.13	0.43 ± 0.12
Heart (g)	0.47 ± 0.08	0.47 ± 0.02
Spleen (g)	0.20 ± 0.06	0.21 ± 0.11

Values expressed as mean ±SEM, n=5 animals/ group. p> 0,05 by ANOVA.

**Table 3.** Frequency of damage, by the comet assay in mice treated orally with *P.vicosanum* (OPV)

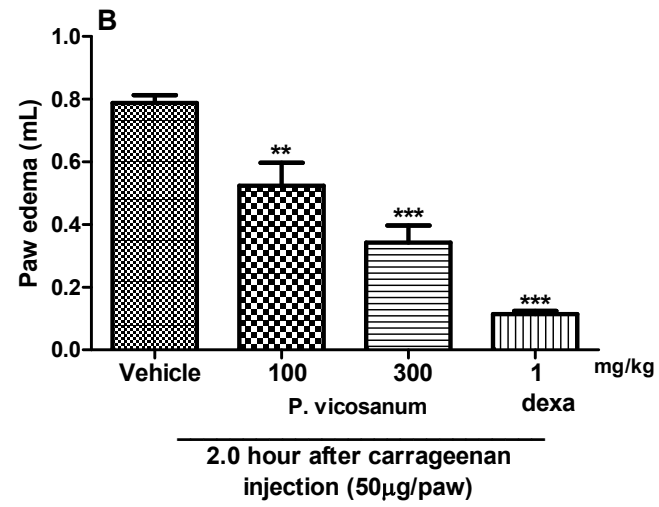
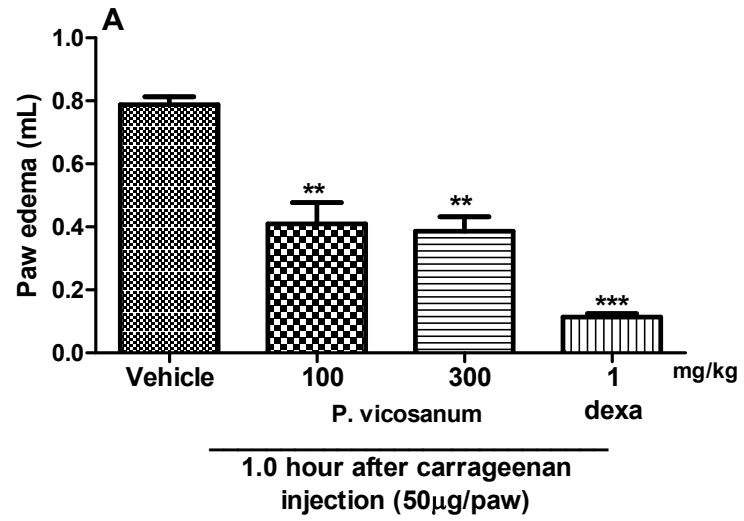
Groups	Damaged Cells	Classes of Damage				Score
		0	1	2	3	
<b>Negative Control</b>	16.70±1.22 <sup>a</sup>	83.30±1.22	11.60±1.76	5.10±1.29	0.00±0.00	21.90±1.80 <sup>a</sup>
<b>Positive Control</b>	84.50 ±1.32 <sup>b</sup>	15.50±1.32	42.20±2.92	35.30±3.22	7.00±0.79	133.80±3.75 <sup>b</sup>
<b>500 mg/kg OPV</b>	15.20±1.52 <sup>a</sup>	84.80±1.52	8.90±0.72	5.60±1.24	0.70±0.33	22.20±2.56 <sup>a</sup>
<b>1000mg/kg OPV</b>	17.20±2.52 <sup>a</sup>	82.80±2.52	9.80±1.70	5.60±1.79	1.80±0.74	26.40±4.71 <sup>a</sup>
<b>2000mg/kg OPV</b>	18.30±2.06 <sup>a</sup>	81.70±2.06	13.40±1.62	3.80±0.87	1.10±0.52	24.30±3.10 <sup>a</sup>

Data presented as mean±SEM. Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ; ANOVA/Tukey). Class 0 – no damage; class 1 – tail of comet shorter than the diameter of nucleoid; class 2 – tail of comet once or twice the diameter of nucleoid; class 3 – tail of comet more than twice the diameter of nucleoid.

