



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLOGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

MILENA DE SOUSA VASCONCELOS

Avaliação da Atividade Farmacológica *in vivo* do Óleo Essencial da *Piper marginatum* (PIPERACEA)

Santarém-PA
Fevereiro de 2019

MILENA DE SOUSA VASCONCELOS

Avaliação da Atividade Farmacológica *in vivo* do Óleo Essencial da *Piper marginatum* (PIPERACEA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências para obtenção do título de Mestra em Biociências; Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração: Fisiologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana.

Santarém- PA

Fevereiro de 2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Processamento Técnico da Divisão de Biblioteca da UFOPA. Catalogação de
Publicação na Fonte. UFOPA - Biblioteca Campus Tapajós

Vasconcelos, Milena de Sousa.

Avaliação da atividade farmacológica in vivo do óleo essencial da Piper Marginatum (Piperacea) / Milena de Sousa Vasconcelos. - Santarém, 2019.

50f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós Graduação em Biociências.

Orientador: Maxwell Barbosa de Santana.

1. Óleo Essencial. 2. Piper marginatum. 3. Gastroproteção. I. Santana, Maxwell Barbosa de. II. Título.

UFOPA/Sistema Integrado de Bibliotecas

CDD 23 ed. 615.32

MILENA DE SOUSA VASCONCELOS

Avaliação da atividade farmacológica *in vivo* do óleo essencial da *Piper Marginatum* (PIPERACEA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências para obtenção do título de Mestra em Biociências; Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração: Fisiologia Ambiental.

Conceito:

Data de Aprovação ____/____/____

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana.

Orientador – Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Profa. Dra. Sâmia Rubielle Silva de Castro

Membro Titular da Banca

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Profa. Dra. Tania Mara Pires Moraes

Membro Titular da Banca

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que apesar de ser clichê, tenho certeza que esteve comigo e me deu forças e coragem para não desistir mesmo quando nada dava certo. Sei que me dava a certeza no coração que tudo tem seu propósito e o tempo certo para acontecer.

Aos meus pais que sempre me ensinaram o valor da educação. Orgulha-los sempre será uma meta na minha vida.

Ao meu namorado, que bem mais que isso, foi meu porto seguro em todas as fases da pesquisa, desde o início. Não sei como teria conseguido realizar todos esses experimentos sem a sua ajuda. Obrigado por ser meu ombro acolhedor em todas as crises e momentos difíceis que passei ao longo dessa caminhada.

Ao meu orientador, Maxwell Santana. Um dos meus maiores medos em fazer um mestrado era a orientação. Sabia que seria difícil por ser diferente de tudo que havia feito, além de estar distante da minha área de formação. Mas eu tive a sorte de ser abençoada com alguém que eu sabia que podia contar, que esteve presente e que me ajudou muito a aprender sobre a vida acadêmica e pesquisa científica. Agradeço todos os ensinamentos e quero ser para meus alunos tão boa quanto você foi para mim.

Aos colegas de laboratório, em especial a Soraia com quem trocava “figurinhas” sobre nossas pesquisas e companhia nos experimentos. A Wanessa e Ludyane pela ajuda muito valiosa que me ajudou a poupar tempo no fim do experimento, além de me ajudarem a desenvolver minhas habilidades na docência.

A todos os laboratórios e funcionários da UFOPA, por onde passei.

RESUMO

A *Piper marginatum*, pertencente a família da Piperaceae, é uma planta nativa e endêmica no Brasil. É uma importante planta utilizada medicinalmente na América do Sul e Central. O uso mais comum da *Piper marginatum* está relacionada a distúrbios gastrointestinais. O óleo essencial da *Piper marginatum* (OEPM) vem sendo descrito com as mais diversas atividades: atividade anti-inflamatória e homeostática, antibacteriana, fungicida e até larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*. O objetivo desse trabalho foi avaliar possíveis efeitos farmacológicos gastroprotetor e antiedematogênico do Óleo Essencial da *Piper marginatum*. O óleo essencial foi obtido pelo processo de hidrodestilação. Foram utilizados camundongos albinos da linhagem swiss. Para análise química foi utilizada Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-EM). A toxicidade aguda foi obtida através do protocolo da OECD423/2001. Para atividade antiedematogênica utilizou-se o modelo de edema de orelha induzido por Fenol. Para a atividade gastroprotetora, utilizou-se os modelos de lesão gástrica induzida por Etanol Acidificado (0,3M HCL/Etanol 60%) e Indometacina (100 mg/Kg). Após os procedimentos, os animais foram sedados e eutanasiados por deslocamento cervical. Foi constatado que, após 1 hora da indução do edema, OEPM inibiu o edema tanto na dose de 1000 mg/Kg (55%) quanto na dose de 500 mg/Kg (42%), quando comparadas com o grupo Fenol. No teste de lesão gástrica induzida por Etanol acidificado, o OEPM demonstrou menor porcentagem de área ulcerada nas doses de 1000 (7,90%) e 500 mg/Kg (8,41%), quando comparadas ao grupo controle (17,92%). No teste de lesão gástrica induzida por Indometacina observa-se menor porcentagem de área ulcerada nos grupos que receberam OEPM, porém não evidenciou diferença estatística nas doses utilizadas 1000 (9,02%), 500 (11,61%) e 250 mg/Kg (15,08%), quando comparadas ao grupo controle (16,92%). Os resultados apresentados neste trabalho permitem sugerir que o OEPM possui princípios ativos com atividade gastroprotetora e antiedematogênica.

Palavras-chave: Óleo Essencial. *Piper marginatum*. Gastroproteção. Edema de Orelha.

ABSTRACT

Piper marginatum, in the Piperaceae family is a native and endemic plant in Brazil. It is an important plant used medicinally in South and Central America. The most common use of *Piper marginatum* is related to gastrointestinal diseases. The aim of this study was to evaluate the possible gastroprotective and antiedematogenic effects of *Piper marginatum* Essential Oil. For antiedematogenic effect was used the ear edema induced by Phenol. For the gastroprotective effect was used the gastric injury induced by acidified ethanol and Indomethacin. It was observed after 1 hour of edema induction, the OEPM inhibited edema both at the dose of 1000 mg / kg (55%) and 500 mg / kg (42%) when compared to the Phenol group. In the acidified acid-induced gastric injury test, the OEPM showed a lower percentage of ulcerated area at the doses of 1000mg / kg (7.90%) and 500 mg / kg (8.41%), when compared to the control group (17.92%). In the indomethacin-induced gastric test, a lower percentage of ulcerated area was observed in the groups which received the OEPM; however, there was no statistically significant difference at 1000 (9.02%), 500 (11.61%) and 250 mg / kg (15.08%), when compared to the control group (16.92%). The results presented in this study showed the OEPM has active compounds with gastroprotective and antiedematogenic effects.

Key-words: Essential Oil. *Piper marginatum*. Gastro protection. Ear edema.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 FAMILIA PIPERACEA E GÊNERO PIPER	10
2.2 <i>PIPER MARGINATUM</i>	11
2.3 INFLAMAÇÃO	13
2.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	15
2.5 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS	18
2.6 ÚLCERA GÁSTRICA	19
2.7 SECREÇÃO GÁSTRICA	19
2.8 FATORES DE PROTEÇÃO MUCOSA GÁSTRICA	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 GERAL	23
3.1 ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	24
4.2 ANIMAIS	24
4.3 OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	24
4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	25
4.5 TOXICIDADE AGUDA	25
4.6 AVALIAÇÃO DA TIVIDADE GASTROPROTETORA	25
4.6.1 Úlcera gástrica induzida por etanol acidificado	25
4.6.2 Úlcera gástrica induzida por Indometacina	26
4.7 ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA	26
4.7.1 Edema de orelha induzido por Fenol	26
4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA	26
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5 RESULTADOS	28
5.1 RENDIMENTOS	28
5.2 COMPONENTES QUÍMICO DO OEPM	28
5.3 TOXICIDADE AGUDA	29
5.4 ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA	30
5.5 ATIVIDADE GASTROPROTETORA	31

5.5.1 Úlcera gástrica induzida por Etanol Acidificado	31
5.5.2 Úlcera gástrica induzida por Indometacina	33
6 DISCUSSÃO	35
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
8 REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais vêm sendo utilizados há gerações pelas populações amazônicas. Seu uso tem as mais diversas especialidades. A utilização de plantas medicinais ainda é um importante recurso utilizado para a manutenção da saúde de comunidades (VÁSQUEZ, MENDONÇA E NODA, 2014). Embora as plantas venham sendo utilizadas como remédio há tempos, está havendo, atualmente, um aumento no interesse pelos produtos naturais (CAMARGO, 2005). Entre esses produtos, destacam-se os óleos essenciais, sendo de fácil obtenção em mercados populares.

Atualmente, a crescente preocupação com o meio ambiente tem conduzido a um maior interesse por produtos naturais. As razões para isso são diversas, entre os principais estão os preços dos medicamentos convencionais (CAMARGO, 2005).

O Uso de plantas como tratamento de doenças e processos inflamatórios é rotineiro, sendo que produtos derivados de plantas tem grande consumo devido também ao fácil acesso da comunidade a uma variedade de produtos naturais em muitas comunidades sem acesso a serviços de saúde (BADKE *et al.*, 2012).

O uso de substâncias de origem natural é comum na cultura amazônica. Estudos de que aliem o conhecimento popular com o conhecimento científico ainda são poucos em comparação à grande variedade de material a ser estudado, principalmente na Amazônia.

A *Piper marginatum* é uma planta pertencente a família Piperaceae. Seu uso comum está relacionado principalmente a alterações gastrointestinais, porém não há registros na literatura que comprovem a eficácia do uso desta planta e seus metabólitos para esse fim ((BRÚ & GUZMAN, 2016).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FAMÍLIA PIPERACEA E GÊNERO PIPER

É formada por 2500 a 3500 espécies com 5 gêneros, 3 deles existentes no Brasil com mais de 400 espécies, entre eles a *Piper marginatum*. Dentro da família Piperaceae, existe o gênero Piper, composta por 5 a 8 gêneros, sendo o Piper e o Piperona os maiores. As plantas do gênero Piper são bastante uniformes morfológicamente (DYER *et al*, 2004; GUIMARÃES e CARVALHO-SILVA, 2012).

Em estudos sobre os constituintes químicos encontrados em plantas do gênero Piper, foram classificados quase seiscentos constituintes químicos pertencentes a diferentes classes de compostos bioativos, dentre eles: Alcalóides, amidas, terpenos, esteroides, flavonoides, entre outros (PARMAR *et al*, 1997; PELAYO *et al*, 2016).

Existem várias atividades biológicas descritas para plantas do gênero Piper coletadas em várias partes do mundo como África, América Central e América do Sul, dentre elas atividade anti-inflamatória, antitumoral, antimalárica, antiparasitária e antimicrobiana (MGBEAHURUIKE *et al*, 2017; SILVIA e BASTOS, 2007; BEZERRA *et al* 2007; BEZERRA *et al*, 2008). Silvia e Bastos (2007) comprovaram atividade fungicida do óleo essencial de 10 gêneros Piper coletados na região amazônica, dentre elas a *Piper dilatatum*, *Piper tuberculatum* e *Piper marginatum*.

A Tabela 1 destaca o uso tradicional de várias espécies de Piper que foram relatados na literatura.

Tabela 1- Uso tradicional de espécies do gênero Piper.

Espécie de Piper	Uso tradicional/medicinal
<i>Piper aborescens</i> Roxb.	Reumatismo, atividade citotóxica e antiagregação plaquetária
<i>Piper acutifolium</i> Ruiz and Pav.	Antisséptico, gastrite e ferimentos de pele.
<i>Piper aduncum</i> L.	Dor estomacal, influenza, reumatismo, febre e tosse.

<i>Piper alatabaccum</i> Trel. And Yunck	Dor estomacal e diarreia.
<i>Piper angustifolium</i> Lam.	Lesões cutâneas associadas a leishmaniose, vaginite, desordens hepáticas e antisséptico.
<i>Piper boehmeriifolium</i>	Analgésico, reumatismo e artrite.
<i>Piper clausenianum</i>	Candidíase e infecções ginecológicas.
<i>Piper cubeba</i> L. F	Desordens renais, gonorreia, sífilis e dor abdominal.
<i>Piper cumanense</i> Kunth	Malária e febre.
<i>Piper grande</i> Vahl	Antiplasmódica e lesões de pele associada a leishmaniose.
<i>Piper nigrum</i> L.	Diarreia, febre, tosse e acometimentos gástricos.
<i>Piper sanvicentense</i> Trel. & Yunck	Atividade antitumoral e anticâncer.

