

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

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum* em modelos experimentais

ARMANDO JORGE JUNIOR

**Dourados - MS
2019**

ARMANDO JORGE JUNIOR

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum* em modelos experimentais

Área do CNPq: Ciências da Saúde.

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

Área de concentração: Farmacologia.

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

Dourados - MS
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

J82a Jorge Junior, Armando

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de Piper vicosanum em modelos experimentais [recurso eletrônico] / Armando Jorge Junior. -- 2019. Arquivo em formato pdf.

Orientador: Cândida Aparecida Leite Kassuya.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Piper vicosanum. 2. . 3. migração de leucócitos. 4. . 5. nocicepção. 6. . 7. inflamação. I. Kassuya, Cândida Aparecida Leite. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ATA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO DO DISCENTE ARMANDO JORGE JUNIOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE REALIZADA EM 20 DE FEVEREIRO DE DOIS MIL E DEZENOVE (20/02/2019).

Aos vinte dias de fevereiro de dois mil e dezenove as 08h, em sessão pública, realizou-se na Sala de Videoconferência da Biblioteca do Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Exame de Qualificação intitulada "Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum* em modelos de inflamação" apresentada pelo mestrando ARMANDO JORGE JUNIOR, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya/UFGD (presidente/orientador), Profa. Dra. Arielle Cristina Arena/UFGD (membro titular), Profa. Dra. Joyce Alencar Santos Radai/UFGD (membro titular) e Dr. Jonas da Silva Mota/UEMS (membro suplente). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Qualificação. Após o candidato ter apresentado a sua Qualificação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Apresentação, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido o candidato considerado APROVADO. Os membros da banca abaixo assinados atestam que o Profa. Dra. Arielle Cristina Arena participou de forma remota desta defesa de dissertação, considerando o candidato APROVADO conforme declaração anexa. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados, 20 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

Profa. Dra. Joyce Alencar Santos Radai

Profa. Dra. Arielle Cristina Arena _____ - Participação Remota

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA EM: __/__/__, PELA PROPP/ UFGD.

Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa
Assinatura e Carimbo



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

UFGD
Universidade Federal
da Grande Dourados

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM: CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA - SÍNCRONA - EM BANCA DE DEFESA DE
MESTRADO/ UFGD**

Às 13h do dia vinte e nove de março de dois mil e dezenove (29/03/2019), participei de forma síncrona com os demais membros que assinam a ata física deste ato público, da Banca de Defesa de Mestrado intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum* em modelos de inflamação" do discente ARMANDO JORGE JUNIOR, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Considerando o trabalho avaliado, as arguições de todos os membros da banca e as respostas dadas pelo candidato, formalizo para fins de registro, por meio deste, minha decisão de que o candidato pode ser considerado: APROVADO.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Arielle Cristina Arena

Instituição e Programa de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada esposa, Juliana Teixeira Oshiro, aos meus pais, Armando Jorge de Souza e Fatima Albertina Jorge da Costa, às minhas irmãs, Monique Jorge de Souza Garcia e Amanda Jorge de Souza Stefanello, à minha avó, Maria de Lourdes Bringel (*in memorian*) e a meus segundos pais, Ivani e Masanori.

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço primeiramente a Deus, “*que sustenta com vida a nossa alma, e não consente que sejam abalados os nossos pés*” (Salmos 66:9), que me concedeu saúde, força e foco para conquistar este feito em minha vida.

Esta conquista tornou-se possível pelo apoio incondicional que tive de pessoas maravilhosas que me rodeiam e que ao longo desta trajetória foram imprescindíveis, aos quais gostaria de deixar aqui registrados meus sinceros agradecimentos.

À minha esposa, Juliana Teixeira Oshiro, que sempre mostrou compreensão nos momentos mais difíceis em que fraquejei e considerei desistir desta caminhada, mas seu apoio foi pra mim prova do amor, sapiência, cuidado e acima de tudo, por acreditar que eu seria capaz de concluir, quando nem mesmo eu acreditei. Sou imensamente grato por tudo isso, sei que este aprendizado foi mutuo e veio por fortalecer nosso enlace e me faz, cada vez mais, te admirar e amar.

À minha orientadora, Prof^a. Cândida Aparecida Leite Kassuya, que acreditou em mim e em minha motivação em alcançar este sonho, sendo sempre companheira, resiliente, direcionando e orientando, oportunizando que minha evolução acadêmica, profissional e pessoal fosse a melhor possível. Além disso, sou grato pela amizade que construímos ao longo destes anos, sendo uma pessoa exemplar, dona de uma motivação e dedicação sem iguais. Pessoa ímpar em minha vida.

À minha mãe, Fatima Albertina Jorge da Costa, que é meu exemplo de caráter e dedicação à família, e ao meu Pai, Armando Jorge de Souza, exemplo de dedicação e de que devemos ter foco em tudo o que fazemos.

À minha avó, Maria de Lourdes Bringel (*in memoriam*), tendo em vista que ao longo desta trajetória ela foi morar com Deus, sendo responsável por importantes memórias da minha infância e de alguém que dedicou sua vida inteiramente à família e que sempre me motivou à busca de conhecimento.

Aos meus gestores do HU-UFGD, Dra Mariana Croda, Dr. José Flávio Sette de Souza, Dr. Ricardo do Carmo Filho e em especial à Dra. Renata Maronna Praça, amiga, e motivadora, que fez com que eu ingressasse nesta jornada de desenvolvimento acadêmico.

Aos meus colegas de trabalho do HU-UFGD, em especial à Laura Priscila Toledo Bernal, Cléber Massato Toda, Ana Paula Paula dos Santos e Jorge Paulo Sales de

Almeida, pois sem a compreensão e apoio destes, acredito que não teria conseguido a realização deste feito.

Aos colegas do meu grupo de pesquisa, especialmente Laura Priscila Toledo Bernal, Maicon Matos Leitão, Saulo Euclides Silva Filho, Roberto Mikio Kassuya, Angela Midori Kuraoka de Oliveira, Lidiane Schultz Branquinho e Joyce Alencar Santos Radai, todos foram importantes neste caminhar, com troca de conhecimentos, ajuda nos experimentos e pela força nos momentos difíceis, mas necessários, ao meu aprendizado.

À CAPES e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE*

*“Se quiseres conhecer
uma pessoa, não lhe
pergunte o que pensa, mas
sim o que ama”.*

(Santo Agostinho)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Arbusto de <i>Piper vicosanum</i>	13
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIEs: Anti-inflamatórios esteroidais;

AINEs: Anti-inflamatórios não-esteroidais;

AMPA: α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico;

ANOVA: Análise de Variância;

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais;

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

COX-1: Cicloxigenase-1;

COX-2: Cicloxigenase-2;

DAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos;

DDMS: Depositado no Herbário da Cidade de Dourados;

EEPV: Extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum*;

EROs: Espécies reativas de oxigênio;

FCS: Faculdade de Ciências da Saúde;

FUNDECT: Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul;

GC: Glicocorticoides;

GCR: Receptor glicocorticoide citosólico;

GM-CSF: Fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófagos;

GR: Receptor de glicocorticoide;

i.a.: Injeção por via intra-articular;

i.p.: Injeção por via intraperitoneal;

i.pl: Injeção por via intrapleural;

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular I;

IL-1 β : Interleucina-1 β ;

IL-1Ra6: Interleucina-1Ra6;

IL-6: Interleucina-6;

IL-8: Interleucina-8;

IL-10: Interleucina-10;

IL-17: Interleucina-17;

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível;

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno;

MPO: Mieloperoxidase;

NF- κ B: Fator Nuclear kappa B;

NMDA: N-metil-D-Aspartato;

NO: Óxido Nítrico;

OMS: Organização Mundial de Saúde;

p38-MAPK: p38 proteína quinase ativada por mitógeno;

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos;

PBS-EDTA: Solução fosfato salina associado à etilenodiaminotetracético;

PGE₂: Prostaglandina do tipo E₂;

PK-A: Proteína quinase-A;

PK-C: Proteína quinase-C

PMN: Polimorfonucleares;

PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares;

PNPMF: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos;

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde;

s.c.: Injeção por via subcutânea;

SUS: Sistema Único de Saúde;

TGF- β : Fator de crescimento transformador beta;

TLR: Receptor toll-like;

TLR-1: Receptor toll-like do tipo 1;

TLR-2: Receptor toll-like do tipo 2;

TLR-6: Receptor toll-like do tipo 6;

TNF: Fator de Necrose Tumoral;

TRPV1: Receptor transitório vanilóide-1;

UFGD: Universidade Federal da Grande Dourados;

VCAM-1: Molécula de adesão vascular 1;

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Piper vicosanum* EM MODELOS EXPERIMENTAIS

RESUMO

Piper vicosanum é uma planta pertencente ao gênero *Piper*, utilizada na medicina popular como diurético, analgésico e anti-inflamatório. Na literatura, há relato da atividade anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *Piper vicosanum*, no entanto, ainda não há trabalhos avaliando o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum*. Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum* (EEPV) em modelos experimentais em camundongos. Para tanto, o EEPV foi testado por via oral em doses que variam de 100 a 700 mg/kg em modelo de pleurisia e na microcirculação do leito mesentérico *in situ*, induzidos por carragenina. Além disso, o EEPV foi testado por via oral na dose de 700 mg/kg nos modelos de artrite e peritonite induzidos por zymosan. Também foram realizados testes de nocicepção com injeção intraplantar de formalina e contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, onde os animais foram tratados com EEPV nas doses de 300 e 700 mg/kg. O EEPV foi capaz de inibir em 26 % (na dose 700 mg/kg) a migração de leucócitos para a pleura induzida pela carragenina. Do mesmo modo, reduziu o rolamento e adesão de leucócitos no modelo de microcirculação *in situ* (na dose 300 mg/kg) em 48,48 % e 48,20 %, respectivamente. Nos modelos de artrite e peritonite induzidos por zymosan, o tratamento com EEPV (na dose de 700 mg/kg) reduziu o recrutamento de leucócitos em 40 % e 41 %, respectivamente. Na análise antinociceptiva, EEPV exibiu atividade dose dependente (doses 300 e 700 mg/kg) nos modelos de injeção intraplantar de formalina e de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético. Nossos resultados demonstraram pela primeira vez o potencial terapêutico do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum*.

Palavras-chaves: *Piper vicosanum*; migração de leucócitos; nocicepção; inflamação;

EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF *Piper vicosanum* LEAVES IN EXPERIMENTAL MODELS

ABSTRACT

Piper vicosanum is a plant belonging to the genus *Piper*, used in folk medicine as a diuretic, analgesic and anti-inflammatory. In the literature, there is a report of the anti-inflammatory activity of the essential oil of *Piper vicosanum* leaves, however, there are still no studies evaluating the anti-inflammatory effect of the ethanolic extract of the leaves of *Piper vicosanum*. Thus, the objective of the present study was to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive effect of the ethanolic extract of the leaves of *Piper vicosanum* (EEPV) in experimental models in mice. For this, the EEPV was orally tested at doses ranging from 100 to 700 mg / kg in the pleurisy model and carrageenin-induced *in situ* mesenteric bed microcirculation. In addition, EEPV was orally tested at a dose of 700 mg / kg in zymosan-induced arthritis and peritonitis models. Nociceptive tests with intraplantar formalin injection and abdominal contortions induced by acetic acid were also performed, where the animals were treated with EEPV at doses of 300 and 700 mg / kg. EEPV was able to inhibit the migration of leukocytes to the pleura induced by carrageenin in 26% (at the dose 700 mg / kg). Likewise, it reduced the bearing and adhesion of leukocytes in the *in situ* microcirculation model (at 300 mg / kg dose) in 48.48% and 48.20%, respectively. In zymosan-induced arthritis and peritonitis models, treatment with EEPV (at the dose of 700 mg / kg) reduced leukocyte recruitment by 40% and 41%, respectively. In the antinociceptive analysis, EEPV showed dose-dependent activity (doses 300 and 700 mg / kg) in the models of intraplantar injection of formalin and of abdominal writhings induced by acetic acid. Our results demonstrated for the first time the therapeutic potential of the ethanolic extract of *Piper vicosanum* leaves.