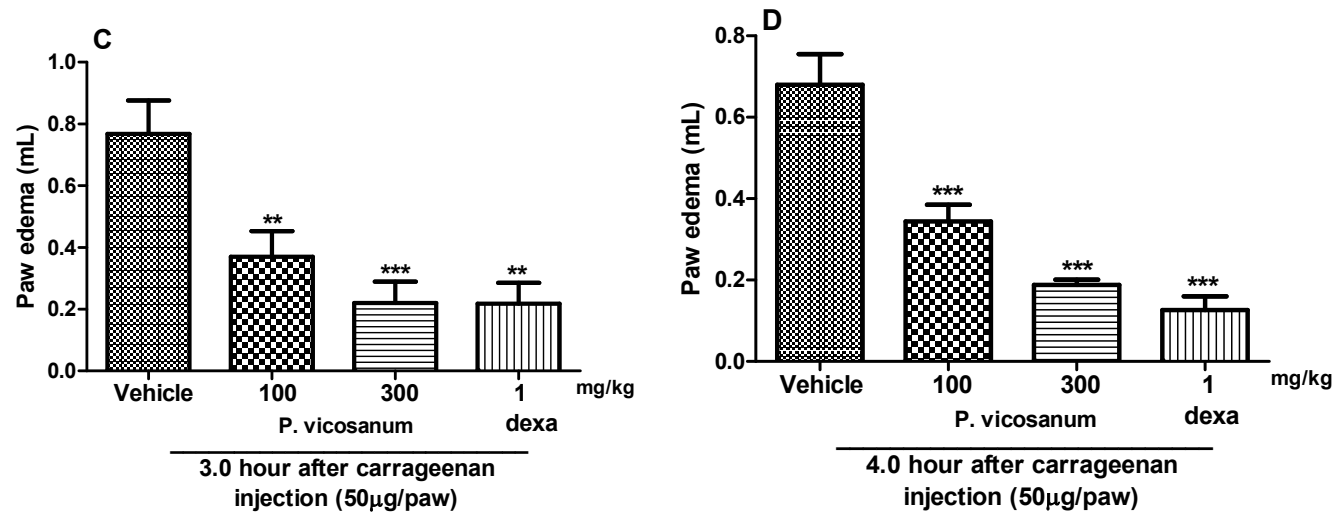
**Table 4.** Frequency of micronuclei in mice treated orally with *P.vicosanum* (OPV).

Groups	Time (h)		
	24	48	72
Negative Control	5.20±0.47 <sup>a</sup>	5.5±0.34 <sup>a</sup>	5.1±0.61 <sup>a</sup>
Positive Control	35.20±0.60 <sup>b</sup>	27.9±0.69 <sup>b</sup>	27.4±0.79 <sup>b</sup>
500 mg/kg OPV	7.10±0.58 <sup>a</sup>	7.0±0.85 <sup>a</sup>	5.6±0.54 <sup>a</sup>
1000 mg/kg OPV	7.70±0.79 <sup>a</sup>	6.7±0.63 <sup>a</sup>	5.8±0.44 <sup>a</sup>
2000 mg/kg OPV	8.00±0.85 <sup>a</sup>	6.5±0.62 <sup>a</sup>	5.3±0.50 <sup>a</sup>

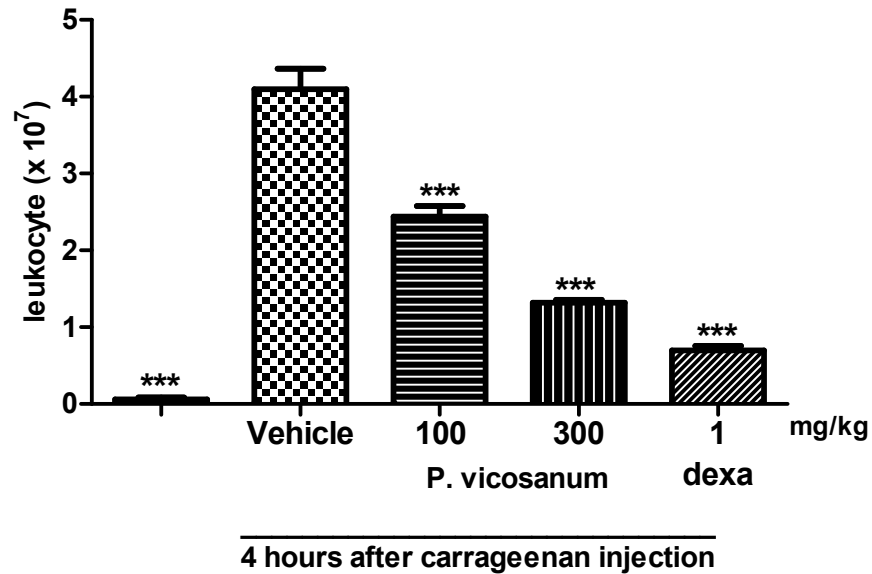
Data presented as mean±SEM. Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ; ANOVA/Tukey).







