



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA, ANTINOCICEPTIVA E
TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE *Piper callosum* Ruiz &
Pavon (Piperaceae).**

MEIVE FREIRE DE LIMA

**Santarém, Pará
Abril de 2015**

MEIVE FREIRE DE LIMA

**ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA, ANTINOCICEPTIVA E
TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE *Piper callosum* Ruiz &
Pavon (Piperaceae)**

ORIENTADOR: DR. RICARDO BEZERRA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos

Linha de pesquisa: Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, Pará
Abril de 2015**

**ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA, ANTINOCICEPTIVA E TOXICIDADE DO
EXTRATO AQUOSO DE *Piper callosum* Ruiz & Pavon (PIPERACEAE)**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 09 de Abril de 2015.

Prof. Dr. Troy Beldini
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
Coordenador do PGRNA
Apresente a comissão examinadora, integrada pelos professores:

Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
Examinador 01

Prof^a Dra. Rosa Helena Veras Mourão
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
Examinador 02

Prof^a Dra. Soraia Valéria de Oliveira Coelho Lameirão
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
Examinador 03

Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
Orientador

**Santarém, Pará
Abril de 2015**

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio em todos os momentos, pelo incentivo e confiança que sempre depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar presente em todos os momentos da minha vida, me dando forças, confiança e direcionamento para vencer os desafios e concluir mais esta etapa.

Ao meu orientador, **Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira** por todos os ensinamentos, pela paciência, apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

À professora **Rosa Helena Veras Mourão**, obrigada por todo apoio, incentivo, pelos conhecimentos transmitidos. Você é um exemplo de profissional dedicada e apaixonada pelo que faz.

À professora **Kátia Honorli e ao Grupo Conquista de Ervas Medicinais (GCEM)**, em especial à dona **Deuza**, por me permitirem a coleta do material vegetal.

À **minha família** por todo apoio e incentivo que foram essenciais ao longo deste caminho.

À **Lucas Castro**, por todo amor, carinho, compreensão e companheirismo.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Bioprospeção e Biologia Experimental (LabBBEx), em especial a **Wânia Cristina, Leomara Andrade, Ana Paula Assunção, Poliane Lopes, Juliana Raposo, Thuanny Raíssa, Sandra Sarrazin, Juliana Almeida, Soraia Baia, Adrielle Serra, Diana Santos, Valéria Mourão, Fernanda e Tamella Portal**. Obrigada pela amizade e pela disposição em ajudar um ao outro.

À **Amanda Azevedo**, pela amizade e por ser minha parceira fiel e dedicada durante a realização dos testes biológicos.

A todos os amigos da turma PGRNA 2013, em especial a **Celyane Batista, Leydielli Ghizoni e Leomara Andrade**. Obrigada pela amizade, pelo apoio dado nos momentos difíceis, pelos conhecimentos compartilhados.

À **Universidade Federal do Oeste do Pará** e ao **Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia** pela oportunidade e investimento.

À **CAPES e CNPq** pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

EPÍGRAFE

Depois de um tempo você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

(William Shakespeare)

LIMA, Meive Freire de. Atividade antiedematogênica, antinociceptiva e toxicidade do extrato aquoso de *Piper callosum* Ruiz & Pavon (Piperaceae), 2015. 65 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Santarém, 2015.

RESUMO

Piper callosum Ruiz & Pavon, conhecida popularmente como “elixir paregórico”, é uma planta bastante utilizada na prática popular para o tratamento de muitas doenças, como as condições inflamatórias e dolorosas e problemas gastrointestinais. Apesar do potencial terapêutico desta espécie, são poucos os estudos voltados para a avaliação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, sendo que tais estudos são essenciais para garantir a eficácia e segurança de plantas utilizadas tradicionalmente como medicinais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades antiedematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso das folhas de *P. callosum* (EAPC), investigar seus possíveis efeitos neurotóxicos e hepatotóxicos, bem como determinar seu perfil fitoquímico. A atividade antiedematogênica foi avaliada por meio do teste de edema de pata induzido por carragenina e a atividade antinociceptiva pelo teste da placa quente. Os possíveis efeitos neurotóxicos foram avaliados através dos testes comportamentais: labirinto aquático de Morris, barra giratória, campo aberto, labirinto em Y e caixa claro/escuro. A avaliação da hepatotoxicidade do EAPC foi realizada por meio da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). A prospecção fitoquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD). Os resultados obtidos mostraram que o EAPC inibiu significativamente ($p \leq 0,05$) o edema de pata induzido por carragenina em todas as doses testadas (240, 360 e 480 mg/kg), em comparação com o grupo controle, demonstrado que o mesmo tem potencial como agente anti-inflamatório, porém, não apresentou efeito antinociceptivo central. O tratamento, tanto agudo quanto subcrônico, com o EAPC na dose testada (480mg/kg), não provocou alterações sobre a locomoção, memória e aprendizagem de ratos Wistar, o que indica que o mesmo não causa efeitos neurotóxicos. Os resultados encontrados para os níveis das enzimas ALT, AST e FA no soro de ratos demonstram que o tratamento por 21 dias com o EAPC na dose de 480 mg/kg, não causa efeitos hepatotóxicos. Para as classes de metabólitos investigadas por CCD, identificou-se apenas a presença de flavonoides. Os resultados indicam um potencial farmacológico do EAPC, o que justifica em parte o uso desta espécie na medicina popular. No entanto, são necessários novos estudos para conhecimento dos princípios ativos da espécie e dos seus possíveis mecanismos de ação.

Palavras-Chave: *Piper callosum*, atividade antiedematogênica, atividade antinociceptiva, neurotoxicidade, hepatotoxicidade.

LIMA, Meive Freire de. Atividade antiedematogênica, antinociceptiva e toxicidade do extrato aquoso de *Piper callosum* Ruiz & Pavon (Piperaceae), 2015. 65 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, Santarém, 2015.

ABSTRACT

Piper callosum Ruiz & Pavon, popularly known as (paregoric elixir), is a plant widely used in folk medicine for the treatment of many diseases, such as inflammatory and painful conditions and gastrointestinal problems. Despite the therapeutic potential of this species, few studies focused on the evaluation of their actual pharmacological and toxicological properties, and such studies are essential to ensure the efficacy and safety of plants traditionally used as medicinal. The objective of this study was to evaluate the antiedematogenic and antinociceptive activities of the *P. callosum* leaves aqueous extract (AEPC), investigate their possible neurotoxic and hepatotoxic effects and determine its phytochemical profile. The antiedematogenic activity was assessed using the paw edema test induced by carrageenan and the antinociceptive activity by the hot plate test. The possible neurotoxic effects were assessed using behavioral tests: the Morris water maze, rota-rod, open field, Y maze and light/dark box. Hepatotoxicity of the AEPC was evaluated by means of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP). Phytochemical prospecting was determined by thin layer chromatography (TLC). The results showed that the AEPC significantly inhibited ($p \leq 0.05$) the paw edema induced by carrageenan at all doses tested (240, 360 and 480 mg/kg), suggesting that it is potential as an agent acting anti-inflammatory, but showed no central analgesic effect. The both acute and subchronic treatment with the AEPC in the tested dose (480 mg/kg) caused no change on mobility, memory and learning of Wistar rats, indicating that it does not cause neurotoxic effects. The results for the levels of ALT, AST and serum AP in rats demonstrate that treatment for 21 days with AEPC at a dose of 480 mg / kg did not cause hepatotoxic effects. For classes of metabolites studied by TLC, it was identified only the presence of flavonoids. The results suggests a pharmacological potential of the AEPC, which explains in part the use of this species in folk medicine. However, it is necessary to conduct further studies to knowledge of the active principles and possible mechanisms of action of these substances.

Keywords: *Piper callosum*, antiedematogenic activity, antinociceptive activity, neurotoxicity, hepatotoxicity.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1.1 Plantas Medicinais	14
1.1.2 Família Piperaceae	15
1.1.3 Nociceção.....	18
1.1.4 O Processo Inflamatório	20
1.1.4.1 Mediadores da Inflamação.....	21
1.1.5 Fármacos Antinociceptivos e Anti-inflamatórios	23
1.1.6 Toxicidade de Plantas Medicinais.....	24
1.1.7 Testes Comportamentais de Toxicidade.....	26
1.2 OBJETIVOS	28
1.2.1 Objetivo Geral.....	28
1.2.2 Objetivos Específicos	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Coleta do Material Vegetal.....	28
2.2 Obtenção do Extrato Aquoso.....	28
2.3 Prospecção Fitoquímica	29
2.4 Animais.....	30
2.5 Testes farmacológicos	30
2.5.1 Edema de para induzido por carragenina	30
2.5.2 Placa quente	31
2.6 Testes Toxicológicos.....	31
2.6.1 Teste da Barra Giratória	32
2.6.2 Teste do Campo Aberto.....	33
2.6.3 Teste do Labirinto Aquático de Morris	34
2.6.4 Teste do Labirinto em Y	35
2.6.6 Hepatotoxicidade.....	36
2.7 Análise Estatística	37

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1 Prospecção Fitoquímica.....	38
3.2 Edema de pata induzido por carragenina.....	39
3.3 Placa quente	41
3.4 Testes Toxicológicos.....	42
3.4.1 Análise do peso corporal	42
3.4.2 Teste da Barra Giratória	43
3.4.3 Teste do Campo Aberto.....	44
3.4.4 Teste do Labirinto Aquático de Morris	45
3.4.5 Teste do Labirinto em Y	47
3.4.6 Teste da Caixa Claro/Escuro.....	48
3.4.7 Avaliação da Hepatotoxicidade.....	49
4. CONCLUSÕES	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
6. ANEXO	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – <i>Piper callosum</i> Ruiz & Pavon	16
Figura 02 – Vias envolvidas na transmissão da dor	18
Figura 03 – Metabolismo do ácido araquidônico	22
Figura 04 – Aparelho rota-rod.....	33
Figura 05 – Campo aberto.....	33
Figura 06 – Labirinto Aquático de Morris ..	34
Figura 07 – Labirinto em Y	35
Figura 08 – Caixa claro/escuro.....	36
Figura 09 – Efeito do extrato aquoso de <i>Piper callosum</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar	40
Figura 10 – Alterações do peso corporal de ratos Wistar submetidos ao tratamento por 21 dias com o extrato aquoso de <i>Piper callosum</i>	43
Figura 11 – Efeito da administração aguda do extrato aquoso de <i>Piper callosum</i> no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da barra giratória	44
Figura 12 – Efeito da administração subcrônica do extrato aquoso de <i>Piper callosum</i> no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da barra giratória	44
Figura 13 – Efeito do tratamento agudo (ag) e subcrônico (sc) do extrato aquoso de <i>Piper callosum</i> em ratos Wistar no teste do labirinto aquático de Morris	46
Figura 14 – Efeito do tratamento subcrônico do extrato aquoso de <i>Piper callosum</i> no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste do labirinto em Y	47
Figura 15 – Efeito do tratamento agudo (ag) e subcrônico (sc) do extrato aquoso de <i>Piper callosum</i> no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da caixa claro/escuro	48

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- AA** – Ácido araquidônico
- AChE** – Acetilcolinesterase
- AINEs** – Anti-inflamatórios não-esteroidais
- ALT** – Alanina aminotransferase
- AST** – Aspartato aminotransferase
- CCD** – Cromatografia em camada delgada
- COX** – Ciclooxigenase
- EPAC** – Extrato aquoso de *Piper callosum*
- FA** – Fosfatase alcalina
- IL-1** – Interleucina 1
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- PLA₂** – Fosfolipase A₂
- SNC** – Sistema nervoso central
- SUS** – Sistema Único de Saúde
- TNF- α** – Fator de necrose tumoral alfa

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais, devido à grande diversidade de compostos secundários que apresentam, constituem uma importante fonte de moléculas bioativas para cura ou tratamento de diversas doenças, constituindo-se em uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade (Veiga Júnior e Pinto, 2008).

O grande potencial terapêutico das plantas tem estimulado muitas pesquisas com o intuito de investigar suas propriedades farmacológicas e descobrir novas substâncias que sejam eficazes contra muitas enfermidades que afligem o homem, como as doenças inflamatórias e a dor. Neste sentido, já houve grandes avanços, pois importantes medicamentos atualmente disponíveis são resultado destas investigações com plantas. A morfina, por exemplo, é um potente analgésico descoberto no século XIX, a partir da planta *Papaver somniferum* L., que é amplamente utilizado até os dias atuais e que serve de protótipo para muitas outras drogas analgésicas (Silva, 2012). O acheflan®, nome comercial para o fitoterápico obtido da espécie *Cordia verbenaceae* DC, também pode ser citado como exemplo, pois representa um importante anti-inflamatório que foi desenvolvido no Brasil e lançado no mercado em 2005 (Calixto, 2005).

Apesar desse avanço, ainda é crescente a necessidade pela descoberta de novas substâncias com propriedades farmacológicas, notadamente anti-inflamatórias e analgésicas, que sejam eficazes e com o mínimo de efeitos colaterais (Calixto *et al.*, 2000). Neste contexto, as pesquisas com plantas medicinais são vistas como uma estratégia bastante promissora (Elizabetsky *et al.*, 1995), principalmente no Brasil e especificamente na Amazônia, região privilegiada por deter grande parte da biodiversidade vegetal, a qual ainda é pouco conhecida e estudada quanto as suas potencialidades terapêuticas (Nodari; Guerra, 2010).

Entre as espécies com notável potencial farmacológico, destacam-se representantes da família Piperaceae, particularmente do gênero *Piper*, as quais além de serem bastante utilizadas na medicina popular para o tratamento ou alívio de diversas doenças, têm sido objeto de muitas pesquisas biológicas e fitoquímicas, muitas destas comprovando suas propriedades farmacológicas (Parmar *et al.*, 1997; Navickiene *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2012; Nascimento; Paula, 2012).

A espécie *Piper callosum* Ruiz & Pavon, conhecida popularmente como elixir paregórico, faz parte das plantas amplamente utilizadas na medicina popular, principalmente nos Estados do Pará e Amazonas, onde o chá de suas folhas é utilizado para tratar diversos

males, como doenças inflamatórias, alívio de dores e problemas gastrointestinais (Andrade *et al.*, 2009; Bernard *et al.*, 2001).

Apesar do uso de *P. callosum* na prática popular, ainda são poucos os estudos relacionados à avaliação de suas propriedades farmacológicas, assim como a inexistência de trabalhos voltados para investigação dos possíveis efeitos tóxicos desta espécie. Tal fato ressalta a importância destas pesquisas, com o intuito de validar ou não o uso desta espécie e de oferecer mais segurança às populações que a utiliza, haja vista que a toxicidade de plantas, assim como dos tratamentos convencionais, pode trazer sérias consequências à saúde (Veiga Júnior e Pinto, 2005). Além disso, estudos desta natureza podem contribuir para o desenvolvimento de novos fitofármacos e para agregar valor à biodiversidade da região. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antiedematogênica e antinociceptiva de *P. callosum* Ruiz & Pavon e investigar seus possíveis efeitos tóxicos.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). A dissertação está dividida em uma breve INTRODUÇÃO GERAL, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO E CONCLUSÕES. Após as devidas correções, a mesma será escrita em formato de artigo, de acordo com as normas da revista escolhida para submissão.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Plantas Medicinais

As pesquisas químicas e farmacêuticas no século XX trouxeram grande contribuição para o tratamento e a cura de diversas doenças, entretanto, a grande oferta de medicamentos sintéticos não solucionou os problemas da maior parte da população, pois segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), grande parte da população dos países em desenvolvimento não tem acesso aos cuidados primários de saúde, seja pela distância aos centros hospitalares ou por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos prescritos. Desta forma, a utilização de plantas medicinais por estas populações constitui-se na sua principal forma de tratamento (Calixto, 2005; Veiga Júnior, 2008).