Fonte: MGBEAHURUIKE *et al*, 2017.

2.2 PIPER *marginatum*

A *Piper marginatum* (Figura 1) da família da Piperaceae, conhecida popularmente como Caapeba, é uma planta nativa e endêmica no Brasil (GUIMARÃES *et al*, 2015). É uma importante planta utilizada medicinalmente na América do Sul e Central.

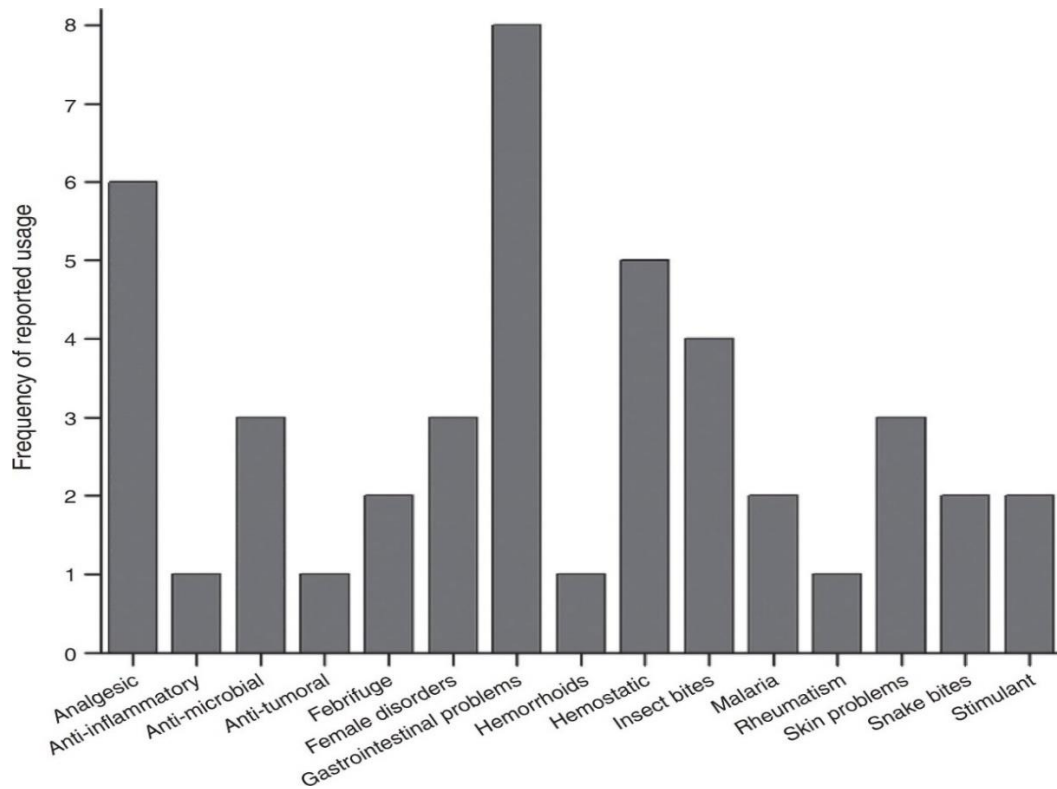
Figura 1. *Piper marginatum*



Fonte: Acervo pessoal da autora, 2018.

O uso popular mais comum da *Piper marginatum* (Figura 2) está relacionada a distúrbios gastrointestinais, enquanto a analgesia é a segunda atividade relatada mais destacada na literatura (BRU e GUZMAN, 2016). Porém não há na literatura tividade gstrointestinal comprovada.

Figura 2. Frequência de uso comum de *Piper marginatum* na cultura tradicional com base no tipo de doença a tratar.



Fonte: (BRÚ & GUZMAN, 2016).

No Brasil, folhas de *Piper marginatum* podem ser utilizadas para tratar afecções reumatológicas, gastrointestinais, sangramento de feridas e dor de dentes (PEREIRA et al, 2011; CORRÊA e PENA, 1984; BRU e GUZMAN, 2016). Para tratamento de doenças, o uso de óleos essenciais torna-se comum e esta presente há gerações pelas comunidades amazônicas.

A função dos óleos essenciais nas plantas pode ser tanto para atrair polinizadores, quanto para repelir insetos, pragas e patógenos. Muitas plantas desenvolveram substâncias que funcionam como inseticidas ou fungicidas naturais (CAMARGO, 2005).

O Óleo Essencial da *Piper marginatum* (OEPM) vem sendo descrito com as mais diversas atividades: atividade anti-inflamatória e homeostática (D'ANGELO et al, 1997), atividade antibacteriana (SÁNCHEZ et al 2012), fungicida (AUTRAN et al, 2009; REIGADA et al, 2007) e até larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* (COSTA et al, 2010).

Estudos realizados em diferentes ocasiões e lugares mostraram que há variação no tipo de componentes encontrados nos óleos de acordo com a época e lugar de onde foram coletadas (ANDRADE et al. 2008). Componentes químicos como flavonóides, alcalóides, monoterpenos, álcoois seisquiterpênicos, foram mencionados em diversos estudos (TILLEQUIN et al, 1978; SILVA et al, 1973, SANTOS, CHAVES e GRAY, 1998; CHAVES, OLIVEIRA e SANTOS, 2006).

2.3 INFLAMAÇÃO

A Inflamação é uma resposta dos tecidos vascularizados a infecções ou lesão tecidual. Consiste em recrutar células e moléculas de defesa do hospedeiro da circulação para os locais onde são necessárias, com a finalidade de eliminar os agentes agressores, ou reparação tecidual. É um fenômeno essencial e benéfico (HIGGINS & LEE, 1984; ROBBINS & COTRAN, 2015).

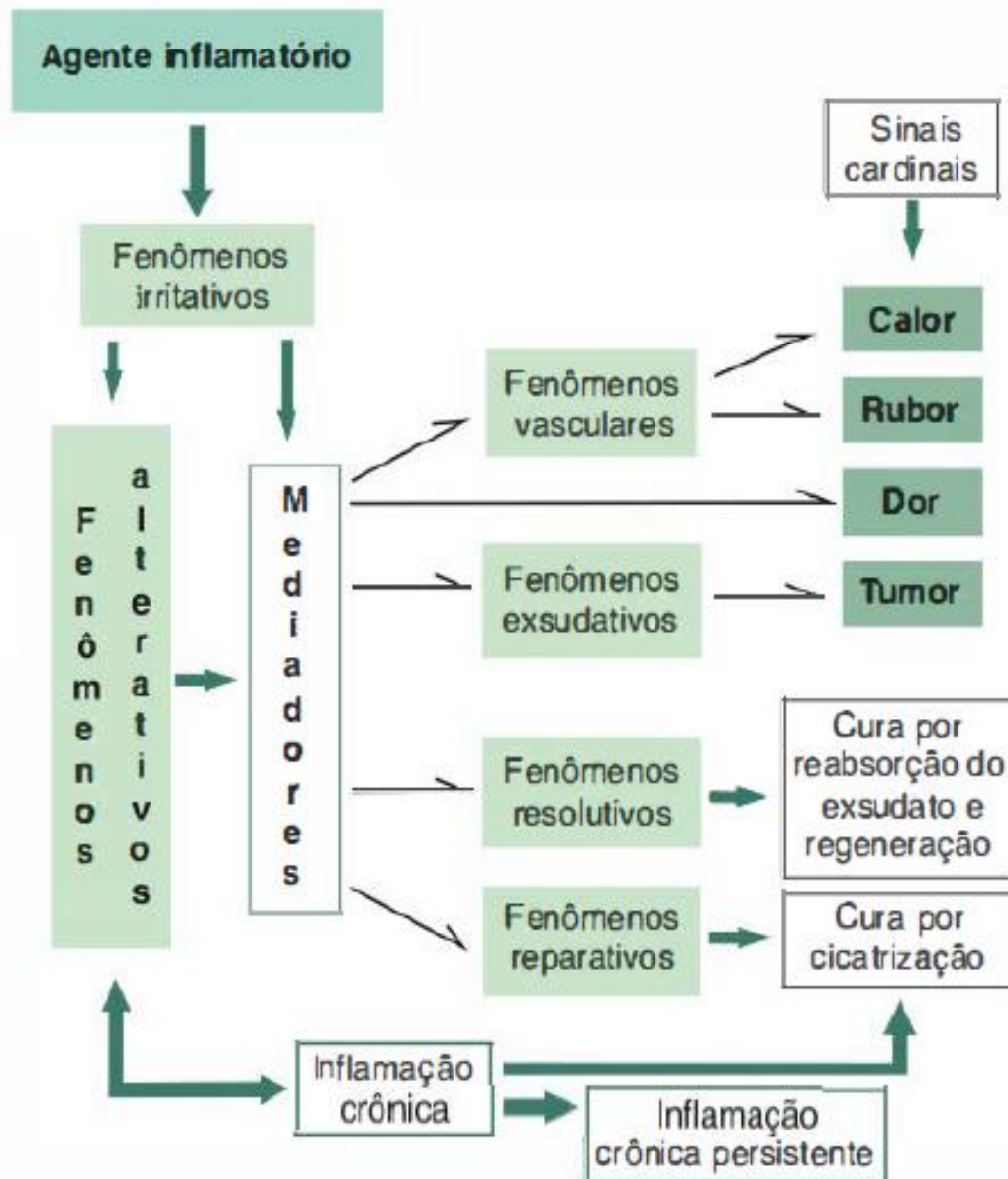
Na primeira fase, os vasos ao redor do local reagem para recrutar células de defesa do sistema imune para o local da lesão. Na segunda fase, ocorre remoção ou neutralização do estímulo que desencadeou a lesão, e em seguida o ocorre o processo de reparação tecidual (BOGLIOLO, 2011).

As alterações iniciais caracterizam-se por quatro sinais cardinais: calor, hiperemia, edema, dor e perda de função (KIM et al., 2004). Os três primeiros devem-

se ao aumento no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular com consequente recrutamento de leucócitos. Os mediadores inflamatórios presentes hipersensibilizam terminações nervosa nociceptivas provocando dor (KAWAHARA,2014).

O mediadores inflamatórios ativados induzem alterações vasculares e extravasamento de exsudatos na fases inicial da inflamação. A vasodilatação arteriolar devido ação principalmente de histamina, substância P, bradicinina, Prostaglandinas; aumenta o fluxo sanguíneo no local de lesão. Conseqüentemente, há aumento na permeabilidade vascular resultante da formação de poros interendoteliais por contração do citoesqueleto dessas células, com extravasamento de exsudato plasmático rico em leucócitos especializados em eliminar infecções e reparo tecidual. (BOGLIOLO,2011 BRANCO *et al.*, 2018; HIGGINS & LEE, 1984).

Figura 3- Esquema simplificado da resposta inflamatória



Fonte: Bogliolo,2011.

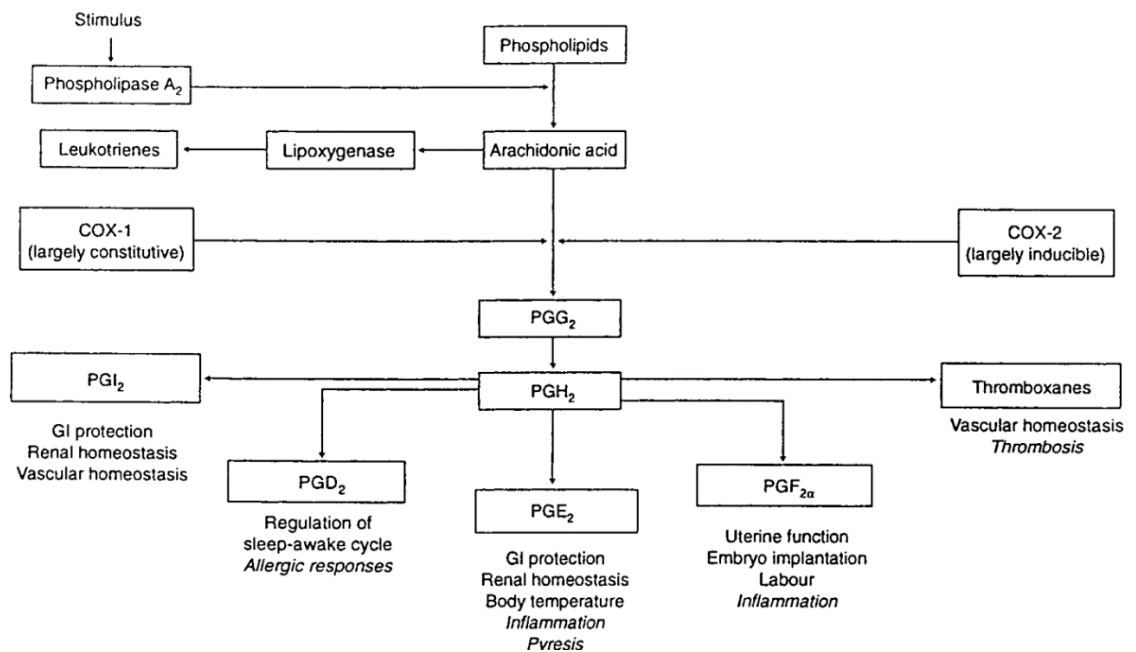
2.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

A Histamina é um dos principais mediadores inflamatórios, estando presente em todos os tecidos. É liberada pelos mastócitos frente a estímulos (mecânicos, químicos, citotóxicos) por meio da exocitose, sendo um importante mediador que promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Há evidências que também possui papel importante em lesões inflamatórias na pele, aumentando a recrutamento de celular (BEAVEN, 1976; BRANCO *et al.*, 2018).