**Figure 1.** Effect of oral administration of OPV on carrageenan-induced paw o edema in rats. Animals received OPV (100 or 300 mg/kg, p.o.) or control (vehicle) or dexamethasone (DEXA, 1 mg/kg, s.c.) and after 1 h an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw). Graphics (A), (B), (C), and (D) represent the evaluation of paw oedema after 1, 2, 3 and 4 h, respectively, after carrageenan injection. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 5 animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  when compared with the control group. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.



**Figure 2.** Effect of oral administration of OPV on the inhibition of the leukocyte migration at both doses tested on pleurisy test. Rats were treated one hour before an intrapleural injection of carrageenan, with OPV (100 or 300 mg/kg, p.o.), dexamethasone (DEXA, 1 mg/kg, s.c.), or saline solution (Vehicle). Naive group (#), also treated with saline p.o., received an intrapleural injection of sterile saline. The bars express the mean  $\pm$  SEM of 5 animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  when compared to group treated with vehicle. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

## ANEXOS

Os resultados descritos abaixo não foram incluídos no manuscrito. No entanto, as análises foram realizadas durante a execução do projeto de pesquisa que originou esta dissertação.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Foram testadas algumas cepas padrões ATCC, mantidas no Laboratório de Pesquisa de Ciências da Saúde (LPCS) da Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD, congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , sendo estes microrganismos: *Candida albicans* ATCC 90028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella sp.* ATCC 13076. As cepas foram reativadas em caldo BHI (Brain heart infusion) por 24h em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a reativação, a cultura foi semeada em Agar Müller Hinton (MH) (HIMEDIA Laboratories Pvt.Ltd.) para cada ATCC, ficando em estufa por mais 24h, a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Após esse procedimento, obteve-se a cultura pura de cada ATCC na qual se utilizou para fazer a suspensão bacteriana, que foi preparada a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) (Cefor Diagnóstica Ltda). Esta suspensão foi diluída e chegou-se a uma concentração final de  $10 \times 10^5$  UFC/mL. A 0,004g do óleo essencial, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de Tween 20 para solubilizar e 900  $\mu\text{L}$  de caldo MH estéril para a obtenção de uma solução estoque com concentração de 4000  $\mu\text{g/mL}$  do óleo essencial das folhas de *P. vicosanum*. Para os ensaios antimicrobianos, o óleo essencial foi utilizado nas seguintes concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , para obter a concentração correspondente ao CIM dos óleos essenciais.

Os testes foram realizados em caldo Müller Hinton contidos em placa de fundo “U” de 96 poços estéreis. Nos ensaios de microdiluição, foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de cada concentração: 1000, 500, 250, 125 até 7,8  $\mu\text{L/mL}$  do óleo de *P. vicosanum* contidas em caldo MH, e em seguida, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de inoculo bacteriano a  $1 \times 10^4$  UFC/mL em cada poço da microplaca. A microplaca foi incubada a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Para o controle positivo de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella sp.* foi utilizado tetraciclina. Fluconazol foi o antifúngico escolhido para controle da *C. albicans* e o Meropenem, como controle da *P.*