As plantas medicinais têm sido utilizadas por milhares de anos como tratamento alternativo para o alívio ou cura de diversas enfermidades, apresentando grande importância na terapêutica, uma vez que uma das características dos produtos naturais é a grande

diversidade química e estrutural que apresentam (Henkel *et al.*, 1999). Este fato possibilita que os compostos químicos presentes nas plantas possam tornar-se fármacos em potencial para as mais diferentes enfermidades (Nodari; Guerra, 2010).

Neste contexto, o Brasil apresenta uma posição bastante privilegiada, pois é considerado o detentor da maior biodiversidade do planeta, abrigando aproximadamente 22 % de todas as espécies vegetais (Pinto *et al.*, 2002). A biodiversidade do Brasil e, especificamente a da região Amazônica, é considerada uma grande fonte de recursos naturais para a obtenção de substâncias biologicamente ativas (Andrade *et al.*, 2009).

A grande importância das plantas medicinais no cuidado à saúde tem sido reconhecida pelos profissionais e programas de assistência a saúde. Neste sentido, o Conselho Nacional de Saúde aprovou a portaria nº 971 de 2006, que propõe a inclusão das plantas medicinais e da fitoterapia como opções terapêuticas no Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2006a). Ainda em 2006, o Ministério da Saúde elaborou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006. Esta política tem como um de seus objetivos incentivar a pesquisa com plantas medicinais, com o intuito de garantir a segurança e eficácia da utilização destas plantas e de fitoterápicos pela população (Brasil, 2006b).

Apesar do reconhecimento do potencial terapêutico das plantas medicinais e da riqueza da flora amazônica, ainda são poucos os dados científicos sobre a avaliação farmacológica e os possíveis efeitos tóxicos de plantas medicinais (Veiga Junior; Pinto, 2005). Simões e Schenkel (2002) corroboram esta afirmação, pois relatam que as plantas medicinais brasileiras são consideradas altamente promissoras no campo farmacológico, no entanto, são pouco conhecidas sob qualquer ponto de vista, sendo que apenas 8% das espécies vegetais nativas foram estudadas em busca de moléculas bioativas (Nodari; Guerra, 2010).

Dentre as espécies com grande potencial farmacológico, destacam-se representantes da família Piperaceae, as quais além de serem intensamente utilizadas na medicina popular para tratar diversas patologias, têm sido objeto de muitos trabalhos científicos que visam investigar suas propriedades biológicas.

1.1.2 Família Piperaceae

A família Piperaceae é considerada uma das mais numerosas famílias dentre as dicotiledôneas basais, somando aproximadamente 3000 espécies distribuídas em oito gêneros (Mabberley, 1997). Destes, o gênero *Piper* é o que possui o maior número de representantes,

com cerca de 1000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Jamarillo; Manos, 2001). No Brasil, ocorrem 285 espécies de *Piper* e estima-se que na Amazônia existam cerca de 170 espécies (Guimarães *et al.*, 2010).

Diversas espécies do gênero *Piper* são bastante utilizadas na medicina popular em várias partes do mundo. Na China, por exemplo, as folhas de *P. futokasura* são utilizadas no tratamento de arritmias cardíacas e asma; na Jamaica, dores de estômago são tratadas com a infusão de folhas de *P. aduncum* L. e *P. hispidum* Sw.; folhas de *P. amalago* (Jacq.) Yunck. são utilizadas no México e no Brasil para tratar dores estomacais e várias infecções (Facundo *et al.*, 2008). As raízes de *P. sarmentosum* Roxb são utilizadas na Tailândia como carminativo e digestivo, enquanto na Malásia e Indonésia, folhas e raízes desta mesma espécie são empregadas no tratamento da dermatite, tosse e asma e ainda com anestésica local (Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2006).

Além do uso na prática popular, muitas espécies de *Piper* já foram estudadas cientificamente e existem diversos trabalhos que demonstram suas propriedades biológicas, como atividades: anti-inflamatória (Silva *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2010; Zakaria *et al.*, 2010), antinocicepiva (Zakaria *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2012), antiúlcera (Lima *et al.*, 2012), antifúngica (Vieira *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2013), antioxidante (Dasgupta *et al.*, 2004; Salleh *et al.*, 2011), anti-*Helicobacter pylori* (Quílez *et al.*, 2010), dentre outras.

A espécie *P. callosum* Ruiz & Pavon, popularmente conhecida como elixir paregórico, óleo-elétrico ou panquilé, é um arbusto de aproximadamente 1 m de altura que apresenta folhas elípticas ou ovado-elípticas com ápice acuminado e base aguda (Figura 01).

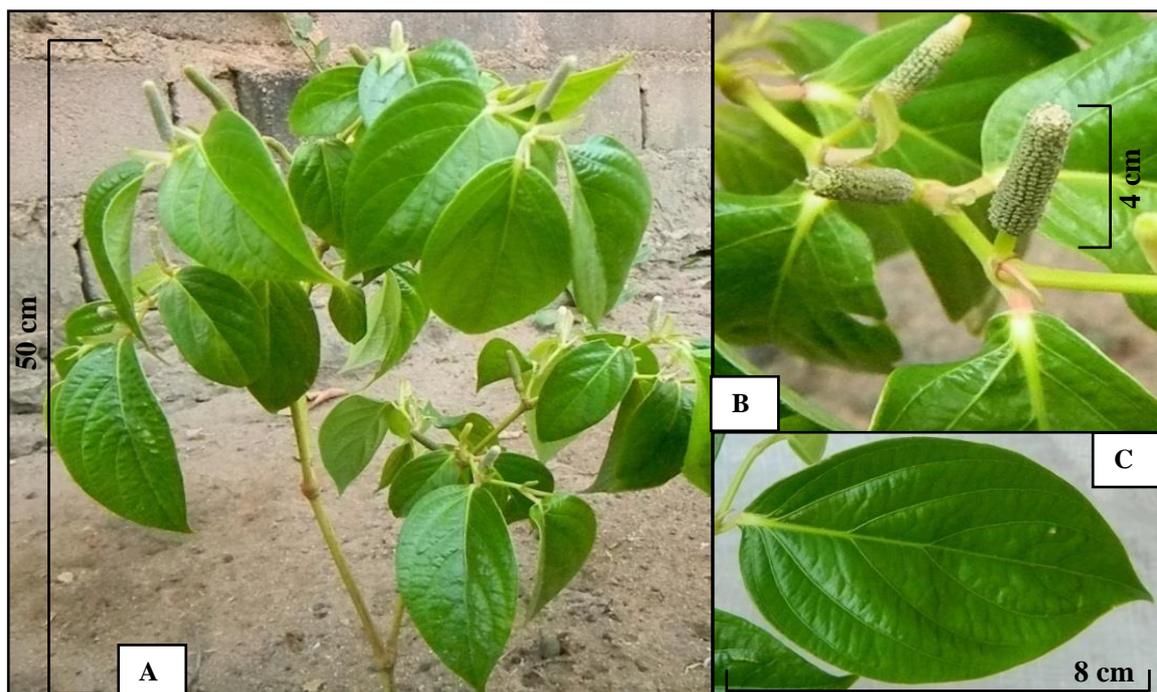


Figura 01: A: *Piper callosum* Ruiz & Pavon; B: inflorescência; C: folha. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2013.

Esta espécie encontra-se bem distribuída na América do Sul, especificamente na Bolívia, Brasil (Pará, Amazonas, Acre, Rondônia e Mato Grosso), Colômbia e Peru (Andrade *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2010), sendo encontrada de forma cultivada nos jardins e quintais dos Estados do Pará e do Amazonas, onde o chá de suas folhas é bastante utilizado para tratar doenças gastrointestinais (Maia *et al.*, 1987). Além disso, possui muitas outras aplicações na medicina popular, como no tratamento de dores reumáticas (Sanz-Biset; Canigual, 2013), como adstringente, hemostática local, antiblenorrágica, antileucorréica (Andrade *et al.*, 2009), anti-inflamatória (Bernard *et al.*, 2001), sendo utilizada também por populações indígenas para o alívio da dor de dente (Pring, 1982).

Existem alguns trabalhos sobre propriedades biológicas para a espécie *P. callosum*. Silva e Bastos (2007) avaliaram a atividade antifúngica de óleos essenciais de diferentes espécies do gênero *Piper*, entre elas, *P. callosum* e demonstraram que os mesmos são eficazes contra alguns fungos fitopatogênicos. Há também estudos que demonstram a ação inseticida e moluscicida desta espécie (Rapado *et al.*, 2011; Souto *et al.*, 2012).

Bernard e colaboradores (2001) realizaram um levantamento etnobotânico na América do Sul com o intuito de identificar as plantas mais comumente utilizadas com fins anti-inflamatórios. Deste levantamento foram selecionadas 56 espécies, dentre elas, *P. callosum*. O extrato destas plantas foi testado quanto à capacidade de inibir a fosfolipase A₂ (PLA₂), enzima que desempenha um importante papel no processo inflamatório. Para esta atividade, *P. callosum* não apresentou resultado significativo. No entanto, os autores ressaltam que a mesma pode ter propriedade anti-inflamatória, visto ser utilizada popularmente para este propósito, mas pode desempenhar outro mecanismo de ação que não seja a inibição da PLA₂.

Pring (1982), visando investigar o princípio ativo responsável pela atividade anestésica de *P. callosum*, isolou três amidas do extrato de suas raízes: pipercallosina, piperovatina e pipercallosidina, sendo que para as duas primeiras foram demonstradas em trabalhos posteriores a atividade anestésica local e anti-inflamatória, respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008).

Percebe-se que apesar de *P. callosum* ser uma espécie utilizada nas práticas medicinais populares, ainda são raros os estudos relacionados à investigação de suas reais propriedades farmacológicas, como as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, bem como seus possíveis efeitos tóxicos, uma vez que as plantas, diante da grande variedade de compostos que apresentam, podem não somente desempenhar efeitos benéficos ao organismo, mas também serem responsáveis por graves efeitos indesejáveis ou tóxicos.

1.1.3 Nociceção

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano real ou potencial dos tecidos” (Calixto *et al.*, 2000). Embora seja uma reação do corpo à estímulos nocivos e, portanto, constitua um sistema de alerta precoce e protetor, a dor traz muitos efeitos deletérios para os seres humanos, constituindo-se em uma das causas mais comuns da procura dos pacientes por atendimento médico (McCurdy; Scully, 2005).

Em termos de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda tem função de alerta do corpo para lesões, inflamação ou doença, sendo transitória e de curta duração (Moorea, 2009); enquanto a dor crônica é aquela que persiste além do tempo razoável para a cura da lesão ou que está associada a processos patológicos crônicos, sendo de caráter contínuo ou recorrente (Salvetti; Pimenta, 2007).

A dor ocorre quando uma lesão tecidual ativa as terminações nervosas livres (os receptores da dor ou nociceptores), sendo sua transmissão um mecanismo que envolve uma interação complexa de estruturas periféricas e centrais, que permitirão que o estímulo nociceptivo seja conduzido até o sistema nervoso central (Figura 02) (Calixto *et al.*, 2000).

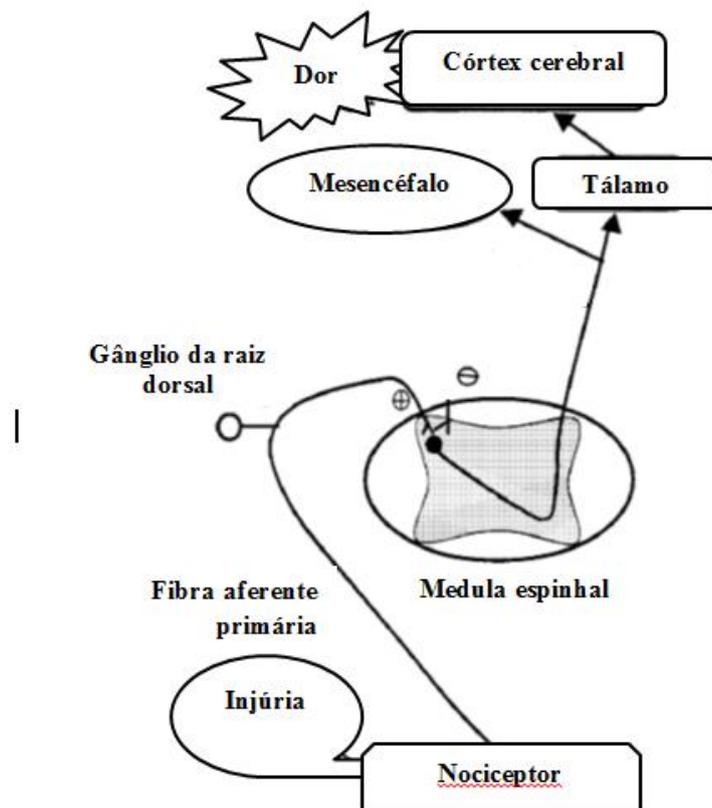


Figura 02: Vias envolvidas na transmissão da dor. **Fonte:** Adaptado de Calixto *et al.* (2000).

Diante de uma injúria ou estímulo nódico, que pode ser mecânico, térmico ou químico, ocorre a ativação dos nociceptores, os quais são amplamente encontrados em diversas estruturas, como pele, músculos, juntas, periósteo e veias arteriais (Calixto *et al.*, 2000). A ativação destes receptores é facilitada pela ação de mediadores químicos, como os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), cininas, a exemplo das bradicininas, aminoácidos excitatórios, como o glutamato, dentre outros, que são capazes de afetar a sensibilidade dos nociceptores (Calixto *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2007; Ren; Dubner, 2010).

Nociceptores primários propagam o estímulo até o corno dorsal da medula espinhal, onde ocorre uma sinapse com neurônios de segunda ordem. Estes neurônios cruzam a medula espinhal e ascendem ao trato espinotalâmico, onde projetam as suas fibras terminais, predominantemente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem estes estímulos para áreas sensoriais do córtex cerebral, região onde ocorre a percepção da experiência dolorosa (Calixto *et al.*, 2000).

A necessidade pela descoberta de novas substâncias capazes de impedir que o estímulo doloroso alcance o SNC e que ao mesmo tempo causem o mínimo de efeitos colaterais tem impulsionado o desenvolvimento de muitos testes em modelos animais com o intuito de avaliar o potencial antinociceptivo destas substâncias (Le Bars *et al.*, 2001). Embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham capacidade de se comunicar verbalmente quando submetidos à dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes àquelas observadas em humanos. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas com drogas potencialmente analgésicas que interferem no processo fisiológico da dor, o que permite inferir se um animal está experimentando uma resposta álgica (Peraza *et al.*, 2007).

Existem vários modelos experimentais descritos na literatura para avaliar a atividade antinociceptiva de uma substância (Le Bars *et al.*, 2001). O teste da placa quente é um dos modelos mais utilizados para avaliar o efeito antinociceptivo de ação central de novos compostos, sendo bastante sensível à drogas que agem centralmente, a exemplo da morfina (Bahamonde *et al.*, 2013). O estímulo nódico utilizado neste teste, o calor, ativa nociceptores (fibras A δ e C) que transmitem a informação nociceptiva aguda ao corno dorsal da medula espinhal, e posteriormente aos centros corticais. A percepção da nocicepção diante deste estímulo produz comportamento estereotípico do animal sobre a placa aquecida, caracterizado por “sapatear” ou lamber as patas (Le Bars *et al.*, 2001; Rabelo *et al.*, 2013). A latência para o aparecimento desta resposta é cronometrada em segundos e é utilizada como parâmetro para avaliação do efeito antinociceptivo.