Existem quatro tipos de receptores histamínicos e estão relacionados a modulação de AMPc intracelular por meio da ativação da proteína G e consequente transdução de sinais intracelulares. O receptor H1 está relacionado a alterações vasculares. Os receptores H2 encontrados nas células parietais do estômago atuam indiretamente na estimulação da bomba de prótons promovendo aumento de secreção de suco gástrico por meio do aumento do AMPc. Os receptores H3 estão relacionados a neurotransmissão central e periférica. Os receptores H4 estão relacionados a resposta imune (BRANCO *et al.*, 2018; OHSAWA e HIRASAWA, 2014.).

Outro mediador inflamatório, as prostaglandinas, estão entre os mediadores mais importantes da resposta inflamatória. A síntese (Figura3) está ligada a liberação de ácido araquidônico (AA) intracelular, processo que é catalisado pela enzima fosfolipase A2. O AA livre pode ser metabolizado em vários mediadores, principalmente as prostaglandinas, por meio das enzimas Ciclo-Oxigenases (COX-1 e COX-2). Por essa razão, as Ciclo-Oxigenases estão entre os principais alvos de fármacos com ação anti-inflamatória (KURUMBAIL *et al.*,1996 MITCHELL *et al.*, 1994).

Figura 4- Síntese de Prostaglandinas



Fonte: Brooks *et al.*,1999.

As prostaglandinas I2(PGI2) e E2(PGE2) são as principais envolvidas no processo inflamatório agudo, promovendo a vasodilatação local. Podem potencializar a ação de outros mediadores inflamatórios como a bradicinina e Histamina e também

auxiliam no aumento da sensibilidade das fibras nociceptivas (BROOKS *et al.*,1999; KAWAHARA,2014).

As prostaglandinas também exercem outras funções no organismo como proteção gástrica, regulação do sono e temperatura corporal e, no útero, auxiliam no processo de implantação do embrião (BROOKS *et al.*, 1999). São produzidas por vários tecidos e agem como mediadores celulares tanto autócrinos como parácrinos (DUBOIS *et al.*, 1998). A figura 4 esquematiza a síntese de prostaglandinas. A tabela 2 resume a ação dos mediadores presentes no processo inflamatório.

Tabela 2- Funções dos mediadores inflamatórios

Resposta	Mediadores Inflamatórios
Vasodilatação	Prostaglandinas (PG) PGI ₂ , PGE ₁ , PGE ₂ , PGD ₂ , Óxido nítrico (NO).
Aumento da permeabilidade vascular	Histamina C3a, C5a (componentes do complemento) Bradicinina Leucotrienos (LT), particularmente LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ Fator de ativação das plaquetas Substância P Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)
Lesão tecidual	Produtos lisossomais dos neutrófilos e macrófagos Radicais de oxigênio NO
Quimiotaxia e ativação dos leucócitos	C5a LTB ₄ , lipoxinas (LX), LXA ₄ , LXB ₄ Produtos bacterianos

Dor	Bradicinina CGRP
Febre	Interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) LTB4, LXA4, LXB4 PGE2, PGI2

2.5 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

Os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (AINE's) são amplamente utilizados para o tratamento de processos inflamatórios. São capazes de inibir a síntese e liberação de prostaglandinas sintetizados a partir das COX 1 e COX2. Os AINE's bloqueiam a entrada de ácido araquidônico pelos canais hidrofóbico das COX e impedem a chegada até o sítio ativo das enzimas e consequentemente, a produção de prostaglandinas (BJARNASON *et al.*, 2018).

As enzimas ciclo-oxigenases tem funções parecidas dentro do processo inflamatório, porém, a COX-1 constitutiva difere-se por ser expressa continuamente pelos tecidos mantendo a produção de Prostaglandinas, responsáveis também pela proteção gástrica. A COX-2 induzível é expressa frente a processos inflamatórios, logo, AINE's inibidores seletivos da COX 2 (COXIB's) são considerados menos danosos do que os convencionais pois promovem menos danos mucosa gástrica decorrente da inibição de prostaglandinas (KURUMBAIL *et al.*, 1996; RODRÍGUEZ e TOLOSA, 2007; MITCHELL *et al.*, 1994.).

A outra classe de antiinflamatórios utilizadas são os glicocorticóides. Eles são capazes de inibir a Fosfolipase A2, impedindo a liberação de ácido araquidônico, retardando toda a cascata inflamatória devido a limitação de mediadores inflamatórios derivados deste componentes, como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Também tem a função de interferir na atividade das COX's, inibir citocinas e outras enzimas envolvidas no processo inflamatório, tendo atividade anti-inflamatória mais eficiente que outros fármacos anti-inflamatórios como os AINE's. (GOPPELT-STRUEBE, 1997; MASFERRER *et al.*, 1990). Apesar disso, possuem mais efeitos colaterais como:

2.6 ÚLCERA GÁSTRICA

Fatores ambientais, fumo, consumo excessivo de álcool e entorpecentes, e uso de AINE's estão entre as causas mais frequentes de úlceras gástricas (MALFEITHEINER, CHAN e MCCOLL, 2009).

Os maiores fatores de risco para úlcera são uso de AINE's e infecção por *Helicobacter pylori* (LANAS, 2017). O uso a curto ou longo prazo está relacionando a um maior risco de desenvolver complicações gástricas. Usuários crônicos de AINE's tem chance de 3 a 5 vezes maior do que não usuários (RODRÍGUEZ e TOLOSA, 2007).

Os Aines's inibem a síntese de prostaglandinas, mecanismos de reparo tecidual do tecido gástrico e agregação plaquetária. A soma desses fatores leva a uma redução da barreira de defesa e de reparo e maior predisposição a hemorragia da mucosa gástrica, favorecendo o aparecimento de úlceras (HALTER *et al.*, 2001).

A patogênese está relacionada a uma alteração no equilíbrio entre fatores que agredem a mucosa, como aumento da produção de suco gástrico, e fatores de defesa da mucosa, como diminuição da barreira de muco (MALFEITHEINER, CHAN e MCCOLL, 2009).

O estímulo ao nervo vago está relacionado a estimulação de agentes envolvidos na patogênese da úlcera gástrica. Este nervo controla diretamente a secreção gástrica e de pepsina (ABDEL-SALAN *et al.*, 2001).

Vários produtos naturais vem sendo apresentados com atividade gastroprotetora e como alternativa de fácil acesso para tratamento de desordens gástricas (Borelli & Izzo, 2000).

2.7 SECREÇÃO GÁSTRICA

O interior das células parietais é preenchido com um sistema túbulo vesicular contendo proteínas transportadoras, H^+/K^+ - ATPase “bomba de prótons”, os canais de Cloro (Cl^-) e a anidrase carbônica. Em condições basais, os canalículos das células parietais estão fechados para o lúmen do estômago. Porém, após estimuladas, rapidamente a superfície aumenta de tamanho e ocorre a fusão entre o sistema tubulovestibular e os canalículos excretorios (AIRES, 2012)

Frente a estímulos, as células parietais iniciam o processo de produção de suco gástrico. Ocorrerá a reação de hidratação de CO_2 , catalisada pela anidrase carbônica, resultando em ácido carbônico. Este pode dissociar-se em íons hidrogênio (H^+) e Bicarbonato (HCO_3^-). O H^+ é excretado para o lúmen do estômago através de um contra transporte de potássio (K^+), mediado pela bomba de prótons presente na membrana das células parietais (RANG&DALE, 2015; HELANDER e KEELING, 1993).

O bicarbonato é transportado para o plasma em troca por Cl^- e este é transportado para o interior das células parietais. Com aumento da concentração de Cl^- intracelular e alteração do equilíbrio eletroquímico, há liberação passiva de Cloro (Cl^-) para o lúmen do estômago (RANG&DALE, 2015; SOLL e GROSSMAN, 1978).

Vários fatores são responsáveis pelo estímulo e controle da secreção de suco gástrico:

- acetilcolina como neurotransmissor parassimpático vagal;
- gastrina sintetizada por células G gástricas;
- Histamina: produzida pelas Células enterocromafinsímiles (ECL);
- Somatostatina: liberado pelas células D;
- Prostaglandinas: PGE_2 e PGEI_2

A acetilcolina liga-se a receptores muscarínicos colinérgicos (M_3) na superfície das células parietais, e age aumentando a concentração de Ca^{2+} intracelular, que ativam proteínquinases dependentes de Ca^{2+} (PKC) e fosforilam proteínas específicas que estimulam a secreção de HCL por meio da bomba de prótons. De modo semelhante, a gastrina também aumenta a concentração de Ca^{2+} ao ligar-se aos receptores CCK_2 . Ambos são capazes também de estimular as células ECL a liberar histamina, induzindo indiretamente a produção de suco gástrico (CUI e WALDUM, 2007; MCPHEE E GANONG, 2011)

A Histamina, ligando-se ao seu receptor H_2 , estimula a liberação de AMP_c intracelular capaz de induzir a bomba de prótons das células parietais para síntese de HCL por meio de proteínquinases do tipo A (PKA) (HELANDER e KEELING, 1993; SOLL e GROSSMAN, 1978)

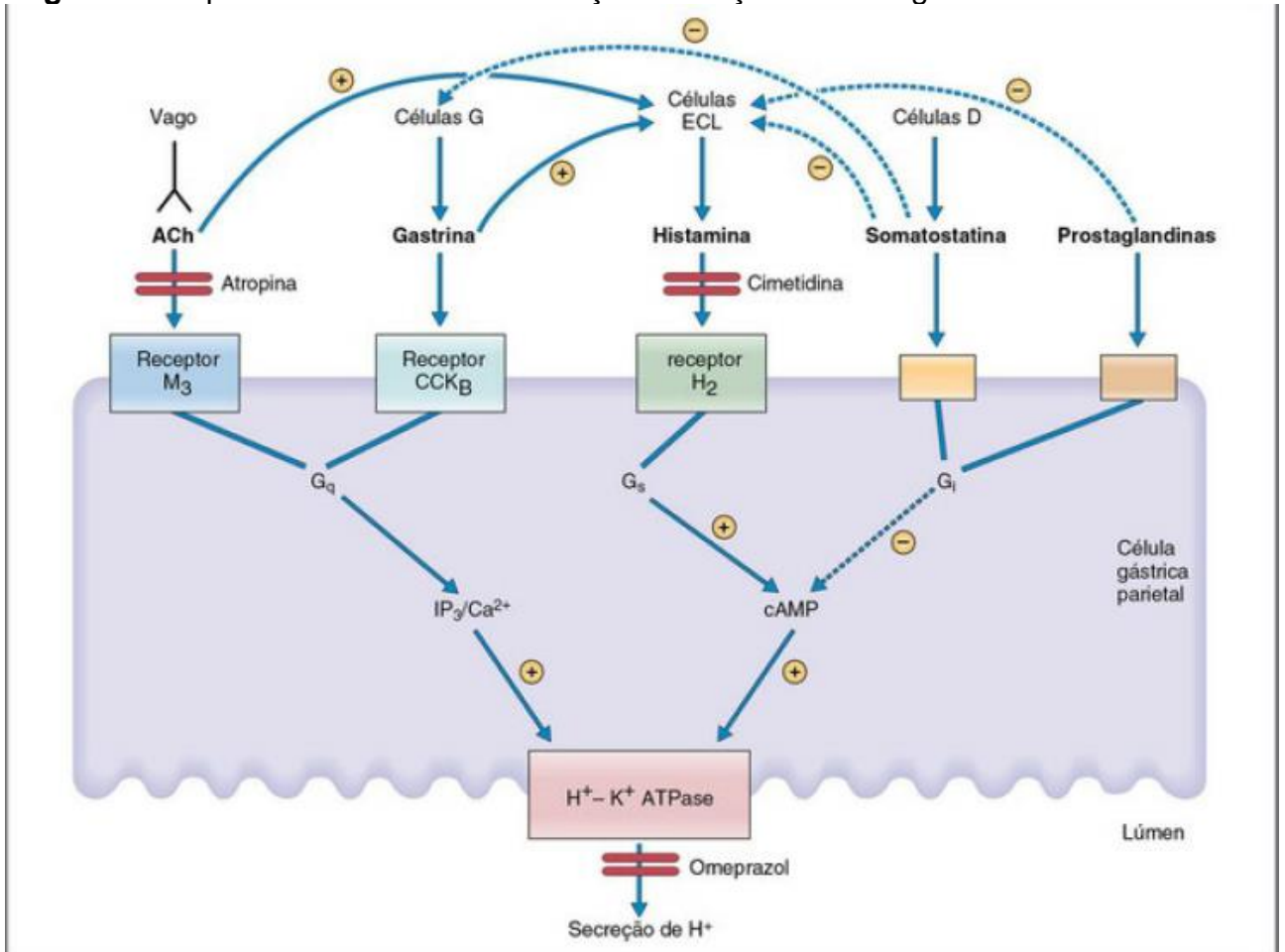
O controle e inibição da síntese de suco gástrico é feito por meio da somatostatina, que ao ligar-se ao seu receptor, reduz a concentração de AMP_c

intracelular tendo efeito direto sobre a síntese de suco gástrico. Também atua na inibição da liberação de Histamina pelas células ECL e Gastrina pelas células G (HELANDER e KEELING,1993; SHAMBUREK e SCHUBERT, 1993)

