UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUCIANE MENDES MONTEIRO

INVESTIGAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE *Piper amalago* L. (PIPERACEAE)

PONTA GROSSA
2021

LUCIANE MENDES MONTEIRO

INVESTIGAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE *Piper amalago* L. (PIPERACEAE)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas a Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel
Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior

PONTA GROSSA
2021

Monteiro, Luciane Mendes
M775 Investigação Etnofarmacológica de *Piper amalago* L. (Piperaceae) / Luciane Mendes Monteiro. Ponta Grossa, 2021.
113 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel.
Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior.

1. Anti-hipertensivo. 2. Citotoxicidade. 3. Óleo volátil. 4. Pariparoba. 5. Vasodilatação. I. Manfron Budel, Jane. II. Gasparotto Junior, Arquimedes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia Fernandes Bertholino dos Santos- CRB9/986

Ponta Grossa, 26 de março de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 01/2021 DA MESTRANDA **LUCIANE MENDES MONTEIRO** REALIZADA NO DIA 26 DE MARÇO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e seis dias de março de dois mil e vinte e um, às 14h00min, por videoconferência, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência da Professora Doutora Jane Manfon Budel reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Luciane Mendes Monteiro, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pela Professora Doutora Jane Manfon Budel (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Juliane Nadal Dias Swiech (UNICESUMAR), Emerson Luiz Botelho Lourenço (UNIPAR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **"INVESTIGAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE *Piper amalago* L"**

Encerrada a defesa, a banca considerou a dissertação APROVADA, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente Ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Jane Manfron Budel 1 - (DEFAR-UEPG) - Presidente

Juliane Nadal Dias Swiech 2 - (UNICESUMAR) – Titular

Emerson Luiz Botelho Lourenço 3 - (UNIPAR) – Titular

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus pelo dom da vida, quero dedicar também a toda minha família em especial meus pais, meu marido e filhos, por sempre acreditarem em mim dando todo amor, incentivo, apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque sem ele não estaria aqui.

Ao meu pai Josmar e minha mãe Marici, que me ensinaram que nada é impossível e sempre acreditaram em mim e no meu potencial.

Aos meus sogros Denizar (*in memorian)* e Terezinha que cuidaram de mim e dos meus filhos para que eu realizasse os meus sonhos.

Aos meus irmãos, Marcia, Junior, Malu e Juliane que me deram todo apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos que alegraram os meus dias e por todo amor que transmitem.

Ao marido Valdeci, que sempre me deu força, apoio em casa e cuidando dos nossos filhos quando precisei estar ausente.

Aos meus filhos Pedro e Isabela pelo tempo que estive ausente, pelos lanches que levavam até mim quando eu estudava, pelas palavras de carinho e amor. Tudo o que faço também é por vocês.

As Professoras Rosi Zanoni da Silva e Lorene Armstrong, pelos conselhos e ensinamentos.

As minhas colegas de trabalho (Bete, Aparecida e Mirian) pela colaboração e incentivo.

Aos meus amigos do laboratório e do mestrado, pela ajuda, pelos momentos de descontração e troca de experiências.

Aos amigos do LEFaC/UFGD, Aline Marques, Bethânia Lorençoni, Lucas Guarnier, Melissa Sepulvida, Paulo Romão, Rhanany Palozi e a todos que participaram das coletas, que me ensinaram e ajudaram nos experimentos tornando meus dias prazerosos.

Ao C-Labmu/Propesp pelo auxílio na liofilização e análise química das amostras.

À Traudi Klein e à Janaína que me auxiliaram na análise química dos extratos.

À DEFAR/UEPG pelo suporte Institucional.

Ao Professor Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, por estar sempre pronto a ajudar, pela colaboração e auxílio na concretização deste estudo.

À Profa. Dra. Jane Manfron Budel pela contribuição de seus conhecimentos e orientação dessa dissertação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Somos todos visitantes deste tempo, deste lugar. Estamos de passagem. Nosso propósito aqui é observar, aprender, crescer, amar... e, então, voltar para casa.”

(Provérbio aborígene)

RESUMO

Piper amalago L., conhecida popularmente como pariparoba e jaborandi-manso, tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional como analgésico, anti-inflamatório, diurético, anti-hipertensivo e cicatrizante. Os principais grupos químicos presentes na espécie são alcaloides, flavonoides, tanino e terpenoides. Objetivou-se testar a citotoxicidade *in vitro*, os efeitos cardiovasculares e a toxicidade dos extratos aquoso, hidroalcoólico e do óleo essencial em ratos, bem como determinar o perfil químico dos extratos e do óleo essencial. No óleo essencial, por meio de CG-EM, foram encontrados como compostos majoritários, biciclogermacreno (11%), espatulenol (9,21%), β-felandreno (8,12%) e α-pineno (6,17%). A análise química dos extratos aquoso e hidroalcoólico foi realizada em CLAE-EM/EM, tendo sido sugeridos os compostos: ácido cinâmico, ácido caféico, ácido quínico, 2-metoxi-4,5-metileno-transcinamolisobutilamida, N-[7- (3,4-metilenodioxifenil) -2Z,4Z-heptadienoico] pirrolidina, di-O-hexosídeo, guinensina, vitexina e apigenina-6,8-di-C-glicosídeo. O extrato hidroalcoólico e o óleo essencial evidenciaram citotoxicidade para linhagem tumoral de melanoma murino B16F10 (CI_{50} de 104,31 ± 28,67 e 221,08 ± 141,10 µg/mL). Ambos os extratos e o óleo essencial não apresentaram toxicidade até a dose de 2000 mg/kg. Atividade diurética aguda e prolongada nas doses de 30 e 300 mg/kg foram verificadas nas 3 amostras testadas. Os extratos, aquoso e hidroalcoólico, bem como o óleo essencial não foram capazes de promover efeitos hipotensores. Da mesma forma, o eletrocardiograma não apresentou diferenças significativas entre todos os grupos experimentais, contudo, o extrato aquoso e hidroalcoólico obtiveram resultados significativos para o estado redox. O extrato hidroalcóolico apresentou ação vasodilatadora nas concentrações 0,3, 1 e 3 nmol/L em leito mesentérico vascular isolado, contudo quando testado frente a fármacos para se determinar o mecanismo de ação, os resultados não foram significativos.

Palavras-chave: Anti-hipertensivo. Citotoxicidade. Óleo volátil. Pariparoba. Vasodilatação.

ABSTRACT

Piper amalago L., popularly known as pariparoba and jaborandi-manso, has been widely used in traditional medicine as analgesic, anti-inflammatory, diuretic, antihypertensive and healing. The main chemical groups present in the species are alkaloids, flavonoids, tannins and terpenoids. The objective was to test the *in vitro* cytotoxicity, cardiovascular effects, and toxicity of aqueous, hydroalcoholic and essential oil extracts in rats. As well as determining the chemical profile of these extracts. In the essential oil, through GC-MS, the majority compounds were bicyclogermacrene (10.52%), spathulenol (8.9%), β-phellandrene (7.8%), and αpinene (5.88%). The chemical analysis of the aqueous and hydroalcoholic extracts was performed in HPLC-MS/MS, and the suggested compounds cinnamic acid, caffeic acid, quinic acid, 2-methoxy-4,5-methylene-trans-cinamolisobutylamide, N- [7-(3,4methylenedioxyphenyl) -2Z, 4Z-heptadienoic] pyrrolidine, di-*O*-hexoside, guinensine, vitexin and apigenin-6,8-di-*C*-glycoside. The hydroalcoholic extracts and essential oil showed cytotoxicity for the murine melanoma tumor line B16F10 (IC_{50} of 104.31 ± 28.67 and 221.08 ± 113.73 µg/mL). Both extracts and the essential oil didn't show toxicity up to the dose of 2000 mg/kg. Acute and prolonged diuretic activity at doses of 30 and 300 mg/kg were verified in the 3 samples tested. The aqueous and hydroalcoholic extracts, as well as the essential oil were not able to promote hypotensive effects. Likewise, the electrocardiogram showed no differences between all experimental groups, however, the aqueous and hydroalcoholic extract obtained significant results for the redox state. The hydroalcoholic extract showed vasodilating action in concentrations 0.3, 1 and 3 nmol/L in isolated vascular mesenteric bed, however when tested against drugs to determine the mechanism of action, the results were not significant.

Keywords: Antihypertensive. Cytotoxicity. Volatile oil. Pariparoba. Vasodilation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Piper amalago* L (Piperaceae)..... 24
Figura 2 - Fluxograma de tratamento medicamentoso.....26
Figura 3 - Fluxograma da metodologia de pesquisa.....28
Figura 4 - Obtenção do extrato aquoso de folhas de *P. amalago*.....40
Figura 5 - Obtenção do extrato hidroalcóolico de folhas de *P. amalago* 41
Figura 6 - Extração do óleo essencial de *P. amalago* por destilação por arraste de vapor, utilizando Aparelho de Clevenger.....42
Figura 7 - Cromatograma de CG de *Piper amalago* obtido de uma coluna apolar...43
Figura 8 - Análise do extrato aquoso de *Piper amalago* CLAE-EM/EM em modos de ionização positiva e negativa.....48
Figura 9 - Análise do extrato hidroalcoólico de *Piper amalago* CLAE-EM/EM em modos de ionização positiva e negativa.....49
Figura 10 - Espectro de UV-VIS (200 a 450 nm) do extrato aquoso (A) e hidroalcoólico (B) de *Piper amalago* 52
Figura 11 - Análise do extrato aquoso de *Piper amalago* por UHPLC 53
Figura 12 - Análise do extrato hidroalcoólico de *Piper amalago* por UHPLC 54
Figura 13 - Viabilidade celular após 72 horas de exposição a diferentes concentrações do extrato aquoso de *Piper amalago* pelo método do MTT 55
Figura 14 - Viabilidade celular após 72 horas de exposição a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Piper amalago* pelo método do MTT....56
Figura 15 - Viabilidade celular após 72 horas de exposição a diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper amalago* pelo método do MTT.....56
Figura 16 - Alterações morfológicas encontradas nas células B16F10 após incubação com diferentes concentrações do óleo de *P. amalago*.....59
Figura 17 - Vista macroscópica dos órgãos dos animais tratados com o EAPA, EHPA e OEPA 2000 mg/kg 61
Figura 18 - Avaliação histopatológica dos órgãos 62
Figura 19 - Efeitos da administração oral prolongada do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* na pressão arterial sistêmica e na frequência cardíaca de ratas Wistar 91
Figura 20 - Efeitos do EHPA sobre o tônus vascular dos leitos vasculares mesentéricos (MVBs) na presença e ausência de endotélio 96

Figura 21 - Efeitos do EHPA sobre o tônus vascular dos leitos vasculares mesentéricos (MVBs) 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *Piper amalago* obtidos por CG-EM.....44
Tabela 2 - Composição química do EAPA e EHPA obtidos por CLAE-EM/EM 50
Tabela 3 - Valores de IC_{50} para diferentes linhagens celulares incubadas com o extrato hidroalcoólico e com o óleo essencial de *Piper amalago* e o índice de seletividade (IS).....57
Tabela 4 - Efeitos da administração oral aguda do EAPA, EHPA e OEPA obtidos de *Piper amalago* sobre o volume urinário 67
Tabela 5 - Efeito da administração oral aguda do EAPA, EHPA e OEPA obtidos de *Piper amalago* no pH urinário.....68
Tabela 6 - Efeito da administração oral aguda do EAPA, EHPA e OEPA obtidos de *Piper amalago* na densidade urinária 69
Tabela 7 - Efeito da administração oral aguda do EAPA, EHPA e OEPA sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 1, 2 4, 8, 12 e 24 horas.....70
Tabela 8 - Efeitos da administração oral prolongada de 8 horas do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* sobre o volume urinário (mL).....74
Tabela 9 - Efeitos da administração oral prolongada de 24 horas do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* sobre o volume urinário (mL).....76
Tabela 10 - Efeitos da administração oral prolongada de 8 horas obtido do EHPA e OEPA sob o pH urinário nos 7 dias de tratamentos.....78
Tabela 11 - Efeitos da administração oral prolongada de 24 horas obtido do EAPA, EHPA e OEPA sob o pH urinário nos 7 dias tratamentos.....79
Tabela 12 - Efeito da administração oral prolongada de 8 horas obtido do EAPA, EHPA e OEPA sobre a densidade urinária nos 7 dias de tratamento 80
Tabela 13 - Efeito da administração oral prolongada de 24 horas obtido do EAPA, EHPA e OEPA sobre a densidade urinária nos 7 dias de tratamento.....81
Tabela 14 - Efeito da administração oral prolongada do EAPA, EHPA e OEPA sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 24 horas durante os 7 dias de tratamento.....84
Tabela 15 – Efeitos dos tratamentos prolongados com o EAPA, EHPA e OEPA sobre parâmetros bioquímicos séricos de ratas Wistar 88
Tabela 16 **-** Efeitos dos tratamentos prolongados com o EAPA, EHPA e OEPA

sobre parâmetros eletrocardiográficos de ratas Wistar.....89
Tabela 17- Estado redox dos tecidos em todos os grupos no final do tratamento...94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 OBJETIVOS 18