Keywords: *Piper vicosanum*; leukocyte migration; nociception; inflammation;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Plantas medicinais e o gênero Piper	11
2.3 Inflamação	13
2.4 Anti-inflamatórios	15
2.4.1 Fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).....	15
2.4.2 Fármacos glicocorticoides (GC).....	16
2.5 Modelos de inflamação.....	16
2.5.1 Pleurisia induzida por carragenina	16
2.5.2 Nocicepção induzida pela formalina	17
2.5.3 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	17
2.5.4 Peritonite induzida por zymosan	18
2.5.5 Artrite induzida por zymosan	18
2.5.6 Microcirculação mesentérica <i>in situ</i>	18
3 OBJETIVOS	19
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
5 APÊNDICES	28
5.1 Artigo: Nutritional Neuroscience (Qualis B1).....	28
6 ANEXOS	50
6.1 Parecer de aprovação do comitê de ética.....	50
6.2 Certidão do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).....	51

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, sobretudo no tocante a espécies vegetais (Leão, 2007). Apoiado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Who, 2002), quanto à difusão e valorização das plantas medicinais na atenção básica de saúde, o Brasil instituiu em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (Brasil, 2006c) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (Brasil, 2006a). Em 2009, o Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos divulgou a 1ª Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Renuis) (Brasil, 2009). Estes marcos regulatórios ampliaram o número de municípios que disponibilizam fitoterápicos na atenção primária de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS) em três vezes (Antonio *et al.*, 2014).

Produtos naturais de origem vegetal com atividade anti-inflamatória são considerados uma fonte importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, podendo minimizar os eventos adversos, quando comparado a medicamentos de uso convencional (Ribeiro *et al.*, 2018). O uso de fármacos com potencial anti-inflamatório é de fundamental importância nos tratamentos iniciais de doenças inflamatórias, tal como a artrite reumatóide, no sentido de promover o alívio da dor decorrente do processo inflamatório na capsula articular (Gegout *et al.*, 1995). Além disso, e com base no uso popular, a busca por diferentes princípios ativos com potencial anti-inflamatório é fundamental (Silva *et al.*, 2013; Carlino *et al.*, 2014) destacando-se plantas pertencentes ao gênero Piper.

Dentre alguns gêneros de plantas medicinais, o gênero Piper possui espécies com importância medicinal (Di Stasi, 2002) e ornamental (Judd, 2009), dentre estes destaca-se *Piper nigrum* L., popularmente conhecida como “pimenta-do-reino” (Semple, 1974). Apesar de alguns representantes amplamente conhecidos, algumas espécies seguem com poucos estudos relatados na literatura, como é o caso da *Piper vicosanum*.

Piper vicosanum foi relatada pela primeira vez em 1966 em Viçosa - Minas Gerais (Carvalho-Okano e Alves, 1998) e sua descrição de composição botânica em 1972 (Yuncker, 1972; Carvalho-Okano e Alves, 1998), sendo posteriormente relatada como espécie endêmica em regiões da mata atlântica brasileira (Geran Ri, 1972). Apesar de não haverem relatos quanto ao uso popular da espécie *Piper vicosanum*, outras espécies do gênero Piper com características botânicas similares são comumente utilizadas na medicina popular. A partir do conhecimento da composição particular do óleo essencial de *Piper vicosanum*, sobretudo quanto à presença de compostos monoterpênicos, o presente trabalho realizou a avaliação da

atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum* em modelos experimentais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais e o gênero *Piper*

Mesmo com o avanço tecnológico que permitiu o desenvolvimento da medicina, populações de países em desenvolvimento permanecem dependentes em até 80% de práticas tradicionais para cuidados primários de saúde e destas, 85% fazem uso de drogas vegetais ou fitoterápicos (Brasil, 2016; Wolkerstorfer *et al.*, 2016). Tal limitação de acesso se deve à insuficiência de recursos financeiros para obtenção de medicamentos (Matias *et al.*, 2013).

Neste contexto, como forma de melhoria das necessidades de saúde pública e após a década de 90, no Brasil, com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), houve a progressão de políticas e diretrizes nacionais para a ampliação da oferta de práticas complementares no cuidado primário de saúde (Brasil, 2006a; b; 2008; 2009; 2016). Além disso, a integração de plantas medicinais (droga vegetal e fitoterápico) às políticas públicas permite a ampliação do arsenal terapêutico, renovação do conhecimento popular, preservação ecológica e incentivo à agricultura familiar (Rahman *et al.*, 2004; Antonio *et al.*, 2013).

No município de Dourados-MS, foi feita a identificação das espécies mais utilizadas na medicina popular, estando as pertencentes à família Piperaceae (10,8%) dentre as mais utilizadas (Alves *et al.*, 2008). Sendo *P. alduncum*, *P. amalago* e *P. umbellata* as espécies de *Piper* relatadas, utilizadas na forma de infusão das folhas no tratamento de queimaduras e de problemas gástricos, além de finalidades analgésica e anestésica (Alves *et al.*, 2008).

A família Piperaceae apresenta 5 gêneros, com mais de 3500 espécies de plantas no mundo (Yang e Chen, 2017), sendo muitas espécies desta família largamente conhecidas por sua aplicação na medicina popular (Mesquita *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). Dentre os diferentes gêneros, estão plantas que compõem o gênero *Piper*, constituído por cerca de 2000 espécies (Prando *et al.*, 2014).

Espécies de *Piper* são popularmente conhecidas como “pimenta”, “pariparobacaapeba” e “falso jaborandi” (Kato e Furlan, 2007), além disso, algumas espécies de *Piper* possuem fins comerciais na produção de pimenta, dado o teor oleífero, possuindo também finalidade medicinal, dentre outras (Junqueira *et al.*, 2007; Kato e Furlan, 2007). A espécie de *Piper* mais conhecida é a *Piper nigrum* (pimenta do reino), utilizada popularmente como

condimento alimentício (Gutierrez *et al.*, 2013), com propriedades terapêuticas, demonstrando atividades analgésica e anti-inflamatória (Tasleem *et al.*, 2014).

No tocante ao uso popular, espécies de *Piper* possuem aplicações medicinais como emolientes, antirreumáticos, diuréticos, estimulantes, abortivos, anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antidermatofíticos (Gutierrez *et al.*, 2013), antitumorais (Arroyo-Acevedo *et al.*, 2015; Sanubol *et al.*, 2017) e antiparasitários (Prando *et al.*, 2014). As folhas e frutos são as principais partes utilizadas na forma de infusão ou decocção (Gutierrez *et al.*, 2013). Análises fitoquímicas de diferentes espécies do gênero *Piper* evidenciaram a presença de alcalóides, amidas, lignanas, neolignanas e terpenos (Parmar *et al.*, 1997; Hoff Brait *et al.*, 2015; Bernuci *et al.*, 2016), sendo que diferentes substâncias presentes na composição fitoquímica de espécies de *Piper* são atribuídas atividade sobre mediadores inflamatórios, como TNF, IL-1 β , IL-6, PGE₂ (Wang-Sheng *et al.*, 2017) e NF- κ B (Nandakumar *et al.*, 2017; Soutar *et al.*, 2017; Wang-Sheng *et al.*, 2017).

Piper vicosanum é um arbusto, monopodial, com folhas e ramos glabros, apresentando espigas eretas e curtas; flores monoclinas e desprovidas de perianto, com ovário súpero, uniovar e frutos drupáceos. Costuma crescer sob a sombra de outras árvores e troncos (Geran Ri, 1972; Hoff Brait *et al.*, 2015). Esta espécie de *Piper* ainda pouco estudada, mas apresenta características medicinais importantes. A composição do óleo essencial de *Piper vicosanum* coletado no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil, foi descrita por cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massas, tendo a constituição do óleo principalmente limoleno (45,5%), α -pineno (6,1%), piperitona (3,4%), beta-cariofileno (1,4%), α -selineno (3,2%), delta-cadineno (2,2%), espatulenol (0,3%), óxido de cariofileno (0,4%), B-pineno (0,2%) e vestígios de Linalol e Germacreno D, evidenciando composição distinta de outras espécies de *Piper* encontradas nas Américas, central e do norte (Mesquita *et al.*, 2006). O óleo das folhas da *Piper vicosanum* apresenta atividade anti-inflamatória que pode estar associada a diversos compostos como limoneno, Y-elemene e (alfa)-alaskene (Hoff Brait *et al.*, 2015). O óleo das folhas de *Piper vicosanum* não apresenta toxicidade aguda ou genotoxicidade (Gutierrez *et al.*, 2013; Hoff Brait *et al.*, 2015).

Análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum* (EEPV), foi descrito com presença de alcalóides, compostos fenólicos, taninos, esteróides e triterpenóides (Oesterreich *et al.*, 2015). Apesar disso, estudos sobre a *Piper vicosanum* (figura 1) seguem com poucos relatos na literatura em modelos experimentais de inflamação e nocicepção.



Figura 1: Arbusto de *Piper vicosanum* (Silva, 2013).

2.3 Inflamação

Inflamação é um processo biológico de identificação, regulação, contenção e reparação do dano tecidual (Vodovotz *et al.*, 2008; Oliveira Júnior *et al.*, 2016), caracteriza-se como fenômeno complexo, ativado por meio da imunidade inata, humoral e celular, em resposta à injúria tecidual, processo infeccioso ou exposição a contaminantes (Andrade *et al.*, 2007). Esse processo apresenta sinais clínicos característicos, tais como dor, calor, edema, rubor e perda de função (Lon *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do processo inflamatório envolve diferentes tipos celulares e mediadores inflamatórios, de modo que a sinalização por meio de segundos mensageiros e proteínas plasmáticas permite o envolvimento coordenado e eficaz destas células (Mulla *et al.*, 2010). Em função de diferenças marcantes, o processo inflamatório é classificado em duas fases, aguda e crônica. Na fase inicial, aguda, com duração de poucas horas à alguns dias, ocorre à formação de edema, com presença de exsudato e migração de células, principalmente neutrófilos. Já a segunda fase, crônica, dura vários dias a meses. Destaca-se que na resposta aguda, há somente ativação da resposta imune inata. Já na fase crônica há resposta imunológica adaptativa e ativação da imunidade humoral e celular (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

Na fase aguda, a injúria é percebida por mastócitos ou macrófagos presentes nos tecidos por meio do reconhecimento de receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMPs), que liberam aminas pré-formadas e ativam citocinas pró-inflamatórias e eicosanoides. Estas substâncias amplificam o sinal químico e aumentam a permeabilidade vascular, levando a formação do edema e recrutamento de leucócitos (Headland e Norling, 2015).