1.1.4 O Processo Inflamatório

A inflamação pode ser definida como uma resposta do corpo à infecção por qualquer agente estranho ou à lesões teciduais, tendo como principal finalidade destruir ou inativar invasores e dar início ao reparo tecidual (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004; Soehnlein; Lindbom, 2010). Apesar do objetivo primordial do processo inflamatório ser a proteção do organismo, seu excesso ou prolongamento pode acarretar em sérias consequências, podendo inclusive levar à morte (Lawrence *et al.*, 2002; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

De acordo com a duração e as características da inflamação, a mesma pode ser classificada em aguda ou crônica. A inflamação aguda é a reação precoce e imediata dos tecidos à injúria, sendo de duração relativamente curta (horas ou dias) e caracterizada por vasodilatação, exsudação de fluido rico em proteínas e uma migração de células para o local da lesão (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Por outro lado, a inflamação crônica tem uma duração mais prolongada (semanas, meses ou até anos), resultando da persistência da inflamação aguda e caracterizada pela presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (Porth; Sommer, 2010).

O processo inflamatório pode se manifestar a partir de qualquer agente lesivo, seja físico (queimadura, radiação, trauma), químico (substâncias cáusticas) ou biológico (microorganismos) (Wang *et al.*, 2014). A resposta inflamatória envolve uma cascata de eventos bioquímicos, celulares e vasculares, sendo caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios e pelo movimento de fluido e de leucócitos do sangue para o local da lesão (Porth; Sommer, 2010; Queiroz *et al.*, 2010).

Uma vez detectados patógenos ou lesão tissular, células do local da lesão passam a liberar mediadores químicos, como citocinas, histamina e bradicinina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, substância P, dentre outros (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004; Queiroz *et al.*, 2010). Estes mediadores promovem modificações vasculares, tais como vasodilatação, com consequente aumento do fluxo sanguíneo local, seguido de uma redução na velocidade do fluxo e estase sanguínea. Estas modificações contribuem para o aparecimento de calor e vermelhidão, que constituem os sinais cardinais iniciais da inflamação. Outra modificação é o aumento da permeabilidade vascular com o extravasamento de fluido rico em proteínas (exsudato) para os tecidos, resultando na formação de edema e dor, que também constituem sinais cardinais da reação inflamatória (Lawrence *et al.*, 2002; Silva, 2012). Além destes, a inflamação pode ocasionar um quinto

sinal, que é a perda da função, sendo este decorrente de diversos fatores, mas principalmente da formação do edema (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004).

Outro evento importante no processo inflamatório é o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, bem como a sua ativação (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004). Os leucócitos ativados, principalmente macrófagos e neutrófilos, passam a fagocitar os agentes agressores, com vista a eliminá-los. Tal eliminação é realizada através de vários mecanismos, incluindo a produção de substâncias tóxicas à base de oxigênio e nitrogênio e de lisozimas e proteases, que destroem os invasores fagocitados e removem tecidos mortos, contribuindo para a homeostase do tecido lesionado (Medzhitov, 2010; Porth; Sommer, 2010).

1.1.4.1 Mediadores da Inflamação

A exposição das células aos patógenos e a lesão tecidual resultam na produção e na liberação de diversos mediadores químicos, responsáveis pelas modificações celulares e vasculares que levam ao desenvolvimento da resposta inflamatória (Coutinho *et al.*, 2009). Dentre os mediadores da inflamação pode-se destacar as aminas vasoativas (histamina e serotonina), citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral – TNF), óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos).

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a reação inflamatória. Suas funções estão relacionadas à dilatação das arteríolas e ao aumento da permeabilidade vascular, contribuindo para a formação do edema. A histamina é produzida principalmente pelos mastócitos, basófilos e plaquetas e a serotonina é sintetizada pelas plaquetas e liberada durante a agregação plaquetária (Kumar *et al.*, 2008).

As citocinas são grupos multifuncionais de proteínas produzidas por muitos tipos de células, notadamente macrófagos e linfócitos, sendo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1) as duas principais citocinas que medeiam à inflamação (Coutinho *et al.*, 2009; Porth; Sommer, 2010). A IL-1 está envolvida na ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), enquanto que o TNF- α está envolvido na estimulação de proteínas da fase aguda da inflamação e na ativação da cascata de coagulação (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004).

O óxido nítrico, produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, possui potente ação vasodilatadora - o que leva a um aumento da permeabilidade vascular. Além disso, atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos (Coutinho *et al.*, 2009).

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo insaturado que está presente nos fosfolipídios de membranas celulares. Diante de uma lesão celular, a enzima PLA₂ é ativada por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e provoca a degradação dos fosfolipídios de membrana, com conseqüente liberação desse ácido. Este, ao ser metabolizado, forma os leucotrienos, pela ação da enzima lipooxigenase, e as prostaglandinas e tromboxanos, pela ação da enzima COX (Figura 03) (Hilário *et al.*, 2006).

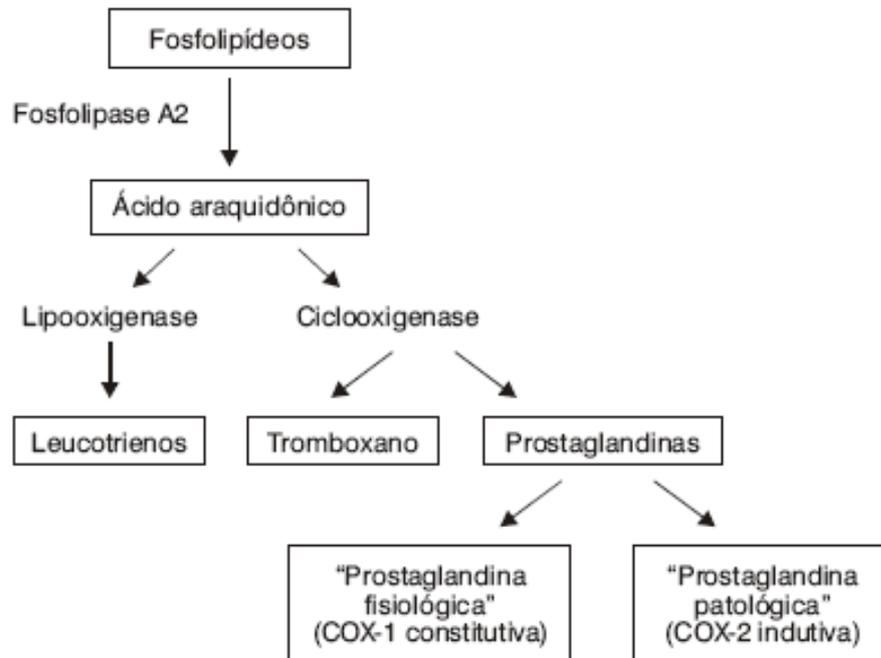


Figura 03: Metabolismo do ácido araquidônico. **Fonte:** Extraído de Hilário e colaboradores, 2006.

As prostaglandinas, assim como o óxido nítrico, têm ação vasodilatadora (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004), mas podem também atuar na sensibilização dos nociceptores, contribuindo para a sensação dolorosa (hiperalgesia). Os leucotrienos aumentam a permeabilidade vascular e atraem os leucócitos para o local da lesão (Monteiro *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2009). Muitos dos anti-inflamatórios, particularmente os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), têm seu mecanismo de ação voltado para a inibição das enzimas ciclooxigenases, pois desta forma inibem a produção de prostaglandinas, as quais desempenham papel crucial no processo inflamatório (Kummer; Coelho, 2002).

Existem muitos modelos experimentais para avaliar a atividade anti-inflamatória de substâncias em pesquisa. Um dos ensaios mais comumente utilizados consiste na indução de edema na pata traseira de ratos ou camundongos, através da aplicação de um agente flogístico, como a carragenina, a qual induz um aumento agudo e progressivo do volume da pata do animal. O edema inflamatório induzido pela carragenina é resultante da ação sequencial de

diversos mediadores químicos, sendo a fase inicial atribuída principalmente à liberação de histamina, serotonina e bradicinina e a segunda fase relacionada ao excesso de produção de prostaglandinas nos tecidos (Carey *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014). Este teste, denominado de edema de pata induzido por carragenina, é considerado um modelo padrão para avaliação do potencial anti-inflamatório de substâncias com propriedades semelhantes aos anti-inflamatórios-não esteroidais, a exemplo da indometacina (Vajja *et al.*, 2004).

1.1.5 Fármacos Antinociceptivos e Anti-inflamatórios

A utilização de compostos para aliviar a dor e a inflamação constitui uma das necessidades mais antigas da humanidade. Desde o isolamento da salicina a partir da planta *Salix alba* L., e da morfina, extraída da papoula (*Papaver somniferum*), ainda no século XIX, novos produtos com ação antipirética, analgésica e anti-inflamatória foram introduzidos na terapêutica (Calixto *et al.*, 2000; Monteiro *et al.*, 2008; Silva, 2012).

Dentre os medicamentos amplamente utilizados no tratamento da dor, tanto aguda quanto crônica, destacam-se os opióides. Estes incluem todas as drogas, naturais ou sintéticas, com propriedades semelhantes à morfina, a qual é considerada o protótipo dos analgésicos opiáceos (Almeida *et al.*, 2001). Estes medicamentos desempenham seu mecanismo de ação através da ligação com receptores opióides, do tipo *mu* (μ), *kappa* (κ) e *delta* (δ), localizados no SNC e também na periferia (Garcia *et al.*, 2012). A ligação dos opióides a estes receptores provoca uma redução da entrada de cálcio nas células e efluxo de potássio, com redução na liberação de neurotransmissores excitatórios, a exemplo da dopamina, serotonina, acetilcolina e substância P, o que provoca o bloqueio da transmissão nociceptiva (Martins *et al.*, 2012; Silva, 2012).

Apesar da grande importância dos opióides para o alívio da dor, os mesmos podem provocar muitas reações adversas, como efeito depressor da respiração, náuseas, alterações de humor, efeitos gastrointestinais, neurotóxicos, além de produzirem algum grau de tolerância (Calixto *et al.*, 2000; Cid, 2008; Fletcher, 2011).

Outra classe de fármacos bastante utilizados no controle da inflamação e da dor são os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). Os AINEs incluem um grupo heterogêneo de compostos, os quais possuem basicamente três tipos principais de efeitos: anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos. No entanto, todos esses efeitos estão relacionados com a ação primária destas drogas, que é a inibição da enzima COX, com consequente inativação da

síntese de prostaglandinas e tromboxanos (Hilário *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008), que constituem importantes mediadores do processo inflamatório.

A COX é na realidade constituída por duas isoformas principais, sendo que a COX-1 é expressa constitutivamente, estando presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins, enquanto que a COX-2 é induzida durante a inflamação, embora possa ser constitutiva em alguns tecidos, como cérebro, ossos e certas áreas dos rins (Monteiro *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2009).

As prostaglandinas produzidas pela ação da COX-1 estão relacionadas a determinadas funções fisiológicas, como secreção de muco para proteção da mucosa gástrica, homeostasia e manutenção da função renal, enquanto que a COX-2 contribui para formação do processo inflamatório e de outras alterações patológicas (Monteiro *et al.*, 2008; Silva, 2012). Os AINEs mais antigos, tais como a aspirina, a indometacina e o ibuprofeno, atuam tanto na inibição da COX-1 quanto da COX-2, portanto com baixa seletividade sobre a COX-2.

Todos os AINEs convencionais, e particularmente os não seletivos da COX-2, podem causar diversos efeitos colaterais, principalmente sobre o trato gastrointestinal, rins, fígado, sistema cardiovascular, sistema imunológico, SNC, dentre outros (Kummer; Coelho, 2002; Monteiro *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2009; Silva, 2012). Estes efeitos constituem um desafio para a busca de novos anti-inflamatórios eficazes e com baixa toxicidade.

1.1.6 Toxicidade de Plantas Medicinais

O conceito de “natural” trouxe uma grande contribuição para o aumento do consumo de plantas medicinais por grande parte da população, pois para muitos tal conceito representa a ausência de compostos que possam causar reações adversas. Desta forma, os produtos naturais passaram a ser vistos como sinônimo de produtos saudáveis, seguros e benéficos (Mengue *et al.*, 2001). No entanto, sabe-se que este conceito é extremamente equivocado, haja vista que produtos naturais, como plantas medicinais, podem apresentar substâncias potencialmente perigosas. Segundo Veiga Júnior e Pinto (2005), a toxicidade de plantas medicinais constitui-se em um sério problema de saúde pública.

Os produtos naturais são constituídos por uma vasta diversidade de compostos químicos, os quais podem exercer diferentes efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos no organismo (Ritter *et al.*, 2002). As plantas medicinais são agentes xenobióticos que apresentam produtos de biotransformação potencialmente tóxicos. Assim, não possuem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com sua ingestão, mas também efeitos

que se instalam em longo prazo e de forma assintomática, podendo levar a um quadro clínico severo, até mesmo fatal (Lapa *et al.*, 2004).

Existem muitos efeitos tóxicos de plantas medicinais, sendo a hepatotoxicidade uma das principais preocupações em decorrência do papel do fígado no metabolismo de drogas (Xue *et al.*, 2014). O confrei (*Symphytum officinale* L.), por exemplo, uma planta bastante utilizada na medicina tradicional como cicatrizante, possui alcalóides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (Stickel; Seitz, 2000). A utilização desta espécie como recurso terapêutico foi proibida pela OMS após diversos casos de morte provocados por estes alcalóides (Veiga Júnior; Pinto, 2005).

Na Europa, a espécie *Piper methysticum* G. Forst (Piperaceae) era intensamente utilizada até a década de 90 como uma estratégia segura para a ansiedade, no entanto, seu uso foi proibido em toda a União Européia e Canadá após a comprovação de graves efeitos de hepatotoxicidade (Stickel *et al.*, 2003; Cloatre, 2004).

Tendo em vista a importância do fígado na biotransformação das drogas e deste constituir um dos órgãos mais suscetíveis à ação de agentes tóxicos, torna-se fundamental a avaliação da função hepática. Entre os métodos mais utilizados para investigar os efeitos hepatotóxicos de substâncias, destaca-se a avaliação de parâmetros bioquímicos, como a mensuração dos níveis de enzimas hepáticas, a exemplo da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) (Ozer *et al.*, 2008; Kasmani *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Estas enzimas constituem importantes marcadores de danos hepáticos, pois segundo Vijayalakshmi *et al.* (2000), uma droga não provoca dano algum ao fígado sem interferir com a atividade normal dessas enzimas.

Além dos efeitos hepatotóxicos de plantas medicinais, pode-se mencionar também os efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central (SNC). De acordo com Coroad-Artal (2003), uma ampla variedade de plantas pode desencadear efeitos neurotóxicos.

Neurotoxicidade pode ser definida como qualquer modificação da estrutura e/ou função SNC ou periférico após a exposição a um agente químico, físico ou biológico, com efeitos permanentes ou reversíveis, os quais diminuem a capacidade do organismo para sobreviver, reproduzir ou se adaptar ao seu ambiente (OECD, 1997; Coecke *et al.*, 2006).

As substâncias neurotóxicas podem afetar diversas regiões do sistema nervoso e assim produzir diferentes danos e consequências, ocasionado principalmente disfunções de memória e aprendizagem, perda da coordenação motora e déficits sensoriais (OECD, 1997).