2.1 OBJETIVO GERAL 18

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18

3 REVISÃO DA LITERATURA 20

3.1 FAMÍLIA PIPERACEAE 20

3.2 GÊNERO *Piper* 21

3.3 *Piper amalago* L. 22

3.4 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS) 24

4 MATERIAL E MÉTODOS 29

4.1 MATERIAL BOTÂNICO 29

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS 29

4.2.1 Preparo do Extrato Aquoso (EAPA) 29

4.2.2 Preparo do Extrato Hidroalcoólico 70% (EHPA).....30

4.2.3 Extração do Óleo Essencial por Hidrodestilação (OEPA) 30

4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL (OE) de *Piper amalago* 31

4.3.1 Análise por Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (CG/EM) 31

4.3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-EM/EM) 31

4.3.3 Análise por Espectroscopia na Região do UV-VIS 32

4.3.4 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (UHPLC) 32

4.4 ESTUDOS *IN VITRO* 33

4.4.1 Análise Citotóxica 33

4.4.2 Linhagens Tumorais.....33

4.4.3 Ensaio de Citotoxicidade através da Metabolização do reagente Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98% (MTT) 33

4.4.4 Cálculo da Concentração Inibitória Mínima (IC_{50}) 33

4.4.5 Cálculo do Índice de Seletividade 34

4.4.6 Análise Morfológica 34

4.5 ESTUDOS *IN VIVO* 35

4.5.1 Animais.....35

4.5.2 Avaliação da Toxicidade Aguda 35

4.5.3 Avaliação da Atividade Diurética Aguda e Prolongada 36
4.5.4 Eletrocardiografia.....37
4.5.5 Medidas da Pressão Arterial (PA).....37
4.5.6 Dosagens Bioquímicas..... 37
4.5.7 Investigações do Estado Redox Tecidual.....38
4.5.8 Avaliações da Atividade Vasodilatadora e Mecanismos Moleculares Envolvidos 38
4.5.9 Análises Estatísticas 39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....40
5.1 PREPARO DOS EXTRATOS.....40
5.1.1 Obtenção do Extrato Aquoso.....40
5.1.2 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico.....40
5.1.3 Obtenção do Óleo Essencial por Hidrodestilação 41
5.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO.....42
5.2.1 Analíse por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) 42
5.2.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-EM/EM) 47
5.2.3 Análise por Espectroscopia na Região do UV-VIS..... 52
5.2.4 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (UHPLC)..... 53
5.3 ESTUDO *IN VITRO* 55
5.3.1 Análise Morfológica 58
5.4 ESTUDOS *IN VIVO* 60
5.4.1 Avaliação da Toxicidade Aguda 60
5.4.2 Avaliação da Atividade Diurética Aguda e Prolongada 63
5.4.2.1 Atividade diurética aguda.....63
5.4.2.2. Atividade diurética prolongada 73
5.5 ELETROCARDIOGRAMA 90
5.6 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL (PA).....90
5.7 DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....92
5.8 INVESTIGAÇÕES DO ESTADO REDOX TECIDUAL.....92
5.9 AVALIAÇÕES DA ATIVIDADE VASODILATADORA E MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS.....95
6 CONCLUSÃO 98
REFERÊNCIAS.....100

ANEXO A - DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELO COMITÊ DE ÉTICA.....109

ANEXO B – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO PELO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTOTRADICIONAL ASSOCIADO (CGEN/SISGEN) 111

1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos medicamentos que estão no mercado origina-se de produtos naturais, em especial, de espécies vegetais. O Brasil com a sua enorme biodiversidade pode contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais (FERREIRA, 1998).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) visa à integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina popular na atenção primária. Dessa forma, a PNPIC busca estimular os mecanismos naturais de prevenção de agravos e recuperação da saúde por meio de tecnologias eficazes e seguras, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas medicinais ou preparações originadas a partis destas (BRASIL, 2016).

Os princípios ativos presentes nas espécies vegetais são constituintes químicos com capacidade de produzir uma ação ou um efeito biológico no organismo dos humanos e dos animais. São comumente divididos em grupos segundo suas características químicas e seus efeitos biológicos (SILVA *et al*., 2015).

Piper amalago L., conhecida popularmente pelo nome pariparoba e jaborandimanso (GUIMARÃES; VALENTE, 2001; GUIMARÃES; CARVALHO-SILVA, 2012), é utilizada na medicina popular no tratamento de queimaduras, como anti-inflamatório, analgésico, carminativo, cicatrizante, anti-hipertensivo, bem como inseticida (DOMINGUEZ; ALCORN, 1985; PARMAR *et al*. 1997; DORIGONI *et al*., 2001; ALVES *et al*., 2008; GUTIERREZ *et al*, 2013; MULLALLY *et al*., 2016; SANTOS *et al*., 2020).

Vários estudos etnofarmacológicos têm sido conduzidos com extratos de *P. amalago* e diversas atividades biológicas foram comprovadas, a exemplo das atividades antioxidante (SILVA *et al*., 2014), diurética (NOVAES *et al*., 2014), inseticida (HERNANDEZ *et al*., 2014).

A administração oral de extrato etanólico de *P. amalago* apresentou atividade diurética, natriurética e antilitiásica, aumentando a excreção urinária de eletrólitos Na^+

e K^+, o volume urinário e inibindo a cristalização do oxalato de cálcio, em estudo de Novaes *et al.* (2014).

Considerando o uso popular e o potencial farmacológico diurético e antihipertensivo de *P. amalago*, o presente trabalho visou investigar os efeitos cardiovasculares e a toxicidade dos extratos aquoso, hidroalcoólico e do óleo essencial em ratos, além de testar a citotoxicidade "*in vitro"* e determinar a composição química desses extratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição química e os possíveis efeitos citotóxicos, toxicológicos, cardiovasculares e renais do extrato aquoso, hidroalcoólico e do óleo essencial de *Piper amalago* em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato aquoso e hidroalcoólico de folhas de *P. amalago*;
- Extrair o óleo essencial de folhas de *P. amalago*;
- Determinar a composição química do óleo essencial extraído de folhas de *P. amalago* por CG/EM;
- Obter o perfil químico dos extratos aquoso e hidroalcoólico por CLAE-EM/EM;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos aquoso e hidroalcoólico e do óleo essencial de *P. amalago* por meio da metabolização do reagente MTT;
- Avaliar morfologicamente as linhagens celulares para investigar os possíveis processos de morte celular envolvidos;
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos aquoso e hidroalcoólico e do óleo essencial de *P. amalago* em ratos;
- Investigar a atividade diurética aguda e prolongada (7 dias) dos extratos aquoso, hidroalcoólico e do óleo essencial de *P. amalago*;
- Investigar a atividade hipotensora e o padrão eletrocardiográfico após tratamento prolongado com os extratos aquoso e hidroalcoólico e com o óleo essencial de *P. amalago*;
- Investigar possíveis alterações bioquímicas em ratos da linhagem Wistar após tratamento prolongado com os extratos aquoso, hidroalcoólico e com o óleo essencial de *P. amalago*;
- Avaliar o estado redox tecidual em fragmentos do coração, artéria aorta e rins de ratas tratados por 7 dias com os extratos aquoso, hidroalcoólico e com o óleo essencial de *P. amalago.*
- Investigar os efeitos vasodilatadores dos extratos aquoso, hidroalcoólico e do

óleo essencial de *P. amalago* em leito mesentérico vascular isolado e perfundido e investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nessas atividades.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA PIPERACEAE

Piperaceae Gisek é uma das mais importantes famílias botânicas de Angiospermas e compreende aproximadamente 2.658 espécies distribuídas em 13 gêneros. No Brasil encontram-se 467 espécies pertencentes a cinco gêneros, denominados *Manekia* Trel., *Ottonia* Spreng., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Piper* L. e *Verhuellia* Miq. encontrados especialmente na Floresta Atlântica e Amazônica. *Piper* é o gênero mais representativo com cerca de 292 espécies, sendo 54 espécies encontradas no Paraná (FLORA DO BRASIL, 2020).

Espécies dessa família compreendem árvores, arbustos, subarbustos, lianas/volúvel/trepadeiras e ervas, sendo 487 representantes endêmicos do Brasil (GIULIETTI *et al*., 2005). Ocorrem no Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e no Sul, tendo seus domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica, Pampa e no Pantanal (GBIF, 2019).

Espécies de Piperaceae possuem várias classes de compostos bioativos, tais como alcaloides, amidas, lignanas, neolignanos, terpenos, esteroides, chalconas, flavanonas (PARMAR *et al*., 1997; CARRARA *et al*., 2012; MARTINS, *et al*., 2003; BATISTA *et al*., 2012) entre outros. Estudos químicos e biológicos revelaram que muitas espécies dessa família são uma rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos.

A importância etnobotânica da família Piperaceae é reconhecida principalmente por suas propriedades medicinais, por exemplo *Peperomia clavigera* Standl. & Steyerm. é utilizada para tratar problemas digestivos, *Peperomia peltilimba* C. DC. ex Trel é usada como anti-inflamatório (MARTÍNEZ-BAUTISTA *et al*., 2019), *Piper cernuum* Vell. (pimenta-de-morcego) é utilizada para combater cólicas abdominais, *Piper marginatum* Jacq. e *Piper tuberculatum* Jacq, são usadas como sedativos em mordidas de cobra (SILVA *et al*., 2017) e a raiz de *Piper methysticum* L. f. Forster tem efeitos narcóticos e sedativos (JUSTO; SILVA, 2008).

3.2 GÊNERO *Piper*

Piper apresenta taxonomia complexa, pois muitas espécies apresentam morfologia foliar similar. Muitos trabalhos morfoanatômicos têm sido conduzidos com espécies do gênero a fim de fornecer dados botânicos para auxiliar na identificação e diferenciação das espécies (GOGOSZ *et al*., 2012; SANTOS *et al*., 2015; BERTOCCO *et al*., 2017). Esses estudos evidenciaram a presença de óleos essenciais dentro de estruturas secretoras, denominadas células oleíferas (GOGOSZ *et al*., 2012; SANTOS *et al*., 2015; dos SANTOS *et al*., 2018).

Devido à enorme variedade, espécies de *Piper* apresentam um considerável desafio taxonômico, provavelmente pelo diminuto tamanho das partes florais. Por isso a morfologia externa da folha tem sido muito utilizada para taxonomia do grupo. Espécies de *Piper* geralmente possuem espigas opostas às folhas e quase sempre são plantas lenhosas e sublenhosas (SOUZA; LORENZI, 2008).

De um modo geral, espécies do gênero *Piper* possuem células secretoras, tricomas tectores e glandulares, compostos lipofílicos e fenólicos, além de grãos de amido, que podem ser encontrados em diversos tecidos de frutas, sementes, folhas, raízes e caules. A maioria das espécies do gênero contém óleo essencial, característica que as classifica como plantas aromáticas (SANTOS *et al*., 2015; SANTOS *et al*., 2018; SALEHI *et al.,* 2019).