*aeruginosa*. Controle do solvente tween 20, controle negativo (contendo somente meio de cultura) e controle positivo testando a suspensão bacteriana. Após 24 h das microplacas em incubação, utilizou-se 20 µL de um marcador chamado rezasurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) (Sigma) 0,01%, que foi adicionado em cada poço das placas. Após 4 h de reincubação, a leitura foi realizada. A resazurina de cor azul é ausência de crescimento microbiano e a cor vermelha condiz com presença de crescimento microbiano [1]. A concentração inibitória mínima se definiu como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos inóculos, evidenciado pela coloração ou por botão formado na microplaca.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela** – Valores da CIM<sub>90%</sub> em µg/mL do óleo da *Piper vicosanum* avaliadas pela técnica de diluição em microplaca

Amostra vegetal / Antibiótico	#PV	**Tetra	**Mero	**Flu	***T 20
Micro-organismo					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥500	≥1	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	≥500	≥1	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	≥1000	-	≥1	-	-
<i>Salmonella</i> ATCC 13076	≥250	≥1	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	≥500	-	-	≥32	-

\* Espécie com crescimento do micro-organismo sem adição de óleo essencial ou antimicrobiano padrão; PV-#óleo da *Piper vicosanum*\*\*Controle padrão dos micro-organismos: Tetra – tetraciclina; Mero – Meropenem; Flu – fluconazol; \*\*\*Solvente utilizado nas diluições T 20 – tween 20;

A descoberta de novos agentes antimicrobianos originados de espécies vegetais vem recebendo maior atenção da comunidade científica [2]. Assim, diversos extratos de plantas medicinais têm sido reconhecidos por suas atividades antimicrobianas devido os seus compostos bioativos [2]. Neste estudo, a atividade antimicrobiana do óleo extraído das folhas de *P. vicosanum* foi avaliada através do teste de CIM, o qual é um teste utilizado para verificar a ação de antimicrobianos com resultados quantitativos [3]. Neste estudo, observou-se que a *P. vicosanum* apresentou atividade antimicrobiana em cepas ATCC testadas tanto contra bactérias gram positivas quanto negativas, incluindo *Candida*

*albicans* (levedura). Entretanto, esta atividade foi melhor contra *Salmonella* (CIM=  $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto contra *P. aeruginosa* (CIM=  $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$ ), foi mais fraca (Tabela 1). Alguns estudos na literatura também avaliaram o potencial antimicrobiano de espécies de *Piper* gênero e encontrou resultados semelhantes. Salleh *et al.* [4] demonstraram que os óleos essenciais extraídos a partir de *P. Offcinarum* mostrou uma atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *E. coli*, com valores de MIC de  $250 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Num outro estudo realizado por estes autores, demonstrou-se que o óleo de *P. caninum* exibiu uma forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *E. coli*), levedura (*C. albicans*) com valores de CMI de  $62,5-250 \mu\text{g} / \text{mL}$ , mas fraca atividade contra estirpes fúngicas [5]. Estes resultados demonstram o grande potencial antimicrobiano destas espécies para terapêutico e a necessidade de mais estudos para identificar os seus compostos bioativos.

## REFERÊNCIAS

1. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(8):2720-22.
2. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to medicines. *Future Microbiol.* 2012; 8:979–90.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that Grow Aerobically*; Approved Standard Eighth edition, M07-A08. 2009;29(2):1-10.
5. Salleh WM, Ahmad F, Yen KH, Sirat HM. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper officinarum* (Piperaceae). *Nat Prod Commun.* 2012;7:1659-62.
4. Salleh WM, Ahmad F, Yen KH, Sirat HM. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume. *Int J Mol Sci.* 2011;12:7720-31.



## Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

---

© 2014 Nordic Association for the Publication of BCPT (former Nordic Pharmacological Society). Published by John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Kim Brøsen

Impact Factor: 2.294

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 47/87 (Toxicology); 125/256 (Pharmacology & Pharmacy)

Online ISSN: 1742-7843

### *Author Guidelines*

#### NOTICE TO CONTRIBUTORS

##### **Aim and Scope**

BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY is an independent journal, publishing original scientific research in all fields of toxicology, basic and clinical pharmacology. This includes experimental animal pharmacology and toxicology and molecular (-genetic), biochemical and cellular pharmacology and toxicology. It also includes all aspects of clinical pharmacology: pharmacokinetics, pharmacodynamics, therapeutic drug monitoring, drug/drug interactions, pharmacogenetics/-genomics, pharmacoepidemiology, pharmacovigilance, pharmacoconomics, randomized controlled clinical trials and rational pharmacotherapy. For all compounds used in the studies, the chemical constitution and composition should be known, also for natural compounds.