O influxo de neutrófilos ocorre por meio de proteínas transmembrana, selectinas e intreginas, que permitem o rolamento e a adesão dos neutrófilos ao longo do endotélio inflamado (Diaz-Gonzalez *et al.*, 1995). Ao final da fase aguda e início da fase crônica, há migração de monócitos, que se diferenciam em macrófagos nos tecidos e iniciam a remoção de restos celulares, dando início à fase de resolução do processo inflamatório (Freire e Van Dyke, 2013; Weinstock e Fisher, 2019).

Com a sinalização de neutrófilos, há liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que prolongam o tempo de vida de neutrófilos e permitem a quimiotaxia de macrófagos. As principais citocinas liberadas são a interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral (TNF). Além disso, há secreção de fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófagos (GM-CSF) e mieloperoxidase (MPO) (Oliveira *et al.*, 2011).

Ocorre ainda intensa migração celular que leva à degranulação e *burst* oxidativo de neutrófilos, com intensa produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), exercendo um importante mecanismo para morte do agente invasor (Kaulmann e Bohn, 2014). A migração de macrófagos, mediada pela presença de quimiocinas, citocinas e eicosanoides, ativa fatores de transcrição responsáveis pela liberação de cicloxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), quimiocinas e citocinas (Kaulmann e Bohn, 2014; Song *et al.*, 2019).

A ação da fosfolipase-A₂ resulta na formação de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos, a partir da metabolização pela enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2) (Hohjoh *et al.*, 2014). A COX-1 é constitutiva e possui ação fisiológica citoprotetora sobre a mucosa gástrica, manutenção da homeostase renal e agregação plaquetária. Já COX-2, é frequentemente referida como isoforma induzida, envolvida na produção de prostaglandinas durante o processo inflamatório. Além do envolvimento em processos inflamatórios, a COX-2 também está relacionada com o crescimento e formação tumoral (Silva *et al.*, 2017).

A prostaglandina E₂ (PGE₂) é o principal prostanóide pró-inflamatório envolvido na hipersensibilidade dolorosa, periférica e central (Hohjoh *et al.*, 2014). A sensibilização de nervos aferentes, para condução de estímulos nocivos (Julius e Basbaum, 2001), ocorre por

meio da ativação de canais de sódio e cálcio, reduzindo o influxo de potássio, e aumentando o cálcio intracelular nos neurônios aferentes. Isso leva à ativação de receptores purinérgicos que sensibilizam o receptor transitório vanilóide-1 (TRPV1) e aumenta a sensibilidade de receptores a bradicinina via proteína quinase (PK-A e PK-C) produzindo assim, hiperalgesia e alodínia (Andrade *et al.*, 2012). A sensibilização central via PGE₂ pré-sináptica ocorre quando há liberação de cálcio e neurotransmissores como glutamato e substância P. Já PGE₂ pós-sináptica potencializa os receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) e α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Chen *et al.*, 2013) e fosforila a liberação de neurotransmissores inibitórios como a glicina (Harvey *et al.*, 2004).

A resolução do processo inflamatório é mediada por citocinas anti-inflamatórias, anti-proliferativas e pró-resolução, como as resolvinas (Bannenberg, 2009) e lipoxinas (Pirault e Back, 2018), além do controle da migração de leucócitos, edema, permeabilidade vascular e da produção de citocinas anti-inflamatórias (Alessandri *et al.*, 2013; Chandrasekharan e Sharma-Walia, 2015; Pirault e Back, 2018).

2.4 Anti-inflamatórios

2.4.1 Fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)

AINEs representam a classe de medicamentos mais usados e prescritos do mundo (Varga *et al.*, 2017). No Brasil, cerca de 30% da população idosa utiliza AINES de maneira contínua, estando o paracetamol, ibuprofeno e diclofenaco de sódio, respectivamente, entre os mais utilizados (Ely *et al.*, 2015). Além disso, em populações especiais como gestantes e crianças menores de 6 meses, apesar da existência de estudos que contestem a segurança, utilizam AINEs como o ibuprofeno com frequência (Section on Clinical *et al.*, 2011; Ben Maamar *et al.*, 2017). O uso destes se dá em razão da eficiência no controle de sinais clínicos da inflamação (Ferreira, 2002).

O mecanismo de ação dos AINEs, envolvido no controle da inflamação, se dá pela inibição não seletiva de isoformas da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2) (Kawahara *et al.*, 2015) ou ainda seletivamente à COX-2 (Chen *et al.*, 2008). Isto leva à redução da síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas, a partir do ácido araquidônico (Kawahara *et al.*, 2015). A inibição das COX-1 e COX-2 permite o controle do processo inflamatório (Marnett, 2009). No entanto, está associado ao desenvolvimento de eventos adversos, como efeitos gastrointestinais e complicações cardiovasculares (Tarp *et al.*, 2012), além de possíveis malformações fetais (Ben Maamar *et al.*, 2017).

2.4.2 Fármacos glicocorticoides (GC)

GC ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) são hormônios esteroides derivados do metabolismo do colesterol, podendo ser endógenas ou exógenas, com atividade mediada por um conjunto de pelo menos 16 isoformas de receptor de glicocorticoide (GR) (Chrousos e Kino, 2007). Essas isoformas são eficientes no controle inflamatório, além disso, apresentam efeitos pleiotrópicos atuando na regulação do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos; sistemas imunes inato e adaptativo; regulação homeostática; processos reprodutivos; no crescimento e funções cerebrais como excitação, cognição, humor, sono, memória e comportamento (Beck *et al.*, 2009; Bereshchenko *et al.*, 2018).

Em função da alta lipofílicidade, o GC possui passagem facilitada através da membrana celular, isso permite a interação do GC ao receptor glicocorticoide citosólico (GCR), com a formação do complexo esteroide-receptor (Fernandes *et al.*, 2008). Após a translocação do complexo, há ligação ao DNA podendo desencadear a transcrição gênica de moléculas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10), interleucina-1Ra6 (IL-1Ra6), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e uteroglobulina (Benson, 2005). Dessa forma, os GC interferem na ativação de fatores de transcrição, inibindo citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF, NF-kB e também moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina (Longui, 2007; Bereshchenko *et al.*, 2018).

Os principais representantes dessa classe são hidrocortisona, prednisona, prednisolona e dexametasona. Doses farmacológicas dos GC variam em função do objetivo terapêutico almejado, se anti-inflamatório, antialérgico ou imunomodulador. Quando usados por período prolongado, há amplificação de eventos adversos, podendo apresentar supressão do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal e síndrome de Cushing, até mudanças no estado mental (Spies *et al.*, 2011)

2.5 Modelos de inflamação

2.5.1 Pleurisia induzida por carragenina

Conforme anteriormente relatado, a injeção de carragenina (i.p.) leva à inflamação aguda da cavidade pleural, com extravasamento de leucócitos polimorfonucleares na fase inicial, principalmente neutrófilos, e macrófagos na fase tardia (Saleh *et al.*, 1996), seguido da produção de citocinas pró-inflamatórias (Hajhashemi *et al.*, 2010), caracterizando-o com perfil bifásico (4 e 48h) (Saleh *et al.*, 1999), com ápice da infiltração e formação de edema na quarta hora após a administração (Coelho, 2009).

No modelo de pleurisia induzido por carragenina, há liberação de EROs, especialmente NO (Tracey *et al.*, 1995) e é observada atividade da iNOS sobre as células inflamatórias na cavidade pleural. A importância do NO no processo inflamatório também foi demonstrada em outros modelos de inflamação por carragenina, como no edema de pata (Ialenti *et al.*, 1992). Além disso, há aumento dos níveis de mieloperoxidase (MPO), atuando como marcador de migração leucocitária na formação do exsudato inflamatório (Krawisz *et al.*, 1984; Rao *et al.*, 1993) e liberação de bradicinina. Assim, modulando a resposta inflamatória por meio do aumento da liberação de MPO, migração leucocitária e extravasamento plasmático (Hall, 1992; Marceau, 1995; Hall e Morton, 1997). Outra amina pré-formada é a histamina, com importante papel no aumento da permeabilidade vascular, formação de prostanóides e secreção de citocinas (Fröde, 2000).

2.5.2 Nociceção induzida pela formalina

Este modelo de nociceção permite a inferência do mecanismo envolvido no controle da dor (Randolph e Peters, 1997). Caracterizado por um padrão bifásico bem definido, o comportamento dos modelos experimentais após a injeção intraplantar de formalina, se define em fase I ou neurogênica (0 a 5 minutos), com liberação neurotransmissores excitatórios, substância P e NO, o que permite a estimulação de nociceptores de fibras aferentes do tipo C e, em parte, de fibras do tipo A δ , conduzindo assim o sinal nocivo. Já a fase II ou inflamatória (15 a 30 minutos), há liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, histamina, citocinas e prostaglandinas (Dubuisson e Dennis, 1977; Hunskaar e Hole, 1987; Martins *et al.*, 2006).

O controle da resposta nociceptiva na fase I é realizada apenas por substâncias que atuam a nível central, como analgésicos opióides, a exemplo da morfina, podendo estas substâncias atuarem também no controle da fase II. Em contrapartida, na fase II, cujo mecanismo é mediado pela inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas, o controle da nociceção é realizado por substâncias de ação periférica, a exemplo dos AINEs (Rosland *et al.*, 1990).

2.5.3 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A nociceção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético é um modelo clássico amplamente aceito na pesquisa de substâncias com atividade antinociceptiva, onde tanto a dor neurogênica quanto a inflamatória estão envolvidas (Ossipov *et al.*, 2010). Neste modelo, o ácido acético induz contorções abdominais, caracterizadas pela contração do

músculo abdominal em conjunto com o alongamento dos membros traseiros, tal modelo permite a análise do potencial antinociceptivo na dor aguda (Batista, 2016). Com o desenvolvimento do efeito algésico pelo ácido acético, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (Bahamonde *et al.*, 2013).

2.5.4 Peritonite induzida por zymosan

Ensaio utilizado para avaliação de atividade anti-inflamatória aguda, por meio da observação do número de leucócitos migrantes para a área agredida. A ativação celular e a liberação de mediadores inflamatórios são efeitos desencadeados pelo zymosan administrado na cavidade peritoneal. Este modelo mimetiza o processo inflamatório agudo decorrente de infecção induzida por leveduras (Kolaczowska *et al.*, 2008).

2.5.5 Artrite induzida por zymosan

O zymosan é um agente flogístico utilizado tradicionalmente em modelos experimentais, sendo obtido a partir da membrana de fungos *Saccharomyces cerevisiae* (Frasnelli *et al.*, 2005). Seu uso como agente flogístico se dá em função de induzir a formação de edema e a formação de exsudato na região, devido ao aumento da permeabilidade vascular e transmigração de células PMN (Frasnelli *et al.*, 2005). Além disso, o zymosan leva à hipernocicepção, entre 3 e 4 horas da indução (Rocha *et al.*, 1999; Da Rocha *et al.*, 2004).

O modelo de artrite induzida por zymosan foi utilizado para observação do potencial de redução do processo inflamatório na capsula articular, como forma de observar *in vivo* o envolvimento do sistema imunológico e a inflamação desencadeada. Os sinais da artrite são observados após 6 horas da administração do agente flogístico (Gegout *et al.*, 1995), que coincide com o pico de infiltração celular (Rocha *et al.*, 1999; Da Rocha *et al.*, 2004). O processo inflamatório é desencadeado pelo zymosan causa a liberação de citocinas pró-inflamatórias que, por meio de receptores *Toll-like 2*, ativam o fator de transcrição NF- κ B (Ozinsky *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2003; Kawai e Akira, 2007).