As espécies de *Piper* são empregadas na medicina popular e como alimentos, incluindo bebidas, temperos e especiarias. Uma das espécies mais conhecidas é *Piper nigrum* L. que é considerada uma importante fonte de pimenta preta e branca. A pungência de algumas espécies de *Piper* é atribuída aos alcaloides, como a piperina (que conferem pungência à aguardente) e a piperidina. O óleo essencial de algumas espécies de *Piper* também é utilizado para fazer molhos e temperos para a carne. *Piper cubeba* L., também conhecida como pimenta com cauda, tem sido usada como tempero em muitos países, incluindo Indonésia, Índia, Europa e Marrocos (GRAIDIST *et al*., 2015).

Espécies de *Piper* são conhecidas popularmente com jaborandis ou pimentas. De fato, *Piper crassinervium* H.B. & K., é conhecida como jaborandi, *Piper hispidinervum* C.DC., como pimenta-longa, *Piper aduncum* L., como pimenta-demacaco e *Piper nigrum* L*,* como pimenta-do-reino (GOGOSZ *et al*., 2012).

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para espécies de *Piper*, tais como depressora do sistema nervoso central e analgésica (PARMAR *et al*., 1997), anti-inflamatória, antifúngica (NAVICKIENE *et al*., 2005), acaricida (FERRAZ *et al*., 2010), anti-inflamatória, anti-secretora (QUÍLEZ *et al*., 2010), antioxidante (SILVA *et al.*, 2014), antinociceptiva, anti-hiperalgésica, antiartrítica (ARRIGO *et al*., 2016) e leishmanicida (CARRARA *et al*., 2013).

Os compostos em estudo apresentaram atividades biológicas, tais como, atividade mosquitocida contra as larvas de *Aedes aegypti* (JACOBS *et al*., 1999), na absorção de endocanabinoides em diferentes linhagens celulares (NICOLUSSI *et al*., 2004), antioxidante e ações depressoras inespecíficas do SNC contribuindo para a ação sedativa e tranquilizante (FERREIRA, 2019), além de cicatrizante (SANTOS *et al.,* 2020).

Vários grupos químicos têm sido encontrados nas espécies de *Piper*, tais como alcaloides, amidas, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteroides, kavapironas, piperolídeos, chalconas, di-hidrochalconas, flavonas e flavanonas (PARMAR *et al*., 1997; NOVAES *et al*., 2014; dos SANTOS *et al*., 2021).

Parmar *et al*. (1997) analisou 9 espécies de *Piper* e encontrou como compostos majoritários no óleo essencial o α-pineno, *β*-pineno, espatulenol, *β*-cariofileno, óxido de cariofileno, germacreno D e limoneno. Atividades biológicas do óleo essencial também têm sido relatada para espécies de *Piper*, incluindo a atividade fungicida, inseticida, larvicida, leishmanicida, moluscicida e tripanocida (SOUSA *et al.* 2008; FAN et al., 2011; SILVA *et al*., 2014; KRINSKI *et al*., 2018; dos SANTOS *et al*., 2021).

3.3 *Piper amalago* L.

Piper amalago, popularmente conhecida no Brasil como jaborandi-manso e jaborandi-falso, é um arbusto que mede de 2 a 7 metros de altura. Habita as regiões Norte (Pará e Rondônia), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2019).

Anatomicamente possui folha hipoestomática, camada subepidérmica, tricomas glandulares e tectores, mesofilo dorsiventral e nervura plano-convexa contendo feixe vascular único e central (SANTOS *et al*., 2015).

A espécie é tradicionalmente utilizada no México e no Brasil para tratar hipertensão, queimaduras, inflamação e infecções por *Leishmania* spp. (CARRARA *et al*., 2013, 2017). *Piper amalago* é tradicionalmente usada pelos curandeiros Q'eqchi 'Maya para a síndrome ligada à cultura, susto e para tratar ansiedade (MULLALLY *et al*., 2016). Estudos prévios evidenciaram que *P. amalago* contém

ação diurética e antilitiásica (NOVAES *et al*., 2014), analgésico, anti-inflamatório, antinociceptivo e antiartrítico (ARRIGO *et al*., 2016). Recentemente, Santos *et al*. (2020) utilizaram o extrato aquoso de folhas de *P. amalago* topicamente com o objetivo de cicatrizar uma ferida lacerada no polegar de um paciente portador de Diabetes mellitus e obtiveram sucesso no tratamento.

Quimicamente, o óleo essencial extraído de folhas de *P. amalago* apresentou como componentes majoritários o α-pineno, biciclogermacreno, β-felandreno, germacreno D e espatulenol (SALEHI *et al*., 2019), enquanto o óleo extraído das raízes evidenciou o componente α-amorfeno (SILVA *et al*., 2017).

Jacobs *et al*. (1999) isolaram, identificaram e testaram amidas alifáticas, ácidos aromáticos como, pirrolidinas e isobutilamidas, a saber: 7-(3’,4’-metilenodioxifenil)2E,4E-ácido heptadienoico pirrolidida; 2’-metóxi-4’5’-metilenodioxi-transcinamoilisobutilamida; 2’-metoxi-4’5’-metilenodioxi-trans-cianamoilpirrolidida; tricostaxina; pipercida e guinesina e utilizadas em ensaio contra larvas de *Aedes aegypti*, sendo que algumas das amidas foram ativas contra o mosquito. Arrigo *et al*. (2016) avaliaram os efeitos farmacológicos do extrato e amidas isoladas de *P. amalago* os quais apresentaram atividade anti-hiperalgésica, anti-nociceptiva e antiartrítica em modelos de dor aguda e crônica em roedores.

Figura 1- *Piper amalago* L. (*Piperaceae*)

Fonte: Acervo pessoal de Jane Manfron Budel

3.4 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

A hipertensão é considerada a mais comum entre as doenças cardiovasculares. A pressão arterial elevada provoca alterações patológicas na vasculatura e hipertrofia do ventrículo esquerdo, podendo causar o acidente vascular encefálico, infarto do miocárdio, além de insuficiência cardíaca e renal (GOODMAN; GILMAN, 2010).

A pressão arterial (PA) é definida como a pressão que o sangue exerce contra a parede das artérias e é dada pelo resultado do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. Ou seja, são obtidas duas pressões, a máxima ou sistólica (PAS) que acontece com a contração do coração e, a mínima ou diastólica (PAD), que ocorre com o relaxamento. O valor de referência da pressão cardíaca é 120/80 mm Hg (SBC, 2016).

A pressão arterial sistêmica média (PAm) é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica, além da impedância (resistência vascular ao fluxo) e do volume arterial sistólico que são outros fatores diretamente relacionados. Esses determinantes diretos envolvem os chamados indiretos, como, atividade do sistema

nervoso autônomo, reserva corporal de sódio e líquido extracelular, sistema reninaangiotensina-aldosterona (SRAA) e diferentes autacoides, tais como prostaglandinas, cininas, fator natriurético atrial e outros peptídeos.

O endotélio é conhecido por desempenhar um papel importante na regulação da constrição e dilatação arterial, com destaque para o óxido nítrico (NO), formado pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e que exerce importante efeito vasodilatador e antioxidante. O sistema nervoso autônomo, especialmente o sistema simpático desempenha um papel importante no controle circulatório por mecanismo reflexo agindo sobre o tônus vascular. Como reflexo responde aos barorreceptores aórticos e carotídeos com liberação de norepinefrina nas terminações nervosas, produzindo vasoconstrição e aumento da frequência cardíaca. Os mecanismos que regulam a PA a longo prazo estão relacionados com a regulação do sódio e do líquido extracelular que é compartilhado em líquido intersticial e volume plasmático (desempenha importante papel hemodinâmico), separados pelo endotélio onde são trocados nutrientes, gases, eletrólitos e água (ALCASENA; ROMERO, 1998).

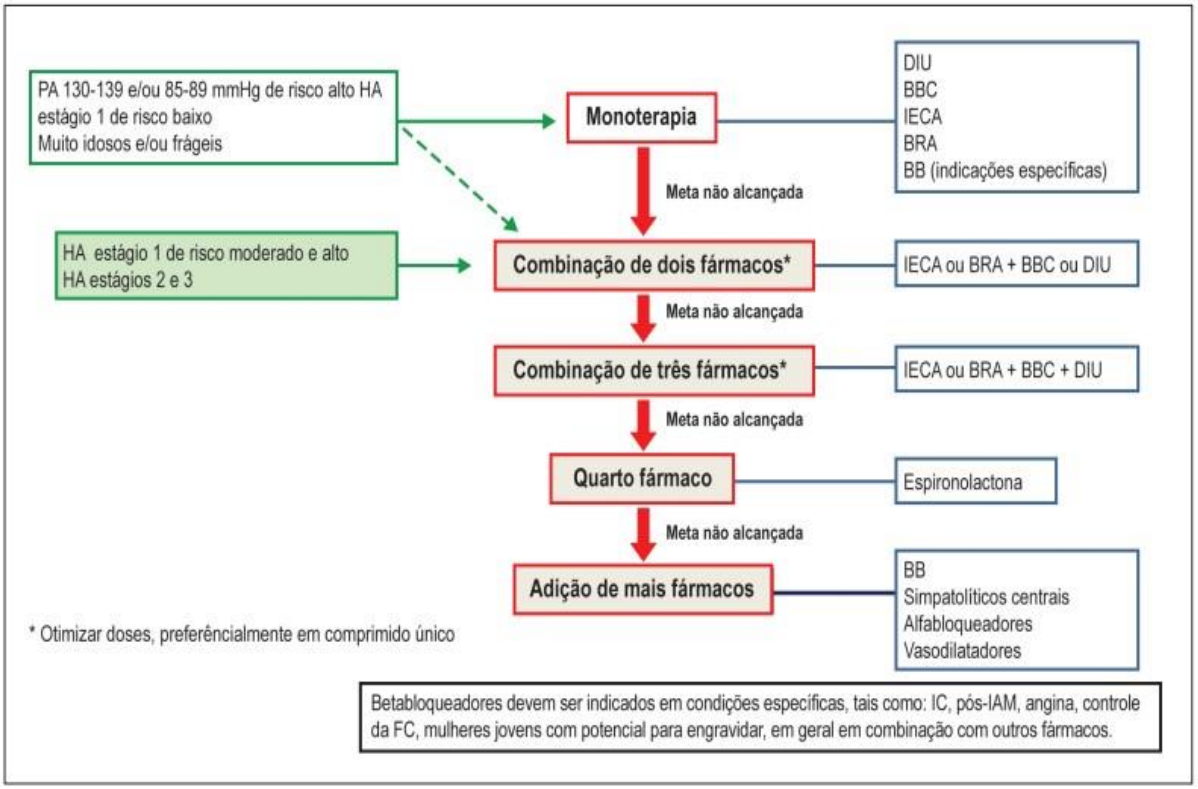
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 600 milhões de pessoas tenham HAS, com crescimento global de 60% dos casos até 2025, além de cerca de 7,1 milhões de mortes anuais. O estilo de vida pouco saudável contribui para o início da HAS. São fatores relacionados os hábitos alimentares inadequados, inatividade física, alcoolismo e tabagismo (VERCEZI *et al*., 2019)

Para alcançar a meta de redução relativa de 25% na prevalência de pressão sanguínea elevada serão necessárias intervenções para redução do consumo de sal, de gorduras saturadas e o aumento do consumo de frutas e verduras, esforços para redução do sobrepeso/obesidade e rastreamento para detecção e tratamento precoce das pessoas hipertensas (MALTA *et al*., 2018). No entanto, deve-se estimular o diagnóstico precoce, o tratamento contínuo do controle da pressão arterial por meio da modificação do estilo de vida e/ou do uso regular de medicamentos (MALACHIAS *et al*., 2016).

Inicialmente são utilizados uma classes de anti-hipertensivos considerados preferenciais para a redução da pressão arterial e do risco de desfechos cardiovasculares e mortalidade associados à hipertensão arterial, como os diuréticos tiazídicos ou similares (DIU), bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e os bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA), ou ainda a combinação de medicamentos que tenham

mecanismos de ação distintos (BARROSO *et al*. 2020), como podemos ver no fluxograma a seguir.