De acordo com Otton (1993), as substâncias neurotóxicas frequentemente produzem alterações substanciais nas funções cognitivas, particularmente na memória. É consensual que

existem vários processos de memória e que estes envolvem diferentes sistemas neurais e regiões cerebrais, assim, distintas áreas do cérebro armazenam diferentes aspectos da memória (Eichenbaum, 2000). No entanto, diversos estudos demonstram que a região do hipocampo desempenha um papel fundamental na formação da memória espacial (Burgess, 2002; Prediger, *et al.*; 2008; Lavenex; Lavenex, 2009), desta forma, alterações nesta região ocasionam déficits graves de memória e aprendizagem (Da Cunha, 2003).

O aprendizado pode ser definido como o processo de aquisição de novas informações como consequência da experiência, podendo ser medido pelo aumento na probabilidade de uma determinada resposta comportamental, em consequência de um estímulo específico. Por outro lado, a memória é o mecanismo de armazenamento ou retenção dessas informações aprendidas ou de experiências prévias, é a persistência do aprendizado em um estado que pode ser evidenciado posteriormente (Gazzaniga *et al.*, 2006; Bear, 2008).

O cerebelo e o córtex cerebral são regiões importantes do cérebro que desempenham um papel de destaque na coordenação de movimentos motores, bem como, nas funções básicas da memória e aprendizagem (Chaudhary; Parvez, 2012). Estas regiões são particularmente vulneráveis à substâncias tóxicas (Manto, 2012), o que pode acarretar também em deficiências da coordenação motora.

A avaliação de possíveis efeitos neurotóxicos de substâncias pode ser realizada tanto em testes *in vitro*, através da análise de células neuronais de diferentes regiões do cérebro, como por experimentos *in vivo*, dos quais se destacam os testes comportamentais em animais, que avaliam principalmente as funções motora (locomção e coordenação motora), sensorial (órgãos dos sentidos, dor) e cognitiva (memória e aprendizagem), visto que modificações do comportamento animal podem estar relacionadas com lesões neurológicas. Essas informações podem ser utilizadas para relacionar o uso das substâncias testadas com o risco associado à saúde do homem (Tilson, 1987; Coecke *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012).

1.1.7 Testes Comportamentais de Toxicidade

De acordo com Vorhees (1987), os métodos comportamentais são muito importantes na avaliação de neurotoxicidade, pois fornecem uma visão mais abrangente sobre a integridade do sistema nervoso, além de ter uma boa relação custo-benefício. Esse mesmo autor considera que a avaliação neurotóxica deveria ser uma prioridade nos ensaios de toxicidade, pois o cérebro funciona como o núcleo da saúde humana e do bem-estar. Weiss (1988) também ressalta a importância das avaliações neurocomportamentais, pois em muitos

casos, os primeiros indícios de exposição a substâncias neurotóxicas se dão por alterações comportamentais, como as disfunções de memória e da atividade locomotora. Além disso, tais avaliações geralmente não são invasivas.

Os testes de labirintos são amplamente utilizados em estudos de memória e aprendizagem animal. Dentre estes, o labirinto aquático de Morris, introduzido por Richard Morris (1984), vem se destacando nos estudos de neurobiologia da memória, sendo intensamente utilizado em pesquisas sobre a capacidade de orientação em roedores (Gallagher; Nicolle, 1993). Este teste parte da premissa de que os roedores são bons nadadores, no entanto, a água lhes representa um meio aversivo, desta forma, terão que procurar uma maneira para escapar da água, tendo que para isso localizar e memorizar o local de escape presente no labirinto.

O labirinto em Y, proposto inicialmente por Montgomery na década de 50, é um teste comportamental utilizado para avaliar os déficits cognitivos de roedores, através da tendência destes animais em explorar novos ambientes (Chen *et al.*, 2010). O teste ocorre em um labirinto em forma de Y, com três braços em um ângulo de 120° entre si. Após a introdução do animal no centro do labirinto, o mesmo pode explorar livremente o ambiente. O número de entradas em cada braço é registrado de modo a calcular a porcentagem de alternância.

O teste da caixa claro/escuro é um modelo experimental que permite avaliar, além dos possíveis efeitos tipo-ansiolíticos de determinadas substâncias, a memória aversiva dos animais. Este teste baseia-se na aversão inata de roedores à ambientes iluminados e sobre o comportamento exploratório espontâneo (Crawley; Goodwin, 1980). O mesmo é composto de uma caixa experimental dividida em dois compartimentos, sendo um iluminado e outro não. Quando um estímulo aversivo, como um choque elétrico, é acionado, o animal é condicionado a lembrar-se que o ambiente de sua preferência não é seguro.

O teste da barra giratória, proposto por Dunham e Miya (1957), é comumente utilizado para detecção de alterações na atividade locomotora dos animais, pois permite avaliar a integridade do sistema motor, uma vez que os animais são desafiados a permanecerem sobre uma barra que gira a uma velocidade constante.

O teste do campo aberto é um dos instrumentos mais utilizados na avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ação tipo-ansiolítica (Prut; Belzung, 2003; Oliveira *et al.*, 2008). Substâncias estimulantes do SNC tendem a aumentar os parâmetros comportamentais registrados no modelo, enquanto que substâncias depressoras tendem a diminuí-los (Oliveira *et al.*, 2008).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar atividades farmacológicas e toxicológicas do extrato aquoso de *Piper callosum* Ruiz & Pavon.

1.2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Investigar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato aquoso das folhas de *P. callosum*;
- ✓ Avaliar o efeito antiedematogênico e antinociceptivo do extrato aquoso das folhas de *P. callosum*;
- ✓ Investigar os possíveis efeitos neurotóxicos do tratamento agudo e subcrônico de *P. callosum* sobre a locomoção, memória e aprendizagem de ratos Wistar;
- ✓ Investigar os possíveis efeitos hepatotóxicos do extrato aquoso de *P. callosum*;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material Botânico

A espécie *P. callosum* foi coletada em uma residência particular na Comunidade de Alter-do-Chão (S 02° 30' 03,2"/W 054°56'55,0") e no Grupo Conquista de Ervas Medicinais (GCEM), localizado no bairro da Conquista (S 02° 26' 59,8"/ W 054° 45' 10,7"), município de Santarém/Pará/Brasil, no qual há cultivo de diversas plantas utilizadas para fins terapêuticos. As coletas foram realizadas entre os meses de junho e setembro de 2013, pelo período da manhã. Exemplares desta espécie encontram-se depositados no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus/Amazonas/Brasil, sob o número de registro 257.081.

2.2 Obtenção do extrato aquoso

Para o preparo do extrato, as folhas de *P. callosum* foram previamente selecionadas e desidratadas em estufa (LICIT LC – E80) a 40 °C com circulação forçada de ar. Posteriormente, foram trituradas em liquidificador industrial (Tron®) até a obtenção de um pó de fina granulação. O extrato aquoso de *P. callosum* (EAPC) foi preparado a partir da diluição

de 50g do pó em 500 mL de água destilada. Essa mistura foi mantida sob agitação constante em placa quente a $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3h. Em seguida, o material foi filtrado e o resíduo foi submetido à nova extração sob as mesmas condições por mais 3h. Ao final deste processo o material foi novamente filtrado e os extratos resultantes foram misturados e liofilizados (Liotop L-101). O EAPC foi então estocado no banco de extratos do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBBEx) da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA/Santarém para posterior utilização nos ensaios biológicos. O rendimento médio do extrato liofilizado foi 19%.

2.3 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *P. callosum* foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD). Alíquotas do extrato diluído em metanol (10mg/mL) foram aplicadas em cromatoplasmas tendo como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ e como fase móvel diferentes sistemas de eluição, adequados a cada classe de metabólitos investigada, bem como padrões e reveladores específicos (Tabela 01), de acordo com metodologia proposta por Wagner e Bladt (1996).

Tabela 01: Condições cromatográficas utilizadas para prospecção fitoquímica do extrato aquoso de *P. callosum*

CLASSE DE METABÓLITOS	ELUENTES	REVELADOR	PADRÃO
Cumarinas simples	Tolueno: éter 5:5 (v:v)	KOH 5% UV 365nm	1,2 benzopirona
Cumarina glicosídea	AcOEt: Acform.: HAc: H ₂ O 6,75:0,75:0,75: 1,75 (v:v)	KOH 5% UV 365nm	Esculina
Terpenóides e ácidos graxos	Hex: AcOEt : Acform. 8,5:1:0,5 (v:v)	Vanilina sulfúrica	Timol
Flavonoides	AcOEt: Acform.: HAc: H ₂ O 6,75:0,75:0,75: 1,75(v:v)	NP PEG	Rutina
Taninos hidrolisáveis	ButOH: HAc: H ₂ O 4:1:5 (v:v)	Cloreto férrico 1%	Ácido gálico
Taninos condensados	ButOH: HAc: H ₂ O 4:1:5 (v:v)	Vanilina clorídrica 1%	Catequina

AcOEt = acetato de etila; Acform = ácido fórmico; Hex = hexano; ButOH = n-butanol; HAc: ácido acético; KOH = hidróxido de potássio.

2.4 Animais

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de manipulação animal e com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará, protocolado sob o N° 03005/2014.

Para a realização dos testes biológicos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com peso entre 160-220g e camundongos machos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 40-60g, provenientes da Unidade de Experimentação Animal do LabBBEx - UFOPA. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à água e alimentação e ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

Os ratos foram utilizados nos ensaios de toxicidade e de atividade antiedematogênica, enquanto os camundongos foram utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva.

2.5 Testes farmacológicos

2.5.1 Edema de pata induzido por carragenina

A avaliação da atividade antiedematogênica do EAPC foi realizada por meio do teste de edema de pata induzido por carragenina, conforme metodologia descrita por Winter *et al.* (1962). Foram formados cinco grupos de ratos Wistar, ($n=6/\text{grupo}$), os quais receberam por via oral por gavagem os seguintes tratamentos:

- **Grupo 1:** EAPC (240 mg/kg)
- **Grupo 2:** EAPC (360 mg/kg)
- **Grupo 3:** EAPC (480 mg/kg)
- **Grupo 4:** Indometacina (10 mg/kg)
- **Grupo 5:** Controle (água destilada - 1 mL/kg)

Após uma hora da administração dos tratamentos, o edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (Sigma Aldrich. Company) (1% em solução salina) na região subplantar da pata posterior direita de cada animal. O volume da pata foi medido com o auxílio de um pletismômetro digital (Insight EFF 304), imediatamente após a injeção da carragenina (tempo zero), e nos intervalos de tempo: 1, 2, 3, 4 e 5 horas. O edema de pata foi expresso em mL e medido pela diferença entre o volume da pata experimental no tempo zero e nos demais tempos.

O percentual de inibição do edema foi obtido segundo a fórmula descrita por Xu *et al.*, 2014:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{aumento do edema (controle)} - \text{aumento do edema (teste)}}{\text{aumento do edema (controle)}} \times 100$$

2.5.2 Teste da placa quente

A avaliação da atividade antinociceptiva central do EAPC foi realizada por meio do teste da placa quente, conforme metodologia descrita por Eddy e Leimbach (1953). Este teste consiste em colocar os animais sobre uma placa aquecida ($55 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e observar o tempo de latência para manifestar uma reação ao estímulo térmico, sendo esta reação caracterizada por movimentos de levantar ou lambe uma das patas.

Um dia antes do teste, os animais foram submetidos a uma pré-seleção. Para isso, os camundongos foram colocados individualmente sobre a placa quente e aqueles animais que tiveram um tempo de latência superior a 20 e inferior a 5s foram eliminados do teste. Após 24 horas, os animais selecionados foram divididos em cinco grupos (n=6 por grupo), os quais receberam os seguintes tratamentos:

- **Grupo 1:** EAPC (240 mg/kg; v.o)
- **Grupo 2:** EAPC (360 mg/kg; v.o)
- **Grupo 3:** EAPC (480 mg/kg; v.o)
- **Grupo 4:** Morfina (10 mg/kg; i.p)
- **Grupo 5:** Controle (água destilada - 10 mL/kg; v.o)

Logo após a administração dos devidos tratamentos (tempo zero), e posteriormente, em intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos, os animais foram colocados individualmente na placa a $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e registrou-se o tempo, em segundos, que cada animal levou para responder ao estímulo doloroso (tempo de latência). Com o intuito de evitar lesões nas patas dos animais, estabelecemos o tempo máximo (tempo de corte ou “cut-off”) de 30 segundos de permanência sobre a placa.

2.6 Testes Toxicológicos

Todos dos testes toxicológicos foram realizados utilizando-se a dose de 480 mg/kg do

EAPC, sendo esta a maior dose testada nos ensaios farmacológicos. Para tanto, foram formados dois grupos de ratos Wistar machos (n=6/grupo):

Grupo 1: Controle (água destilada – 1 mL/kg)

Grupo 2: EAPC (480 mg/kg)

Uma hora após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, os animais foram avaliados por meio dos testes comportamentais: barra giratória, campo aberto, labirinto aquático de Morris e caixa claro/escuro. Este procedimento foi realizado com o intuito de investigar os possíveis efeitos neurotóxicos do tratamento agudo do EAPC.

Para a avaliação dos efeitos neurotóxicos do tratamento subcrônico do extrato, os dois grupos de animais continuaram a receber os devidos tratamentos durante 21 dias consecutivos. Após, foram novamente submetidos aos testes comportamentais mencionados, sendo avaliados também na performance do labirinto em Y.

Durante todo o período de administração do extrato, os animais foram monitorados diariamente quanto a alterações no peso corporal.

2.6.1 Teste da Barra Giratória

O modelo experimental da barra giratória (figura 04), descrito por Dunhan e Miya (1957), foi utilizado para avaliação dos possíveis efeitos neurotóxicos do EAPC sobre a locomoção e coordenação motora dos animais. O aparelho Rota-rod (EFF 411 Insight ®), utilizado para realização deste teste, é constituído de uma barra giratória, com 45 cm de altura, 54 cm de largura e 35 cm de comprimento, dividido em quatro compartimentos iguais e que possui uma velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.). O procedimento consiste na avaliação da capacidade do animal de se manter sobre a barra que gira a uma velocidade constante.

Inicialmente foi realizado um treino com os animais visando a adaptação e o aprendizado, o mesmo foi dividido em três séries de dois minutos cada, com velocidade de 10 r.p.m. Após 24 horas do treino, os animais foram submetidos ao teste, onde foram novamente colocados na barra giratória em três séries de dois minutos e o resultado foi obtido pela média do tempo de permanência de cada animal no aparelho, sendo o tempo máximo de 2 minutos sobre a barra.



Figura 04: Aparelho Rota-rod Insight®.
Fonte: Arquivo pessoal, 2014.

2.6.2 Teste do Campo Aberto

Este modelo experimental, proposto por Broadhurst (1960), foi utilizado para avaliar o efeito do EAPC sobre a locomoção e o comportamento exploratório dos animais. O mesmo consiste de um tipo de caixa circular com 58 cm de diâmetro e 50 cm de altura (figura 05). O piso desse campo é dividido por duas linhas concêntricas as quais são subdivididas por linhas radiais formando 12 quadrantes, sendo 4 centrais e 8 periféricos.



Figura 05: Campo Aberto. **Fonte:** Arquivo Pessoal, 2014.