As prostaglandinas têm efeito de proteção gástrica como aumento de produção de bicarbonato e muco via receptor EP3 (isoforma de receptor da PGE₂), mas também atuam na redução da produção de suco gástrico ao ligar-se aos receptores específicos das células ECL (de LUCIA, 2014; SHAMBUREK e SCHUBERT, 1993)

Os receptores envolvidos tanto no estímulo quanto na inibição da secreção de suco gástrico são um dos principais alvos dos fármacos utilizados para o tratamento de úlcera gástrica (MALFERTHEINER, CHAN e MCCOLL, 2009). A Figura 4 exemplifica a regulação da secreção de suco gástrico e o alvo de parte dos fármacos existentes.

Figura 5- Esquema do controle de liberação e inibição do suco gástrico.



Fonte: CONSTANZO,2014.

2.8 FATORES DE PROTEÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA

A manutenção da integridade da mucosa gástrica deve-se ao equilíbrio entre fatores que agredem a mucosa e as barreiras de proteção da mucosa (ABDEL-SALAN et al, 2001). A barreira de proteção da mucosa gástrica consiste em: barreira de muco e Bicarbonato (HCO_3^-), regulação de prostaglandinas, Óxido Nítrico (NO), citocinas, inervação entérica e fluxo sanguíneo local (TAKEUCHI e WANG, 2014).

O muco e o HCO_3^- são secretados pelas células superficiais das gândulas gástricas. O Bicarbonato fica retido na barreira de muco e juntos deixam o pH local próximo a 7. Serve como proteção da parede gástrica por tamponamento do HCL pelo HCO_3^- , e previne a difusão de H^+ para o interstício pela barreira de muco (COSTANZO,2014).

O muco serve como uma barreira de fosfolípidos que aderem a superfície da mucosa gástrica e a protegem. A interação entre AINE's e esses fosfolípidos danifica a estrutura desse revestimento hidrofóbico, deixando a mucosa a mostra e vulnerável a agentes agressores (BLACKLER et al, 2014; BJARNASON et al,2018).

A mucosa gástrica é bastante vascularizada, o que auxilia na remoção e neutralização de ácido de volta a lâmina e a chegada de suprimento correto de oxigênio e nutrientes e fatores de proteção da mucosa como as prostaglandinas. As prostaglandinas têm função primordial na redução de vasoconstrição frente a injúrias. Diminuição do fluxo sanguíneo exacerba os efeitos de agentes ulcerogênicos (ABDEL-SALAN et al, 2001).

O Óxido Nítrico possui capacidade de redução do efeito da inibição de prostaglandinas, pois possibilitava aumento no fluxo sanguíneo por vasodilatação local e maior aderência de neutrófilos, possibilitando reparo tecidual (HALTER *et al.*, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar possíveis efeitos farmacológicos gastroprotetores e anti-edematogênicos do Óleo Essencial da *Piper marginatum*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar a análise fitoquímica do OEPM.
- Avaliar toxicidade aguda do OEPM em camundongos.
- Avaliar atividade gastroprotetora do OEPM em modelos de úlcera induzida por etanol acidificado e indometacina;
- Avaliar atividade anti-edematogênica do OEPM em modelo de edema de orelha induzido por fenol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Piper marginatum* utilizadas para produção do óleo essencial foram coletadas na comunidade Cipoal, situada na BR 163, município de Santarém, Km 10 (S 02°30'06.4"; W 054°43'45.4"), no dia 15 de julho de 2017, de 10-12 horas. a exsicata foi Depositada no herbário da Universidade Federal do Oeste do Pará sob o número HSTM-10926.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) da variedade Swiss, machos e fêmeas (22-35g), de seis a 10 semanas, mantidos em caixas de propileno, com ciclos de claro/escuro de 12 horas, temperatura de $\pm 23^{\circ}$, recebendo ração balanceada diariamente e água a vontade. Os animais eram procedentes do Biotério do Instituto Esperança de Ensino Superior- IESPES.

Todos os animais permaneceram no laboratório Laboratório de Química Aplicada a Análise Toxicológicas e Sanitária da UFOPA, Unidade Tapajós, Santarém – Pará por um período de 24 horas antes da realização dos testes para adaptação.

Todos os testes desenvolvidos seguiram as normas de ética com animais, tendo aprovação do CEUA-UFOPA, protocolo 0220180020.

4.3 OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

As folhas inicialmente passaram por processo de desinfecção por meio de 3 banhos com 2 minutos cada: hipoclorito, álcool e água. Após os procedimentos, foram secas e colocadas em estufa por 7 dias em uma temperatura constante de 40° .

O óleo essencial foi obtido através do processo de hidrodestilação. Foram utilizadas 1200g de folhas de *Piper marginatum*. Após secas, as folhas foram trituradas e mantidas em ebulição por 4 horas, em um sistema de doseamento tipo Cleavenger. Ao final do processo, o óleo foi retirado do aparato e mantido em vidro âmbar, em resfriamento na geladeira.

Para avaliação do rendimento do OEPM, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = 100 \times \frac{\text{massa do OEPM}}{\text{massa do amostra}}$$

4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A análise química foi realizada através da Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GG- EM) na divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade de Campinas (UNICAMP). Foi utilizado cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 equipado com um detector seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) nas seguintes condições: temperatura do injetor 250°C, Coluna 80°C, taxa de aquecimento 5°C/min até 280° e detector 300°C. Foi utilizado gás Hélio como gás de arraste numa vazão de 1mL/min e detector seletivo de massas operando a 70 eV, m/z 30 a 500 u.m.a.. O OEPM foi solubilizado e a identificação dos compostos majoritários realizada através da comparação entre os Índices de Retenção (IR) calculados, com os disponíveis na literatura e a base de dados da biblioteca NIST.

4.5 TOXICIDADE AGUDA

Foi utilizado o protocolo da OECD 423/2001, para obtenção da faixa de toxicidade. Foram utilizados camundongos albinos da linhagem Swiss, fêmeas, pesando entre 32-36g. O Óleo Essencial da *Piper marginatum* (OEPM) foi diluído em solução Salina (0,9%) e Tween 80. Os animais foram divididos em 4 grupos com 3 animais cada e separados quanto a dose de óleo a ser recebida: :grupo (1) controle/salina.; grupo (2) 50mg/kg; grupo (3)300 mg/kg e grupo (4) 2000mg/kg. Os animais foram observados a cada 30 minutos nas primeiras 4 horas, e depois diariamente na mesma hora de administração durante 14 dias. Foram observados parâmetros como: alterações na pele, nos pelos, nos olhos, mucosas, desconforto respiratório, alterações motoras do comportamento, tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sonolência e morte, sendo anotado o dia de aparecimento de sintomas e morte caso ocorresse. O peso inicial e final também foi avaliado. Após o teste, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA

4.6.1 Úlcera Gástrica induzida por Etanol acidificado

Seguindo protocolo de Mizui e Doteuchi (1983), com modificações, após um jejum prévio de 24 horas, os animais foram divididos em 5 grupos com 7 animais

cada: controle/salina, lansoprazol (30mg/Kg), OEPM (1000, 500 e 250 mg/Kg). Todas as soluções foram administradas oralmente 1 hora antes da administração do agente lesivo (0,2mL de 0,3M HCL/etanol 60%). Uma hora após a administração do agente lesivo, os animais foram sedados e eutanasiados por deslocamento cervical, tiveram seus estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e limpos com água destilada para avaliação das úlceras. Os estômagos foram comprimidos em lâminas histológicas e escaneados (scanner HP PSC 1315) e as imagens foram analisadas através do software *ImageJ*®. A porcentagem de área ulcerada foi utilizada como parâmetros para avaliação.

4.6.2 Úlcera gástrica induzida por Indometacina

Este teste foi realizado seguindo o protocolo de Rainsford (1980) com modificações. Após um jejum prévio de 24 horas, os animais foram divididos em 5 grupos com 6 animais cada: controle/salina, Cimetidina (100mg/Kg), OEPM (1000, 500 e 250 mg/Kg). Todas as soluções foram administradas oralmente 1 hora antes da administração do agente lesivo (indometacina 100mg/Kg p.o.). Quatro horas após a administração do agente lesivo, os animais foram sedados e eutanasiados por deslocamento cervical, tiveram seus estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e limpos com água destilada para avaliação das úlceras como descrito no item 3.6.1.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA

4.7.1 Edema de orelha induzido por Fenol

Seguindo o protocolo de Lim (2004), com adaptações, os animais foram divididos em 4 grupos com 7 animais cada: controle/acetona, Dexametasona (0,1 mg/orelha), OEPM (20 µL nas doses de 1000 e 500 mg/Kg). O agente lesivo (20 µL de fenol 10%/acetona) foi administrado topicamente na orelha direita dos animais e em seguida as substâncias testadas. Uma hora depois, os animais foram sedados e eutanasiados por deslocamento cervical e foram retirados pequenos fragmentos de 6mm de diâmetro de cada orelha com uso de “punch” de biópsia. A diferença no peso das orelhas (mg) foi utilizada como medida de avaliação.

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Todos os fragmentos foram fixados por 48 horas em formol tamponado (10%), corados posteriormente processados para análise.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 6. Os resultados foram expressos por meio de média \pm erro padrão médio (EPM.). Foi utilizado o teste de análise de variância (one- way ANOVA), seguido Newman-Keuls para comparações múltiplas (* $p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 RENDIMENTO

A partir de 1200g de folhas secas de *Piper marginatum*, obteve-se 5,6516g de óleo essencial. O rendimento total correspondeu a 0,47%.