Figura 2 - Fluxograma de tratamento medicamentoso



Fonte: Barroso *et al.* 2020.

A HA tem alta prevalência, é de fácil diagnóstico e possui tratamento adequado, mas é de difícil controle pela baixa adesão, devido ao alto custo de alguns fármacos, bem como, seus efeitos colaterais (BARROSO *et al.* 2020).

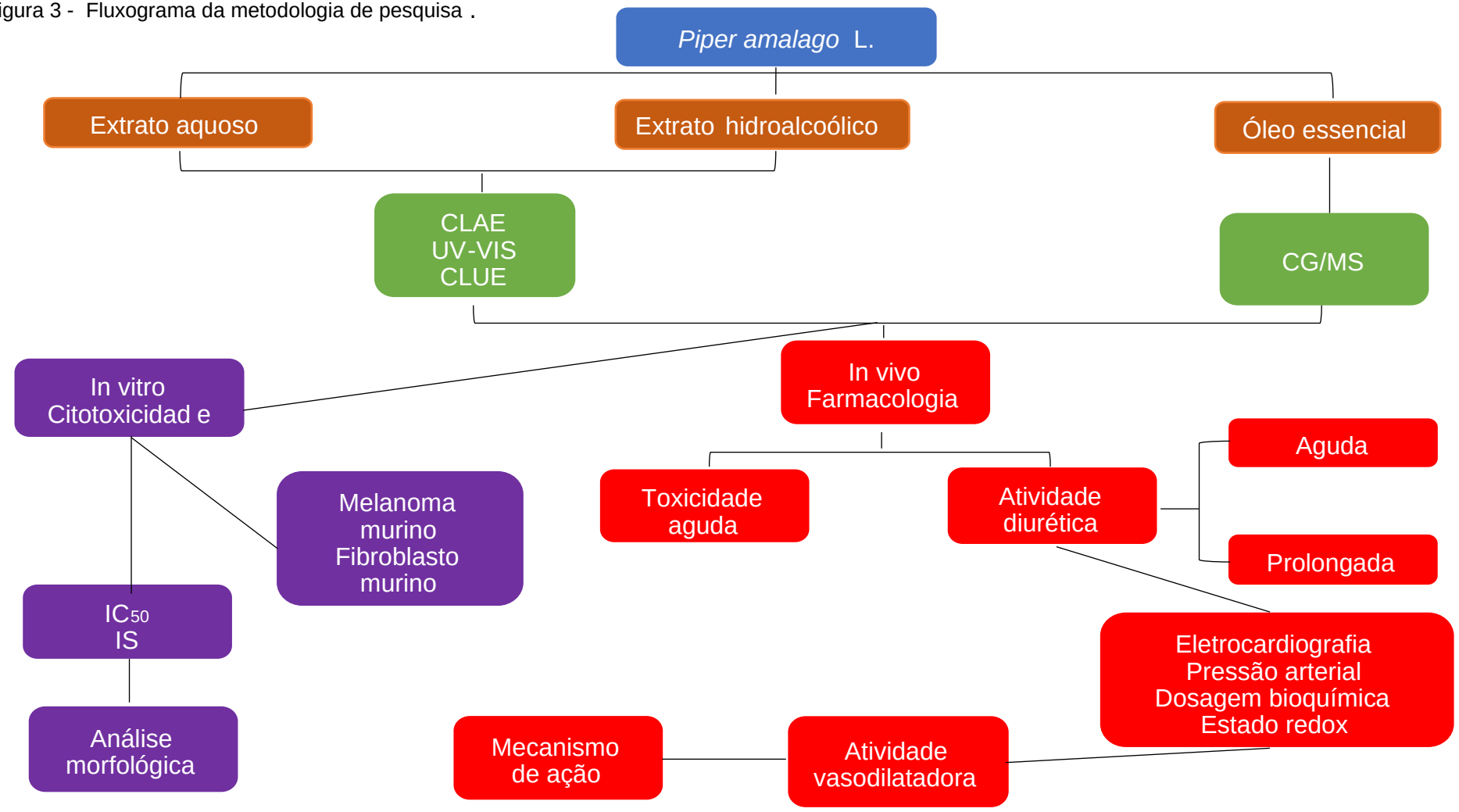
Consequentemente, com o avanço científico as plantas medicinais têm acompanhado a evolução do homem que procura na natureza, saídas que melhorem sua condição de vida aumentando suas perspectivas de sobrevivência e uma melhora de sua saúde (LOPES *et al*., 2010).

Inúmeras plantas medicinais estão sendo investigadas para tratamento da HAS, por consequência, os medicamentos fitoterápicos são constituídos por misturas complexas de substâncias bioativas, denominados compostos secundários, que podem ser responsáveis por ações polivalentes (ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES; 2008). Nesse sentido, os extratos hidroalcoólicos do alho (*Allium sativum* L.) e do capim-limão (C*ymbopogon citratus* (DC.) Stapf) mostraram-se igualmente potentes na redução da pressão arterial média de ratos anestesiados nos estudos de Singi *et al*.

(2005).

Nesse contexto, a OMS recomenda estimular mecanismos naturais de prevenção de agravos e recuperação da saúde por meio de tecnologias eficazes e seguras, com ênfase na escuta acolhedora, no desenvolvimento do vínculo terapêutico e na integração do ser humano com o meio ambiente e a sociedade. No Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) contempla sistemas médicos complexos e recursos terapêuticos (BRASIL, 2006). Dessa forma, considera-se importante a realização de pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas com base na medicina tradicional, a exemplo do uso de espécies vegetais com atividades diuréticas e anti-hipertensivas.

Figura 3 - Fluxograma da metodologia de pesquisa .



Fonte: A autora

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Partes aéreas de *Piper amalago* L. foram coletadas em Curitiba, Paraná (25º23´53" S e 49º20'36" W, 980 m), em fevereiro de 2019. O material vegetal foi submetido à confecção de exsicata, identificado por taxonomista e depositado no Museu Botânico Municipal de Curitiba sob o registro MBM 71947.

O acesso ao material botânico foi aprovado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (CGEN/SISGEN), tendo como código de autorização A14F6AF.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

4.2.1 Preparo do Extrato Aquoso (EAPA)

O extrato aquoso de *P. amalago* foi obtido a partir da espécie vegetal seca em estufa a 30 °C por três dias e depois fragmentada. Para isso, 100 g da amostra foi submetida ao processo de extração por infusão em 1 L de água fervente (88 a 90 °C). A extração foi realizada até que o infuso atingisse a temperatura ambiente (20 a 23 °C, por ± 5 h). O resíduo foi separado por filtração e o extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório até um volume de 200 mL. O produto obtido foi tratado com 600 mL de etanol para a precipitação das proteínas e polissacarídeos, obtendose um precipitado (PEI) e um sobrenadante etanólico do infuso (ESPA). O ESPA foi liofilizado e armazenado em freezer (-20°C) (TIRLONI *et al*., 2018).

Calculou-se o rendimento total do extrato (RODRIGUES *et al*., 2011), de acordo com a fórmula:

$$Re = \left(\frac{Pext}{Pfolhas}\right) x\ 100 \quad (1)$$

Onde: *Re* = Rendimento total do extrato (%);
Pext = Peso do extrato seco (g);
Pfolhas = Peso das folhas frescas ou secas (g).

4.2.2 Preparo do Extrato Hidroalcoólico 70% (EHPA)

O extrato hidroalcoólico de *P. amalago* foi obtido pela maceração de 100 g de planta seca e fragmentada em 3 L da solução de etanol: água (70:30 v/v), por 7 dias, sendo filtrado e concentrado em evaporador rotativo e, posteriormente, liofilizado (PEREIRA *et al*., 2015).

Calculou-se o rendimento total do extrato (RODRIGUES et al., 2011), de acordo com a fórmula:

$$Re = \left(\frac{Pext}{Pfolhas}\right) x\ 100 \quad (2)$$

Onde: *Re* = Rendimento total do extrato (%);
Pext = Peso do extrato seco (g);
Pfolhas = Peso das folhas frescas ou secas (g)

4.2.3 Extração do Óleo Essencial por Hidrodestilação (OEPA)

O óleo essencial foi extraído a partir de 200 g de folhas secas fragmentadas, por hidrodestilação, usando um aparelho Clevenger, por 6 h. No final de cada destilação os óleos essenciais foram recolhidos, secos com Na_2SO_4 anidro e mantidos a uma temperatura de -4 ± 0,5 °C, na ausência de luz até o processamento das análises. O rendimento de óleo essencial foi calculado em volume/% em massa (BUDEL *et al.,* 2018) e a densidade ($g.mL^{-1}$) foi calculada através da equação:

$$d = \frac{massa\ do\ OE\ (g)}{volume\ do\ OE\ (mL)} \quad (3)$$

Onde: d = densidade
massa do OE (g) = massa do óleo essencial em gramas
volume do OE (mL) = volume do óleo essencial em mL

4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL (OE) de *Piper amalago*

4.3.1 Análise por Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (CG/EM)

O OE de *P. amalago* foi analisado por CG/EM usando um sistema Agilent 7890A GC equipado com um espectrômetro de massa quadrupolo 5975C e um amostrador automático 7693 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Dez microlitros de EO foram dissolvidos em 1 mL de n-hexano para cada amostra de óleo essencial, sendo injetada 1 µL da solução de amostra. O gás de arraste empregado foi o hélio com vazão de 1 mL/min, em modo split 50:1, estando o injetor à 250 ºC. A separação foi realizada em coluna apolar DB-5MS (Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, EUA) com dimensões de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. O programa de temperatura do forno iniciou em 45 °C (mantido por 2 min), foi aumentado para 130 °C a uma taxa de 2 °C/min (mantido por 10 min), depois a 150 °C a uma taxa de 2 °C/min e, finalmente, a 250 °C a uma taxa de 2 °C/min e isotérmica em 10 min a 280 °C. O tempo total de experimento foi de 70 min. Foram realizadas injeções em triplicata. Os espectros de massa foram registrados a 70 eV em um modo de varredura de m/z 35 a 500. Na linha de transferência a temperatura era 260 °C. A fonte de íons e as temperaturas do quadrupolo foram 230 °C e 130 °C, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada com Agilent MSD Chemstation (F.01.03.2357). A identificação dos compostos envolveu a comparação dos espectros de massa com os bancos de dados (Wiley e o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST), usando uma correspondência baseada em probabilidade algoritmo. A identificação posterior foi baseada nos índices de retenção relativos em comparação com a literatura (Adams, 2007). A porcentagem bruta da área de pico de cada composto foi obtida em análise por CG/EM de varredura completa em coluna DB-5MS (Análise foi realizada no Centro Nacional de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade do Mississippi).

4.3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-EM/EM)

Os extratos aquosos e hidroalcoólico de *P. amalago* foram avaliados qualitativamente em espectrômetro de massas para análise da composição química dos extratos. A análise preliminar foi realizada em espectrômetro de massas de alta resolução (HR-MS; Xevo, Waters, Milford, MA, USA) por infusão direta dos extratos a

20 μg/mL em água:metanol (50:50) com 0,1% de ácido fórmico. Os compostos foram analisados nos modos negativo e positivo, programado para monitorar a faixa de m/z 100-800 (MSScan). As soluções foram filtradas em filtro de politetrafluoroetileno (PTFE, Chromafil Xtra, 0,2 μm × 13 mm) e injetadas por infusão direta no espectrômetro de massas com fluxo de 10 $\mu L min^{-1}$.

A espectrometria de massa foi realizada em voltagem capilar (KV): 3.50, voltagem do cone (V): 55, temperatura de dessolvatação: 350 ºC, dessolvatação (L/Hr): 550, a energia de colisão foi de 12 a 40V, de acordo com a melhor fragmentação de cada massa analisada (Daughter Scan) (Análise realizada no Labmu-Sebisa da UEPG).