##### **Publication Ethics**

Authors are invited to consult our editorial policy on publication ethics statement [here](#).

##### **Submission of manuscripts**

Manuscripts written in the English language should be submitted online to <http://www.manuscriptmanager.com/bcpt>.

BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript will be checked for plagiarism against previously published works.



### Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

#### For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

#### For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

#### Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. See the full list of [terms and conditions](#).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website [here](#). Prior to acceptance, there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

#### **Word 2007**

Authors, please note that **docx files are** compatible with journal production systems.

#### **Liability**

No responsibility is assumed by the journal for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material published herein.

#### **Ethical guidelines**

Studies involving human beings must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and guidelines on Good Clinical Practice.

For the humane use and care of experimental animals, internationally accepted principles must be observed. The ethical standards in Directive 86/609/EEC, "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes", 1986, and the "Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology", adopted by the Society of Toxicology in 1989, for the acceptable use of experimental animals, must be adhered to. In general, manuscripts in which animals are used without reasonable respect to their lives and sufferings will not be accepted. Live experimental animals should only be used, if similar results can not be obtained by alternative methods, e.g. *in vitro* methods.

#### **Conflict of interest and sources of funding**

The politics of BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY regarding conflict of interest and sources of funding complies with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (<http://www.icmje.org/>). Thus, a conflict of interest exists if an author, reviewer or an editor handling any given manuscript has ties that could influence his or her judgement in an inappropriate manner. This could typically be financial ties with industry either directly or indirectly via family in the form of research funding, employment, consultancies, stock ownership, honoraria or expert testimony. Other sources of conflict of interest could be personal relationships, academic competition and intellectual passion. Authors submitting a manuscript to BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY are required to disclose any conflict of interest, and in the event the manuscript will be published, these will be published as well. This includes disclosure of all sources of funding. The Editor and MiniReview Editors will abstain from participation in the peer review process and editorial handling of a manuscript if a conflict of interest exists, and the same applies to the reviewers.

The ICMJE conflict of interest disclosure form can be found [here](#).

#### **Organisation of manuscripts**

Manuscripts should be submitted in the English language (see the Language paragraph below), double-spaced with a wide margin and pages should be numbered consecutively. **They should be submitted as only ONE Word file including all text, and with tables and figures at the end. Do not upload separate files with tables and figures please!**



#### Title page

This should contain a concise title, institution(s) or laboratory(ies) where the work was done (in English), names of all authors with first names spelled out, and an abbreviated form of the title (running title). Full mailing address in English for the corresponding author should also be given, including e-mail address.

#### Page 2

This should contain an abstract of up to 250 words. The abstract should contain a summary of what was done, the results obtained, and valid conclusions drawn therefrom.

#### Main text

The following pages should contain Introduction and background (long historical introductions should be avoided, a reference to bibliographies in handbooks or the like will suffice), followed by Materials and Methods, Results, Discussion which should incorporate the conclusion(s) drawn from the study, Acknowledgements and References. Numbered tables with legends, illustrations or graphs in high quality with legends should be on separate pages at the end of the manuscript document. Abbreviations should be kept to an absolute minimum.

Abbreviations in tables and figures should be explained in the legends. Text and footnotes must contain all the information necessary to understand and interpret the table without reference to the text. Illustrations must be clear enough to permit readable reproduction. Symbols should be large enough to be readable also after reduction of the illustration.

The experimental results should on the whole be published only in the form of graphs or tables, which must contain all the information necessary to understand the table or illustration without reference to the text.

#### Illustrations

*Tables.* Each table should have a brief, specific, descriptive title, giving sufficient explanation to make the data intelligible without reference to the text. Number all tables and cite in numerical order in the text, using Arabic numerals.

*Preparation of figures.* Cite figures in the text in numerical order using Arabic numerals. For peer-review submission, follow the online uploading instructions. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). Ideally, vector graphics that have been saved in metafile (.WMF) or pict (.PCT) format should be embedded within the body of the text file. More information on electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/faq.asp>.