5.2 COMPONENTES QUÍMICOS DO OEPM

Tabela 3. Componentes Químicos encontrados no OEPM

t _R (min)	IR	Identificação	% rel.
5,388	932	α-pineno	2,01%
6,501	975	β-pineno	1,51%
6,857	989	β-mirceno	0,38%
7,473	1010	Δ- 3- careno	3,13%
8,048	1026	Limoneno	0,27%
8,337	1034	trans-beta-ocimeno	1,39%
8,691	1044	β-ocimeno	1,43%
10,60	1099	Linalol*	5,81%
18,219	1286	Safrol*	5,70%
20,225	1334	Δ-Elemeno	0,42%
21,348	1361	Ciclosativeno	0,66%
21,850	1373	α-Copaeno*	6,19%
22,189	1381	β-borboneno	1,97%
22,407	1386	β-Copaneno	0,30%
22,495	1389	β-elemeno	0,59%
23,062	1402	Metileugenol	1,63%
23,627	1416	cariofileno*	7,82%
23,975	1425	2-isopropil-5-metil-9-metilenebiciclo [4.4.0]dec-1-eno	0,97%
24,363	1435	Alloaromadendreno	0,39%
24,568	1440	Ni	0,44%
24,938	1449	Humuleno	1,56%
25,057	1452	beta-Guaieno	0,33%
25,221	1456	Ni	0,34%
25,696	1468	Ni	0,71%
25,921	1474	γ- muuroleno	0,84%
26,089	1478	Germacreno D	4,87%
26,285	1483	β- Selineno	3,20%
26,721	1494	γ-Elemeno*	7,61%
26,860	1497	α-muuroleno	1,41%
27,016	1501	Ni	0,006%
27,368	1510	Ni	0,58%
27,481	1513	Eudesma-3,7(11)-Dieno	0,24%
27,761	1520	Δ-cadineno	2,86%
28,211	1532	3,4- metilendioxipropiofenona*	15,29%

28,746	1546	Elemol	0,003
29,109	1555	Elemicina	0,99%
29,354	1561	Isoelemicina	0,99%
29,837	1574	Espatulol	3,89%
30,016	1578	Óxido de Cariofileno	2,08%
31,729	1624	Ni**	0,74%
31,909	1629	2-Hidroxi-4,5-metilenidioxipropiofenona	2,31%
32,076	1633	Ni**	0,77%
32,219	1637	epi- α -Muurolol	1,00%
32,488	1644	β -Selinenol	0,93%
32,665	1649	α -Cadinol	1,69%
32,780	1652	β -Maaleno	0,37%
35,541	1729	Ni**	0,46%

* Componentes majoritários

** ni: não identificado.

Os principais constituintes químicos encontrados no OEPM 3,4-metilenodioxipropiofenona, Cariofileno, Linalol, Safrol, α -Copaeno. Entre os componentes majoritários, foi encontrada diversas classes de compostos que estão presentes em plantas com função principal a proteção contra predadores. O local de coleta das folhas de *Piper marginatum*, foi em local aberto e suscetível a predadores naturais. Assim foi encontrado compostos com atividade protetiva de plantas.

5.3 TOXICIDADE AGUDA

O OEPM foi administrado oralmente nas doses de 2000 mg/kg, 300 mg/kg e 50 mg/Kg. Os animais foram observados durante 14 dias e pesados diariamente.

Durante os 14 dias de teste de toxicidade, o grupo 4 (2000mg/Kg) apresentou sonolência durante o primeiro dia de teste, não apresentando essa alteração durante o restante do período do teste. Não foi observada essa alteração nas outras doses avaliadas.

Tabela 4- Média de Peso Inicial e Final da Toxicidade aguda do OEPM

Grupos	Dia 0	Dia14
2000mg/Kg	32 \pm 1g	32 \pm 0,57g
300 mg/Kg	33 \pm 1g	36,7 \pm 1.52g
50 mg/Kg	32 \pm 1g	36,7 \pm 1.52g
Veículo	25g	29.4 \pm 2.30g

A Tabela apresenta os valores médios (g) \pm EPM por grupo, do peso inicial e final.

A Tabela 4 mostra a evolução do peso durante o teste de toxicidade. Não houve alterações significativas entre os grupos testados e o controle. Houve

sonolência no primeiro dia de administração das soluções na maior dose (2000 mg/Kg). Não houve quaisquer outras alterações no comportamento dos demais animais avaliados, assim como não houve mortes. Relatar sonolência.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA

Para avaliar o efeito antiedematogênico do OEPM foi utilizado o teste de edema induzido por Fenol a 10%. Foi constatado que, após 1 hora da indução do edema, OEPM inibiu o edema tanto na dose de 1000 mg/Kg (55%) quanto na dose de 500 mg/Kg (42%), quando comparadas com o grupo Fenol.

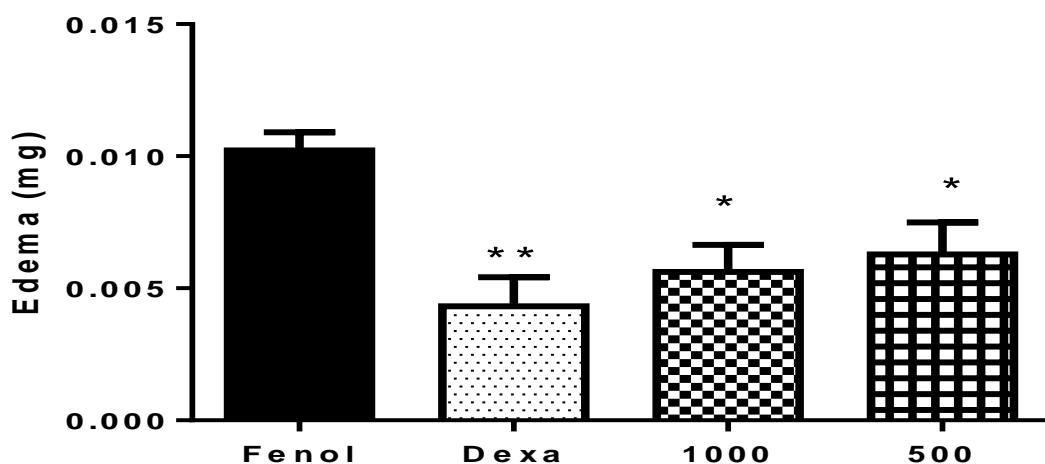
Tabela 5- Efeitos do OEPM no edema de orelha induzido por Fenol

Grupo	Dose	Edema (mg)	Inibição (%)
Fenol	20µL/orelha	0,010 ± 0,011	
Dexametasona	0,1 mg/orelha	0,004 ± 0,007	58% ± 0,001
OEPM	1000 mg/Kg	0,005 ± 0,001	55% ± 0,001
	500 mg/Kg	0,006 ± 0,009	42% ± 0,001

A Tabela apresenta os valores médios (mg) ± E.P.M da diferença do peso entre as orelhas direita (tratada) e orelhas esquerdas (não tratada), por grupo testado.

Quando comparada ao grupo controle (0,01mg), todas as doses utilizadas apresentaram efeito antiedematogênico significantes estatisticamente ($p < 0,05$). Tendo as doses apresentado respectivamente: 1000 (0,005mg), 500 (0,006mg) e Dexametasona(0,004mg) na diferença do peso das orelhas.

Figura 6- Efeito do OEPM (100 mg/Kg e 500 mg/Kg) e da Dexametasona (0,1 mg/orelha) sobre o Edema de Orelha induzido por Fenol

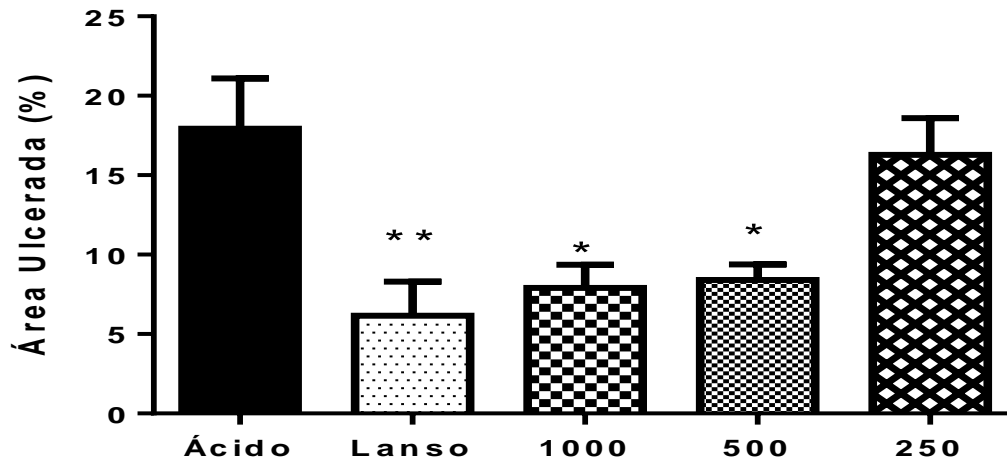


Os valores representam as médias ± EPM da diferença de peso (mg) entre a orelha Direita (tratada) e a orelha esquerda (não tratada) de cada grupo. Foi utilizado o teste de análise de variância (one-way ANOVA), seguido Newman-Keuls para comparações múltiplas (* $p < 0,05$).

5.5 ATIVIDADE GASTROPROTETORA

5.5.1 Úlcera Gástrica induzida por Etanol acidificado

Figura 7- Efeito do OEPM (1000 mg/Kg, 500 mg/g e 250mg/Kg) e do lansoprazol (30 mg/Kg) na redução da Área Ulcerada no modelo de Úlcera Gástrica induzida por Etanol Acidificado

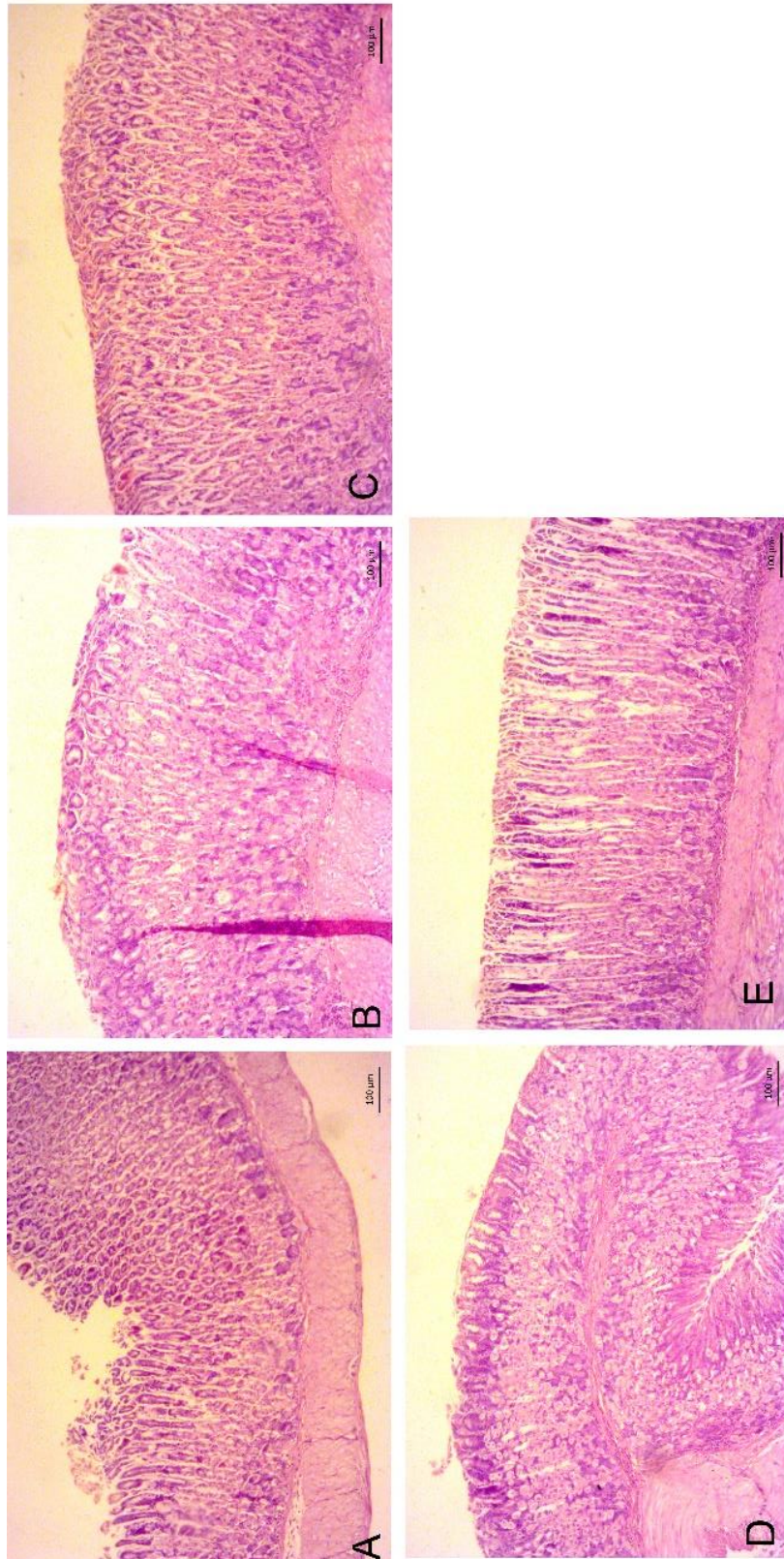


Os valores representam a média \pm EPM. de cada grupo, da porcentagem de área ulcerada. Foi utilizado o teste de análise de variância (one- way ANOVA), seguido Newman-Keuls para comparações múltiplas (* $p < 0,05$).