4.3.3 Análise por Espectroscopia na Região do UV-VIS

As formulações foram analisadas por espectroscopia na região UV-VIS, utilizando o equipamento Genesys 10uv scanning (Thermo Scientific, Rochester, Nova Iorque), na faixa de 450-200 nm. Os extratos, aquoso e hidroalcoólico foram preparados na concentração de 20μg/mL metanol:água (50:50). As medidas espectrofotométricas foram realizadas no modo de varredura em cubetas padronizadas de quartzo de 1 cm.

4.3.4 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (UHPLC)

A análise foi desenvolvida por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC), em equipamento Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Quito, Japão), com bomba quaternária (LC-30AD), desgaseificador modelo DGU20A5RA, amostrador automático (SIL-30 AC), compartimento de coluna termostatizado (CTO-20AC) e um detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), conforme os parâmetros: detecção UV (λ = 244, 256, 266, 271, 282, 333 nm), fluxo isocrático 5% 3 min, gradiente 90 a 100 10 min e 100%, coluna Shimadzu Shim-pack XR-ODS III C18 (2,0 mm x 200 mm x 2,2 μm), temperatura 30 ºC, concentração de 1 μg/mL, fase móvel metanol e água acidificada com 2% de ácido fórmico PA (50:50, v/v), as soluções foram filtradas em filtro de politetrafluoroetileno (PTFE, Chromafil Xtra, 0,2 μm × 13 mm) e o volume de injeção 0,30 mL/min com o tempo de análise de 20 min. (Análise realizada no LabmuSebisa da UEPG).

4.4 ESTUDOS *IN VITRO*

4.4.1 Análise Citotóxica

4.4.2 Linhagens Tumorais

Foram utilizadas células de fibroblasto murino (3T3, Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0017) e melanoma murino (B16F10, Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0342). Todas as linhagens cultivadas em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 100 µg/L de estreptomicina e 100 U/L de penicilina, em estufa a 37 °C e em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2.

4.4.3 Ensaio de Citotoxicidade através da Metabolização do reagente Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98% (MTT)

O ensaio de citotoxicidade com MTT foi baseado na metodologia descrita por Mosmann (1983), com modificações. Em placas de 96 poços foram semeadas $3x10^3$ células/poço e incubadas. Após 24 h o meio de cultura foi retirado e as células tratadas com concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL do óleo essencial e dos extratos em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 100 µg/L de estreptomicina e 100 UI/L de penicilina. Os microtubos contendo o meio, o óleo essencial ou os extratos, aquoso e hidroalcoólico foram submetidos à agitação vigorosa em agitador tipo vórtex, por 1 min, imediatamente antes de serem acrescentados aos poços. Após 72 h, as células foram lavadas com meio de cultivo, e aos poços foi acrescentado 100 µL de uma solução contendo 0,5 mg/mL do reagente MTT diluído em solução salina tamponada (PBS). Após 2 h, o MTT foi retirado e os cristais de formazam formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido. A coloração formada foi mensurada em espectrofotômetro de microplaca em 570 nm. O controle negativo foi realizado com as células incubadas com RPMI® 1640, suplementados com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 100 µg/L de estreptomicina e 100 UI/L de penicilina sem os tratamentos com o óleo essencial ou com os extratos aquoso e hidroalcoólico.

As absorbâncias obtidas foram transformadas em % de viabilidade celular de acordo com a fórmula seguinte:

$$\%\ de\ viabilidade\ celular = \left(\frac{absorbância\ do\ poço\ do\ tratamento\ a\ absorbância\ do\ branco}{absorbância\ do\ controle - absorbância\ do\ branco}\right) \times 100 \quad (4)$$

4.4.4 Cálculo da Concentração Inibitória Mínima (IC_{50})

A concentração que promove a inibição de 50% do crescimento celular (IC_{50}) foi determinada por análise de regressão não-linear usando o programa GraphPad Prisma, versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

4.4.5 Cálculo do Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) do óleo essencial e dos extratos aquoso e hidroalcoólico foram definidos pela razão da IC_{50} do composto entre as linhagens nãotumoral (3T3) e tumoral (B16F10) conforme fórmula a seguir:

$$IS = \frac{IC50\ célula\ não\ tumoral}{IC50\ célula\ tumoral} \quad (5)$$

4.4.6 Análise Morfológica

As análises morfológicas foram realizadas nas células após incubação, na concentração de 250, 300 e 350 µg/mL do óleo essencial que foi definido após os ensaios de citotoxicidade. As células (3.000/poço) foram plaqueadas sobre lamínulas redondas estéreis e depositadas em placas de 24 poços, e após 24 h, as células foram tratadas com o óleo essencial. Depois de 24 h de tratamento, as células foram lavadas com o meio RPMI e fixadas com formol 2% em solução salina tamponada (PBS) por 10 min. Depois de fixadas, as células foram submetidas à coloração de MayGrünwald-Giemsa e as alterações morfológicas foram observadas em microscopia convencional, utilizando objetiva de imersão em microscópio com câmera digital acoplada (Nikon E600 equipado com sistemas de câmera Nikon DSFiv e software de imagem Nikon Elements (Nikon Inc., Tóquio, Japão).

4.5 ESTUDOS *IN VIVO*

4.5.1 Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (134 dias) provenientes do biotério central da Universidade Federal da Grande Dourados. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), com cama de maravalha esterilizada, livre acesso à comida e água, e em condições padrão de temperatura (22 ± 3°C), umidade e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h). Para os diferentes protocolos experimentais, o número de animais por grupo foi de 6 (seis) indivíduos. A escolha das ratas como espécie a ser utilizada nesta pesquisa baseouse em trabalhos desenvolvidos por Kau *et al*. (1984) e Gasparotto Junior *et al.* (2009).

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Grande Dourados (protocolo n.28/2019). Os procedimentos executados apresentaram grau de invasividade 2 e estão de acordo com as Diretrizes Brasileiras Para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA, 2013).

4.5.2 Avaliação da Toxicidade Aguda

A avaliação da toxicidade oral aguda foi realizada em ratas de acordo com o protocolo n. 425 estabelecido pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) de 2008. Para tal experimento foram utilizadas 15 ratas (n = 5) divididas em três grupos experimentais. Os diferentes extratos aquoso, hidroalcoólico e óleo essencial foram administrados por via oral (gavagem) em uma única dose de 2000 mg/kg. O ganho de peso corporal e o consumo de água e ração foram monitorados e registrados diariamente. Os animais foram observados criteriosamente durante 14 dias, contando a partir do dia que receberam a dose única do extrato (2000 mg/kg). Sinais clínicos de toxicidade, peso corporal, consumo de água e ração também foram mensurados diariamente. O comportamento dos animais foi diariamente observado segundo o screening hipocrático (MALONE; ROBICHAUD, 1962), incluindo a agitação, irritabilidade, depressão, resposta ao toque, sensibilidade a dor, contorção abdominal, relaxamento muscular, tremores, respiração, convulsão, diarreia, constipação, alteração cutânea, mucosa e pêlos. No 15º dia os animais foram

submetidos à eutanásia por overdose de isoflurano (em câmara com saturação acima de 35%), obedecendo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Resolução no 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Depois de confirmada a morte pela análise dos sinais vitais e reflexo corneal, os órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, baço e rim) foram removidos, pesados e avaliados macroscopicamente. Posteriormente esses órgãos foram submetidos à análise histopatológica.

4.5.3 Avaliação da Atividade Diurética Aguda e Prolongada

A avaliação da atividade diurética foi determinada segundo métodos previamente descritos por Gasparotto Junior *et al*. (2009), onde as doses escolhidas foram utilizadas de modo que, na medida do possível, mimetizasse as doses que a população utiliza para o preparo de chás por meio de infusão. Para tal procedimento, os animais foram randomizados e divididos em 8 grupos experimentais (n = 8), como segue:

1. EAPA 30 mg/kg (animais tratados com extrato aquoso; 30 mg/kg);
2. EAPA 300 mg/kg (animais tratados com extrato aquoso; 300 mg/kg);
3. EHPA 30 mg/kg (animais tratados com extrato hidroalcoólico; 30 mg/kg);
4. EHPA 300 mg/kg (animais tratados com extrato hidroalcoólico; 300 mg/kg);
5. OEPA 30 mg/kg (animais tratados com óleo essencial; 30 mg/kg);
6. OEPA 300 mg/kg (animais tratados com óleo essencial; 300 mg/kg);
7. HCTZ (animais tratados com hidroclorotiazida; 25 mg/kg);
8. Controle negativo (animais tratados com água; 0,2 mL/100g).

Previamente aos tratamentos enumerados, todos os animais receberam uma solução de cloreto de sódio 0,9% (5 mL/100 g) para impor uniformidade corporal de sal e água. Todos os tratamentos foram realizados pela via oral (gavagem), uma vez ao dia (pela manhã), por um período de 7 dias. Após o primeiro tratamento, os animais foram mantidos (em duplas) em gaiolas metabólicas e a urina foi coletada em um cilindro graduado após 1, 2, 4, 6 e 8 h, e a cada 8 e 24 h, por 7 dias. Ao volume final de urina excretada foram mensurados a densidade e o pH, as concentrações de sódio, potássio, cálcio, magnésio, ureia, creatinina e cloreto.

4.5.4 Eletrocardiografia

Ao final do período experimental, todos os animais utilizados na atividade diurética foram anestesiados por via intramuscular com 100 mg/kg de cetamina e 20 mg/kg de xilazina. Após a anestesia, os ratos foram submetidos à eletrocardiografia (ECG) segundo metodologia de Guarnier *et al*. (2019). Para isso, os eletrodos foram posicionados nos dois membros anteriores e nos dois posteriores do animal. Um período de aclimatação de 5 min foi aguardado e as ondas de ECG foram registradas por mais 5 min. Os seguintes dados foram coletados em gravador digital de ECG (WinCardio, Micromed, Brasília, Brasil): Ondas P, Q, R e S; e os Intervalos PR, QRS, QT e QTc.

4.5.5 Medidas da Pressão Arterial (PA)

Para este protocolo foram utilizados os mesmos animais submetidos aos experimentos de atividade diurética e eletrocardiografia. Após a eletrocardiografia e com os animais ainda anestesiados, foi administrado heparina (30 UI) por via subcutânea. Posteriormente, a artéria carótida esquerda foi isolada, canulada e conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de gravação computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Austrália), onde os dados de pressão sanguínea sistólica (PSS), pressão sanguínea diastólica (PSD), pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram mensurados e gravados. Após os 15 min necessários para a estabilização da PA, o nível basal da PAS, PAD, PAM e FC foram registrados durante 5 min (GASPAROTTO JUNIOR *et al*., 2011). Ao final deste procedimento, e após a coleta do sangue arterial, todos os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de isoflurano em câmara de saturação (acima de 35%), obedecendo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a resolução no 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

4.5.6 Dosagens Bioquímicas

Para a realização das análises bioquímicas, amostras do sangue periférico (coletado diretamente da artéria carótida canulada) foi transferido para um tubo de ensaio contendo gel separador com ativador de coágulo (BD SST II® Advance® BD)

e centrifugados em até 2 h após a coleta para obtenção do soro. As amostras de soro foram armazenadas em freezer (-20°C), descongeladas e processadas em um analisador bioquímico automatizado (Selectra E, Vital Scientific, Holanda). Os íons foram determinados utilizando um sistema semi-automatizado MH-Lab Ise – íon seletivo. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), potássio (mmol/L), sódio (mmol/L), cálcio (mg/dL) e magnésio (mg/dL).

4.5.7 Investigações do Estado Redox Tecidual

Após a eutanásia (overdose de isoflurano em câmara com saturação), amostras da artéria aorta, coração, rins e fígado obtidos dos animais ao final do período experimental (diurese, eletrocardiograma, medida da pressão arterial e coleta de sangue), foram homogeneizadas e centrifugadas a 9700 rpm durante 20 min. Diferentes diluições foram utilizadas para cada tecido. A homogeneização foi realizada em gelo e a centrifugação foi refrigerada a 4ºC. O sobrenadante foi armazenado em 80ºC para análises posteriores.