Os animais foram colocados individualmente no centro da caixa e foram observados durante 10 minutos. Foram registrados, com o auxílio de câmera filmadora (GEA 1425-14,1

megapixel), os seguintes parâmetros: 1) número de quadrantes percorridos, 2) número de levantamentos, 3) tempo de permanência no centro, 4) tempo de permanência na periferia, 5) número de auto-limpeza e 6) número de bolos fecais. Tais parâmetros foram comparados ao grupo controle para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato nos animais.

2.6.3 Teste do Labirinto Aquático de Morris

O efeito do EAPC sobre a memória espacial de ratos foi avaliado por meio do labirinto aquático de Morris (figura 06) (Morris *et al.*, 1984). Utilizou-se uma caixa d'água de 500 L, com água até 20 cm da borda, onde foi adicionada tinta branca não-tóxica para que a superfície da água se tornasse opaca. A caixa foi dividida em quatro quadrantes imaginários: Norte (N), Sul (S), Leste (L) e Oeste (O) que serviram como ponto de partida para os animais durante o teste. Em um dos quadrantes foi colocada uma plataforma (10 cm x 10 cm) submersa em um local fixo. Próximo a caixa d'água foi colocada uma lâmpada incandescente (60W), que serviu na orientação (pista) para localização da plataforma.

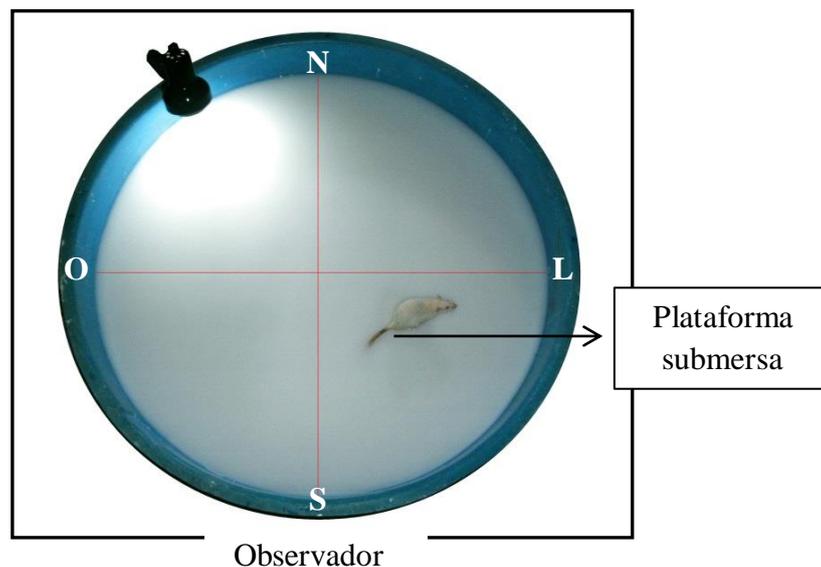


Figura 06: Labirinto aquático de Morris. **Fonte:** Arquivo Pessoal, 2014.

O teste foi realizado em duas etapas: a primeira consistiu de um treino para que os animais pudessem aprender a localização da plataforma, observando para isto os pontos de referência (a lâmpada e o observador). Os animais puderam nadar livremente na caixa até encontrar a plataforma submersa durante o período de 120s. Aqueles que não a encontraram durante o tempo pré-estabelecido, foram colocados manualmente sobre a plataforma por 10s

para a observação do ambiente. Na segunda fase (teste), após 24h do treino, observou-se o tempo, em segundos, que cada animal levou para encontrar a plataforma a partir dos quatro pontos de partida.

2.6.4 Teste do Labirinto em Y

O teste do labirinto em Y (Montgomery, 1958), foi utilizado para avaliar o efeito do tratamento subcrônico do EAPC sobre a memória de curta duração e reconhecimento espacial. O mesmo consiste em um labirinto de madeira em forma de Y (figura 07), com três braços (A, B e C) medindo 10 cm de largura, sendo dois deles com 34 cm de comprimento e um com 43 cm.

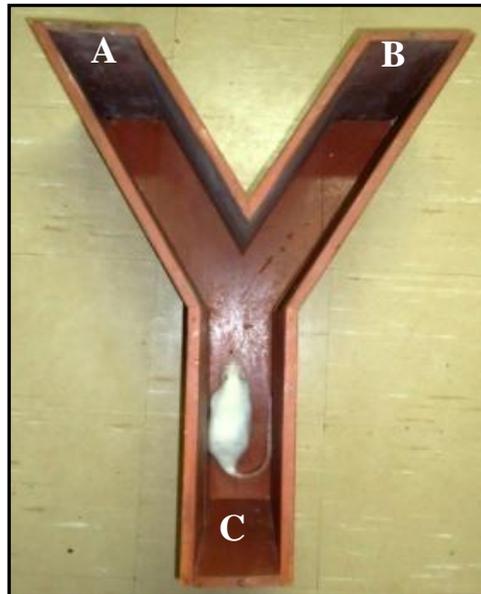


Figura 07: Labirinto em Y. **Fonte:** Marissol Almeida, 2014.

Após a administração da 21ª dose do EAPC, cada animal foi colocado em um dos braços, podendo caminhar livremente pelo labirinto durante 8min. Durante este período foi registrado a sequência de entradas em cada braço e se analisou o número de entradas sem repetições ou número de acertos (exemplo: ABC, BCA, CAB), sendo este critério um indicativo de boa memória de curta duração dos animais. O percentual de alternância entre os braços foi obtido segundo a fórmula:

$$\% \text{ alternância} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de acertos}}{\text{N}^\circ \text{ de entradas} - 2} \times 100$$

2.6.5 Teste da Caixa Claro/Escuro

O teste da caixa claro/escuro (Denoble *et al.*, 1986) foi utilizado com o objetivo de avaliar a memória aversiva dos animais. A caixa claro/escuro (Figura 08) é composta por uma arena em acrílico (46 x 27 x 30 cm de altura) dividida em dois compartimentos, sendo um branco e iluminado e outro preto e escuro. Os dois compartimentos são separados por uma placa de acrílico que possui uma abertura de 7,5 x 7,5 cm localizada no centro. A caixa possui um fundo formado por barras, ligadas a um dispositivo eletrônico que libera um choque no momento em que o animal migra para o compartimento escuro.



Figura 08: Caixa claro/escuro. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2014.

O teste foi realizado em duas etapas: a primeira consistiu de um treino onde os animais foram colocados individualmente no centro do compartimento claro. No momento em que o animal migrou para o compartimento escuro, o mesmo recebeu um choque de 1mA durante 2 segundos para demonstrar que este ambiente não é seguro. A retenção do aprendizado (etapa teste) foi avaliada 24 horas após o treino (para avaliação do tratamento agudo), quando os animais foram colocados no compartimento claro por um período máximo de 5 minutos e o tempo de latência para a entrada no compartimento escuro foi então registrado. Para a avaliação do efeito do tratamento subcrônico não foi necessário condicionar os animais ao treino novamente.

2.6.6 Hepatotoxicidade

Após a administração por 21 dias com EAPC em ratos Wistar, foi realizada a dosagem dos níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase

(ALT) e fosfatase alcalina (FA), com o intuito de avaliar os possíveis efeitos hepatotóxicos do extrato. Para isso, os animais foram anestesiados com pentobarbital e foi então realizada punção cardíaca para coleta das amostras de sangue. Foram colhidos 3 mL de sangue de cada animal, o qual foi centrifugado para obtenção do soro. A determinação dos níveis de AST, ALT e FA no soro dos animais foi realizada com a utilização de kits comerciais (LABTEST®), seguindo-se os procedimentos descritos pelo fabricante. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro, modelo 3300 – UV.

2.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos foram expressos como média \pm erro padrão das médias. A análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey foram aplicados para avaliar a diferença entre os grupos. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Prospecção Fitoquímica

A tabela 02 apresenta os resultados do perfil fitoquímico por CCD do extrato aquoso das folhas de *P. callosum*. Pode-se observar que para as classes de metabólitos investigadas, identificou-se apenas a presença de flavonoides.

Tabela 02: Prospecção fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *P. callosum*.

Classes de Metabólitos Secundários	Extrato aquoso das folhas de <i>P. callosum</i>
Cumarinas	-
Ácidos graxos	-
Flavonoides	+
Taninos	-
Terpenoides	-

(+) = presença; (-) = ausência.

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, sendo conhecidas mais de 8000 variedades destes compostos (Pietta, 2000). Os mesmos podem ser encontrados em frutas, sementes, raízes, flores, cascas de árvores, bem como em chás e vinho (Nijveldt *et al.*, 2001).

Estes metabólitos já são constituintes característicos para algumas espécies do gênero *Piper* (Facundo *et al.*, 2012). No entanto, para *P. callosum*, espécie alvo deste estudo, a ocorrência destes metabólitos só foi evidenciada por Facundo *et al.* (2000), os quais isolaram três flavonoides do extrato etanólico das folhas desta espécie, que segundo os autores, são dotados de atividade antibiótica e justificam em parte o uso de *P. callosum* na medicina popular.

Além de desempenharem um importante papel no metabolismo das plantas, diversas atividades biológicas são comprovadas para essa classe de polifenóis, tais como atividade antioxidante, antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antiulcerogênica, anti-inflamatória, dentre outras (Kim *et al.*, 2004; Odontuya *et al.*, 2005; Rathee *et al.*, 2009), o que lhe confere significativa importância farmacológica.

Quanto à atividade anti-inflamatória atribuída a essa classe de metabólitos secundários, muitas pesquisas têm demonstrado que uma grande variedade de flavonoides apresenta efeitos anti-inflamatórios tanto em testes *in vitro* quanto em modelos *in vivo* (Hollman; Katan, 1997; García-Lafuente *et al.*, 2009; Rathee *et al.*, 2009).

Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar o efeito anti-inflamatório de flavonoides (García-Lafuente *et al.*, 2009; Rathee *et al.*, 2009). Um dos mecanismos mais importantes e citados envolve a modulação do metabolismo do ácido araquidônico via inibição das enzimas fosfolipase A₂, ciclooxigenase e lipoxigenase, o que acarreta na redução dos níveis de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, importantes mediadores da resposta inflamatória (Ferrándiz e Alcaraz, 1991; Rathee *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014). Os flavonoides podem afetar o metabolismo do ácido araquidônico de diferentes maneiras, seja bloqueando especificamente a ciclooxigenase ou a lipoxigenase ou ainda inibindo ambas as enzimas simultaneamente (Rathee *et al.*, 2009).

Além disso, estes metabólitos podem desempenhar seus efeitos anti-inflamatórios através da inibição da liberação do óxido nítrico, de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 e da histamina (Kim *et al.*, 2004; Magaji *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2009; García-Lafuente *et al.*, 2009; Rathee *et al.*, 2009).

3.2 Edema de pata induzido por carragenina

Os resultados expressos na figura 09 mostram que o EAPC apresentou efeito antiedematogênico significativo ($p \leq 0,05$), nas três doses testadas, a partir da primeira hora após a injeção do agente flogístico.

O percentual de inibição do EAPC na dose de 240 mg/kg variou de 31,3 a 36,3% da 1^a à 5^ah. A dose de 360 mg/kg reduziu o edema em 68,8; 60,9; 62,5; 68 e 72,7% na 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a hora após a indução do edema, respectivamente. Para a dose de 480 mg/kg, o percentual de inibição ficou entre 68,8 e 81,8%.

O efeito antiedematogênico do EAPC nas doses de 360 e 480 mg/kg foi semelhante ao efeito da indometacina ($p > 0,05$), cujos percentuais de inibição foram de 75, 74, 75, 80 e 81,8% da primeira à quinta hora, respectivamente.

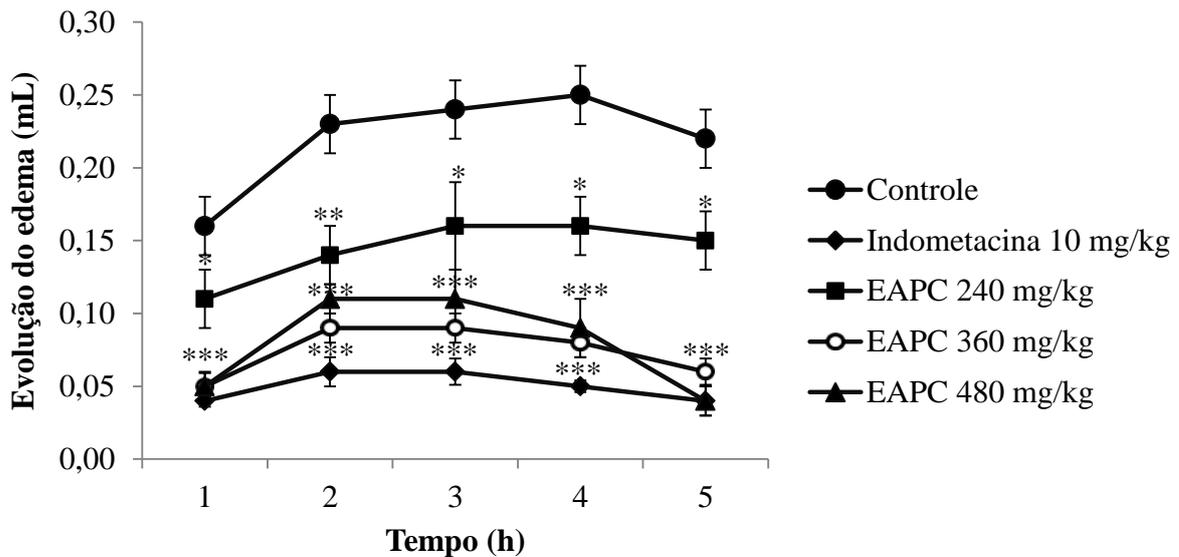


Figura 09: Efeito do extrato aquoso de *Piper callosum* sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar. Os valores representam a média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle.

A inflamação induzida por carragenina é um modelo inflamatório agudo e amplamente aceito como uma ferramenta útil na avaliação da atividade anti-inflamatória de novos compostos (Bahamonde *et al.*, 2013). O desenvolvimento do edema provocado pela carragenina é um evento bifásico, caracterizado pela ação sequencial de vários mediadores inflamatórios (Salvemini *et al.*, 1996). A fase inicial, que ocorre de 0-2,5h após a injeção da carragenina, envolve a liberação de histamina, serotonina e bradicininas, enquanto a segunda fase (3-6h) é atribuída principalmente à liberação de prostaglandinas (Wang *et al.*, 2014).

No presente estudo, o extrato aquoso de *P. callosum* foi efetivo em ambas as fases da inflamação, podendo-se sugerir que o mesmo pode atuar tanto sobre a inibição da liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina), quanto na inibição da liberação de prostaglandinas. Resultado semelhante foi obtido para a espécie *Piper chaba* Hunter, pois o extrato metanólico desta espécie causou uma inibição significativa ($p \leq 0,01$) do edema induzido por carragenina em todas as horas avaliadas (Rahman *et al.*, 2005).

O extrato hidroalcoólico de *Carthamus tinctorius* L. (Asteraceae), assim como um flavonoide isolado desta espécie (kaempferol 3-O-glucoside), também inibiram significativamente o edema de pata induzido por carragenina em ambas as fases do processo inflamatório, indicando que os mesmos desempenham seu mecanismo de ação pela inibição da liberação de histamina e serotonina durante a fase inicial, bem como pelo bloqueio da liberação de prostaglandinas durante a segunda fase da inflamação (Wang *et al.*, 2014).