O efeito macroscópico do OEPM no teste de lesão gástrica induzida por Etanol acidificado demonstrou menor porcentagem de área ulcerada nas doses de 1000 (7,90%) e 500 mg/Kg (8,41%), quando comparadas ao grupo controle (17,92%). As duas doses não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao lansoprazol (6,15%).

Ao analisar o efeito microscópico na mucosa gástrica (Figura 6), observa-se lesão severa no epitélio com perda de células epiteliais e edema no grupo que recebeu apenas o veículo como pré- tratamento ao agente lesivo (Figura 8.A), quando comparado ao grupo que recebeu lansoprazol (Figura 8.B). Os grupos que receberam doses do OEPM (Figuras 8.C,8.D e 8.E) evidenciaram atividade gastroprotetora quando comparados ao grupo do controle. Os aspectos microscópicos desses grupos assemelharam-se ao grupo da droga padrão.

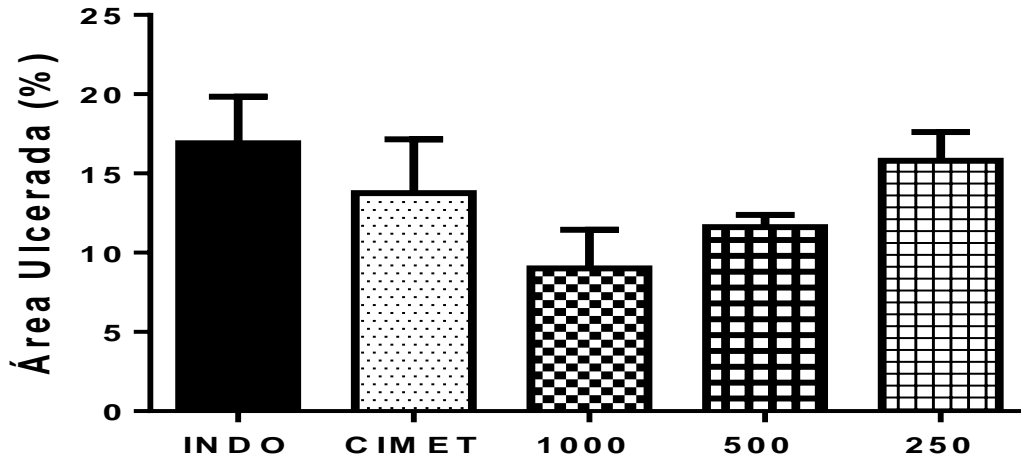
Figura 8- Efeito microscópico na mucosa gástrica de camundongos com lesões induzidas por Etanol acidificado.



A-E estômagos abertos pela grande curvatura, coradas com hematoxilina- eosina em aumento em 100x. **A-** grupo que recebeu apenas o agente lesivo Etanol. **B-** grupo que recebeu lansoprazol como pré tratamento ao agente indutor Etanol acidificado. **C-E** grupos que receberam respectivamente 1000, 500 e 250 mg/Kg do OEPM como pré tratamento.

5.5.2 Úlcera gástrica induzida por Indometacina

Figura 9- Efeito do OEPM (1000 mg/Kg, 500 mg/g e 250mg/Kg) e da Cimetidina (100 mg/Kg) na redução da Área Ulcerada no modelo de Úlcera Gástrica induzida por Indometacina (100 mg/Kg).

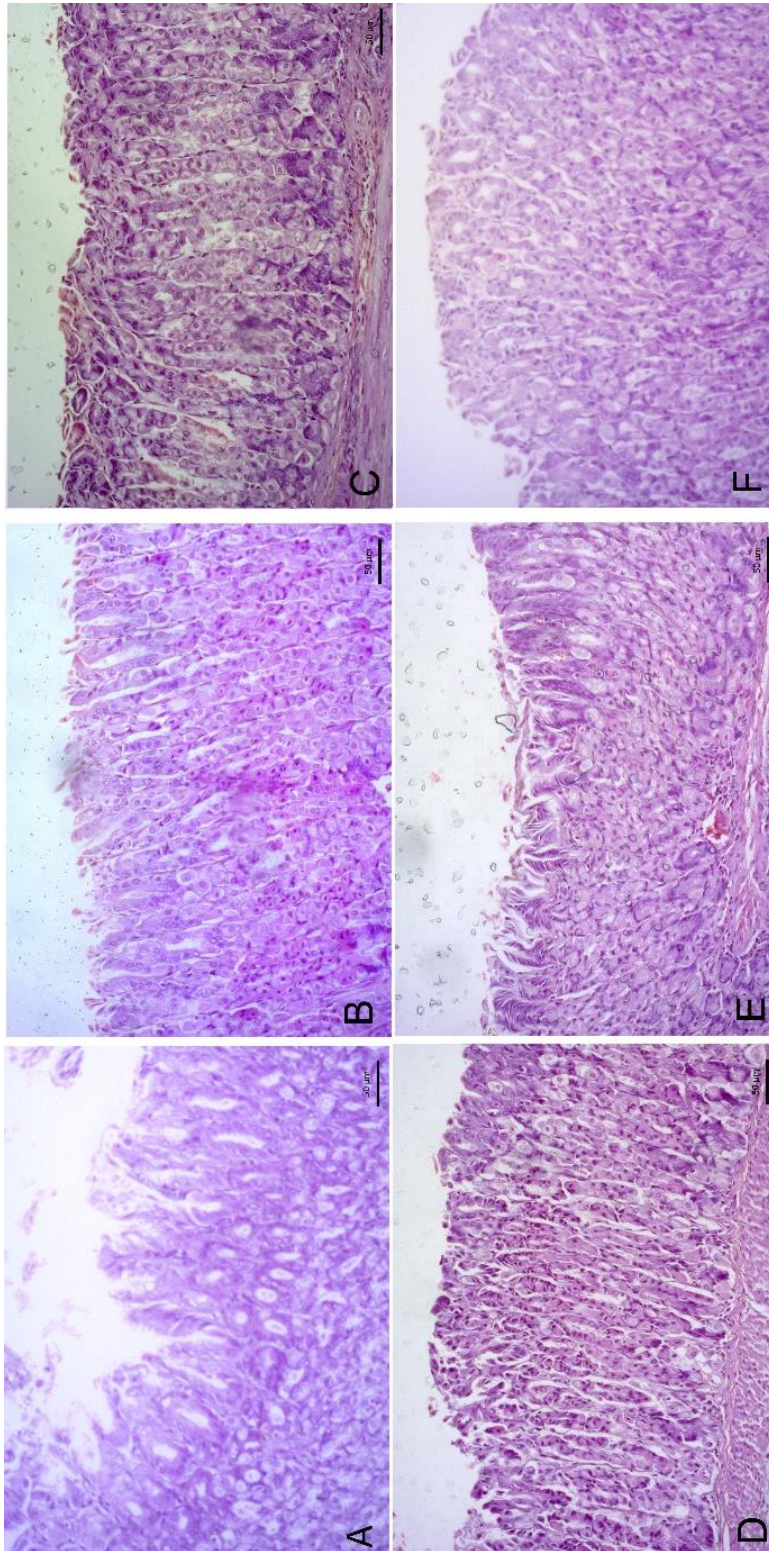


Os valores representam a média \pm E.P.M. de cada grupo, da porcentagem de área ulcerada. Foi utilizado o teste de análise de variância (one-way ANOVA), seguido Newman-Keuls para comparações múltiplas (* $p < 0,05$).

O efeito macroscópico do OEPM no teste de lesão gástrica induzida por Indometacina observa-se menor porcentagem de área ulcerada nos grupos que receberam OEPM, porém não evidenciou diferença estatística nas doses utilizadas 1000 (9,02%), 500 (11,61%) e 250 mg/Kg (15,08%), quando comparadas ao grupo controle (16,92%). Também não apresentaram diferença estatística quando comparadas à Cimetidina (13,75%), mesmo com as maiores doses tendo área ulcerada menor.

Ao se fazer observar o efeito microscópico na mucosa gástrica (Figura 10), observa-se lesão severa no epitélio com perda de células epiteliais e edema no grupo que recebeu apenas o veículo como pré-tratamento (Figura 10.A), quando comparado ao grupo que recebeu cimetidina (Figura 10.B). Os grupos que receberam doses do OEPM (Figuras 10.C, 10.D e 10.E) evidenciaram atividade gastroprotetora quando comparados ao grupo da indometacina. Os aspectos microscópicos desses grupos assemelharam-se ao grupo da droga padrão.

Figura 10. Efeito microscópico na mucosa gástrica de camundongos com lesões induzidas por indometacina.



A-F estômagos abertos pela grande curvatura, coradas com hematoxilina- eosina em aumento em 400x. **A-** grupo que recebeu apenas o agente lesivo indometacina. **B-** grupo que recebeu cimetidina como pré tratamento. **C-E** grupos que receberam respectivamente 1000, 500 e 250 mg/Kg do OEPM como pré tratamento. **F-** grupo não tratado.

6 DISCUSSÃO

Testes de toxicidade aguda são utilizados para avaliação preliminar de possíveis efeitos tóxicos de fármacos que possam ser utilizados em testes de farmacológicos. Para o uso seguro, existe a necessidade de estudos que avaliem o potencial tóxico de compostos obtidos de plantas como o OEPM.

Neste trabalho, a toxicidade aguda foi avaliada durante sete dias, seguindo o protocolo OECD 423 do ano de 2001. A administração até a dose de 2000 mg/Kg provocou sonolência nos animais durante o primeiro dia de experimento. Não houve alterações nas outras doses avaliadas, assim como também não houve mortes. A avaliação diária do peso dos animais não demonstrou alteração significativa com relação ao grupo controle (Tabela 3). Este estudo classificou o OEPM com baixa toxicidade de acordo com a OECD (2001).

O OEPM apresentou entre seus componentes majoritários o safrol, derivados de Propiofenona e Linalol, compostos com comprovado efeito ansiolítico, antiespasmódico e depressor do SNC (MAIOR *et al.*, 2011;

Não foi encontrado na literatura, estudos que avaliassem a toxicidade aguda da *Piper marginatum* em camundongos. Branquinho *et al.* (2017) avaliaram a toxicidade aguda em camundongos do óleo essencial obtido de folhas de outra espécie de Piper, a *Piper glabratum*, e observaram que não houve morte de animais, sinais de alterações comportamentais assim como as alterações no peso dos animais não foram significativas. Outro estudo, com extrato da *Piper purusanum*, encontrou sonolência nas primeiras horas após administração do composto, não observando nenhuma outra alteração no comportamento dos animais (SOUZA, JUNIOR e PINHEIRO, 2009).

Vários modelos de indução de inflamação podem ser utilizados em testes farmacológicos. No presente estudo, utilizou-se o edema de orelha induzido por Fenol para avaliar a atividade antiedematogênico do OEPM. O efeito irritativo provocado pela substância é capaz de provocar uma irritação local e liberar mediadores inflamatórios responsáveis por alterações vasculares e edema local (LIM, PARK e KIM, 2004).

Foi observado que o OEPM aplicado topicamente reduziu significativamente o edema de orelha em todas as doses utilizadas quando comparado ao grupo controle (figura 4). Outro estudo demonstrou que o efeito anti-inflamatório atribuído à esta planta está relacionado ao efeito vasoconstritor e consequente antiedematogênico. Tendo como consequência, uma menor concentração de mediadores inflamatórios sem alterar a quantidade de leucócitos na região (D'ANGELO *et al*, 1997).

Os mediadores inflamatórios envolvidos no processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade celular na fase aguda da inflamação são principalmente as Prostaglandinas, Histamina e bradicinina (BROOKS *et al*, 1999). Sugere-se que componentes existentes no OEPM podem alterar a produção desses mediadores, visto que os resultados apresentados se assemelham ao da droga padrão, dexametasona, que por ser um glicocorticoide, tem ação inibidora das COX's, supressora da produção de metabólitos do ácido araquidônico (COSTA, MACHADO e SELORES, 2005; GOPPELT-STRUEBE, 1997).

Nos estudos de Branquinho *et al.* (2017) e Iwamoto *et al.* (2015) foi proposto que o efeito anti-inflamatório e antiedematogênico da *Piper glabratum* e *Piper umbellatum*, sejam devido aos componentes do óleo essencial que afetam a produção de prostaglandinas. Eles afirmam também que houve menor quantidade de leucócitos no local da lesão, comparados ao grupo controle.

Óleos Essenciais que apresentaram Cariofileno, Copaeno, Linalol e outros terpenóides como componentes majoritários, também apresentaram atividade anti-inflamatória em estudos com in vivo (KOBAYASHI *et al.*, 2011; PEANA *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2011).