A partir do sobrenadante foram analisados os seguintes parâmetros de acordo com metodologias previamente estabelecidas: superóxido dismutase (SOD) através do método de oxidação do pirogalol (GAO *et al*., 1998), e a taxa de lipoperoxidação (LPO), foram avaliados de acordo com metodologia previamente descrita por Sedlak e Lindsay (1968), com pequenas modificações. Os resultados foram expressos pela quantidade de proteína presente nos homogenatos. A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

4.5.8 Avaliações da Atividade Vasodilatadora e Mecanismos Moleculares Envolvidos

Nesta etapa do trabalho, objetivou-se avaliar o potencial vasodilatador (em vasos de resistência) dos extratos testados, e investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos nessas atividades. Para isso, leitos mesentéricos vasculares oriundos de ratos normotensos (n = 5), sem qualquer tratamento prévio, foram rapidamente isolados e preparados para a perfusão como descrito previamente (KAWASAKI *et al*., 1988; KAWASAKI *et al*., 1991). A artéria mesentérica superior foi canulada e lavada delicadamente com uma solução de PSS (119 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 2,4 mM de $CaCl_2$, 1,2 mM de $MgSO_4$, 25,0 mM de $NaHCO_3$, 1,2 mM de

KH_2PO_4, 11,1 mM de dextrose e 0,03 mM EDTA) para eliminar o sangue de seu interior. Após a remoção do intestino inteiro e do leito vascular associado, o leito mesentérico foi delicadamente separado. Foram utilizados somente quatro filiais arteriais principais do tronco mesentérico superior, colocalizado próximo ao íleo terminal. Os leitos mesentéricos isolados foram acondicionados em cubas de vidro, mantidos a 37 °C, aerados com carbogênio (O_2 95 % e CO_2 5 %) e perfundidos a um fluxo constante de 4 mL/min com uma solução de PSS com auxílio de uma bomba peristáltica. O registro da pressão de perfusão foi feito através de um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão, interligado a um polígrafo computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Austrália). Após 30 min para estabilização das preparações, uma solução de PSS contendo fenilefrina (Phe, 3 µM) foi continuamente perfundida. Após estabilização do tônus, diferentes preparações receberam injeções *em bolus* contendo 0,0003, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03 e 0,1 mg dos extratos selecionados, e a redução da pressão de perfusão foi registrada. Então, após um novo período de equilíbrio (30 min), diferentes preparações foram perfundidas com PSS contendo 3 µM de Phe associada com os seguintes agentes, usados isoladamente ou combinados: L-NAME (100 µM; um inibidor não seletivo da NO sintase), indometacina (1 µM; um inibidor não seletivo das cicloxigenases), KCl (40 mM), tetraetilamônio (TEA 1 mM; um bloqueador não seletivo de canais de potássio sensíveis ao cálcio), 4aminopiridina (4-AP 10 µM; um bloqueador de canais de potássio dependentes de voltagem) e glibenclamida (GLB 10 µM; um bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP; Kir6.1). Após os 15 min da perfusão contínua, os extratos foram novamente injetados no sistema de perfusão. A capacidade dos extratos testados para reduzir a pressão de perfusão na presença e ausência de diferentes inibidores foi, então, avaliada.

4.5.9 Análises Estatísticas

Os dados foram previamente analisados quanto à homogeneidade da variância e à normalidade da distribuição. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett ou Tukey, dependendo dos fatores envolvidos. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$). Para a análise estatística e a confecção dos gráficos foi utilizado o programa Graphpad Prism versão 7.0.

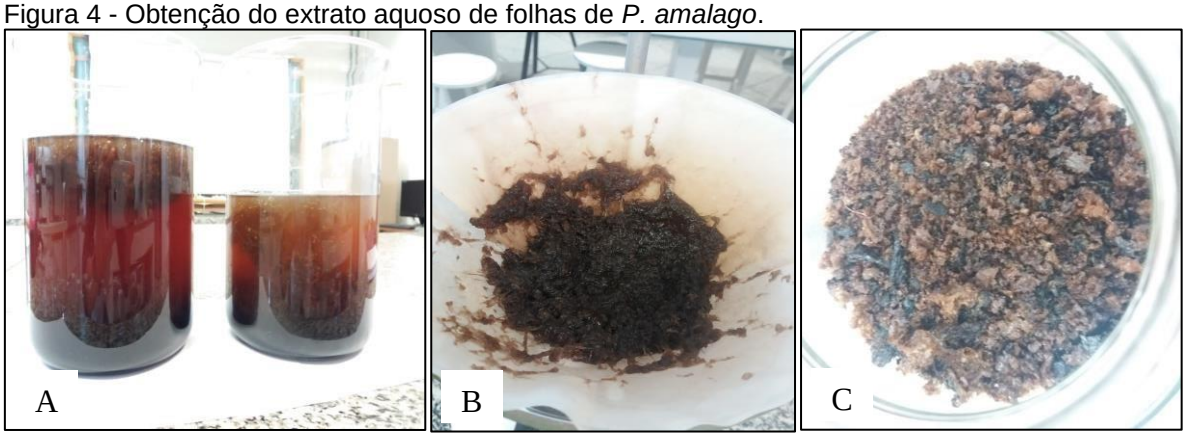
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DOS EXTRATOS

5.1.1 Obtenção do Extrato Aquoso

O extrato aquoso obteve um aroma forte e levemente adocicado e apresentou um rendimento de 15% (Figure 4).

Figura 4 - Obtenção do extrato aquoso de folhas de *P. amalago*.

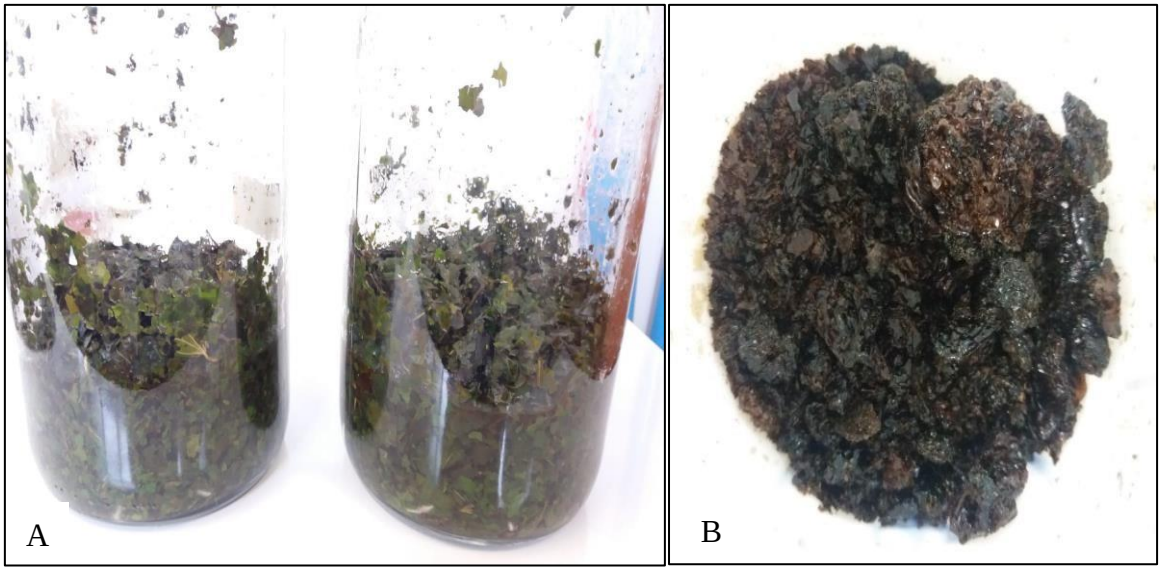


Fonte: A autora
Legenda: A: extrato de folhas. B: resíduo em funil de separação. C: extrato liofilizado.

5.1.2 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico obteve um aroma forte e levemente adocicado e apresentou um rendimento de 14,6% (Figura 5).

Figura 5 - Obtenção do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. amalago*.



Fonte: A autora
Legenda: A: extrato hidroalcoólico por maceração. B: extrato hidroalcoólico liofilizado.

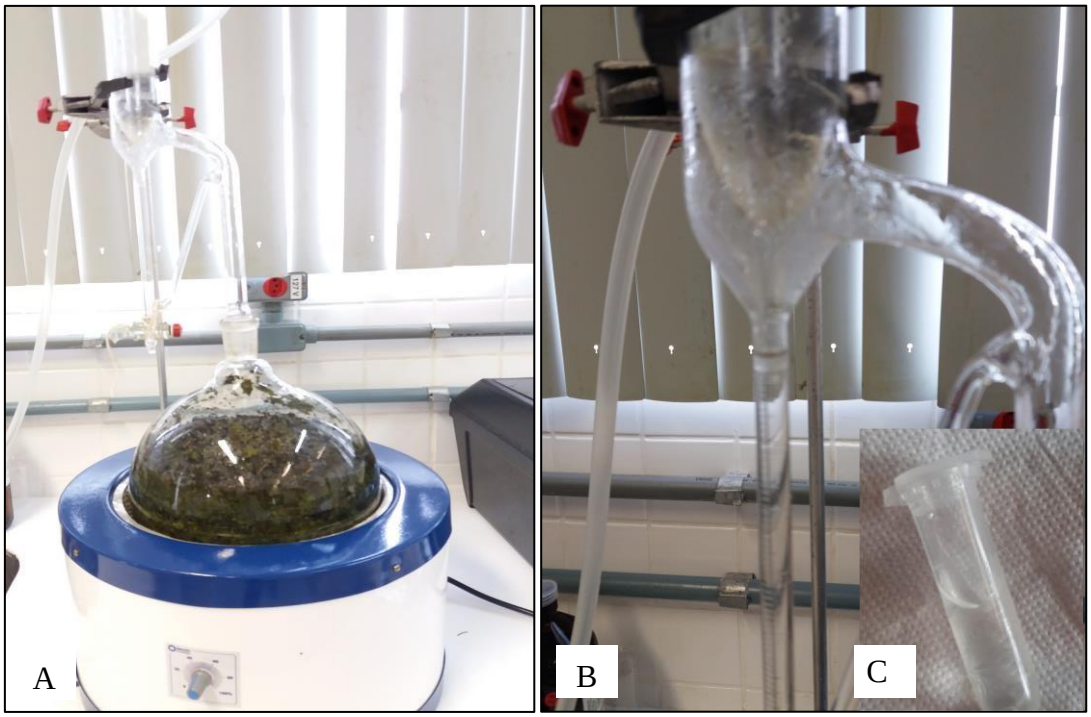
5.1.3 Obtenção do Óleo Essencial por Hidrodestilação

O óleo essencial de *P. amalago* apresentou um aroma forte e levemente acre, praticamente transparente, com densidade de 0,98 g/mL e teor de 1,02%.

Mesquita *et al*. (2005) analisaram o óleo essencial de 8 espécies de *Piper* da região de Minas Gerais e encontraram rendimentos diferentes para o óleo essencial das espécies avaliadas, a saber, 0,7% em *P. amalago*, 1,2% em *P. arboreum,* 1,7% em *P. cernum*, 0,3% em *P. hispidum*, 2% em *P. regnelli*, 0,2% em *P. submarginatum* e 2,3% em *P. viscosanum.* No presente estudo, o rendimento de *P. amalago* foi maior que o encontrado no estudo de Mesquita *et al.* (2005). Entretanto, valores superiores ou inferiores ao encontrado nesse trabalho foram obtidos para outras espécies de *Piper*.

O rendimento do OE pode ser influenciado pelas variações fisiológicas inerentes à planta, condições ambientais, fatores fenológicos, características genéticas, secagem, condições aplicadas ao material vegetal antes da extração, o processo empregado para moagem, as condições de armazenamento, além dos métodos de extração do OE (BUDEL *et al*. 2018).

Figura 6 - Extração do óleo essencial de *Piper amalago* por destilação por arraste de vapor, utilizando aparelho de Clevenger.



Fonte: A autora
Legenda: A: extração do óleo essencial. B: óleo essencial coletado no tubo graduado do aparelho de Clevenger. C: óleo essencial armazenado em Eppendorf.