2.5.6 Microcirculação mesentérica *in situ*

Modelos experimentais de inflamação tendo a carragenina como agente inflamatório são classicamente utilizados. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado, obtido a partir do musgo-da-irlanda (*Chondrus crispus*) (Di Rosa *et al.*, 1972). A carragenina induz a migração de neutrófilos por mecanismo indireto, ativa macrófagos, induz a secreção de citocinas (TNF,

IL-6, IL-1 β), formação de metabólitos do ácido araquidônico e de EROs (Alencar *et al.*, 2010).

No tocante à microcirculação mesentérica, a migração celular do meio intravascular ao tecido lesado é desencadeado em nível microvascular, predominantemente em vênulas pós-capilares, onde há a interação de células do endotélio e moléculas de adesão expressas por neutrófilos, induzidos por mediadores e citocinas inflamatórias (Smith, 1993; Edwards e Hallett, 1997). No processo inflamatório agudo induzido pela carragenina, após a expressão de moléculas de adesão, o endotélio vascular se torna suscetível à interação, permitindo a ocorrência da rolagem, adesão, transmigração e diapedese para a área afetada (Calixto *et al.*, 2004). Tais processos são mediados por citocinas como a interleucina-17 (IL-17), que sinaliza a expressão de moléculas de adesão ao endotélio (E-selectina, VCAM-1 ou ICAM-1) dependente da via p38-MAPK (Nogueira De Melo *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

GERAL

Determinar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Piper vicosanum* em modelos experimentais.

ESPECÍFICOS

Verificar se o extrato etanólico das folhas de *Piper vicosanum* inibem:

- i. A migração leucocitária em modelos de pleurisia, artrite, peritonite e microcirculação *in situ*;
- ii. A nocicepção em modelos de injeção intraplantar de formalina e de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético;

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, N. M. et al. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflammation research**, v. 59, n. 4, p. 245-54, Apr 2010.

ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology and therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189-212, Aug 2013.

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

ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology and therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 189-204, Feb 2012.

ANDRADE, S. F. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 464-71, Feb 12 2007.

ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**, v. 17, p. 615-633, 2013.

ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in primary health care. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 541-553, 2014.

ARROYO-ACEVEDO, J. et al. Protective Effect of Piper aduncum Capsule on DMBA-induced Breast Cancer in Rats. **Breast cancer: basic and clinical research**, v. 9, p. 41-8, 2015.

BAHAMONDE, S. M. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chiliodendron diffusum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 699-705, 2013.

BANNENBERG, G. L. Resolvins: Current understanding and future potential in the control of inflammation. **Current opinion in drug discovery and development**, v. 12, n. 5, p. 644-58, Sep 2009.

BATISTA, E. K. F. T., H.I.; LIRA, S.R.S.; MULLER, J.B.B.S.; SILVA, L.L.B.; BATISTA, M.C.S. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 433-441, 2016.

BECK, I. M. et al. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 7, p. 830-82, Dec 2009..

BEN MAAMAR, M. et al. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44184, 03/10/online 2017.

BENSON, M. Pathophysiological effects of glucocorticoids on nasal polyps: an update. **Curr Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 5, n. 1, p. 31-5, Feb 2005.

BERESHCHENKO, O.; BRUSCOLI, S.; RICCARDI, C. Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1332, 2018.

BERNUCI, K. Z. et al. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of Piper Species. **Molecules**, v. 21, n. 12, Dec 12 2016.

BRASIL. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. 2006a. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 26 jan 2019.

_____. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. 2006b. Disponível em: < <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf> >. Acesso em: 26 jan 2019.

_____. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica**, 2006c. Disponível em: < <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf> >.

_____. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos dezembro de 2008. 2008. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html >. Acesso em: 23 jan 2019.

_____. Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS - RENISUS. 2009. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf> >. Acesso em: 26 jan 2019.

_____. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos., p. 190, 2016. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_mediciniais_fitoterapicos.pdf >. Acesso em: 26 jan 2019.

CALIXTO, J. B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta medica**, v. 70, n. 2, p. 93-103, Feb 2004.

CARLINO, E.; FRISALDI, E.; BENEDETTI, F. Pain and the context. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 10, n. 6, p. 348-55, Jun 2014.

CARVALHO-OKANO, R. M. D.; ALVES, S. A. M. Piperaceae C. Agardh da Estação Experimental Mata do Paraíso, Viçosa, MG. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, p. 497-513, 1998.

CHANDRASEKHARAN, J. A.; SHARMA-WALIA, N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. **Journal of inflammation research**, v. 8, p. 181-92, 2015.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v. 104-105, p. 58-66, Jul-Aug 2013.

CHEN, Y. F. et al. Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. **Health technology assessment**, v. 12, n. 11, p. 1-278, iii, Apr 2008.

CHROUSOS, G. P.; KINO, T. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 213-9, Jun 2007.

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

DA ROCHA, F. A. et al. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **European journal of pharmacology**, v. 497, n. 1, p. 81-6, Aug 2004.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L.; PARENTE, L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and leucocyte emigration. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 24, n. 7, p. 575-7, Jul 1972.

DI STASI, L. C. H.-L., C.A.; MARIOT, A.; PORTILHO, W.G. & REIS, M.S. . **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: 2002.

DIAZ-GONZALEZ, F. et al. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 4, p. 1756-65, Apr 1995.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-74, Dec 1977.

EDWARDS, S. W.; HALLETT, M. B. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunology today**, v. 18, n. 7, p. 320-4, Jul 1997.

ELY, L. S. et al. Uso de anti-inflamatórios e analgésicos por uma população de idosos atendida na Estratégia Saúde da Família. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 18, p. 475-485, 2015.

FERNANDES, A. M.; VALERA, F. C. P.; ANSELMO-LIMA, W. T. Mecanismos de ação dos corticosteróides na polipose rinossinusal. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, p. 279-283, 2008.

FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. **International journal of clinical practice. Supplement**, n. 128, p. 2-10, Jul 2002.

FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis research and therapy**, v. 7, n. 2, p. R370-9, 2005.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, v. 63, n. 1, p. 149-64, Oct 2013.

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

GEGOUT, P. et al. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life sciences**, v. 56, n. 20, p. PL389-94, 1995.

GERAN RI, G. N., MACDONALD MM, SCHUMACHER AM, ABBOTT BJ. *Piper arborescens* contra leucemia linfocítica. 1972.

GUTIERREZ, R. M.; GONZALEZ, A. M.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from Piper: a review of its phytochemistry and pharmacology. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 163-93, Feb 2013.

HAJHASHEMI, V. et al. Central and peripheral anti-inflammatory effects of maprotiline on carrageenan-induced paw edema in rats. **Inflammation research**, v. 59, n. 12, p. 1053-9, Dec 2010.

HALL, J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacology and therapeutics**, v. 56, n. 2, p. 131-90, Nov 1992.

HALL, J. M.; MORTON, I. K. M. 2 - The Pharmacology and Immunopharmacology of Kinin Receptors. In: FARMER, S. G. (Ed.). **The Kinin System**. London: Academic Press, 1997. p.9-43. ISBN 978-0-12-249340-9.

HARVEY, R. J. et al. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 884-7, May 7 2004.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in immunology**, v. 27, n. 3, p. 149-60, May 2015.

HOFF BRAIT, D. R. et al. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from Piper vicosanum leaves. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 699-705, Dec 2015.

HOHJOH, H. et al. Prostanoid receptors and acute inflammation in skin. **Biochimie**, v. 107 Pt A, p. 78-81, Dec 2014.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, Jul 1987.

IALENTI, A. et al. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European journal of pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 177-82, Feb 1992.

JUDD, W. S. C., C.S.; KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. . **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre. 3 ed., 2009.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 13 2001.

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

KATO, M.; FURLAN, M. **Chemistry and evolution of the Piperaceae**. p. 529-538. 2007.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition research**, v. 34, n. 11, p. 907-29, Nov 2014.

KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1851, n. 4, p. 414-21, Apr 2015.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 11, p. 460-9, Nov 2007.

KOLACZKOWSKA, E.; ARNOLD, B.; OPDENAKKER, G. Gelatinase B/MMP-9 as an inflammatory marker enzyme in mouse zymosan peritonitis: comparison of phase-specific and cell-specific production by mast cells, macrophages and neutrophils. **Immunobiology**, v. 213, n. 2, p. 109-24, 2008.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-50, Dec 1984.

LEÃO, R. B. A. F., M.R.C.; JARDIM, M.A.G. . Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará,. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 21-25, 2007.

LON, H. K.; LIU, D.; JUSKO, W. J. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 40, n. 4, p. 295-312, 2012.

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

MARCEAU, F. Kinin B1 receptors: a review. **Immunopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 1-26, Jun 1995.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 49, p. 265-90, 2009.

MARTINS, M. A.; DE CASTRO BASTOS, L.; TONUSSI, C. R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **The journal of pain**, v. 7, n. 2, p. 100-7, Feb 2006.

MATIAS, E. F. et al. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, p. 164215, 2013.

MESQUITA, J. M. O. et al. Essential Oil Constituents of *Piper vicosanum* Yunker from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 4, p. 392-395, 2006/07/01 2006.

MULLA, W. et al. Antioxidant, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Ethanollic Extract of Leaves of *Alocasia indica* (Schott.). **Journal of young pharmacists**, v. 2, n. 2, p. 137-43, Apr 2010.

NANDAKUMAR, N. et al. Synthesis of coumapherine derivatives: Their NF-kappaB inhibitory effect, inhibition of cell migration and their cytotoxic activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 125, p. 1076-1087, Jan 05 2017.

NOGUEIRA DE MELO, G. A. et al. Inhibitory effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil on leukocyte migration in vivo and in vitro. **Journal of natural medicines**, v. 65, n. 1, p. 241-6, Jan 2011.

OLIVEIRA, C. M. B. D. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 260-265, 2011.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. D.; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 35-42, 2016.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010.

OZINSKY, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13766-71, Dec 2000.

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

PIRAULT, J.; BACK, M. Lipoxin and Resolvin Receptors Transducing the Resolution of Inflammation in Cardiovascular Disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1273, 2018.

PRANDO, T. B. et al. Amides from Piper as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of Piper glabratum Kunth. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2014, p. 615109, 2014.

RAHMAN, M. A. et al. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 149-61, Mar 2004.

RANDOLPH, B. C.; PETERS, M. A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. **Anesthesia progress**, v. 44, n. 1, p. 11-6, 1997.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-41, Dec 1993.

RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, Dec 2018.

ROCHA, F. A. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res**, v. 48, n. 9, p. 485-90, Sep 1999. ISSN 1023-3830. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10522803>>.

ROSLAND, J. H. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, n. 2, p. 235-42, Aug 1990.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 3, p. 811-9, Jun 1996.

_____. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, v. 20, n. 8, p. 949-56, 1999.

SANUBOL, A. et al. Pre-Clinical Evaluation of Extracts and Essential Oils from Betel-Like Scent Piper Species Identified Potential Cancer Treatment. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines**, v. 14, n. 1, p. 89-102, 2017.

SATO, M. et al. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. **Journal of immunology**, v. 171, n. 1, p. 417-25, Jul 1 2003.

SECTION ON CLINICAL, P. et al. Fever and antipyretic use in children. **Pediatrics**, v. 127, n. 3, p. 580-7, Mar 2011.

SEMPLE, K. S. Pollination in Piperaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. vol. 61, p. 868-871, 1974.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004.