A presença de flavonoides no EAPC pode justificar o efeito antiedematogênico encontrado no presente estudo, visto que essa classe de metabólitos possui um amplo espectro de atividades biológicas (Rathee *et al.*, 2009), sendo bem conhecidos seus efeitos anti-inflamatórios (Ferrándiz; Alcaraz, 1991; Kim *et al.*, 2004; García-Lafuente *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014), os quais são atribuídos principalmente pela capacidade destas substâncias de atuar sobre a inibição da liberação de importantes mediadores inflamatórios, tais como as histaminas e prostaglandinas (Kim *et al.*, 2004; Rathee *et al.*, 2009).

Existem muitos trabalhos que relatam a atividade anti-inflamatória de diferentes espécies de *Piper*. Zakaria *et al.* (2010) demonstraram que o extrato aquoso das folhas de *P. sarmentosum* Roxb. exibiu efeito anti-inflamatório significativo ($p \leq 0,05$) de maneira dose-dependente, confirmando o uso tradicional desta espécie no tratamento de doenças inflamatórias. O extrato hidroalcolico, frações e amidas isoladas de *P. ovatum* Vahl. foram bastante eficazes na inibição do edema de orelha provocado pelo óleo de cróton (Silva *et al.*, 2008). Quílez *et al.* (2010) relatam que *Piper carpunya* Ruiz e Pav. possui grande potencial para se tornar um fitoterápico relevante, pois verificaram que além de apresentar outras atividades, como anti-*Helicobacter pylori*, possui efeito anti-inflamatório significativo, o que é atribuído em parte pela presença de flavonoides identificados no extrato desta espécie.

Em nosso estudo, foi demonstrado pela primeira vez o efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *P. callosum*, confirmando assim o potencial terapêutico desta espécie. Este resultado justifica em parte o uso de *P. callosum* na medicina popular.

3.3 Teste da placa quente

Os resultados apresentados na tabela 03 mostram que o pré-tratamento com EAPC, nas doses de 240, 360 e 480 mg/kg, não aumentou de forma significativa ($p > 0,05$) o tempo de latência dos camundongos sobre a placa aquecida em todos os tempos avaliados, em comparação com os animais do grupo controle. Choi e Hwang (2003) encontraram resultado semelhante para a espécie *Piper cubeca* L., pois o extrato metanólico desta espécie, também não foi capaz de alterar o tempo de latência dos animais submetidos à placa quente.

Tabela 03: Efeito do extrato aquoso de *Piper callosum* sobre o tempo de latência de camundongos Swiss submetidos ao teste da placa quente.

Tratamentos	Tempo de Latência (s)				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	9.2±0,4	9.2±0,5	7,6±0,9	7.5±1,1	6.3±0,8
Morfina 10 mg/kg	8.3±0,5	13.3±1,6*	14.2±1,0*	16.8±2,3**	15.8±2,5**
EAPC 240 mg/kg	9.0±0,8	10.6±0,2	8,2±1,8	6.0±0,8	6.0±0,8
EAPC 360 mg/kg	7.4±0,7	8,2±0,3	8,5±0,8	8.2±1,6	8.2±1,4
EAPC 480 mg/kg	7,2±1,2	7,2±1,0	7,5±1,4	9.3±0,7	8,2±1,7

Os valores representam a média ± erro padrão da média. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ quando comparados ao grupo controle (água).

O teste da placa quente representa um dos modelos mais utilizados para avaliar o efeito antinociceptivo de ação central de novos compostos (Bahamonde *et al.*, 2013). Considera-se que a resposta nociceptiva observada neste modelo resulte da ativação direta dos nociceptores pelo calor. Os analgésicos opióides, a exemplo da morfina, bem como outras drogas que agem centralmente, aumentam o tempo de latência dos animais submetidos à placa aquecida, resultado que é interpretado como efeito antinociceptivo (Rabelo *et al.*, 2013). O EAPC nas doses testadas não produziu diferença significativa ($p > 0,05$) no comportamento nociceptivo, descartando-se assim o possível efeito analgésico central do mesmo.

Embora o EAPC não tenha demonstrado efeito antinociceptivo de ação central, esta propriedade já é bem relatada para algumas espécies deste gênero, a exemplo de *P. sarmentosum* Roxb. (Zakaria *et al.*, 2010), *P. auritum* Kunth (Estrada-Reyes *et al.*, 2013) e *P. nigrum* L. (Tasleem *et al.*, 2014), pois os extratos destas espécies foram eficazes em aumentar o tempo de permanência dos animais submetidos a placa quente. No entanto, sabe-se que as propriedades farmacológicas de plantas medicinais estão diretamente relacionadas à sua composição química, a qual pode diferir significativamente entre as espécies de acordo com fatores genéticos e ambientais. Desta forma, pode-se inferir que o EAPC, nas condições testadas, não apresenta compostos capazes de desempenhar um efeito analgésico central.

3.4 Testes Toxicológicos

3.4.1 Análise do peso corporal

Durante os 21 dias de administração do EAPC na dose de 480 mg/kg, não foram observados quaisquer sinais de morbidade ou mortalidade. Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) nas variações de peso corporal entre os animais tratados com o extrato e os animais do grupo controle (figura 10).

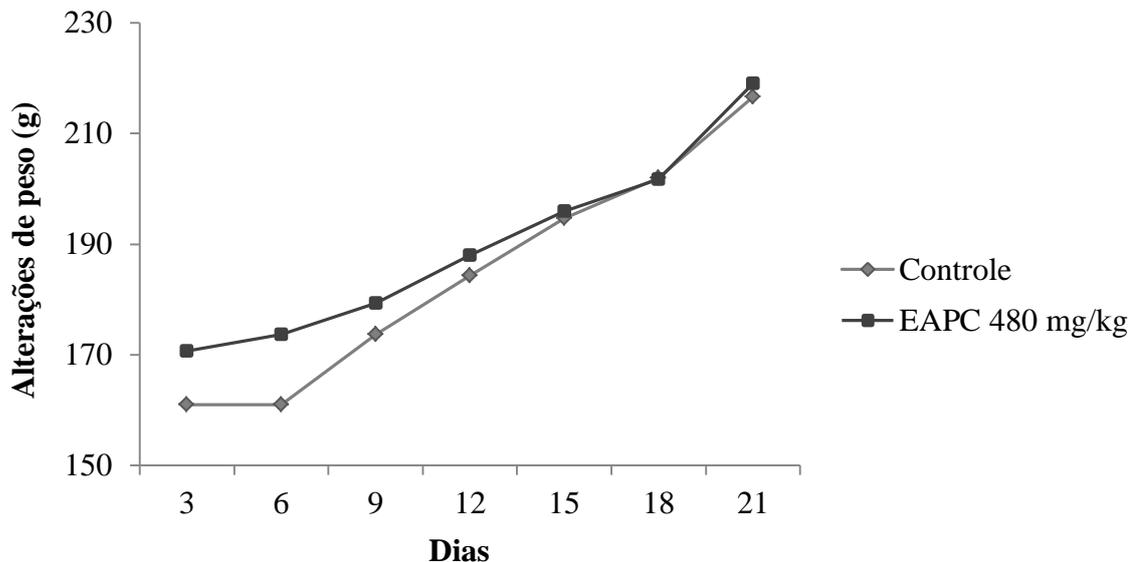


Figura 10: Alterações do peso corporal de ratos Wistar submetidos ao tratamento por 21 dias com o extrato aquoso de *Piper callosum*.

Alterações de peso são importantes indicadores de efeitos adversos das drogas e de produtos químicos em animais de laboratório (Amenia *et al.*, 2014). Segundo Ezeja *et al.* (2014), o comportamento geral dos animais e a avaliação do peso corporal representam parâmetros críticos para a avaliação dos primeiros sinais de toxicidade. O resultado deste parâmetro indica, portanto, que o EAPC na dose testada foi bem tolerado pelos animais.

3.4.2 Teste da barra giratória

O tratamento dos animais com o EAPC (480 mg/kg), tanto na administração aguda quanto na subcrônica, não alterou o tempo de permanência dos animais sobre a barra giratória, em comparação com o grupo controle (figuras 11 e 12), demonstrando assim que o EAPC nas condições testadas, não causou incoordenação motora nos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Estrada-Reyes *et al.* (2013), encontraram resultado semelhante para a espécie *P. auritum* Kunth, pois verificaram que o extrato aquoso desta

espécie, apesar de ter provocado efeito tipo-ansiolítico semelhante ao diazepam, não comprometeu a atividade locomotora dos animais.

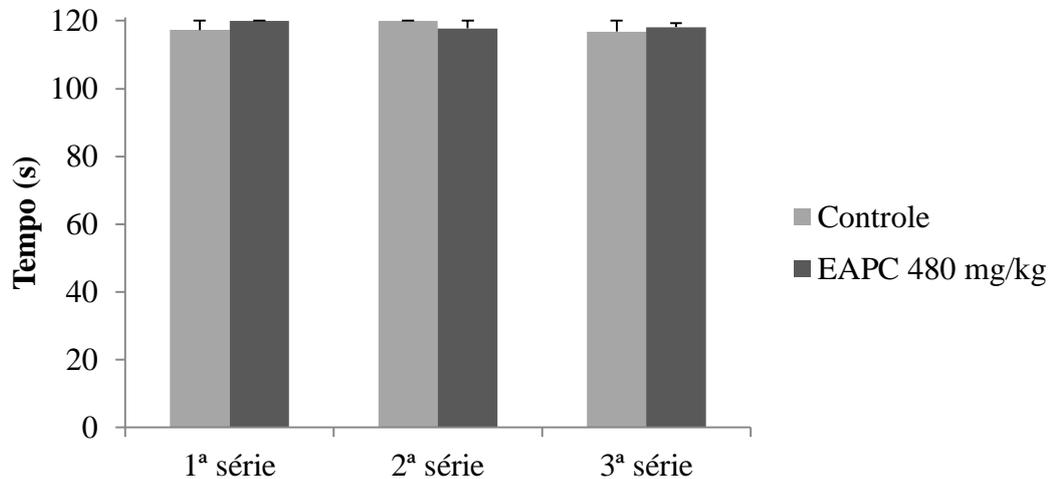


Figura 11: Efeito da administração aguda do extrato aquoso de *Piper callosum* no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da barra giratória. Os valores representam a média \pm erro padrão.

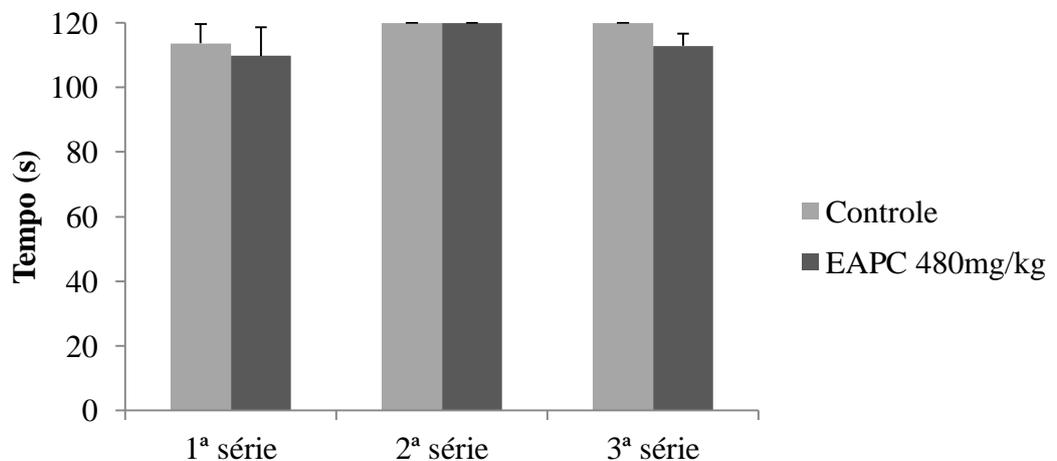


Figura 12: Efeito da administração subcrônica do extrato aquoso de *Piper callosum* no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da barra giratória. Os valores representam a média \pm erro padrão.

3.4.3 Teste do Campo Aberto

No teste do campo aberto diversos parâmetros podem ser analisados: dados como aumento do tempo despendido na parte central do campo é uma indicação de efeito ansiolítico ou sedativo, a locomoção aumentada é indicativo de um efeito estimulante, enquanto o número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e de levantar-se sobre as patas

traseiras (*rearing*) é relatado como sedação ou medo (ansiedade), a defecação do animal reflete seu índice de emocionalidade (Prut; Belzung, 2003).

Na tabela 04 estão sumarizados os resultados de cada parâmetro analisado neste teste. Tanto para o tratamento agudo quanto para o subcrônico, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) nos parâmetros analisados entre os animais do grupo controle e os animais tratados com o EAPC na dose de 480 mg/kg. Tais resultados descartam a ação do extrato na atividade locomotora dos animais, o que é corroborado pelos resultados obtidos no teste da barra giratória e demonstram que o mesmo não causa efeitos sedativos ou ansiogênicos.

Tabela 04: Efeito da administração aguda e subcrônica do extrato aquoso de *P. callosum* sobre ratos Wistar submetidos ao teste do campo aberto

Parâmetros	Controle (agudo)	EAPC 480 mg/kg (agudo)	Controle (subcrônico)	EAPC 480 mg/kg (subcrônico)
Nº Quadrantes percorridos	63,1±5,2	71,6±5,0	69,4±6,9	73,7±5,8
Tempo no centro (s)	10,1±2,4	9,4±1,7	8,3±3,5	10,3±4,8
Tempo na periferia (s)	589,9±2,4	590,6±1,7	591,7±3,5	588,0±4,8
Nº de autolimpeza	4,5±0,8	6,7±0,5	5,7±0,6	6,0±0,5
Nº de levantamentos	36,6±4,0	37,5±2,7	32,5±2,9	30,2±3,1
Nº Bolos fecais	3,5±0,9	4,5±0,8	2,1±0,5	3,1±0,8

Os valores representam a média ± erro padrão.

Lopes e colaboradores (2012), ao investigarem o efeito do extrato de *P. amalago* sobre o comportamento de ratos no teste do campo aberto, encontraram resultado semelhante, pois o mesmo não afetou a atividade locomotora dos animais. Porém, o extrato de *P. mikanianum*, na dose de 270 mg/kg, foi capaz de provocar uma diminuição no número de levantamentos e de quadrantes percorridos, indicando afetar a capacidade locomotora e exploratória dos animais.

3.4.4 Teste do Labirinto Aquático de Morris

Como mostrado na figura 13, o tratamento agudo e subcrônico dos animais com o EAPC (480 mg/kg) não comprometeu a memória espacial dos animais, pois os mesmos

tiveram um bom desempenho na memorização e localização da plataforma submersa durante a realização desta tarefa.