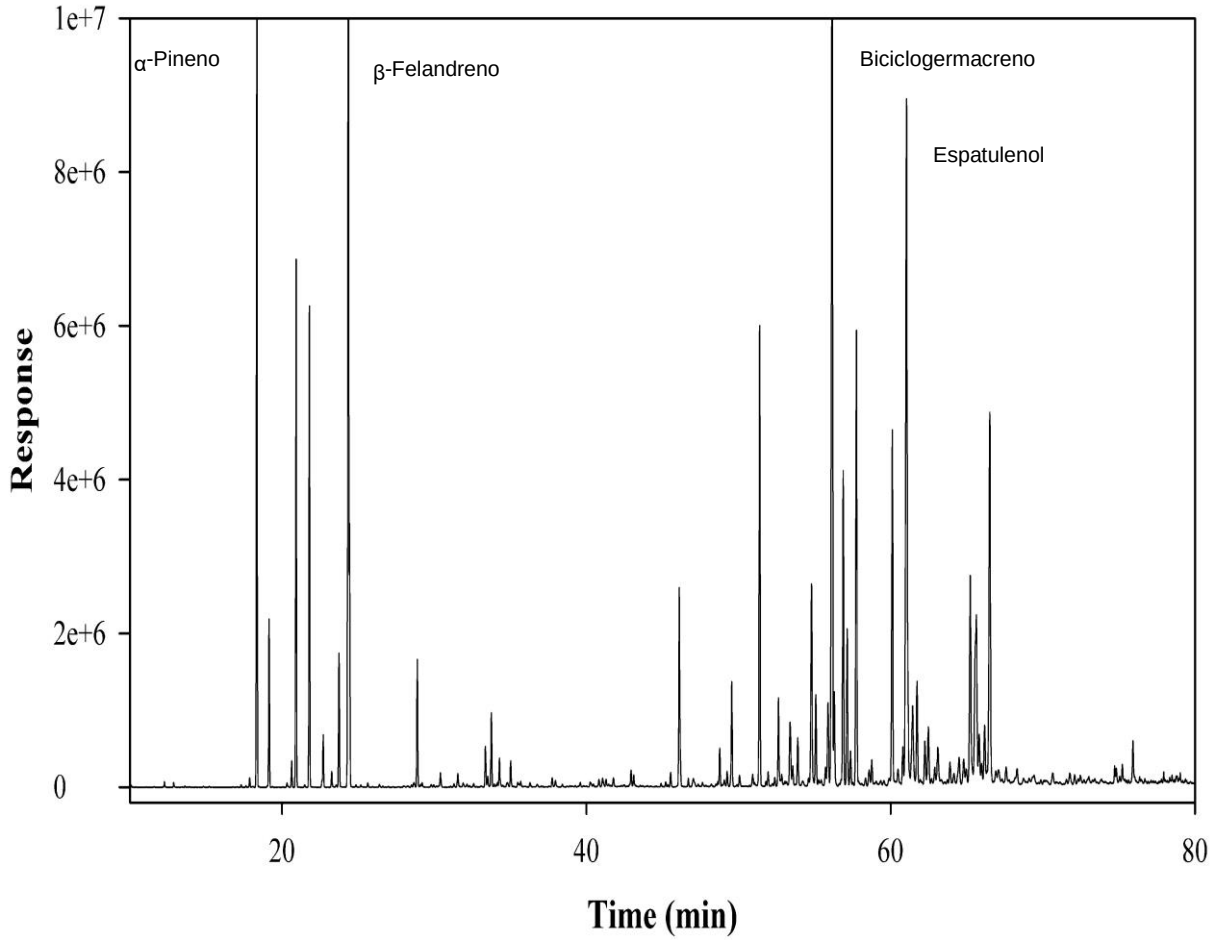
5.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO

5.2.1 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

Por CG/EM do óleo essencial foi determinado o índice de retenção (RI) dos compostos correspondentes à respectiva eluição em coluna apolar. Teoricamente, cada constituinte da amostra é referenciado pela conjunção dos índices dos respectivos picos no cromatograma (Figura 7).

A composição química do óleo essencial de *P. amalago* foi investigada e por meio da CG/EM obteve-se o cromatograma e os compostos identificados estão sumarizados na tabela 1.

Figura 7 – Cromatograma do óleo essencial de *Piper amalago.*



Fonte: A autora

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *P. amalago*

(continua)

N°	RT	RRI[b]	RI Lit[a]	Nome do Composto	%
1	18,351	930	932	**α-Pineno***	**6,174**
2	19,137	942	946	Canfeno*	1,147
3	20,908	969	974	β-Pineno*	3,767
4	21,780	982	988	β-Mirceno*	3,309
5	22,700	996	1002	α-Felandreno	0,409
6	23,737	1011	1020	p-Cimeno*	0,981
7	24,358	1020	1025	**β-Felandreno***	**8,124**
8	24,438	1021	1024	Limoneno*	1,584
9	28,877	1083	1095	Linalol	0,930
10	33,365	1146	1165	Borneol	0,330
11	33,755	1152	1183	Criptona	0,595
12	34,279	1159	1174	Terpinen-4-ol*	0,243
13	35,023	1170	1186	α-Terpineol*	0,211
14	46,175	1334		Não identificado	1,835
15	48,801	1374	1374	α-Copaeno	0,31
16	49,571	1386	1389	β-Elemeno*	0,879
17	51,486	1416	1419	β-Cariofileno*	3,974
18	52,636	1434	1439	Aromandendreno	0,752
19	53,444	1446	1452	α-Humuleno*	0,691
20	53,797	1452	1457	β-Santaleno	0,434
21	54,775	1467	1478	γ-Muuroleno	2,048
22	55,102	1472	1484	Germacreno D	0,78
23	55,872	1484	1496	Valenceno*	0,866
24	56,106	1487	1500	**Biciclogermacreno**	**11,003**
25	56,305	1490	1500	α-Muuroleno	0,853
26	56,867	1499	1505	β-Bisaboleno	2,9
27	57,134	1503	1513	γ-Cadineno	1,465
28	57,364	1506	1521	Calameneno	0,33
29	57,738	1511	1522	Cadina-1(10),4-diene	4,493

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *P. amalago*

(conclusão)

N°	RT	RRI[b]	RI Lit[a]	Nome do Composto	%
30	58,755	1526	1537	α-Cadineno	0,227
31	60,147	1545	1559	Germacreno B	3,473
32	60,798	1554	1567	Palustrol	0,352
33	60,99	1557	1577	Espatulenol*	9,214
34	61,44	1563	1582	Oxido de Cariofileno*	1,155
35	61,729	1568	1590	Globulol*	1,037
36	62,251	1575	1592	Viridiflorol*	0,419
37	62,435	1577	1595	Cubeban-11-ol	0,655
38	63,098	1587	1602	Ledol	0,47
39	63,916	1598	1599	Widdrol	0,215
40	64,547	1606	1630	Muurola-4,10(14)-dien-1β-ol	0,223
41	64,832	1610	1618	Di-epi-1,10-cubenol	0,29
42	65,606	1620	1640	τ-Muurolol	3,14
43	65,815	1623	1652	δ-Cadinol	0,569
44	65,981	1625	1645	Cubenol	0,204
45	66,173	1627	1649	β-Eudesmol	0,672
46	66,515	1632	1652	α-Cadinol	4,532
47	67,050	1639	1685	ent-Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1β-ol	0,21

Classes de compostos	%
Monoterpenoides hidrocarbonetos	17,021
Monoterpenoides oxigenados	10,638
Sesquiterpenoides hidrocarbonetos	36,170
Sesquiterpenoides oxigenados	34,042
Não identificado	2,127
Total	100,00

Legenda: RI Lit[a], índice de retenção da literatura (coluna DB-5) (Adams, 2017), RRI[b], índice de retenção relativo calculado, identificação com base nos tempos de retenção (tr) de compostos genuínos na coluna DB5MS; MS, identificado com base em correspondência de computador dos espectros de massa com os espectros da biblioteca NIST e comparação com os dados da literatura, * Compostos identificados utilizando-se padrões de referência. Os compostos em negrito são os compostos majoritários.

Quimicamente, os OEs são misturas complexas que podem conter de 20 a 60 compostos em diferentes concentrações e são comumente caracterizados por dois ou três componentes principais com concentrações mais altas em comparação com outros presentes em concentrações mais baixas. De uma maneira geral, os principais compostos que estão presentes nos OEs são responsáveis pelas atividades biológicas (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; GUIMARÃES *et al.,* 2012).

Monoterpenoides e sesquiterpenoides são frequentemente encontrados em óleos essenciais de espécies de *Piper* (SALEHI *et al*., 2019*;* dos SANTOS *et al.,* 2021). Entretanto, sesquiterpenoides são mais abundantes no gênero *Piper*, como em *P. arboreum* subsp *arboreum, P. dilatatum* e *P. hispidum* (POTZERNHEIM *et al.*, 2006), *P. aduncum, P. amalago, P. cernuum* e *P. regnelii* (MESQUITA *et al*., 2005). No presente estudo, o óleo essencial de *P. amalago* apresentou 100% dos compostos químicos identificados, sendo eles: 17,021% de monoterpernoides hidrocarbonetos, 10,683% de monoterpenoides oxigenados, 36,170% de sesquiterpenoides hidrocarbonetos e 34,042% sesquiterpenoides oxigenados.

Uma recente revisão bibliográfica apontou que a composição química dos óleos essenciais de espécies de *Piper* é muito variável e depende do órgão da planta do qual foi extraído. Mais de 270 compostos químicos presentes nos óleos essenciais de *Piper* foram identificados, aproximadamente 80 compostos, pertencentes às classes dos monoterpenoides e sesquiterpenoides, além dos aldeídos, álcoois, ácidos, cetonas, ésteres e fenóis (SALEHI *et al*., 2019).

O perfil químico do óleo essencial (OE) de folhas de *P. amalago* evidenciou como componentes majoritários o biciclogermacreno (11%), espatulenol (9,21%), βfelandreno (8,12%) e α-pineno (6,17%). Mesquita *et al*. (2005) analisaram o OE de folhas de *P. amalago* coletada em Minas Gerais e encontraram como compostos majoritários o óxido de cariofileno (18%), *E*-cariofileno (17,8%), biciclogermacreno (16,4%) e germacreno D (10,9%). Esses compostos também foram detectados no presente estudo, todavia com concentrações distintas. Entretanto, outros estudos utilizando folhas de *P. amalago* mostraram diferentes compostos. Metil geranato (7,8%), α-amorfeno (25,7%) e cubenol (6,2%) foram encontrados no óleo essencial de *P. amalago* em estudo de Mota *et al*. (2013).

Óleos essenciais também foram extraídos de outros órgãos de *P. amalago*, apresentando perfis diferentes. Silva *et al*. (2017) analisou o OE extraído de inflorescências de *P. amalago* coletada em Dourados, Mato Grosso do Sul, onde os

componentes principais encontrados foram, p-cimeno (9,3%), limoneno (10,5%), silfiperfol-6-eno (13,5%), alo-aromadendreno (18,5%) e α-muurolol (5,0%).