SILVA, A. V. D. Fenologia de *Piper gaudichaudianum* kunth e *P. vicosanum* yunck. (Piperaceae) em fragmento de floresta atlântica, com enfoque na biologia floral de *P. vicosanum*. Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2013.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. p. 18-23, 2013. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2013-94-1-2.pdf>>.

SILVA, R. H. M. et al. Antinociceptive Activity of *Borreria verticillata*: In vivo and In silico Studies. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 283, 2017.

SMITH, C. W. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 71, n. 1, p. 76-87, Jan 1993.

SONG, S.; DANG, M.; KUMAR, M. Anti-inflammatory and renal protective effect of gingerol in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats via inflammatory mechanism. **Inflammopharmacology**, Mar 2 2019.

SOUTAR, D. A. et al. Piperine, a Pungent Alkaloid from Black Pepper, Inhibits B Lymphocyte Activation and Effector Functions. **Phytotherapy research**, v. 31, n. 3, p. 466-474, Mar 2017.

SPIES, C. M. et al. Prednisone chronotherapy. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 29, n. 5 Suppl 68, p. S42-5, Sep-Oct 2011.

TARP, S. et al. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the C-reactive protein level in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Arthritis and rheumatism**, v. 64, n. 11, p. 3511-21, Nov 2012.

TASLEEM, F. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of Piper nigrum L. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7S1, p. S461-8, Sep 2014.

TRACEY, W. R. et al. The nitric oxide synthase inhibitor, L-NG-monomethylarginine, reduces carrageenan-induced pleurisy in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 273, n. 3, p. 1295-9, Jun 1995.

VARGA, Z.; SABZWARI, S. R. A.; VARGOVA, V. Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Under-Recognized Public Health Issue. **Cureus**, v. 9, n. 4, p. e1144, Apr 2017.

VODOVOTZ, Y. et al. Translational systems biology of inflammation. **PLoS computational biology**, v. 4, n. 4, p. e1000014, Apr 25 2008.

WANG-SHENG, C. et al. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International immunopharmacology**, v. 42, p. 44-48, Jan 2017.

WANG, Y. H. et al. Anticancer principles from medicinal piper (hu jiao) plants. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 4, n. 1, p. 8-16, Jan 2014.

WEINSTOCK, A.; FISHER, E. A. Methods to Study Monocyte and Macrophage Trafficking in Atherosclerosis Progression and Resolution. **Methods in molecular biology**, v. 1951, p. 153-165, 2019.

WHO. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. 2002. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/health_technology/book_who_traditional_medicine_strategy_2002_2005.pdf>. Acesso em: 26 jan 2019.

WOLKERSTORFER, A.; HANDLER, N.; BUSCHMANN, H. New approaches to treating pain. **Bioorganic and medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 4, p. 1103-19, Feb 15 2016.

YANG, S. Z.; CHEN, P. H. Cambial variations of Piper (Piperaceae) in Taiwan. **Botanical studies**, v. 58, n. 1, p. 17, Dec 2017.

YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil**. 1972.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo: Nutritional Neuroscience (Qualis B1)

<https://www.editorialmanager.com/nns/default.aspx>

EFFECT OF *Piper vicosanum* LEAF EXTRACT IN INFLAMMATION AND NOCICEPTION MODELS IN MICE

Armando Jorge Junior^{1,2}, Saulo Euclides Silva-Filho³, Maicon Matos Leitão², Jonas da Silva Mota⁴, Roberto Kenji Nakamura Cuman⁵, Cândida Aparecida Leite Kassuya^{1,2}

¹Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados (HU-UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (FCS-UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁵Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil.

**Autor correspondente:* Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS, 79825-070, MS, Brasil, contato: +55 67 3410-2321, Fax: +55 67 3410-2326. *E-mail:* candida2005@gmail.com

EFFECT OF *Piper vicosanum* LEAF EXTRACT IN INFLAMMATION AND NOCICEPTION MODELS IN MICE

Abstract

Background and Aims: *Piper vicosanum* is a plant used in folk medicine as a diuretic, analgesic and anti-inflammatory. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Piper vicosanum* leaves has been reported; nevertheless, there are no studies evaluating the anti-inflammatory effect of the ethanolic extract of these leaves. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the ethanolic extract of *Piper vicosanum* leaves (EEPV) in experimental mouse models.

Methods: EEPV was orally tested at doses ranging from 100 to 700 mg/kg in carrageenan-induced pleurisy and *in situ* mesenteric bed microcirculation models. EEPV was also orally tested at 700 mg/kg in zymosan-induced arthritis and peritonitis models. Nociceptive tests with intraplantar formalin injection and acetic acid-induced abdominal writhing were also performed, where the animals were treated with EEPV at 300 and 700 mg/kg.

Results: EEPV inhibited the migration of leukocytes into carrageenan-induced inflamed pleura in 26% (at 700 mg/kg). Likewise, EEPV reduced the migration and adhesion of leukocytes in an *in situ* microcirculation model (at 300 mg/kg dose) by 48.48% and 48.20%, respectively. In the zymosan-induced arthritis and peritonitis models, EEPV (at 700 mg/kg) reduced leukocyte recruitment by 40% and 41%, respectively. In the antinociceptive analyses, EEPV exhibited dose-dependent effects (300 and 700 mg/kg) against intraplantar injection of formalin and acetic acid-induced abdominal writhing.

Conclusions: We demonstrated for the first time the anti-inflammatory, antiarthritic and antinociceptive effects of the ethanolic extract of *Piper vicosanum* leaves, highlighting the therapeutic potential of the species for control of inflammation and nociception.

Keywords: *Piper vicosanum*, leukocyte migration, nociception, inflammation

Introduction

The diffusion and application of plant drugs and herbal medicines in the Brazilian public health system has increased over the last 20 years. National health conferences and guidelines [1,2] allowed the regulation and addition of medicinal plants into complementary health policies [3]. Furthermore, the inclusion of these items into the therapeutic arsenal generated synergies in popular wisdom, ecological preservation and incentives for family agriculture [4].

Plant-derived products with anti-inflammatory and analgesic activity are important sources for the development of new therapeutic agents and are aimed developing products able to minimize conventional drug-mediated adverse effects, including gastrointestinal tract irritation and alteration in renal function, among other functions [5,6]. Furthermore, the use of plant-derived products with analgesic [7] and anti-inflammatory [8] potential are of fundamental importance for the treatment of inflammatory pain as well as initial treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [9].

The family Piperaceae is composed of 5 genera, with more than 3500 species of plants [10], including shrubs, herbs and vines. In the Brazilian biome, they are found in the Amazon, Caatinga, Cerrado and Atlantic Forest [11]. Many species that make up this family are known for their applications in folk medicine [12-14], in particular the genus *Piper*, with more than 2000 species. In Brazil, about 300 *Piper* species are found, of which approximately 200 are endemic [11].

Several species of *Piper* are used in folk medicine as emollients, antirheumatics, diuretics, stimulants, abortifacients, anti-inflammatories, antibacterials, antifungals, and antidermatophytics [15]. There have also been descriptions of antitumor and antiparasitic potentials [16-18]. Alkaloids, amides, lignans, neolignans and terpenes are frequently found in these species [19-21]. In anti-inflammatory analyses of *Piper* species, the mechanisms

frequently observed include inhibition of inflammatory mediators, including TNF, IL-1 β , IL-6, PGE2 as well as inhibition of NF- κ B transcription [22-24]. A study carried out in Dourados, MS, Brazil, identified the medicinal species most used in popular medicine, and found that the family Piperaceae (10.8 %) was among the most used. *Piper aduncum* (“false jaborandi”) and *Piper amalago* (“jaborandi”), were reported among with the most used species as analgesics, anesthetics, burns treatments and gastric problem treatments [12]. Nevertheless, some species of the genus *Piper* continue to be poorly documented in the literature, as is the case of *Piper vicosanum* [16,20].

Piper vicosanum is a shrub found mainly in the Brazilian Atlantic forest [20,25]. Phytochemical analysis of the ethanolic extract of the leaves revealed the presence of alkaloids and phenolic compounds, tannins, steroids and triterpenoids, a composition different from those of other species in the genus [26]. A study using leaf essential oil of *Piper vicosanum* demonstrated the anti-inflammatory potential of the plant and did not identify acute toxicity or genotoxicity [20]. Nevertheless, there are no reports of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of the ethanolic extract of *Piper vicosanum* leaves (EEPV) in experimental models.

In view of the need to expand the therapeutic strategies for the treatment of inflammatory diseases, we analyzed the response to EEPV in experimental models of inflammation: in situ microcirculation, carrageenan-induced pleurisy, and zymosan-induced arthritis and peritonitis. In addition, antinociceptive activity was evaluated using the formalin-induced nociception and acetic acid-induced abdominal writhing tests.

Materials and methods

Preparation of the ethanolic extract of *Piper vicosanum* leaves (EEPV)

The species *Piper vicosanum* was collected in February 2017 in Dourados, MS, Brazil, (coordinates 22°12'37.8" S, 54°55'2.6" W) and identified by comparison with dried exemplars (DDMS 4411) by Maria do Carmo at UFGD. In addition, the use of the species was duly registered and approved by the National System for Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen Registry number AE032EB).

Leaves (1430 g) were dried at room temperature, pulverized, and subjected to three extractions by maceration with 70% ethanol for 7 days. The extract was concentrated in a reduced-pressure rotary evaporator and dried in a hood. A total of 203 g of ethanolic extract were obtained, as previously described [26].

Animals

Male Swiss mice (n=168, mean weight between 25 and 30 g) mice were allocated to polypropylene boxes in the Central Warehouse of the Federal University of Grande Dourados (UFGD). Subsequently, they were transferred to the Regional Warehouse of the Faculty of Arts and Sciences (FCS) or UFGD and were maintained in controlled light conditions (12 h light/dark) and temperature (mean 23 ± 2 °C), receiving water and commercial feed *ad libitum*. On the day of the experiment, they were taken to the laboratory for adaptation 60 minutes before the start. Anesthesia were induced with 20 µL of 10 mg/kg xylazine 2% + 100 mg/kg ketamine 10% intraperitoneally. When the animals were to be euthanized, we used a solution 100 µL xylazine 2% + 100 µL of ketamine 10% intraperitoneally. The experiment was conducted according to the animal rights guidelines with the approval of the UFGD Committee on Animal Ethics under number 37/2017.

Carrageenan-induced pleurisy

The animals were divided into six groups of six mice each: The control and naïve groups were treated with saline solution (0.9 %); the groups treated with oral EEPV at 100, 300 and 700 mg/kg; and the reference group receiving dexamethasone at 1 mg/kg IP. All the animals (except the naïve group that received 100 µL of sterile saline 0.9 % intrapleural) received 100 µL intrapleural injections of carrageenan 1% (500 µg/cavity) 60 min after the treatments [27]. After 4 hours, the animals were euthanized for collection of pleural exudates in 1 ml of PBS-EDTA. Subsequently, samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 min, the supernatants were discarded and the pellets were resuspended in 0.5 ml PBS-EDTA. Aliquots of 50 µL of samples were taken for counting total leukocytes in a Neubauer chamber [28].