A formação de úlcera gástrica envolve vários fatores como aumento na produção de suco gástrico, diminuição da barreira de proteção da mucosa e formação de espécies reativas de oxigênio (BARROS *et al*, 2016). Neste estudo, buscou-se avaliar a atividade gastroprotetora do OEPM. Para tanto, foram realizados os testes de úlcera gástrica induzidas por Etanol acidificado e úlcera gástrica induzida por Indometacina.

O Etanol é capaz de produzir aumento da permeabilidade vascular, e posteriormente pode produzir hemorragia intragástrica. Com aumento do diâmetro de arteríolas, provocando lesão microvascular e declínio da circulação local (ABDEL-SALAN *et al*, 2001). O Etanol produz uma lesão necrosante, com diminuição da produção de Bicarbonato e da camada de muco. Ainda é capaz de quebrar a barreira de bicarbonato do muco da mucosa causando ruptura celular e das paredes dos vasos causando extravasamento e hemorragia. Também estão relacionados a produção de radicais livres que estão relacionados a morte celular (ALRASHDI *et al*, 2012; GUSLANDI, 1987).

No modelo de úlcera gástrica induzida por Etanol acidificado, o OEPM reduziu a área ulcerada em todas as doses testadas. Estudos anteriores com outras espécies de Piper como a *Piper umbellatum* e *Piper aleyreanum*, já haviam demonstrado atividade gastroprotetora através do mesmo teste (JUNIOR *et al*, 2016; LIMA *et al*, 2012). Os autores sugerem que um dos mecanismos para gastroproteção seja a presença de componentes bioativos que preservem a barreira de proteção de muco e também apresentem atividade antioxidante.

Existem relatos de atividade gastroprotetora de diversos produtos originados de plantas (AI-SNAFI, 2018). A combinação de produtos naturais e drogas utilizadas no tratamento de úlcera gástrica mostram um efeito sinérgico contra essa afecção, e essa combinação pode ser uma alternativa para tratamento de úlceras gástricas (BI e MAN, 2014).

O Lansoprazol utilizado nesse estudo, é um fármaco “inibidor da bomba de prótons”, tendo atividade em alterações decorrente da secreção de ácido gástrico no lúmen do estômago. Os resultados desse estudo demonstraram efeito similar entre as duas maiores doses, ao lansoprazol, sugerindo também atividade antsecretiva do OEPM.

A Indometacina reduz a síntese de prostaglandinas, reduzindo assim a proteção da mucosa gástrica através da barreira de muco/HCO₃⁻. A adesão de neutrófilos é o primeiro sinal de dano gástrico. Os neutrófilos aderidos liberam radicais livres, liberando proteases, e obstruindo o fluxo sanguíneo capilar (MALFEITHEINER, CHAN e MCCOLL, 2009).

Neste estudo, para o teste de lesão gástrica induzida por indometacina, o OEPM reduziu a área ulcerada em todas as doses, porém não foram estatisticamente significantes. No estudo de Bhattacharya *et al* (2007) que utilizaram metabólitos da *Piper betel*, também houve atividade gastroprotetora comprovada pelo teste de indução por indometacina.

A Cimetidina atua como um antagonista receptor H₂, inibindo a secreção de suco gástrico mediada pela histamina. Porém não é efetiva na inibição do estímulo mediado pela acetilcolina (CROSS, 1977). Essa afirmação pode explicar os resultados com relação a área ulcerada encontrados neste estudo.

Estudos demonstraram atividade gastroprotetora, através de testes de lesão aguda de indução de ulcera por Etanol acidificado e indometacina, de óleos essenciais que tem em sua composição química componentes como: Linalol, Cariofileno, Limoneno e óxido de cariofileno. Os autores sugerem que esses componentes são capazes de aumentar níveis de PGE₂ assim como aumento na barreira de muco da mucosa gástrica (MORAES *et al.*, 2009; ROZZA e PELLIZZON, 2012; ROZZA *et al.*, 2011).

O aumento da permeabilidade vascular induzido pela ação de Histamina leva ao extravasamento do plasma e formação de edema no local de lesão (KAWAHARA, 2014). Além disso, a histamina é capaz também de estimular a secreção de suco gástrico (HELANDER e KEELING, 1993). Assim, diante dos resultados apresentados por este estudo, um possível mecanismo de gastroproteção deve-se à inibição da ação da histamina, à nível de receptor, ou na sua cascata de sinalização intracelular na célula parietal, pois evidenciou-se atividade antiedematogênica do OEPM, no teste de dermatite de contato na orelha induzido por fenol.

Também baseado nos nossos resultados encontrados nesse estudo, sugerimos outros possíveis mecanismos farmacodinâmicos do OEPM no efeito gastroprotetor deste. O OEPM sugere ação sobre a atividade das prostaglandinas envolvendo mecanismos de diminuição no nível de Prostaglandina I₂ (PGI₂), a qual é ativada principalmente perante processos inflamatórios e/ou aumento de Prostaglandina E₂ (PGE₂) relacionada também a proteção gástrica, a qual pode ser mediada via a ativação do receptor EP₃. O receptor EP₃ é o receptor da PGE₂

presente nas células parietais da mucosa gástrica, e quando ativado, elicita nestas células uma cascata de sinalização intracelular, a qual é descrita por culminar como efeito biológico na inibição da secreção de HCl. Já sobre as células mucosas das glândulas gástricas, sugerimos que a ativação do receptor EP3 nestas células, pela ação do OEPM, promova um aumento na secreção de muco e de HCO_3^- .

Deste modo, mais experimentos direcionados a elucidar esses mecanismos possibilitarão comprovar ou descartar essas hipóteses, bem como determinar em qual passo ou passos da cascata de sinalização intracelular o OEPM atua para promover um efeito gastropotetor.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise fitoquímica do OEPM apontou 3,4- metilenodioxipropiofenona, Cariofileno, Linalol, Safrol, α - Copaeno como compostos mais abundantes presentes. Cada composto tem sua atividade comprovada na literatura relatar atividade, podendo estar relacionados aos efeitos apresentados pelo óleo essencial.

Nossos resultados mostraram que o OEPM não demonstrou efeitos tóxicos agudos, exceto sonolência no primeiro dia no grupo com maior dose, sendo seguro para utilização em testes farmacológicos.

Além disso, o OEPM promoveu efeito antiedematogênico quando aplicado topicamente, perante o modelo de edema de orelha induzido por Fenol.

Do mesmo modo, o OEPM promoveu atividade gastroprotetora quando administrado por via oral, frente aos modelos de úlcera gástrica induzida por Etanol acidificado e Indometacina. Apenas no modelo de Etanol acidificado apresentou significância estatística.

Os possíveis mecanismos que possam esclarecer os efeitos retratados sugerem que o OEPM possa estar envolvido no metabolismo de síntese e/ou inibição de Prostaglandinas e Histamina. Experimentos adicionais direcionados a elucidar esses mecanismos possibilitarão comprovar ou descartar essas hipóteses.

8 REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J., MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 105-127, 2001.
- AIRES, Margarida de Mello. Fisiologia. In: **Fisiologia**. 2012.
- ALRASHDI, A. S; SALAMA, S. M., ALKIYUMI, S. S., ABDULLA, M. A., HADI, A. H. A., ABDELWAHAB, S. I. E ASYKIN, N. Mechanisms of gastroprotective effects of ethanolic leaf extract of *Jasminum sambac* against HCl/ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- AL-SNAFI;ALI ESMAIL. Arabian medicinal plants possessed gastroprotective effects-plant based review (part 1). **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 8, n. 7, p. 77-95, 2018.
- ANDRADE, E.H. A.; CARREIRA, L. M. M., DA SILVA, M. H. L., DA SILVA, J. D., BASTOS, C. N., SOUSA, P. J. C. Variability in Essential-Oil Composition of *Piper marginatum sensu lato*. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, n. 1, p. 197-208, 2008.
- AUTRAN, E. S. NEVES, I. A., DA SILVA, C. S. B., SANTOS, G. K. N., DA CÂMARA, C. A. G., & NAVARRO, D. M. A. F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum jacq.* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2284-2288, 2009.
- BEAVEN, Michael A. Histamine. **New England Journal of Medicine**, v. 294, n. 1, p. 30-36, 1976.
- BEZERRA, D. P., CASTRO, F. O. D., ALVES, A. P. N., PESSOA, C., MORAES, M. O. D., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. W. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with pirlartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008.
- BEZERRA, DANIEL PEREIRA; MILITÃO, G. C. G., DE CASTRO, F. O., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2007.
- BHATTACHARYA, S. BANERJEE, D., BAURI, A. K., CHATTOPADHYAY, S., BANDYOPADHYAY, S. K. Healing property of the Piper betel phenol, allylpyrocatechol against indomethacin-induced stomach ulceration and mechanism of action. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 13, n. 27, p. 3705, 2007.
- BI, Wei-Ping; MAN, Hui-Bin; MAN, Mao-Qiang. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 45, p. 17020, 2014.
- BJARNASON I, SCARPIGNATO C, HOLMGREN E, OLSZEWSKI M, RAINSFORD KD, LANAS A. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, **Gastroenterology**, v. 154, n. 3, p. 500-514, 2018.

BLACKLER, R. W; GEMICI, B., MANKO, A., & WALLACE, J. L. NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention. **Current opinion in pharmacology**, v. 19, p. 11-16, 2014.

BOGLIOLO, Luigi. Patologia. In: **Patologia**. 2011.

BORRELLI, Francesca; IZZO, Angelo A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 14, n. 8, p. 581-591, 2000.

BRAIT, D.R. H; VAZ, M. S. M., DA SILVA ARRIGO, J., DE CARVALHO, L. N. B., DE ARAÚJO, F. H. S., VANI, J. M.; KASSUYA, C. A. L. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from Piper vicosanum leaves. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 699-705, 2015.

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

BROOKS, P. EMERY, P., EVANS, J. F., FENNER, H., HAWKEY, C. J., PATRONO, C. E; EHRICH, E. W. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. **Rheumatology**, v. 38, n. 8, p. 779-788, 1999.

BRÚ, J.; GUZMAN, J.D. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of Piper marginatum. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 767-779, 2016.

BURCI, LÍGIA MOURA; PEREIRA, I. T., DA SILVA, L. M., RODRIGUES, R. V., FACUNDO, V. A., MILITÃO, J. S. L. T., DE PAULA WERNER, M. F. Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of Piper tuberculatum Jacq. in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 165-174, 2013.

CALAM, J; BARON, J. H. ABC of the upper gastrointestinal tract: pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **BMJ: British Medical Journal**, v. 323, n. 7319, p. 980, 2001.

CAMARGO, Samuel Barbosa; DE VASCONCELOS, Darizy Flavia Silva Amorim. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpeno. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 381-387, 2015.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, RICHARD M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia**. Elsevier Brasil, 2014

CROSS, S. A. Localization of histamine and histamine H₂-receptor antagonists in the gastric mucosa. **The Histochemical Journal**, v. 9, n. 5, p. 619-644, 1977.

- CUI, Guanglin; WALDUM, Helge L. Physiological and clinical significance of enterochromaffin-like cell activation in the regulation of gastric acid secretion. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 13, n. 4, p. 493, 2007.
- D'ANGELO, L. C. A.. Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, antiinflammatory and hemostatic. ***Phytomedicine***, v. 4, n. 1, p. 33-40, 1997.
- DA SILVA JUNIOR, I. F., BALOGUN, S. O., DE OLIVEIRA, R. G., DAMAZO, A. S., DE OLIVEIRA MARTINS, D. T. *Piper umbellatum* L.: a medicinal plant with gastric-ulcer protective and ulcer healing effects in experimental rodent models. ***Journal of ethnopharmacology***, v. 192, p. 123-131, 2016.
- DE O SANTOS, B.V.C.; E. V. D. C. M., de O, C., & Gray, A. I. Phenylalkanooids from *piper marginatum* f. 2. ***Phytochemistry***, v. 49, n. 5, p. 1381-1384, 1998.
- DE OLIVEIRA CHAVES, M.C; DE OLIVEIRA, A.H; DE OLIVEIRA SANTOS, B.V.. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq (Piperaceae). ***Biochemical systematics and ecology***, v. 1, n. 34, p. 75-77, 2006.
- DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B., CROFFORD, L., GUPTA, R. A., SIMON, L. S., A. VAN DE PUTTE, L. B., LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal*, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.
- DYER, L. A.; PALMER, A. DN (Ed.). ***Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution***. New York: Kluwer academic/Plenum publishers, 2004.
- FANTUZZI, G; GHEZZI, P. Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine control and therapy of inflammatory diseases. *Mediators of inflammation*, v. 2, n. 4, p. 263-270, 1993.
- FRISCHKORN, C. G. B.; FRISCHKORN, H. E.; CARRAZZONI, E. Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil. ***Naturwissenschaften***, v. 65, n. 9, p. 480-483, 1978.
- GABRIEL, S E.; JAAKKIMAINEN, L; BOMBARDIER, C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. ***Annals of internal medicine***, v. 115, n. 10, p. 787-796, 1991.
- GOPPELT-STRUEBE, M. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. ***Biochemical pharmacology***, v. 53, n. 10, p. 1389-1395, 1997.
- GUIMARÃES, E.F. & CARVALHO-SILA, M. 2012. Piperaceae. ***Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo***. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 7, pp: 263-320.
- GUSLANDI, M. Effects of ethanol on the gastric mucosa. ***Digestive diseases***, v. 5, n. 1, p. 21-32, 1987.
- HALTER, F.; TARNAWSKI, A. S., SCHMASSMANN, A., & PESKAR, B. M. Cyclooxygenase 2—implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. ***Gut***, v. 49, n. 3, p. 443-453, 2001.