*Figure sizing for accepted manuscripts.* For the print publication, lay out figures as compactly as is consistent with conveying the relevant data. Figures will be sized to fit the smallest possible space, but in order to prevent radical changes in figure content, prepare the figures in one of two sizes: 8.0 cm (1-column width) or, if necessary, 11.5 cm (1 1/2 column width). These instructions do not apply to figures submitted for online review and prepublication.

*Figure legends.* All legends must begin with a short descriptive sentence that sums up the intent and content of the data contained in the figure. This sentence should be in boldfont. A more detailed explanation of the data contained in the figure and/or its parts should follow. The detailed description should be in Roman type (ie, not in boldfont).

*Colour charges.* Colour charges apply to all articles (except MiniReviews) printed in *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology*. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when accepted for publication, which you would like to appear in print, you are required to complete and return a colour work agreement (CWA) form before your paper can be published. This form can be downloaded from [here](#). (Please note that we are pleased to provide colour online only free of charge. If you would like to take advantage of this, please ensure that your image is suitable for both colour and black-and-white publication. For example, please do not refer to the 'red dots' or 'blue lines', as these will NOT be apparent in the print version.) Please correspond with the Editor-in-chief on acceptance of the manuscript. Should you require your figures to be printed in colour, please complete and sign the [CWA](#), and post or courier all pages of your completed form to: Customer Services (OPI), John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre, New Era Estate, Oldlands Way, Bognor Regis, West Sussex, PO22 9NQ. Please note that electronic or faxed copies cannot be accepted. For queries, please contact the production editor at [bcpt@wiley.com](mailto:bcpt@wiley.com).

Please note that funds will be collected after the article is published in print.

### References

As of 1 January 2007, references must be cited according to the Vancouver system (<http://www.icmje.org>).

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology deviates from icmje in the following respects:

- No full stop after the abbreviated name of the journal
- As journals paginate consecutively, issue number is not used; only volume and page number.

Journal names should be abbreviated according to the system used in Index Medicus (Pubmed Service "Journals Database").

Number the references consecutively in the order they appear for the first time in the text. References that are cited in table or figure texts should be numbered in accordance with the first appearance of the table or figure in question. References in the text must be cited with the appropriate number in square bracket. In case of more than one reference in one square bracket, the numbers must be separated by a comma, e.g. [3, 4, 8]; In case of more than two consecutive reference numbers, use hyphen, e.g. [6-9];

Avoid abstracts and meeting proceedings as references; unpublished observations and personal communications must not be used as references. Accepted manuscripts that have not yet been published may appear in the reference list. Indicate journal name and year in question followed by "in press" in brackets. Articles published online are identified by their DOI (Digital Object Identifier System) reference (<http://dx.doi.org/>). Electronic material is cited like other literature.

### *In general, references must be written as follows*

Surname followed by initial(s) without comma or full stop; then comma before the next author's surname followed by his/her initial(s): Larsen JT, Brøsen K.

If there are more than six authors, et al after the sixth author's initial(s) should be added:

Smith PJ, Byron AM, Jones E, Andersson C, Tucker AD, Rowland P et al.

Put a full stop after the last author's initials (or after et al), and before the article/monography title etc.

The title should be written with initial capital while all other words are in small letters, unless it is a matter of nationalities (in a Swedish population) or names of e.g. commissions and the like. As a rule, continue with small letters after colon. Do not include sub-title.

The journal name should be written with ordinary font (no italics); do not put full stops between the individual

parts of the abbreviation or between the journal name and year: Basic ClinPharmacolToxicol 2005.

Year, volume number and pages should be written without space.

Put a semicolon between year and volume number and colon between volume number and page number:  
BMJ 2004;329:1233-6.

### Examples of correctly written references

#### *Journal article*

Brøsen K, Skjelbo E, Rasmussen BB, Poulsen HE, Loft S. Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P4501A2. *BiochemPharmacol* 1993;45:1211-4.

Rasmussen SG, Gether U. Purification and fluorescent labelling of the human serotonin transporter *Biochemistry* 2005;44:3494-505.

#### *Book chapter*

Zanger UM, Eichelbaum M. CYP2D6. In: Levy RH, Thummel KE, Trager WF, Hansten PD, Eichelbaum M (eds). *Metabolic Drug Interactions*. Lippincott Williams & Willis Philadelphia PA 2002;87-94.