Formalin-induced test of nociception

For the formalin test, mice were divided in 5 groups of 6 mice each. The experimental groups were treated with oral EEPV (300 and 700 mg/kg); the vehicle group was treated with oral sterile saline (0.9%); and the morphine group was treated with 5 mg/kg, subcutaneously. After 60 min of administration of the treatment, the animals received intraplantar injections of formalin 2.5% (20 µL/animal) in the right rear paw. After administration of formalin, the animals were placed individually under a glass funnel, and the time the animals spent licking the right hind paw was timed in two phases (phase I: 0 to 5 min; phase II: 15 to 30 min). Time zero was considered immediately after formalin injection. At the end of phase 2 (30 min), cold sensitivity tests (allodynia) were performed with the application of 20 µL of acetone topically on the right hind paw. After 60 minutes, paw edema analysis was performed using a plethysmometer. At the end, the animals were euthanized [29].

Acetic acid-induced abdominal writhing test

For the abdominal writhing test, the animals were distributed in 5 groups of 6 mice each. The EEPV groups were treated with oral doses of 300 and 700 mg/kg. The vehicle group was treated with sterile saline solution (0.9 %); and the morphine group was treated with 5 mg/kg, subcutaneously. After 60 minutes, we administered acetic acid 0.8% (0.1 ml/10 g) intraperitoneally and observed behavior for over 20 minutes [30]. At the end the animals were euthanized.

The zymosan-induced peritonitis model

To test the effect of EEPV in the peritonitis model, the mice were distributed in 4 groups of 6 mice each). The naïve group received injections of saline (0.9 % and treatment with vehicle (aqueous solution of Tween 80 0.5 %); the vehicle group received injection of zymosan and treatment with vehicle; the treated group was injected with zymosan and EEPV 700 mg/kg; the reference group received injections of zymosan followed by dexamethasone 1 mg/kg. Peritonitis was induced by intraperitoneal (IP) injection of 300 µL zymosan at 1 mg/cavity. The animals received oral (gavage) vehicle or EEPV 60 min after IP zymosan injection. After 6 hour, the animals were euthanized and the peritoneal cavities were washed with PBS-EDTA (pH 7.4), after which peritoneal exudates were collected and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. The pellets were resuspended to count leukocytes in a Neubauer chamber [31].

Zymosan-induced arthritis model

The animals were distributed in 4 groups of 6 animals each. The control and naïve groups were treated with saline (0.9 %); the treatment group was treated with EEPV 700 mg/kg orally; and the reference group received dexamethasone at 1 mg/kg IP. After 60 min of treatment, all animals received 20 µL injections of zymosan (500 µg/cavity) behind the suprapatellar tendon of the left knee space [32,33]; the naïve group received an equal volume

of sterile saline (0.9 %). The control animals received intra-articular injections of equal volumes of saline. After 4 and 6 hours of induction, the animals, the animals had the edema volume measured using a digital micrometer.

For analysis of intra-articular migration, 6 hours after induction of arthritis, the animals were euthanized. After exposure of the joint, cavity lavage was performed with 4 aliquots of 2.5 µL PBS-EDTA to collect exudates. We added 40 µl Turk's liquid to a cryotube tube with 10 µl of the wash. Leukocyte counts were then performed using the Neubauer chamber [32,33].

Microcirculation *in situ*

The rolling and adhesion of the leukocytes in the vascular endothelium were evaluated in the mesentery of the mice. The animals were distributed in 4 groups of 6 animals each. After IP injection of carrageenan (500 µg/cavity), with the exception of the control animals, who received saline solution (0.9 %), EEPV (300 mg/kg), indomethacin (5 mg/kg SC) or vehicle (0.5% aqueous Tween 80) were given orally for 60 min before carrageenan injection in their respective groups. Two hours after injection of the phlogiston agent, the animals were anesthetized, and the mice were placed on a special plate, thermostatically controlled at 37 °C, with a transparent platform for transillumination of mesenteric tissue, exposed by surgical incision and fixed for microscopic analysis *in situ*. The vessels selected were post-capillary venules with diameters of 15–25 µm. The number of rolling leukocytes was determined at 10-minute intervals. Leukocytes were considered adherent to the venous endothelium when they adhered for a period equal to or greater than 30 seconds. At the end, the animals were euthanized [31].

Statistical analysis

The results were presented as \pm standard deviation of the mean (SD). To compare the differences of the results between the groups, one-way statistical analysis of variance (ANOVA) was used, followed by the Newman-Keuls test using GraphPad Prism 5.0 software. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effects of EEPV on carrageenan-induced pleurisy

The dose of 700 mg/kg EEPV inhibited ($p < 0.01$) leukocyte recruitment 26% compared to the group treated with vehicle. The group treated with dexamethasone showed 81% inhibition (Figure 1).

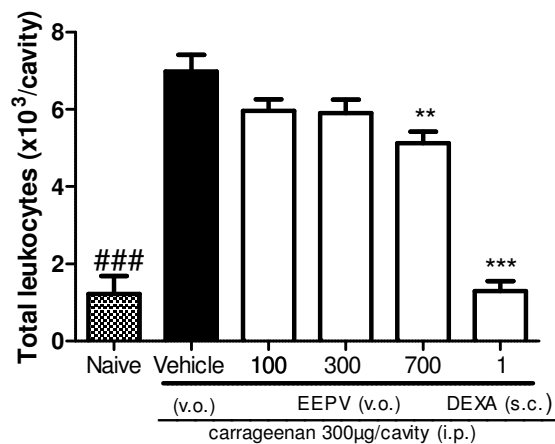


Figure 1. Evaluation of leukocyte recruitment in a carrageenan-induced pleurisy model. Treatment with EEPV at 100, 300 700 mg/kg, oral; vehicle – sterile saline 0.9%, oral; and positive control - dexamethasone 1 mg/kg, subcutaneously. The naïve group (### $P < 0.001$, significantly different from the vehicle group), was equal amounts of saline solution 0.9%. Bars represent mean \pm SE. Asterisks indicate levels of significance: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, comparing treated and control groups. Unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Evaluation of antinociceptive effect of formalin-induced EEPV

Antinociceptive activity was observed with treatment in animals receiving treatment following intraplantar injection of formalin. In stage 1 we observed inhibition of pain sensation at 300 and 700 mg/kg, respectively, 81% and 78%, respectively (Figure 2A). In

phase 2, the inhibition was 93% and 68%, respectively (Figure 2B). None of the doses tested showed paw edema activity (Figure 2C). In the cold response test, the inhibition results were 70% and 74% for 300 and 700 mg/kg, respectively. The same result was observed for the group treated with morphine, with total inhibition of the nociceptive stimulus (Figure 2D).

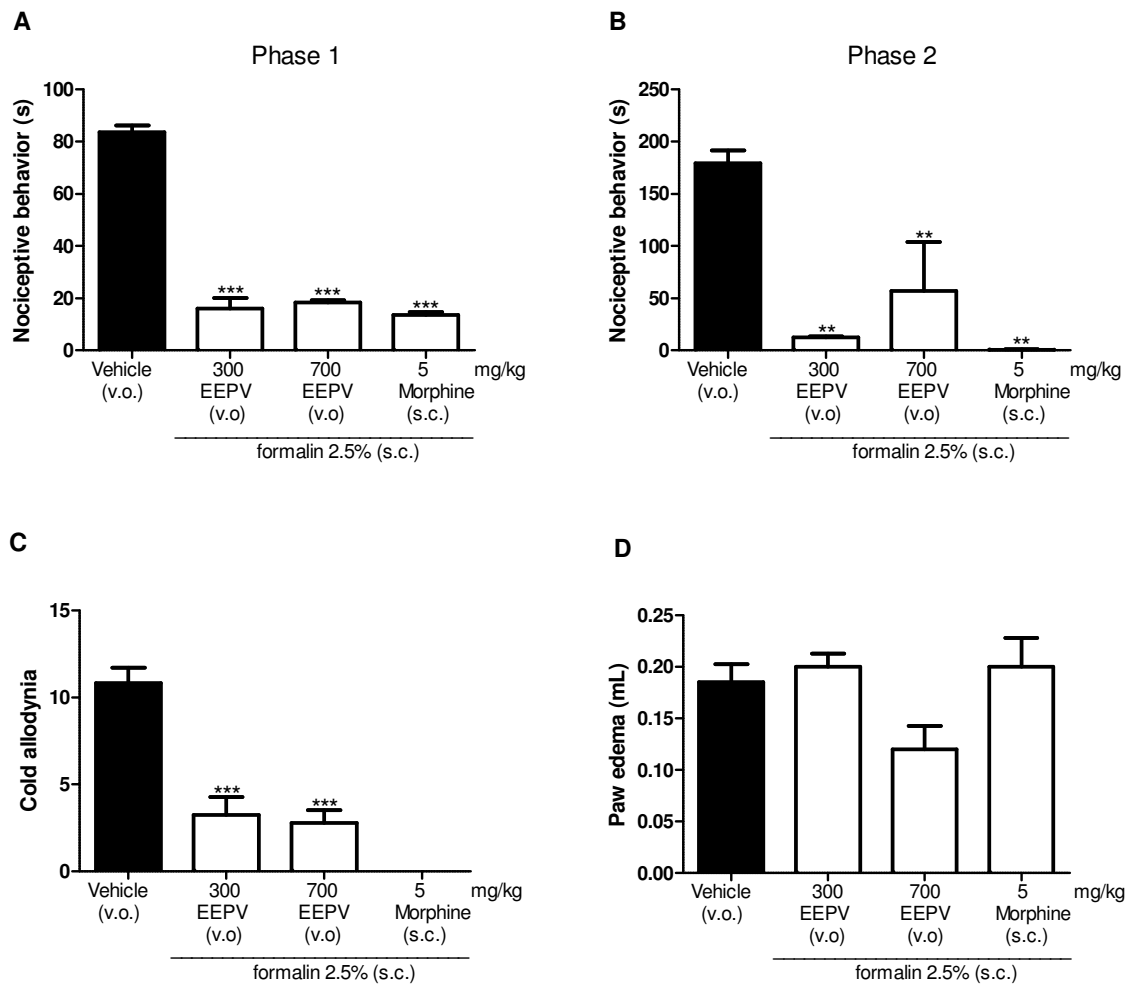


Figure 2. Effect of treatment with EEPV in a model of formalin-induced nociception. The animals were treated with 300 or 700 mg/kg; vehicle group received orally saline solution (0.9%); and the morphine group received subcutaneous doses of 5 mg/kg. Antinociceptive activity observed through phases I (Figure 2A) and II (Figure 2B). Sensitivity to cold with acetone after 30 min of intraplantar formalin injection (Figure 2C). Edema evaluated 1 h after intraplantar injection of formalin 2.5% (Figure 2D). Bars represent mean \pm SE. Asterisks indicate levels of significance: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, comparing treated and control groups. Unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Effect of EEPV on the nociceptive control of acetic acid-induced abdominal writhing

In the analysis of the antinociceptive effect of EEPV on acetic acid-induced abdominal writhing, a significant effect was observed at both doses (300 and 700 mg /kg), 36% and 44%, respectively. The morphine group showed total inhibition of the effect (Figure 3).

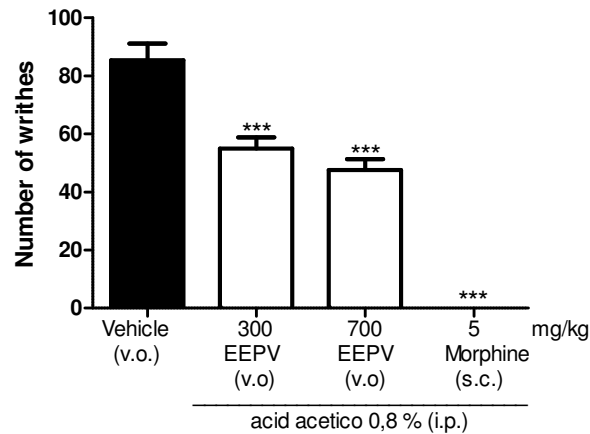


Figure 3. Effect of EEPV treatment on acetic acid-induced abdominal writhing. After injection of acetic acid 0.8% IP, the count of the number of writhings. Bars represent mean \pm SE. Asterisks indicate levels of significance: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, comparing treated and control groups. Unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Analysis of the effect of EEPV on the zymosan-induced peritonitis model

In the analysis of zymosan-induced peritonitis, 700 mg/kg EEPV caused a 41% reduction compared to the control (** $p < 0.01$, Figure 4).