HIGGINS, A. J.; LEES, P. The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 3, p. 163-175, 1984.

KAWAHARA, K.; HOHJOH, H., INAZUMI, T., TSUCHIYA, S., & SUGIMOTO, Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 414-421, 2015.

KAWAHARA, Kohichi; H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., & Sugimoto, Y.. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 414-421, 2015.

KIM, H. K.; CHEON, B. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. Y., & KIM, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. **Biochemical pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 759-765, 1999.

KOBAYASHI, C.; FONTANIVE, T. O., ENZWEILER, B. G., DE BONA, L. R., MASSONI, T., APEL, M. A., SUYENAGA, E. S. Pharmacological evaluation of Copaifera multijuga oil in rats. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abbas; ASTER, Jon C. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2015.

KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M., GIERSE, J. K., MCDONALD, J. J., STEGEMAN, R. A., PAK, J. Y., STALLINGS, W. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, v. 384, n. 6610, p. 644, 1996.

LIM, H; PARK, H; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of pharmacal research**, v. 27, n. 4, p. 442, 2004.

LIMA, D.K.S; BALLICO, L. J., LAPA, F. R., GONÇALVES, H. P., DE SOUZA, L. M., IACOMINI, M., FACUNDO, V. A. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from Piper aleyreanum C. DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 274-282, 2012.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F.K.L; MCCOLL, K.E.L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 374, n. 9699, p. 1449-1461, 2009.

MASFERRER, J.L. ZWEIFEL, B. S., SEIBERT, K., & NEEDLEMAN, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 86, n. 4, p. 1375-1379, 1990.

MGBEAHURUIKE, E. E. YRJÖNEN, T., VUORELA, H., & HOLM, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54-69, 2017.

MITCHELL, J.A.; AKARASEREENONT, P., THIEMERMANN, C., FLOWER, R. J., & VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of

constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11693-11697, 1993.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 1, p. 3-35, 2004.

OHSAWA, Yusuke; HIRASAWA, Noriyasu. The role of histamine H₁ and H₄ receptors in atopic dermatitis: from basic research to clinical study. **Allergology International**, v. 63, n. 4, p. 533-542, 2014.

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

PELAYO, V. R. T.; FERNANDEZ, M. S., HERNANDEZ, O. C., TORRES, J. M., GARCIA, J. A. L. A phytochemical and ethnopharmacological review of the genus Piper: as a potent bio-insecticide. **Res J Biol**, v. 4, n. 2, p. 45-51, 2016.

PINHEIRO, B. G. SILVA, A. S. B., SOUZA, G. E. P., FIGUEIREDO, J. G., CUNHA, F. Q., LAHLOU, S., SOUSA, P. J. C. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 479-486, 2011.

RANG, Rang; Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. Rang & Dale **Farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.

RAO, P.; KNAUS, E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 11, n. 2, p. 81-110s, 2008.

RASO, G.M.; MELI, R., DI CARLO, G., PACILIO, M., & DI CARLO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. **Life sciences**, v. 68, n. 8, p. 921-931, 2001.

BADKE; Denardin Budó, M. D. L., Titonelli Alvim, N. A., Dolejal Zanetti, G., & Heisler, E. V.. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. *Texto & contexto enfermagem*, v. 21, n. 2, 2012.

REIGADA, J. B. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq.(Piperaceae)—antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, n. 9, p. 1054-1058, 2007.

REIGADA, J. B.; TCACENCO, C. M., ANDRADE, L. H., KATO, M. J., PORTO, A. L., LAGO, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq.(Piperaceae)—antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, n. 9, p. 1054-1058, 2007.

RIBEIRO, D.; FREITAS, M., TOMÉ, S. M., SILVA, A. M., LAUFER, S., LIMA, J. L., & FERNANDES, E. Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 858-870, 2015.

RODRÍGUEZ, L.A.G.; TOLOSA, L.B. Risk of upper gastrointestinal complications among users of traditional NSAIDs and COXIBs in the general population. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 498-506, 2007.

ROZZA, A.L.; DE MELLO MORAES, T., KUSHIMA, H., TANIMOTO, A., MARQUES, M. O. M., BAUAB, T. M., PELLIZZON, C. H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. **Chemico-biological interactions**, v. 189, n. 1-2, p. 82-89, 2011.

ROZZA, A.L.; PELLIZZON, C.L. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 51-63, 2013.

SHAMBUREK, Robert D.; SCHUBERT, Mitchell L. Pharmacology of gastric acid inhibition. **Baillière's clinical gastroenterology**, v. 7, n. 1, p. 23-54, 1993.

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

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

SOUTO-MAIOR, F.B. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 2, p. 259-263, 2011.

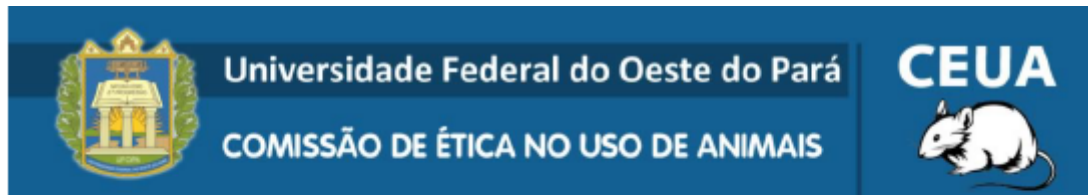
TAKEUCHI, K.; WANG, Jian-Ying. Editorial overview: Gastrointestinal: gastrointestinal research-mucosal injury, protection, and repair at organ, cellular, and molecular levels. **Current opinion in pharmacology**, v. 19, p. iv, 2014.

TILLEQUIN, F.; PARIS, M., JACQUEMIN, H., PARIS, R. R. Flavonoides de Piper marginatum. **Planta Medica**, v. 33, n. 01, p. 46-52, 1978.

VÁSQUEZ, S.P.F; MENDONÇA, MS de; NODA, S. do N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

Vizzoto, M. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado**, p.16,2010.

ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 0220180020, intitulado Avaliação de possíveis efeitos antiinflamatório e antiulcerogênico de óleo essencial e extratos de fungos endofíticos da *Piper marginatum* em camundongos, sob a responsabilidade de Maxwell Barbosa de Santana, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 0220180020, entitled "Avaliação de possíveis efeitos antiinflamatório e antiulcerogênico de óleo essencial e extratos de fungos endofíticos da *Piper marginatum* em camundongos", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 23/04/2018

Prof. Dr. Adenomar Neves de Carvalho
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>

ANEXO B- POSTER APRESENTADO NO I CIPEC

I CONGRESSO INTERNACIONAL DE PESQUISA E CIÊNCIA DO IESPES



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DA PIPER MARGINATUM

Milena de Sousa Vasconcelos, Victor Hugo Rabelo de Aquino, Soraia Baia dos Santos, Éden Bruno Sousa da Silva, Luis Afonso Ramos Leite, Ludyanne da Silva Sousa, Kelly Christina Ferreira Castro e Maxwell Barbosa de Santana

milenavasconcelos34@gmail.com

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA

Resumo: A Piper Marginatum é conhecida pelo uso tradicional em distúrbios gastrointestinais, analgesia e atividade antiinflamatória. Para o uso seguro, existe a necessidade de estudos que avaliem o potencial tóxico de fitoterápicos, como o óleo essencial da Piper Marginatum (OEPM). O objetivo desse trabalho é avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial da Piper Marginatum. Seguindo o protocolo de toxicidade aguda preconizado pelo Guia número 423 da OECD, de 2001, nos quais foram utilizados camundongos albinos da linhagem Swiss, fêmeas, pesando entre 32-36g. O OEPM foi diluído em solução Salina (0,9%) e Tween 80. Os animais foram divididos em 4 grupos com 3 animais cada e separados quanto a dose de óleo a ser recebida: grupo (1) controle/salina.; grupo (2) 50mg/kg; grupo (3) 300 mg/kg e grupo (4) 2000mg/kg. Os animais foram observados a cada 30 minutos nas primeiras 4 horas, e depois diariamente na mesma hora de administração durante 14 dias. Foram observados parâmetros como: alterações na pele, nos pelos, nos olhos, mucosas, desconforto respiratório, alterações motoras do comportamento, tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e morte, sendo anotado o dia de aparecimento de sintomas e morte caso ocorresse. O peso inicial e final também foi avaliado. Após o teste, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Foi observado sonolência apenas em animais do grupo (4) durante os quatro primeiros dias de teste, porém não foram observadas alterações no comportamento motor ou sensorial nos outros grupos avaliados, assim como também não houve mortes. A média de peso inicial e final respectivamente: Grupo (1) 35±1g - 39,7±5g; Grupo (2) 32±1g - 36,7±1,52g; Grupo (3) 33±1g - 36,7 ±1,52g; Grupo (4) 32 ±1g - 32 ±0,57g. De acordo com os resultados obtidos nos testes aqui pode-se sugerir que essa espécie apresentou baixa toxicidade e com isso pode ser utilizada com segurança em testes farmacológicos.

Palavras-chave: toxicidade aguda, Piper Marginatum, óleo essencial

ANEXO C- APRESENTAÇÃO ORAL PRÊMIO JOVEM PESQUISADOR ENSINO MÉDIO NO I CIPEC

I CONGRESSO INTERNACIONAL DE PESQUISA E CIÊNCIA DO IESPES



AVALIAÇÃO DO PESO DE CAMUNDONGOS (MUS MUSCULUS) UTILIZADOS EM UM TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Leonardo Vasconcelos Cativo, Milena de Sousa Vasconcelos, Soraia Baia dos Santos, Victor Hugo Rabelo de Aquino e Maxwell Barbosa de Santana

leonardo.cativo14@gmail.com

Colégio Santa Clara - CSC¹, Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA², Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA³, Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA⁴ e Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA⁵

Testes de toxicidades são amplamente utilizados para avaliar possíveis efeitos tóxicos de fármacos que possam ser utilizados em testes farmacológicos. Um dos aspectos avaliados é o peso dos animais. Muitas substâncias são avaliadas em testes de toxicidade, como óleos essenciais. Este trabalho tem como objetivo avaliar o peso corpóreo de animais diariamente, durante um teste de toxicidade aguda do Óleo Essencial da Piper Marginatum, realizado no Laboratório de Laboratório de Química Aplicada a Toxicologia, Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos da Universidade Federal do Oeste do Pará. Para tanto, foram utilizados 12 camundongos, albinos, da linhagem Swiss, pesando entre 32-36g. Antes do início do teste, os animais passaram por uma triagem de peso, onde estes foram pesados individualmente e separados por peso homogêneos, em 4 grupos de 3 animais cada, conforme a dose única de óleo a ser aplicada oralmente. Posteriormente, os animais tiveram o seu peso avaliado todos os dias duranteos 14 dias de teste, sempre na mesma hora em que foi feita a administração do óleo no 1º dia, e antes de receberem a dose diária de ração também pesada. Ao final, obteve-se as respectivas médias de peso inicial e final: Grupo (1) 35±1g -39,7 ±5g; Grupo (2) 32±1g - 36,7±1.52g; Grupo (3) 33±1g -36,7g ±1.52g; Grupo (4) 32g ±1g - 32 ±0,57g. Com este trabalho, foi possível perceber a importância dos conhecimentos científicos para as pesquisas experimentais com animais em laboratório, bem como para o desenvolvimento destas, pois, durante as atividades desempenhadas foram seguidos protocolos de experimentos já padronizados tanto para o uso do animal modelo utilizado quanto para o teste que foi aplicado.

Palavras-chave: experimentação animal, toxicidade aguda, óleo essencial