#### *DOI reference*

Masmanian SK, Thon-That H, Schneewind O. Sortasecatalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Stapylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2001;40:1049-1057.

Doi: 10.1046/j. 1365-2958.2001.02411.x

#### *Internet reference*

<http://www.imm.ki.se/CYPalleles> /March 2006

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>.

### Supporting Information

BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY gives authors the opportunity to include data online that would be inappropriate or impractical to include in the printed version. These data may substantially enhance the importance of the research and may also be of benefit to readers. Authors are encouraged to include data such as 3-D structures/images, large tables and any other supporting data too large for print publication. All supporting information must be submitted as 'supplementary files for review' with the original manuscript via ScholarOne Manuscripts. 'Supporting Information' will be made available alongside the online version (only) of the published article. Please note that supporting information will not be copy-edited or typeset, but be made available online in exactly the form it is received and approved. Supporting information guidelines including acceptable file formats and sizes are available [here](#).

### Language

The manuscript should be written in a concise and clear British English language. Some linguistic in-house correction is performed, however, a manuscript may be returned to the authors for major linguistic revision and rewriting. The authors have the full responsibility for the English language and the style of the manuscript. The manuscript will be edited according to the style of the journal, and the proofs must be read carefully by the author.

### Nomenclature

The international nomenclature should be used. Chemical formulae should as far as possible be written on one line. If proprietary names are used, the chemical constitution or, if this is not known, the outline of the

preparation must appear clearly in the text. When available, INN-names should be used.

Only officially accepted abbreviations and abbreviations of long chemical names etc. should be used.

Unnecessary abbreviations impede the reading of a paper; therefore the number of abbreviations should be kept at an absolute minimum. Necessary abbreviations should be used with consistency and defined at first mention. Abbreviations should not be used in the title of the paper and in the running title.

#### **Page Charges**

**Authors will be charged GBP 150 for each page in the final published version exceeding 6 printed pages, although for "Short Communications" GBP 150 for each page exceeding 2 printed pages. Page charge does not apply to MiniReviews. As a rule of thumb, an average text page in the printed issue (without figures and tables) is approximately 900 words.**

#### **Short communications**

BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY will accept "Short Communications" for rapid publication of important experimental results and short preliminary results. The length of the manuscript should not exceed 2 printed pages including title, general text, presentation of experimental results without headings, either table or figure, and references. The general rules for manuscripts published in BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY should be followed. No abstract is necessary. Authors will be charged for pages in excess of 2 printed pages, according to the above Page charge paragraph.

#### **MiniReviews**

BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY accepts both invited and spontaneous MiniReviews, which will be peer-reviewed and should conform to the form and style of the journal. MiniReviews should be up to 8 printed pages including a maximum of 50 references. If invited, please indicate in the cover letter the name of the person you were invited by.

#### **Letters to the Editor and Annotations & Reflections**

Letters to the Editor may contain essential corrections and comments to articles published in the journal. Letters to the Editor will be published without delay after acceptance. Annotations & Reflections concerning important developments within the publication scope of the journal will be accepted by the Editor. Annotations & Reflections should not exceed 6 printed pages.

#### **Supplements**

BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY will publish supplements, consisting of e.g. monographs, abstracts or papers from a congress or a symposium, articles or a series of articles or a doctorate thesis. The publication of the supplement should be approved by the journal, and the authors or organizers will be responsible for all production and mailing costs, unless otherwise agreed. After approval, the supplements are not subject to revision by the Editorial Office. The quality of language must meet the standards maintained by the journal, and all the above-mentioned instructions should be followed.

Supplements are delivered free of charge to the subscribers of the journal.

Further information and cost estimates may be obtained from the Editorial Office.

#### **Offprints**

The corresponding author will be provided with a free PDF file of the article.

#### **Announcements**

BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY will accept for publication announcements of interest to pharmacologists and toxicologists (the readers), such as notices of congresses, society meetings, symposia, awards, or other matters.

#### Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate)

Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

---

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 6 de outubro de 2015.

Senhor Pesquisador:

**Cândida Aparecida Leite Kassuya**

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

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

A handwritten signature in black ink that reads "Melissa Negrão Sepulveda".

---

Melissa Negrão Sepulveda

Coordenadora CEUA