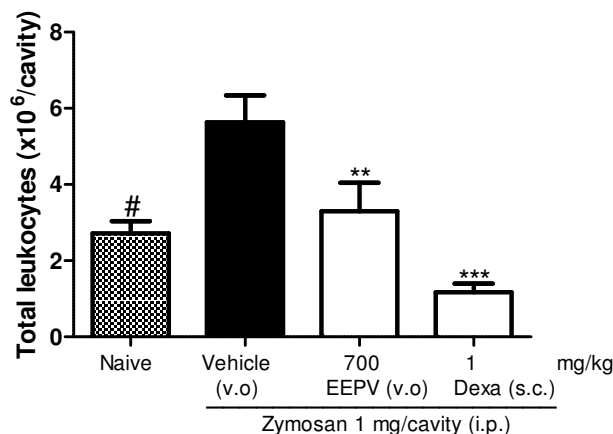


Figure 4. Leukocyte migration in the zymosan-induced peritonitis model. Treatment with oral EEPV at 700 mg/kg; vehicle group treated with 0.9% oral sterile saline solution; and dexamethasone group treated with 1 mg/kg (SC). # indicates the statistical comparison between the naive group and the control group ($P < 0.001$). Bars represent mean \pm SE. Asterisks indicate levels of significance: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, comparing treated and control groups. Unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

EEPV activity in zymosan-induced arthritis

In the zymosan-induced arthritis model, in terms of joint edema formation, EEPV did not cause significant differences (Figure 5A and 5B). In the evaluation of leukocyte recruitment, we observed a significant difference in the EEPV group at 700 mg/kg (***) with maximum inhibition of 40%, similar to that of the dexamethasone-treated group, with maximum inhibition of 54% (Figure 5C).

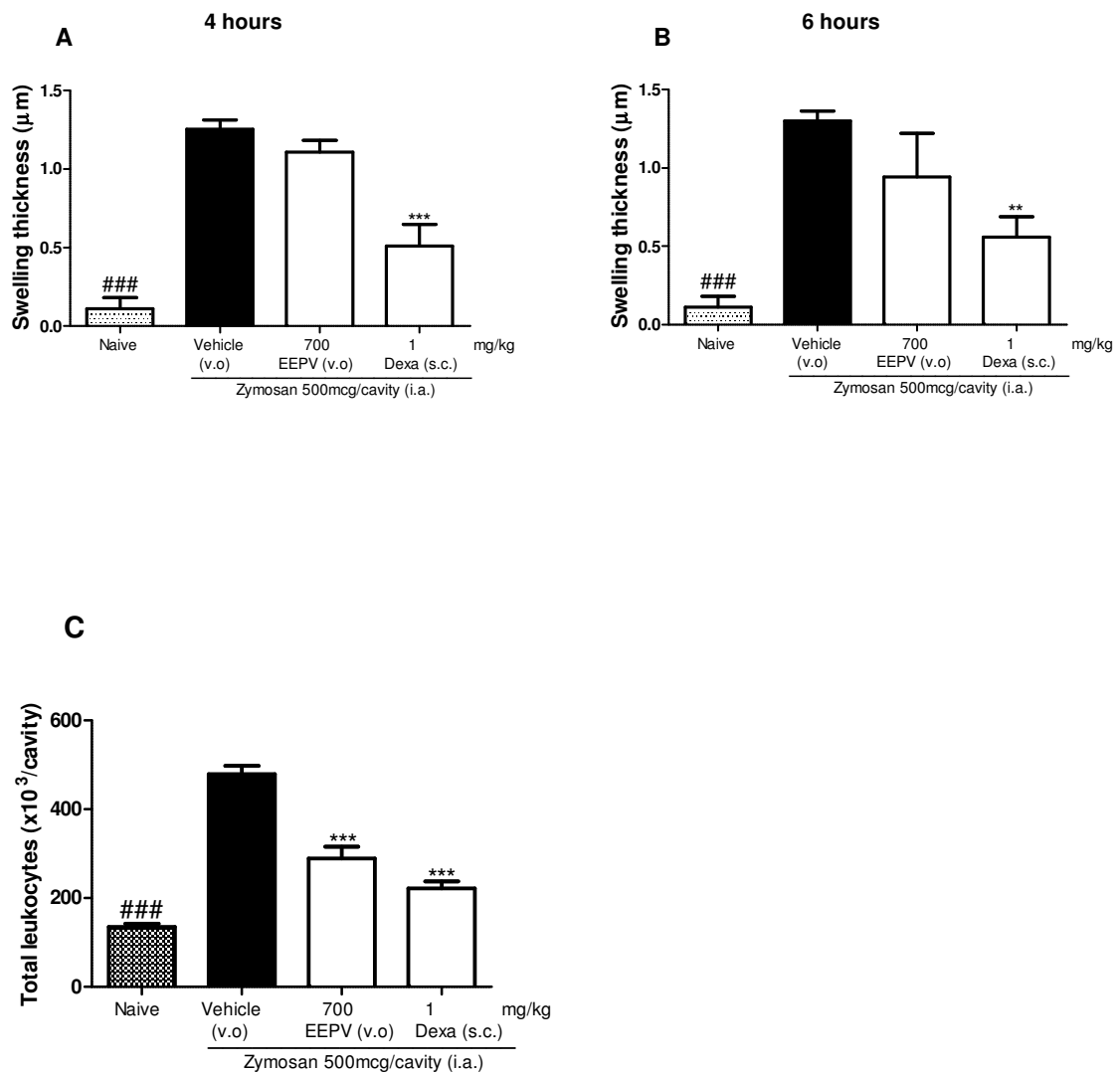


Figure 5. Effect of EEPV on the zymosan-induced arthritis model. Evaluation of knee edema after 4 (A) and 6 h (B) and recruitment of leukocytes (C) induced by zymosan. Treatment with oral EEPV at 700 mg/kg, vehicle group treated with oral sterile saline solution 0.9% and dexamethasone group treated with 1 mg/kg (SC). ### indicates the comparison between the naive and vehicle groups ($P < 0.001$). Bars represent mean \pm SE. Asterisks indicate levels of significance: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, comparing treated and control groups. Unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Effects of EEPV on mesenteric *in situ* microcirculation

Carrageenan injection (IP) significantly augmented rolling (Figure 6A) and adhesion (Figure 6B) of leukocytes in the endothelium, 2 h after stimulation with carrageenan, compared with vehicle. Oral pre-treatment with EEPV (300 mg/kg) significantly diminished leukocyte rolling by 48.84%, and adhesion by 48.2%. Indomethacin reduced leukocyte rolling by 59.67% and adhesion by 49.51%.

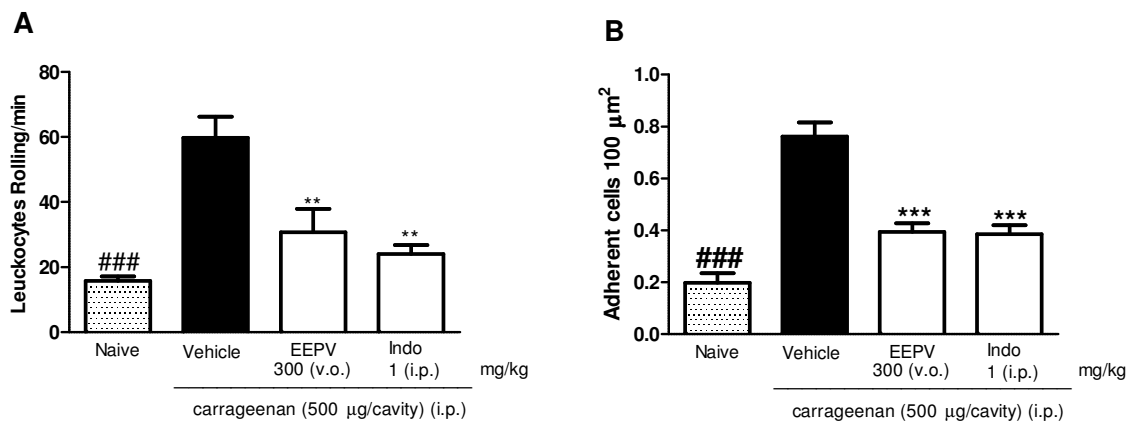


Figure 6. The effect of EEPV on carrageenan-induced leukocyte rolling (A) and adhesion (B). Mice were pre-treated orally with EEPV (300 mg/kg), indomethacin (5 mg/kg) or vehicle. Treatment with oral EEPV at the dose of 300 mg/kg, control treated with oral sterile saline solution 0.9% and indomethacin group at 5 mg/kg IP. After 60 min, saline or carrageenan was injected IP. Leukocyte rolling (A) and adhesion (B) was evaluated by using intravital microscopy of the mesentery 2 h later. ### indicates comparison between naïve and control groups ($P < 0.001$). Bars represent mean \pm SE. Asterisks indicate levels of significance: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, comparing treated and control groups. Unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report of the anti-inflammatory, antiarthritic and antinociceptive effects of *Piper vicosanum* leaf ethanolic extract (EEPV), on *in vivo* models of inflammation (carrageenan-induced pleurisy and mesenteric *in situ* microcirculation, zymosan-induced arthritis and zymosan-induced peritonitis) and nociceptive models (formalin-induced nociception test and acetic acid-induced abdominal writhing test).

In carrageenan-induced inflammation, a two-stage process is observed: an acute phase (60 to 120 minutes), where there is the release of preformed inflammatory mediators, including histamine, serotonin and kinins; and a late phase (180 to 360 minutes), with release of prostanoids and reactive oxygen species (ROS) [34-36]. We demonstrated that EEPV exhibits anti-inflammatory activities capable of inhibiting carrageenan-induced inflammation.

A study demonstrated that alpha-pinene (a compound present in the essential oil of *Piper vicosanum*) reduced leukocyte recruitment in acute inflammation models by inhibiting the production of proinflammatory cytokines, prostaglandins and nitric oxide [37]. Therefore, because in our study we observed reduction of the inflammatory process, we suggest that the EEPV effect may be related to the inhibition of these mediators.

Zymosan is a polysaccharide obtained from the membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [38]. It is frequently used as an inducing agent for inflammation in various experimental models. Zymosan activates toll-like receptors (TLR-1, TLR-2 and TLR-6) in inflammatory cells [38] and activates the NF- κ B pathway with consequent release of proinflammatory cytokines such as TNF, IL-1 β and IL-6 and ROS [39-42].

Zymosan-induced arthritis in the knee joints of the mice evolves with increased vascular permeability, leukocyte migration and pain. This process is caused by large influx of neutrophils into the region of the joint capsule that leads to the development of the inflammatory process [40]. The presence of limonene (45.5%) and α -pinene (5.1 %) found in the essential oil of this species [13] may contribute significantly to the anti-inflammatory effect of EEPV seen in the zymosan-induced arthritis and peritonitis models; there have been reports that these substances are related to the inhibition of zymosan-induced MAPK and NF- κ B leading to the reduction of proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF and NO [43,44].