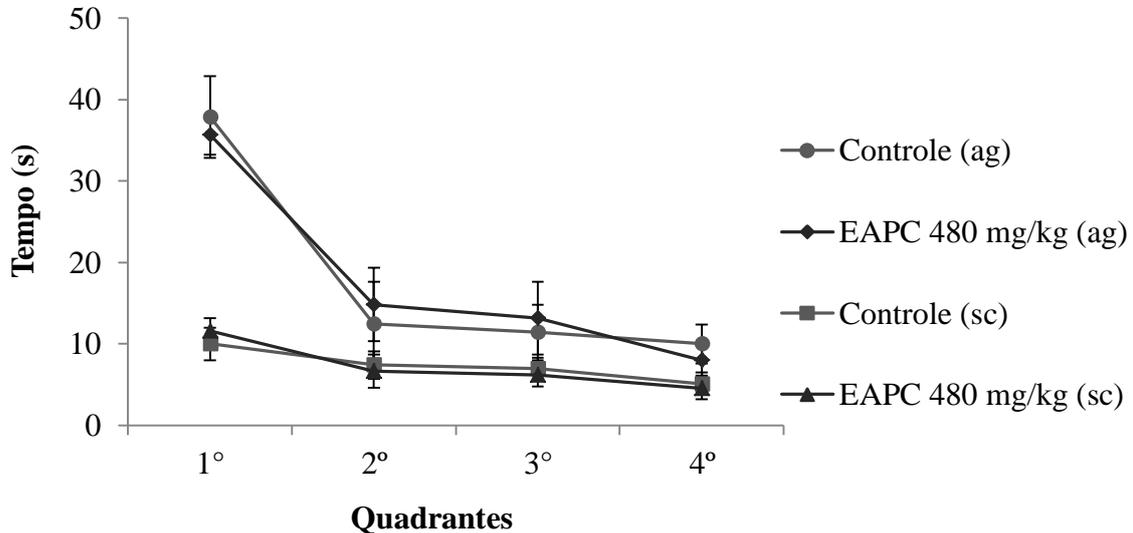


Figura 13: Efeito do tratamento agudo (ag) e subcrônico (sc) com extrato aquoso de *Piper callosum* em ratos Wistar no teste do labirinto aquático de Morris. Os valores representam a média \pm erro padrão.

Dickel e colaboradores (2010), ao avaliarem os efeitos neurotóxicos do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* G. Don (Solanaceae), administrado de forma aguda (um dia) e subcrônica (21 dias), encontraram resultado diferente, pois o tratamento por 21 dias consecutivos com o extrato aquoso desta espécie na dose de 300 mg/kg, provocou alterações significativas na evocação da memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris, indicando desta forma, que houve um prejuízo da memória nestes animais, o que não foi evidenciado para o tratamento agudo.

É bem conhecido que o hipocampo desempenha papel essencial no mecanismo de cognição, sendo fundamental para a localização espacial, como a requerida no teste do labirinto aquático de Morris (Lavenex; Lavenex, 2009). Além disso, muitos trabalhos demonstram que a atividade de algumas enzimas, tais como a acetilcolinesterase (AChE), também desempenham papel chave no processo de memória e aprendizagem (George; Grossberg, 2003; Giacobini, 2004; Calabria *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2013). Segal e colaboradores (1988), foram um dos primeiros pesquisadores a estudar a correlação entre a atividade desta enzima em cérebro de ratos e o desempenho em uma tarefa espacial. Tais pesquisadores verificaram que altos níveis de AChE em regiões cerebrais específicas, como o corpo estriado e o hipocampo, afetam significativamente a memória e o aprendizado, causando um desempenho ruim dos ratos no teste do labirinto aquático de Morris. Isto

acontece porque a AChE causa a hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor fundamental na regulação dos processos de memória e aprendizagem (Oh *et al.*, 2013).

Diante destes fatos, pode-se inferir que o EAPC na dose testada e, administrado tanto de forma aguda quanto subcrônica, não afeta a função hipocampal, bem como não compromete o sistema colinérgico. Olton e Markowska (1994) e Save e Poucet (2000), corroboram com o exposto, pois segundo estes autores o teste do labirinto aquático de Morris é um modelo muito adequado para avaliar a integridade da função do hipocampo.

3.4.5 Teste do labirinto em Y

Como pode ser observado na figura 14, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quanto ao percentual de alternância entre os animais do grupo controle e do grupo teste, demonstrando assim que o EAPC (480 mg/kg), administrado por 21 dias consecutivos, não afeta a memória espacial de curta duração dos animais.

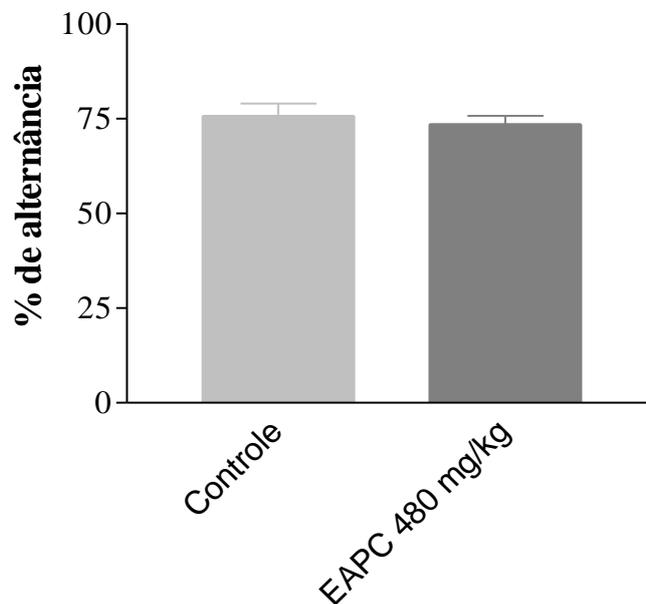


Figura 14: Efeito do tratamento subcrônico do EAPC no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste do labirinto em Y. EAPC = extrato aquoso de *Piper callosum*. Os valores representam a média ± erro padrão.

Modelos de comportamento espontâneo, como o labirinto Y, têm sido bastante utilizados para avaliação da memória espacial de curto prazo. Tem-se demonstrado que animais com lesões no córtex pré-frontal e no hipocampo apresentam baixos percentuais de alterações espontâneas (Lalonde, 2002). Além disso, alterações no sistema colinérgico, como

as induzidas por substâncias antagonistas da acetilcolina, a exemplo da escopolamina, também causam redução significativa no percentual de alternância dos animais submetidos ao teste do labirinto em Y (Oh *et al.*, 2013). Neste contexto, conclui-se que o EAPC, nas condições testadas, não comprometeu a integridade destas regiões neurais e não atua como um antagonista colinérgico.

3.4.6 Teste da Caixa Claro/Escuro

O tratamento agudo e subcrônico com o EAPC (480 mg/kg) não comprometeu a memória aversiva dos animais (figura 15), uma vez que estes aprenderam a evitar o choque, pois todos os animais avaliados não migraram para o compartimento escuro após o treino (realizado 24h antes da administração da 1ª dose).

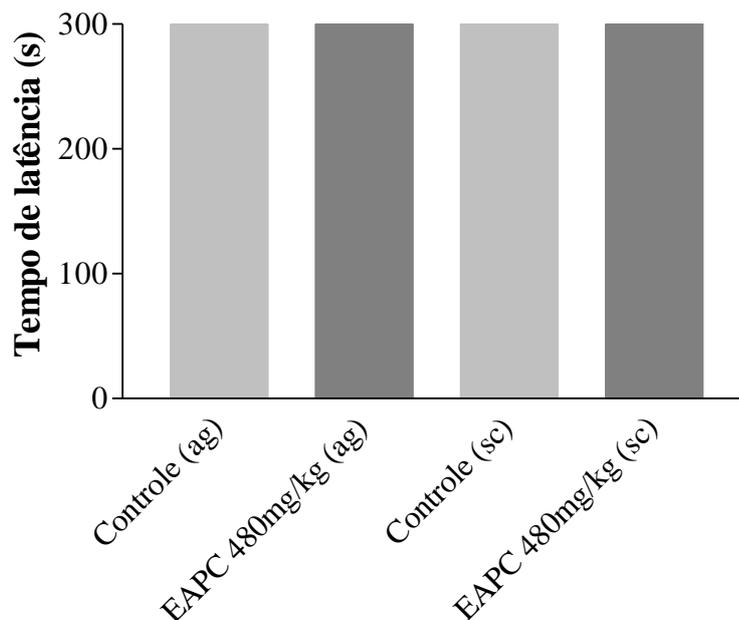


Figura 15: Efeito do tratamento agudo (ag) e subcrônico (sc) do extrato aquoso de *P. callosum* no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da caixa claro/escuro. Os valores representam a média \pm erro padrão.

É válido ressaltar que para avaliação do efeito do tratamento subcrônico (após a 21ª dose) do EAPC neste teste, não foi necessário condicionar os animais ao treino novamente, visto que nenhum animal, mesmo tendo realizado o treino somente na primeira dose, migrou para o compartimento escuro durante os 5 minutos de observação, indicando desta forma que não somente a memória aversiva de curto prazo foi preservada, mas também a memória de longa duração.

Muitos trabalhos demonstram que a amígdala é uma estrutura essencial para a formação e expressão do medo condicionado (Fendt; Fanselow, 1999; Ledoux, 2000; Maren, 2001; Kim; Jung, 2006). Apesar da amígdala está bem estabelecida na literatura como uma estrutura importante na formação da memória aversiva, outras estruturas encefálicas também desempenham papel importante neste tipo de memória, tais como o hipocampo (Kim; Fanselow, 1992; Phillips; LeDoux, 1992; Fanselow, 2000; Pang; Lu, 2004). Desta forma, pode-se sugerir que o EAPC, nas condições testadas, não comprometeu a integridade da função destas regiões neurais, a ponto de causar déficits de memória aversiva.

3.4.7 Avaliação da hepatotoxicidade

O tratamento por 21 dias consecutivos com o EAPC (480 mg/kg) não provocou diferenças significativas ($p > 0,05$) nos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), asparto aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) no soro de ratos Wistar, quando comparados com o grupo dos animais que receberam apenas água (tabela 04).

Tabela 04: Níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT), asparto aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) em soro de ratos Wistar

Tratamentos	Enzima ALT (U/mL)	Enzima AST (U/mL)	Enzima FA (U/L)
Controle	63,5±2,9	116,6±4,1	58,5±2,3
EAPC 480 mg/kg	68,1±1,2	114,8±3,8	59±1,7

EAPC = extrato aquoso de *Piper callosum*. Os valores estão expressos como média ± erro padrão.

O fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação de drogas. Os níveis séricos de algumas enzimas, como ALT, AST e FA são parâmetros valiosos utilizados como indicadores de doenças hepáticas (Kasmani *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Os aumentos nos níveis destas enzimas no soro estão associados com a toxicidade no fígado pelas drogas ou qualquer outra hepatotóxina (Ramaiah, 2011). Segundo Vijayalakshmi *et al.* (2000), uma droga não provoca dano algum ao fígado sem interferir com a atividade normal dessas enzimas.

Embora a enzima AST seja considerada um indicador de lesão hepática, a mesma não é tão específica para o fígado, uma vez que também está presente em outros órgãos, como coração, rins e pâncreas (Al-Habori, 2002; Ozer *et al.*, 2008). No entanto, a ALT é

primariamente limitada ao citosol dos hepatócitos, sendo, portanto, considerada um indicador altamente sensível para detecção de danos hepatocelulares (Al-Habori, 2002; Ramaiah, 2011). Em estudos pré-clínicos de rotina, ALT em combinação com AST são usados para confirmar a lesão hepatocelular (Ramaiah, 2011).

A fosfatase alcalina está presente na maior parte em células que revestem o ducto biliar do fígado e é utilizada para diagnosticar obstrução do sistema biliar (Ramaiah, 2007).

No presente estudo, a exposição dos animais ao EAPC (480 mg/kg) durante 21 dias não provocou um aumento significativo nos níveis destas enzimas, o que fornece evidências de que o extrato aquoso de *P. callosum* não é hepatotóxico. A ausência de hepatotoxicidade de potenciais agentes terapêuticos assume grande relevância, uma vez que danos hepáticos representam o maior obstáculo ao desenvolvimento de drogas, sendo a principal razão para a retirada de medicamentos do mercado (Ramaiah, 2007).

4. CONCLUSÕES

O extrato aquoso de *P. callosum* possui propriedade antiedematogênica, o que confirma o potencial terapêutico desta espécie e justifica em parte seu uso na medicina popular. Esta propriedade pode ser atribuída à presença de flavonoides. No entanto, mais investigações são necessárias para determinar os princípios ativos e estabelecer os mecanismos de ação envolvidos nessa atividade farmacológica.

A avaliação da atividade antinociceptiva mostrou que o EAPC, nas condições testadas, não apresenta efeito analgésico de ação central.

O tratamento por via oral com o EAPC, tanto agudo quanto subcrônico, não provocou alterações sobre a locomoção, memória e aprendizagem de ratos Wistar, demonstrando que o mesmo não causa efeitos neurotóxicos na dose testada.

Os resultados encontrados para os níveis das enzimas ALT, AST e FA no soro de ratos demonstram que o uso subcrônico do EAPC na dose de 480 mg/kg, não causa efeitos hepatotóxicos.

Os resultados indicam um potencial farmacológico do EAPC, o que justifica em parte o uso desta espécie na medicina popular. No entanto, são necessários novos estudos para conhecimento dos princípios ativos da espécie e dos seus possíveis mecanismos de ação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 209–217, 2002.
- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 310-322, 2001.
- AMENYA, H. Z.; GATHUMBI, P. K.; MBARIA, J. M.; THAIYAH, A. G.; THOITHI, G. N. Sub-acute toxicity of the chloroformic extract of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 593–599, 2014.
- ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia**. Belém: FEQ/UFGA, 2009. 448p.
- BAHAMONDE, S. M. A.; FLORES, M. L.; CÓRDOBA, O. L.; TAIRA, C. A.; GORZALCZANY, S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chiliotrichum diffusum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 699-705, 2013.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 896p.
- BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHON, J. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. **Phytochemistry**, v. 58, p. 865–874, 2001.
- BRASIL, **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 03 de maio de 2006a.
- BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de junho de 2006b.
- BROADHURST, P. L. Experiments in psycho genetics. Experiments in Personality. Londres: Routledge and Paul, 1960.
- BURGESS, N. The hippocampus, space, and viewpoints in episodic memory. **Journal of Experimental Psychology**, v. 55, n. 4, p. 1057–1080, 2002.
- CALABRIA, M.; GEROLDI, C.; LUSSIGNOLI, G.; SABBATINI, F.; ZANETTI, O. Efficacy of acetyl cholinesterase-inhibitor (ACHEI) treatment in Alzheimer's disease: A 21-month follow up "real world" study. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 49, p. 6-11, 2009.
- CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401–418, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CAREY, M. W.; RAO, N. V.; KUMAR, B. R.; MOHA, G. K. Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract of *Kigelia pinnata* DC flower. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 179–182, 2010.

CHAUDHARY, S.; PARVEZ, S. An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. **Neuroscience**, v. 225, p. 258-268, 2012.

CHEN, Y.; MAO, Y.; ZHOU, D.; HU, X.; WANG, J.; MA, Y. Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: Effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 212, p. 49-55, 2010.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 171–175, 2003.

CID, M. L. Síndrome de neurotoxicidad inducido por opioides (NIO). **Revista de la Sociedad Espanola del Dolor**, v. 8, p. 521-526, 2008.

CLOUATRE, D. L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v.150, n.1, p. 85-96, 2004.

COECKE, S.; ESKES, C.; GARTLON, J.; KINSNER, A.; PRICE, A.; VLIET, E.; PRIETO, P.; BOVERI, M.; BREMER, S.; ADLER, S.; PELLIZZER, C.; WENDEL, A.; HARTUNG, T. The value of alternative testing for neurotoxicity in the context of regulatory needs. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 153-167, 2006.

COROAD-ARTAL, F. J. Síndromes neurológicos asociados con el consumo de plantas y hongos con componente tóxico (I). Síndromes neurotóxicos por ingesta de plantas, semillas y frutos. **Revista de neurología**, v. 36, n.9, p. 860-871, 2003.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista virtual de química**, v. 1, p. 241-256, 2009.

