

RESUMO

Piper vicosanum (Piperaceae) é uma espécie tradicionalmente utilizada na terapia popular para o tratamento de dor, febre e inflamação. Entretanto, até o momento, há poucos estudos que comprovem cientificamente esses efeitos. Dessa forma, objetivou-se neste estudo avaliar as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas de *P. vicosanum* (OPV) e determinar o potencial toxicológico desta planta através de testes de toxicidade aguda, genotóxicos e mutagênicos. Para os testes de toxicidade aguda, ratas fêmeas foram tratadas oralmente (gavage) com 0 ou 2000 mg/kg/massa corporal de OPV. Sinais clínicos de toxicidade foram avaliados durante 14 dias. Para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico, camundongos fêmeas foram divididas em cinco grupos: grupo I: controle negativo; grupo II: controle positivo; grupo III: 500 mg/kg de OPV; grupo IV: 1000 mg/kg de OPV; grupo V: 2000 mg/kg de OPV. O sangue periférico foi coletado para o ensaio cometa e para o teste de micronúcleo. A atividade anti-inflamatória de OPV foi avaliada através do teste de pleurisia e de edema de pata induzidos por carragenina. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi analisada pelo teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Nenhum sinal de toxicidade foi observado nos animais expostos, indicando que a DL₅₀ do óleo é maior que 2000 mg/kg. Os dados do ensaio cometa demonstraram que o OPV não aumentou a frequência ou a taxa de danos ao DNA nos grupos tratados com as doses avaliadas em comparação com o grupo controle negativo. No teste de micronúcleo, os animais tratados não apresentaram nenhuma alteração mutagênica ou citotóxica em eritrócitos do sangue periférico. O óleo da folha de *P. vicosanum* apresentou atividade anti-inflamatória nas duas doses testadas (100 e 300 mg/kg) através dos testes de edema de pata e pleurisia, sendo que para o teste de edema de pata, o melhor resultado foi obtido na terceira hora após a aplicação da carragenina. Além disso, o óleo essencial mostrou uma atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, e *C. albicans*, com valor de CIM ≥ 500 ug/mL; *P. aeruginosa* ≥ 1000 ug/mL e *Salmonella sp.* ≥ 250 ug/mL. Conclui-se que o óleo essencial das folhas de *P. vicosanum* apresenta atividades anti-inflamatória e antimicrobiana, sem causar toxicidade aguda ou genotoxicidade.

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

Alves e colaboradores [6] fizeram um levantamento etnobotânico das espécies vegetais que são utilizadas como plantas medicinais em dois fragmentos florestais localizados no município de Dourados-MS, e identificaram 28 famílias e 37 espécies consideradas medicinais segundo uso popular na região. Destas, as que apresentaram maior número de espécies foram Piperaceae (10,8%), Moraceae (8,1%), Smilacaceae (8,1%), Myrtaceae (5,4%) e Rubiaceae (5,4%).

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

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

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

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais e família Piperaceae

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

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

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

Alves e colaboradores [6] fizeram um levantamento etnobotânico das espécies vegetais que são utilizadas como plantas medicinais em dois fragmentos florestais localizados no município de Dourados-MS, e identificaram 28 famílias e 37 espécies

consideradas medicinais, segundo uso popular na região. Destas, as que apresentaram maior número de espécies foram Piperaceae (10,8%), Moraceae (8,1%), Smilacaceae (8,1%), Myrtaceae (5,4%) e Rubiaceae (5,4%).

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

2.2 Processo Inflamatório

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

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

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

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

2.2.1 Processo Inflamatório Agudo e Crônico

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

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

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

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

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

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

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

2.2.2 Anti-inflamatórios Não Esteroides e Plantas Medicinais

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

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

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

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

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

2.3 Patologias Infecciosas e Resistência Bacteriana

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3.1 Concentração Inibitória Mínima - CIM

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4 Estudos toxicológicos

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

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

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

2.4.1 Toxicidade Aguda

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

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

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

2.5 Ensaios de Genotoxicidade

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

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

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

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

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

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

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

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

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

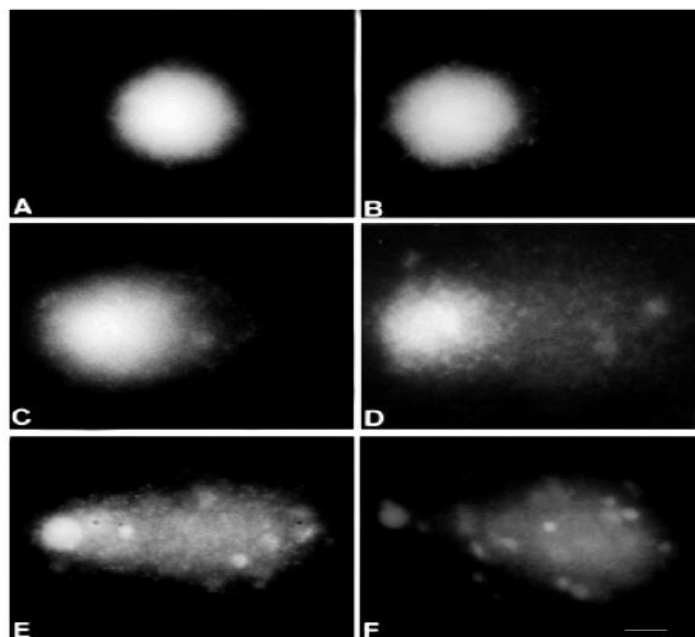


Figura 2. Classificação dos cometas em células de sangue periférico no ensaio SCGE. Classe 0 (A); Classe 1 (B); Classe 2 (C); Classe 3 (D); Classe 4 (E); Classe 5 (F) apoptose.

FONTE: Freitas, 2007.

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

2.5.2 Teste do Micronúcleo

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

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

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

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

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

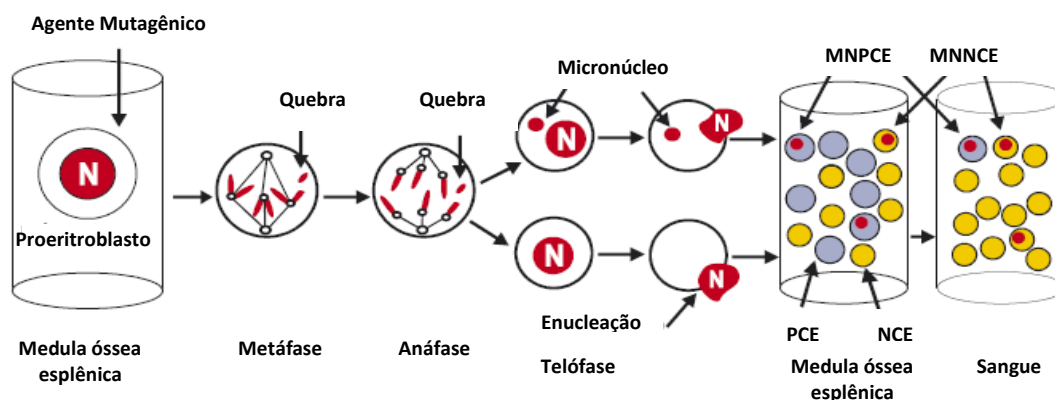


Figura 3. Eritropoiese *in vivo*. Formação de eritrócitos policromáticos, normocromáticos e micronúcleos. N: Núcleo. PCE: eritrócito policromático. NCE: eritrócito normocromático. MNPCE: Eritrócito policromático micronucleado

FONTE: Adaptado de Krishna e Hayashi, 2000.

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

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

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

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

3.2 Objetivos Específicos

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

4 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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