In the zymosan-induced arthritis test, EEPV showed no anti-edematogenic activity. However, after 6 h of induction of the inflammatory process, at the peak of articular exudate

generation, with intense leukocyte migration, we observed inhibition with administration of EEPV and dexamethasone. In previous work by our research group with leaf essential oil of *Piper vicosanum*, anti-inflammatory activity was observed in a carrageenan-induced paw edema model [20].

To verify the stage in leukocyte migration at which EEPV interferes, we performed an *in situ* microcirculation assay. In this assay, we observed decreased leukocyte rolling in animals treated with EEPV and indomethacin, possibly associated with inhibition of the expression of adhesion molecules such as L-selectin [45]. Oesterreich et al. described the presence of triterpenic compounds in EEPV [16]; in addition, there are studies that support our results obtained on rolling and leukocyte adhesion, many of which relate to activities of terpene compounds [46,47].

The analysis of the results obtained in the nociception, intraplantar formalin injection and acetic acid-induced writhing models showed dose-dependent inhibition of inflammatory pain in mice. Although they are simple tests, they are sensitive to measure effects on opioid receptors (phase I) and on the prostaglandin pathway (phase II), as with NSAIDs [29].

Several studies using R-(+)-limonene have demonstrated its antinociceptive potential of [48,49]. It was reported that limonene comprises 45.5% of the volatile oils present in the composition of *P. vicosanum* extracts [13]. Therefore, it is possible that the high content of this monoterpene may be responsible for the reduction of nociception induced in the intraplantar formalin model and the acetic acid-induced abdominal writhing model.

Conclusion

For the first time, we report on the effects of EEPV in models of inflammation, zymosan-induced arthritis and nociception models.

In the present study, the various experimental models demonstrated that the EEPV has important anti-inflammatory, antiarthritic and antinociceptive activities. From analysis of inflammation, arthritis and nociception models, our data support the suggest anti-inflammatory activity in terms of inhibition of leukocyte migration, characterized by reduction of leukocyte infiltration, adhesion and rolling. Antinociceptive activity was also observed in the intraplantar formalin injection model and the acetic acid-induced abdominal writhing model. Taken together, the data suggest that EEPV has therapeutic potential.

Acknowledgements

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

Declaration of interest statement

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

References

- [1] BRASIL. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS 2006 [26 Jan 2019]. Available from: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/npic.pdf>
- [2] BRASIL. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos 2008 [updated dezembro de 2008.;23 Jan 2019]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html
- [3] Bruning MC, Mosegui GB, Vianna CM. [The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguacu - Parana: the viewpoint of health professionals]. *Cien Saude Colet.* 2012 Oct;17(10):2675–85.

- [4] Antonio GD, Tesser CD, Moretti-Pires RO. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária. *Interface - Comunicação, Saúde, Educação*. 2013;17:615–633.
- [5] Ben Maamar M, Lesné L, Hennig K, et al. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development [Article]. *Sci Rep*. 2017 03/10/online;7:44184.
- [6] Ribeiro VP, Arruda C, Abd El-Salam M, et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. *Pharm Biol*. 2018 Dec;56(1):253–268.
- [7] Carlino E, Frisaldi E, Benedetti F. Pain and the context. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Jun;10(6):348–55.
- [8] Silva JC, Raquel S, Gonçalves De R, et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. Vol. 94. 2013.
- [9] Gegout P, Gillet P, Terlain B, et al. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. *Life Sci*. 1995;56(20):PL389–94.
- [10] Yang SZ, Chen PH. Cambial variations of *Piper* (Piperaceae) in Taiwan. *Bot Stud*. 2017 Dec;58(1):17.
- [11] Silva AVd. Fenologia de *piper gaudichaudianum* kunth e *p. vicosanum* yunck. (piperaceae) em fragmento de floresta atlântica, com enfoque na biologia floral de *P. vicosanum* 2013.
- [12] Alves EO, Mota JH, Soares TS, et al. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciência e Agrotecnologia*. 2008;32:651–658.
- [13] Mesquita JMO, Oliveira AB, Braga FC, et al. Essential Oil Constituents of *Piper vicosanum* Yunker from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Essential Oil Research*. 2006 2006/07/01;18(4):392–395.

- [14] Wang YH, Morris-Natschke SL, Yang J, et al. Anticancer principles from medicinal piper (hu jiao) plants. *J Tradit Complement Med.* 2014 Jan;4(1):8–16.
- [15] Gutierrez RM, Gonzalez AM, Hoyo-Vadillo C. Alkaloids from piper: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Mini Rev Med Chem.* 2013 Feb;13(2):163–93.
- [16] Prando TB, Baciquete Tda F, Vieira JA, et al. Amides from Piper as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of Piper glabratum Kunth. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:615109.
- [17] Arroyo-Acevedo J, Chavez-Asmat RJ, Anampa-Guzman A, et al. Protective Effect of Piper aduncum Capsule on DMBA-induced Breast Cancer in Rats. *Breast Cancer (Auckl).* 2015;9:41–8.
- [18] Sanubol A, Chaveerach A, Tanee T, et al. Pre-Clinical Evaluation of Extracts and Essential Oils from Betel-Like Scent Piper Species Identified Potential Cancer Treatment. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2017;14(1):89-102.
- [19] Bernuci KZ, Iwanaga CC, Fernandez-Andrade CM, et al. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of Piper Species. *Molecules.* 2016 Dec 12;21(12).
- [20] Hoff Brait DR, Mattos Vaz MS, da Silva Arrigo J, et al. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from Piper vicosanum leaves. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015 Dec;73(3):699-705.
- [21] Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, et al. Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry.* 1997 1997/10/01;46(4):597-673.
- [22] Wang-Sheng C, Jie A, Jian-Jun L, et al. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. *Int Immunopharmacol.* 2017 Jan;42:44–48.

- [23] Nandakumar N, Muthuraman S, Gopinath P, et al. Synthesis of coumapherine derivatives: Their NF-kappaB inhibitory effect, inhibition of cell migration and their cytotoxic activity. *Eur J Med Chem.* 2017 Jan 05;125:1076–1087.
- [24] Soutar DA, Doucette CD, Liwski RS, et al. Piperine, a Pungent Alkaloid from Black Pepper, Inhibits B Lymphocyte Activation and Effector Functions. *Phytother Res.* 2017 Mar;31(3):466–474.
- [25] Geran RI GN, MacDonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. *Piper arborescens* contra leukemia linfocítica. Vol. 3. 1972. (Reports CC, editor.).
- [26] Oesterreich SA, Traesel GK, Piccinelli AC, et al. ANTIDEPRESSANT AND ANXIOLYTIC EFFECTS OF ETHANOL EXTRACTS FROM FOUR PIPER SPECIES [animal models; anxiety; depression; Piper spp.]. 2015. 2015 2015-07-31;10(1):9.
- [27] Ralph V, James FT, Jeffrey LS. Some Quantitative Temporal Characteristics of Carrageenin-Induced Pleurisy in the Rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1973;143(3):711–14.
- [28] Freitas de Lima F, Lescano CH, Arrigo JDS, et al. Anti-inflammatory, antiproliferative and cytoprotective potential of the *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. pulp oil. *PloS one.* 2018;13(4):e0195678.
- [29] Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 1987 Jul;30(1):103–14.
- [30] Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British journal of pharmacology and chemotherapy.* 1968 Feb;32(2):295–310.
- [31] Silva-Filho SE, Wiirzler LAM, Cavalcante HAO, et al. Effect of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on in vitro and in vivo leukocytes behavior in acute inflammatory response. *Biomed Pharmacother.* 2016 Dec;84:1697–1704.

- [32] Conte FP, Barja-Fidalgo C, Verri WA, Jr., et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. *J Leukoc Biol.* 2008 Sep;84(3):652–60.
- [33] Penido C, Conte FP, Chagas MS, et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res.* 2006 Nov;55(11):457–64.
- [34] Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.* 1971 May;104(1):15–29.
- [35] Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol.* 2004 May;142(2):331–8.
- [36] Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1969 Mar;166(1):96–103.
- [37] Kummer R, Estevão-Silva C, Lucena Bastos R, et al. Alpha-pinene reduces in vitro and in vivo leukocyte migration during acute inflammation. Vol. 8. 2015.
- [38] Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Peclat V, et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R370–9.
- [39] Ajuebor MN, Virag L, Flower RJ, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. *Immunology.* 1998 Dec;95(4):625–30.
- [40] Chaves HV, Ribeiro Rde A, de Souza AM, et al. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:707985.

- [41] Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011 Jan;3(1):118–27.
- [42] Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007 Nov;13(11):460–9.
- [43] Chi G, Wei M, Xie X, et al. Suppression of MAPK and NF-kappaB pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. *Inflammation.* 2013 Apr;36(2):501–11.
- [44] Kim DS, Lee HJ, Jeon YD, et al. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF-kappaB Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. *Am J Chin Med.* 2015;43(4):731–42.
- [45] Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, Campanero MR, et al. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1756–65.
- [46] Kummer R, Estevão-Silva C, Lucena Bastos R, et al. Effect of p-cymene on chemotaxis, phagocytosis and leukocyte behaviors. Vol. 8. 2015.
- [47] Nogueira de Melo GA, Grespan R, Fonseca JP, et al. Inhibitory effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil on leukocyte migration in vivo and in vitro. *J Nat Med.* 2011 Jan;65(1):241–6.
- [48] do Amaral JF, atilde, Silva MIG, et al. Antinociceptive Effect of the Monoterpene *R*-(+)-Limonene in Mice. *Biol Pharm Bl.* 2007;30(7):1217–1220.
- [49] Lenardão EJ, Savegnago L, Jacob RG, et al. Antinociceptive Effect of Essential Oils and Their Constituents: an Update Review. *J Braz Chem Soc.* 2016;27:435–474.

6 ANEXOS

6.1 Parecer de aprovação do comitê de ética



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 30 de março de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Atividade anti-inflamatória, analgésica e antidepressiva de *Piper vicosanum***", registrada sob o protocolo de nº 37/2017, sob a responsabilidade de *Cândida Aparecida Leite Kassuya e Armando Jorge Junior* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 17/11/2017.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	22/04/2018 a 31/03/2019
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus – Wistar / Mus musculus</i>
<i>Nº de animais</i>	255
<i>Peso/idade</i>	60 dias
<i>Sexo</i>	<i>Swiss – 147 machos e 48 fêmeas/ Wistar - 60 machos</i>
<i>Origem</i>	Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

6.2 Certidão do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AE032EB

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AE032EB**
 Usuário: **ARMANDO JORGE JUNIOR**
 CPF/CNPJ: **010.674.591-38**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Piper vicosanum

Piper vicosanum

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Atividade anti-inflamatória, analgésica e antidepressiva de Piper vicosanum**

Equipe

Cândida A. Leite Kassuya	UFGD
Márcia Midori Shinzato	UFGD
Laura Priscila Toledo Bernal	HU-UFGD
Joyce Alencar	UFGD
Maicon Matos Leitão	UFGD
Paulo Cesar de Paula Vasconcelos	HU-UFGD
Márcia Strassburger Araújo	HU-UFGD
Jorge Sales de Almeida	HU-UFGD
Jefferson Teodoro	HU-UFGD
Armando Jorge Júnior	HU-UFGD

Data do Cadastro: **11/02/2018 00:15:22**

Situação do Cadastro: **Concluído**