CRAWLEY, J.N.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behavior**, v. 13, p. 167–170, 1980.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, S.; WIETZIKOSKI, E. C.; MIYOSHI, E.; FERRO, M. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; CANTERAS, N. S. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, p. 236–242, 2003.

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract *in vitro*. **Food Chemistry**, v.88, p. 219–224, 2004.

DENOBLE, V.J.; REPETTI, S.J.; GELPKE, L.W.; WOOD, L.M.; KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-

through passive avoidance response in rats. **Pharmacol Biochem Behavior**, v. 24, n.4, p. 1123-1128, 1986.

DICKEL, O. E.; AGUIAR, R. B.; GERACITANO, L.; MONSERRAT, J. M.; BARROS, D. M. Efeitos comportamentais e neurotóxicos do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* em ratos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 91, n.4, p. 189-99, 2010.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and Dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385–393, 1953.

EICHENBAUM, H. A cortical–hippocampal system for declarative memory. **Neuroscience**, v. 1, p. 41-50, 2000.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S.; CARVALHO, A. C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p. 77-83, 1995.

ESTRADA-REYES, R.; MARTÍNEZ-LAURRABAQUIO, A.; SUÁREZ, D. U.; ARAUJO-ESCALONA, A. G. Neuropharmacological studies of *Piper auritum* Kunth (Piperaceae): antinociceptive and anxiolytic-like effects. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n.23, p. 1718-1729, 2013.

EZEJA, M. I.; ANAGA, A. O.; ASUZU, I. U. Acute and sub-chronic toxicity profile of metanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1155–1164, 2014.

FACUNDO, V. A.; BÁLICO, L. J.; LIMA, D. K. S.; SANTOS, A. R. S.; MORAIS, S. M.; SILVA, G. V. J.; MILITÃO, J. S. L. T. Non-substituted B-ring flavonoids and an indole alkaloid from *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 206–208, 2012.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; FILHO, R. B. Flavonoides de *Piper callosum* da Amazônia. IN: Sociedade Brasileira de Química, 23ª Reunião Anual, 2000, Poços de caldas. **Anais da Sociedade Brasileira de Química**, 2000.

FACUNDO, V. A.; POLLLI, A. R.; RODRIGUES, R. V.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**, v. 38, v. 4 p. 733-742, 2008.

FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 110, p. 73-81, 2000.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 743-760, 1999.

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions**, v. 32, p. 283-288, 1991.

FLETCHER, D. Farmacología de los opioides. **EMC-Anestesia Reanimación**, v. 37, n.2, p. 1-24, 2011.

GALLAGHER, M.; NICOLLE, M. M. Animal models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. **Behavioural Brain Research**, v. 57, p. 155-162, 1993.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, p. 537–552, 2009.

GARCIA, J. B. S.; CARDOSO, M. G. M.; DOS-SANTOS, M. C. Opioids and the immune system: clinical relevance. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 62, n. 5, p. 709-718, 2012.

GAZZANIGA, M. S.; IVRY, R. B.; MANGUM, J. R. **Neurociência cognitiva: a biologia da mente**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 768p.

GEORGE, T.; GROSSBERG, M. D. Cholinesterase inhibitors for the treatment of alzheimer's disease: getting on and staying on. **Current Therapeutic Research**, v. 64, p. 216-235, 2003.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 433-440, 2004.

GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E. S. *Piperaceae*. 2010. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12735>>. Acesso em: 04 Mar. 2014.

HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MÜLLER, H.; REICHEL, F. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v.38, n.5, p.643-647, 1999.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed & Pharmacother**, v. 51, p. 305-310, 1997.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.88, n.4, p.706-716, 2001.

KASMANI, F. B.; TORSHIZI, M. A. K.; ALLAMEH, A.; SHARIATMADARI, F. A novel aflatoxin-binding *Bacillus* probiotic: Performance, sérum biochemistry, and immunological parameters in Japanese quail. **Poultry Science**, v. 91, p. 1846–1853, 2012.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, W. H.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229-245, 2004.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, p. 675-677, 1992.

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, p. 188–202, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Patologia básica**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 1028p.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.52, n. 4, p.498-512, 2002.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26. P. 94-101, 2002.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 247-262.

LAVENEX, P. B.; LAVENEX, P. Spatial memory and the monkey hippocampus: not all space is created equal. **Hippocampus**, v. 19, p.8–19, 2009.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews**, v. 2, p.787-795, 2002.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597–652, 2001.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155-184, 2000.

LI, A. A.; LEVINE, T. E.; BURNS, C. J.; ANGER, W. K. Integration of epidemiology and animal neurotoxicity data for risk assessment. **NeuroToxicology**, v.33 p. 823–832, 2012.

LIMA, D. K. S.; BALLICO, L. J.; LAPA, F. R.; GONÇALVES, L. M. S.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p. 274–282, 2012.

LIU, X.; CAO, P.; ZHANG, C.; XU, X.; ZHANG, M. Screening and analyzing potential hepatotoxic compounds in the ethanol extract of *Asteris Radix* by HPLC/DAD/ESI-MSn technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 68, p. 51–62, 2012.

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

MABBERLEY, D. J. **The plant book**. A portable dictionary of the vascular plants. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 858p.

MAGAJI, M. G.; ANUKA, J. A.; ABDU-AGUYE, I.; YARO, A. H.; HUSSAINI, I. M. Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Securinega virosa* (Euphorbiaceae) in experimental animal models. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, p. 039-044, 2008.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, v. 10, p. 200–204, 1987.

MANTO, M. Toxic agents causing cerebellar ataxias. **Hendb Clin Neurol**, v. 103, p. 201-213, 2012.

MAREN, S. Neurobiology of pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 897–931, 2001.

MARTINS, R. T.; ALMEIDA, D. B.; MONTEIRO, F. M. R.; KOWACS, P. A.; RAMINA, R. Opioid receptors to date. **Revista da dor**, v. 13, n. 1, p. 75-79, 2012.

MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, v. 78, p. 476 – 484, 2005.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428-435, 2008.

MENGUE, S. S; MENTZ, L. A.; SHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.11, p. 21-35, 2001.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os anti-inflamatórios não-esteroidais. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MONTGOMERY, K. C. The elevated plus-maze. **Pharmac. Methodol. Ethology Psychopharmacol.**, v. 53, n.1, p. 334–342, 1958.

MOOREA, N. D. In search of an ideal analgesic for common acute pain. **Acute Pain**, v. 11, p. 129-137, 2009.

MORRIS, M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47-60, 1984.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 61-66, 2006.

NASCIMENTO, J. C.; PAULA, V. F. Occurrence, biological activities and ^{13}C NMR data of amides from *piper* (piperaceae). **Química Nova**, v.35, n.11, p. 2288-2311, 2012.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E. L. S.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-25, 2001.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. p. 13-28.

ODONTUYA, G.; HOULT, J. R. S.; HOUGHTON, P. J. Structure-Activity Relationship for Antiinflammatory Effect of Luteolin and its Derived Glycosides. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 782–786, 2005.

OECD. Neurotoxicity Study in Rodents. 1997.

OH, S. R.; KIM, S. J.; KIM, D. H.; RYU, J. H.; AHN, E. M.; JUNG, J. W. *Angelica keiskei* ameliorates scopolamine-induced memory impairments in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 82–88, 2013.

OLIVEIRA, R. B.; NASCIMENTO, M. V. M.; VALADARES, M. C.; PAULA J. R.; COSTA, E. A.; CUNHA, L. C. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, 2008.

OLTON, D. S.; MARKOWSKA, A. L. Memory and hippocampal function as targets for neurotoxic substances. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 439-443, 1994.

OTTON, D. S. The use of animal models to evaluate the effects of neurotoxins on cognitive processes. **Neurobehavior Toxicol Teratol**, v. 5, n. 8, p. 635-640, 1993.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAWC, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245 p. 194–205, 2008.

PANG, P. T.; LU, B. Regulation of late-phases LTP and long-term memory in normal and ageing hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. **Ageing Research Reviews**, v.3, n. 4, p. 407-430, 2004.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n.4, p. 597-673, 1997.

PERAZA, G. G.; RODRIGUES, S. T.; MEDEIROS, S. H. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vittale**, v. 19, n.1, p. 35-44, 2007.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274-285, 1992.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45- 61, 2002.

PORTH, C. M.; SOMMER, C. Inflamação, reparo tecidual e cura de feridas. IN: PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 389-411.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, M. S.; RIAL, D.; WOPEREIS, S.; PEREIRA, V. S.; BOSSE, T. S.; SILVA, C. B.; CARRADORE, R. S.; MACHADO, M. S.; CHECHINEL-FILHO, V.; COSTA-CAMPOS, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 465– 73, 2008.

PRING, B. G. Isolation and identification of amidas from *Piper callosum*. Synthesis of pipercallosine and pipercallosidine. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, v. 1, p. 1493-1498, 1982.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; DIAS, T. L. M. F.; SOUZA, E. T.; MATTA, C. B. B.; AQUINO, A. B.; SILVA, L. H. A. C.; SILVA, D. J. C.; MELLA, E. A. C.; AGRA, M. F.; FILHO, J. M. B.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. A.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 377–383, 2010.

QUÍLEZ, A.; BERENGUERA, B.; GILARDONI, G.; SOUCCAR, C.; MENDONÇA, S.; OLIVEIRA, L. F. S.; MARTIN-CALERO, M. J.; VIDARI, G. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 583–589, 2010.

RABELO, A. S.; OLIVEIRA, I. D.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S; PRATA, A. P. N.; GELAIN, D. P.; VENCESLAU, E. M.; SANTOS, J. P. A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SANTOS, A. D. C.; NOGUEIRA, P. C. L.; COSTA, E.V.; MORAES, V. R. S.; ARAÚJO, A. A. S. Antinociceptive, anti-

inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 11–17, 2013.

RAHMAN, M. T. U.; SHILPI, J. A.; AHMED, M.; HOSSAIN, C. F. Preliminary pharmacological studies on *Piper chaba* stem bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 203–209, 2005.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1551–1557, 2007.

RAMAIAH, S. K. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31 p. 161–172, 2011.

RAMIREZ, J.; CARTUCHE, L.; MOROCHO, V.; AGUILAR, S.; MALAGON, O. Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 370-373, 2013.

RAPADO, L. N.; NAKANO, E.; OHLWEILER, E. P.; KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T. Molluscicidal and ovocidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of Helminthology**, v. 85, p. 66-72, 2011.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 8, p. 229-235, 2009.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**, v.16, n. 11, p.1267-1276, 2010.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 51-62, 2002.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; JOÃO GARCIA, B. S.; SAKATA, R. K. Pain: current aspects on peripheral and central sensitization. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

RODRÍGUEZ, N.; RODRÍGUEZ, M.; CALDERÓN, A. I.; FELICIANO, A. S.; SOLÍS, P. N.; GUPTA, M. P. Anesthetic activity of pipericallosine isolated from *Piper dariense*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 33, n. 2, p. 115-120, 2005.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F.; YEN, K. H.; SIRAT, H. M. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p.7720-7731, 2011.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-838, 1996.

SALVETTI, M. G. S.; PIMENTA, C. A. M. Dor crônica e a crença de auto-eficácia. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 41, n. 1, p. 135-40, 2007.

SANZ-BISET, J.; CANIGUERAL, S. Plants as medicinal stressors, the case of depurative practices in Chazuta valley (Peruvian Amazonia). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, 67-76, 2013.

SAVE, E.; POU CET, B. Involvement of the hippocampus and associative parietal cortex in the use of proximal and distal landmarks for navigation. **Behavioural Brain Research**, v. 109: p. 195-206, 2000.

SEGAL, M.; GREENBERGER, V.; ISRAELI, M.; BIEGON, A. A correlation between regional acetylcholinesterase activity in rat brain and performance in a spatial task. **Behavioural Brain Research**, v. 30, p. 215-219, 1988.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, R. D.; BARONI, S.; SVIDIZINSKI, A. E.; BERSANI-AMADO, C. A.; CORTEZ, D. A. G. Anti-inflammatory activity of the extracts, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl. (Piperaceae). **Journal Ethnopharmacology**, v. 116, p. 569-573, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, 1325p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: A necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n.1, p. 35-40, 2002.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Natura Reviews**, v.10, p.427-439, 2010.

SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Insecticidal Activity of *Piper* Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 510-517, 2012.

STICKEL, F.; BAUMULLER, H. M.; SEITZ, K.; VASILAKIS, D.; SEITZ, G.; SEITZ, H. K. Hepatitis induced by Kava (*Piper methysticum* rhizoma). **Journal of hepatology**, v. 39, n.1, p. 62-7, 2003.

STICKEL F.; SEITZ H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public Health Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 501-8, 2000.

TASLEEM, F.; IAZHAR, I.; ALI, S. N.; PERVEEN, S.; MAHMOOD, Z. A. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**, v. 7, p. 461-468, 2014.

TILSON, H. A. Behavioral índices of neurotoxicity: what can be measured?. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 9, p. 427-443, 1987.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; PHANSA, P.; POOTAENG-ON, Y.; TAYLOR, W. C. Chemical Constituents of the Roots of *Piper Sarmentosum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n.2, p.149-151, 2006.

VAJJA, B. N. L.; JULURI, S.; KUMARI, M.; KOLE, L.; CHAKRABARTI, R.; JOSHI, V. D. Lipopolysaccharide – induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 901-909, 2004.

VEIGA JÚNIOR, V. F; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JÚNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VIEIRA, S. C. H.; PAULO, L. F.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, A. YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* kunth (Piperaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1001-1006, 2011.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug–milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 9–15, 2000.

VORHESS, C. V. Reability, sensibility and validity of bahavioral índices of neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 9, p. 445-464, 1987.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer Chromatografy Atla**. 2^a ed. Berlin: Springer, 1996.

WANG, Y.; CHEN, P.; TANG, C.; WANG, Y.; YAZHEN, L.; ZHANG, H. Antinociceptive and anti-inflammatory of extracts and two isolates flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 944-950, 2014.

WEISS, B. Quantitative perspectives on behavioral toxicology. **Toxicol Left**, v. 43, p. 285-293, 1988.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenin-induced edema in haind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544– 547, 1962.

XU, Q.; WANG, Y.; GUO, S.; SHEN, Z.; WANG, Y.; YANG, L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 540–545, 2014.

XUE, L. M.; ZHANG, Q. YHAN, P.; JIANG, Y. P.; YAN, R. D.; WANG, Y.; RAHMAN, K.; JIA, M.; HAN, T.; QIN, L. P. Hepatotoxic constituents and toxicological mechanism of *Xanthium strumarium* L. fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 272–282, 2014.

ZAKARIA, Z. A.; PATAHUDDIN, H.; MOHAMAD, A. S.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 42–48, 2010.

6. ANEXO

ANEXO A – Autorização do comitê de ética para uso de animais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação Farmacológica e Toxicológica de *Piper Callosum Ruiz & Pavon (Piperaceae)***”, protocolado sob o número Nº 03005/2014, utilizando Camundongo heterogênico e Rato heterogênico, sob a responsabilidade da professora Dra. **Ricardo Bezerra de Oliveira**, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém, 18 de junho de 2014.



Antonio F. J. Moreira
PRESIDENTE CEUA - UFOPA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA

Antonio Humberto Romão Minervino
 Presidente da Comissão de Ética
 no Uso de Animais - CEUA/UFOPA
 Port. nº 15, de 11/01/2013

CEUA/UFOPA Instituída pela portaria nº 15 de 11 de janeiro de 2013 e credenciada junto ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Deferimento publicado no Diário oficial da União Nº 187, 26 de setembro de 2013. CIAEP: 01.0065.2013