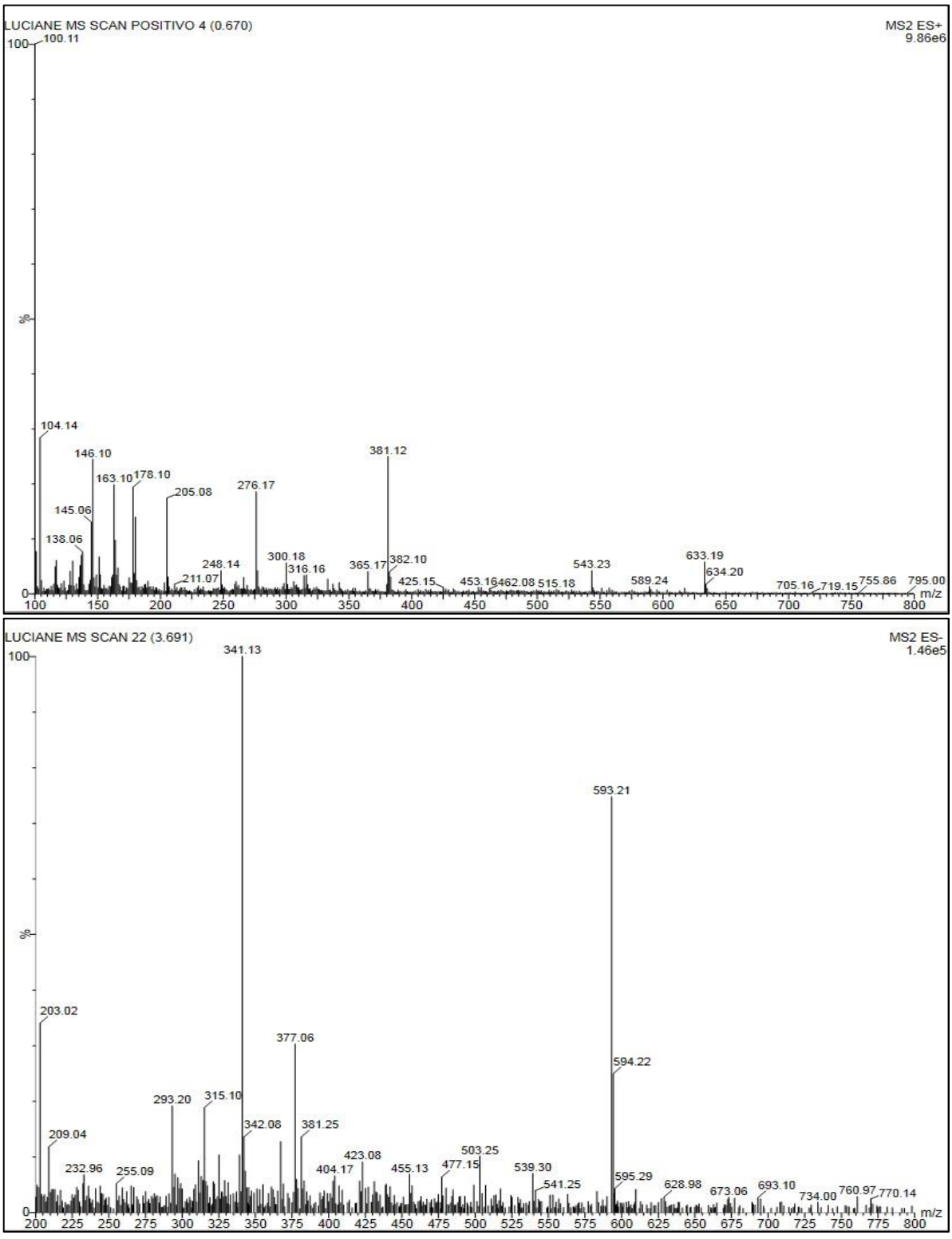
Devido a diversidade dos perfis químicos do OE de espécies de *Piper*, Thin *et al.* (2018) propôs uma divisão do gênero em 6 grupos, considerando as classes de compostos químicos dominantes, são elas: OEs dominados por compostos monoterpenoides, OEs dominados por compostos sesquiterpenoides, OEs dominados por ambos compostos monoterpenoides e sequiterpenoides, OEs dominados por compostos fenilpropanoides, OEs dominados por compostos benzenoides e OEs dominados por compostos não terpenoides (SALEHI *et al*. 2019). Nesse sentido, analisando a composição química do OE de *P. amalago,* pode-se classificar o OE dessa espécie no grupo dos OEs dominados por compostos sequiterpenoides.

Considerando as atividades biológicas, a composição química do OE é extremamente importante e deve ser avaliada (BARBOSA *et al.,* 2012). No presente estudo, o biciclogermacreno, o composto mais abundante no OE de *P. amalago*, apresentou ação larvicida sobre os vetores da malária, dengue e encefalite japonesa em trabalho de Govindarajan e Benelli (2016). Atividade fungicida também foi relatada para esse composto volátil (SILVA *et al*., 2017). Santos *et al.* (2012) avaliaram atividades biológicas do espatulenol e encontraram ação antibacteriana e citotóxica.

5.2.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-EM/EM)

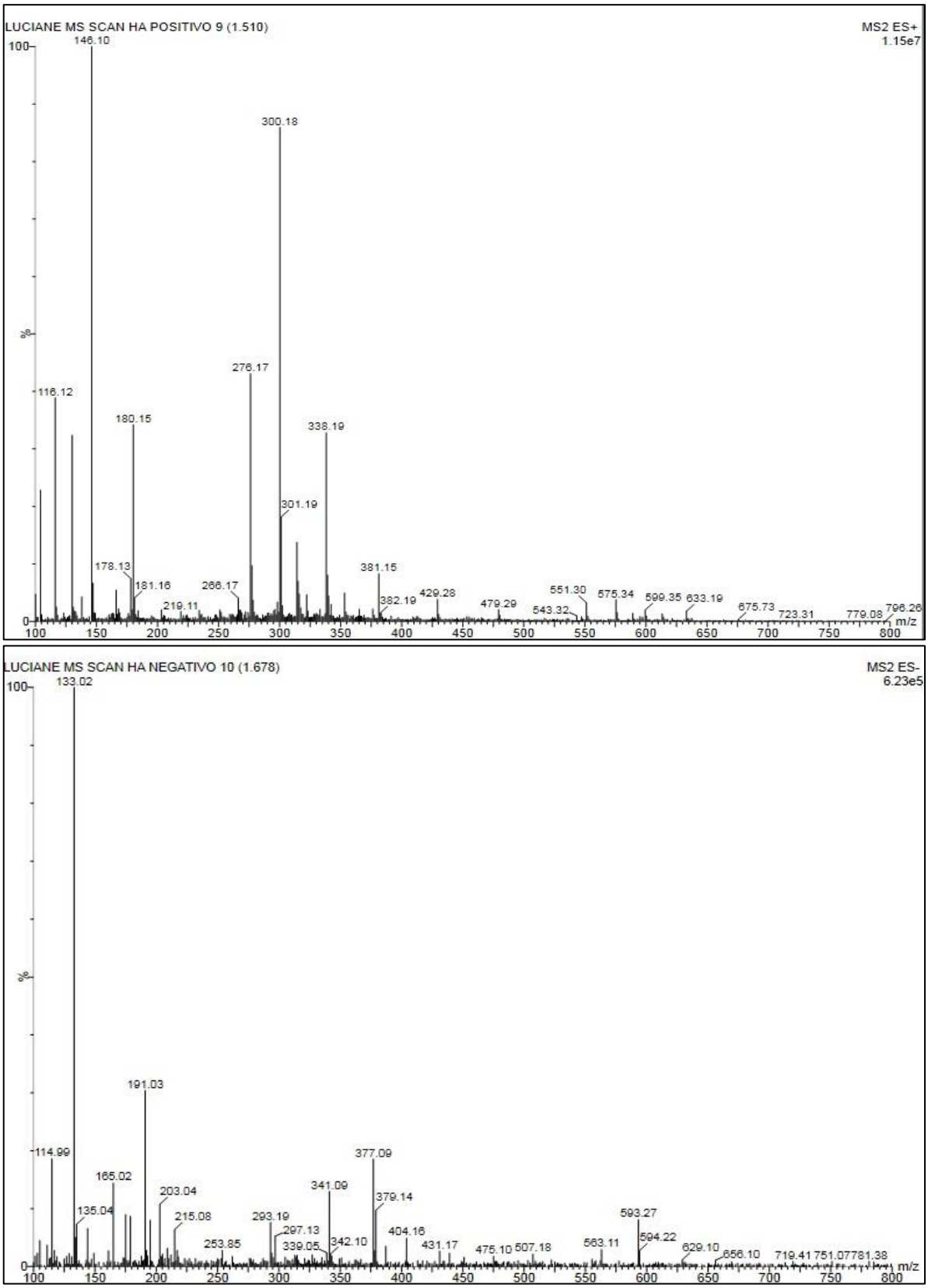
Por meio de CLAE-EM/EM operando no modo positivo e negativo, foi possível analisar o perfil do extrato aquoso e hidroalcoólico de *Piper amalago* e, dessa forma, sugerir alguns compostos relatados na literatura. Foi realizado o ms-scan para se obter as massas majoritárias dos extratos, também foi realizada a fragmentação dos íons presentes nos extratos analisados (Figura 8 e 9).

Figura 8 - Análise do extrato aquoso de *Piper amalago* CLAE-EM/EM em modos de ionização positiva e negativa.



Fonte: A autora

Figura 9 - Análise do extrato hidroalcoólico de *Piper amalago* CLAE-EM/EM em modos de ionização positiva e negativa.



Fonte: A autora

Tabela 2 - Composição química do EAPA e EHPA obtidos por CLAE-EM/EM

Picos	Modo positivo (m/z) MS $[M+H]^+$	Modo negativo (m/z) MS $[MS-H]^-$	MS^2	Nome do Composto
1	146,10[ab]		100, 82	Ácido cinâmico
2	178,10[a], 180,15[b]		163, 145, 117	Ácido cafeico
3		190,96[a], 191,03[b]	129, 111, 87	Ácido quínico
4	276,17[ab]		205, 98	2-metoxi-4,5metilenodioxi-transcinamoilisobutilamida
5	300,18[ab]		187, 135, 72	N-[7- (3,4-metilenodioxifenil) 2Z,4Z-heptadienoico] pirrolidina
6	338,19[b]	341,09[ab]	179, 119, 88	Di-O-hexosídeo
7	381,12[a], 381,15[b]		261, 219, 39	Guinensina
8	429,28[b]	431,17[b]	179, 119, 88	Vitexina
9	589,24[a]	593,21[a], 593,27[b]	431, 383, 311	Apigenina-6,8-di-Cglucosídeo

Fonte: a autora
Legenda: [a]Espectro registrado no EAPA, [b]espectro registrado no EHPA.

A análise dos espectros de massas revelou que os íons com maior intensidade para o extrato aquoso e hidroalcoólico em modo positivo foram m/z 381, 300, 276, 180 e 146, e no modo negativo foram m/z 593, 377, 341 e 190. Na Tabela 2 é possível observar os íons correspondentes às amostras inseridas em espectrômetro de massas, bem como os padrões de fragmentações e a sugestão de possíveis compostos.

No presente trabalho, os compostos químicos sugeridos em modo positivo foram o íon m/z 146 que se refere ao ácido cinâmico, o íon m/z 178,10 no EAPA e m/z 180,15 no EHPA que se relaciona ao ácido cafeíco, o íon m/z 276 que corresponde ao composto 2-metóxi-4,5-metilenodioxi-trans-cinamoilisobutilamida, o íon m/z 338,19 que se refere ao composto Di-O-hexosídeo, o íon m/z 300 que se relaciona ao composto pirrolidida de ácido 7- (3,4-metilenodioxifenil) -2E,4E-heptadienoico, o íon m/z 381 que corresponde ao composto guinensina, o íon m/z 429,28 que indica o composto vitexina e o íon m/z 589,24 que se relaciona ao composto apigenina-6,8-di-C-glucosídeo.

O espectro de massas em modo negativo apresentou os compostos químicos: ácido quínico com íon m/z 190,96 no EAPA e m/z 191,03 no EHPA, Di-O-hexosídeo com íon m/z 341,09, a vitexina com o íon m/z 431,17 e o íon m/z 593,21 e 593,27 no EHPA correspondendo ao composto apigenina-6,8-di-C-glucosídeo.

Estudos químicos de espécies de *Piper* levaram à identificação de uma variedade de novos compostos químicos pertencentes a diferentes classes, incluindo alcaloides, amidas, cromenos, derivados de ácidos benzóicos, lignanos, neolignanos, propenil fenóis, terpenos, esteroides, chalconas, diidrocalconas, flavonas, flavanonas, kavalactonas, piperolídeos, ceramidas, ácidos graxos e flavonoides (TAKEARA *et al*., 2017).

Em *P. amalago* já foram descritas e isoladas amidas de vários ácidos alifáticos e aromáticos, com predominância de pirrolididas e isobutilamidas (JACOBS *et al.,* 1999). Novaes *et al*. (2014), analisando quimicamente o extrato etanólico de folhas de *P. amalago,* também encontrou amidas pirrolididas abundantes, além de chalconas e um flavonol.

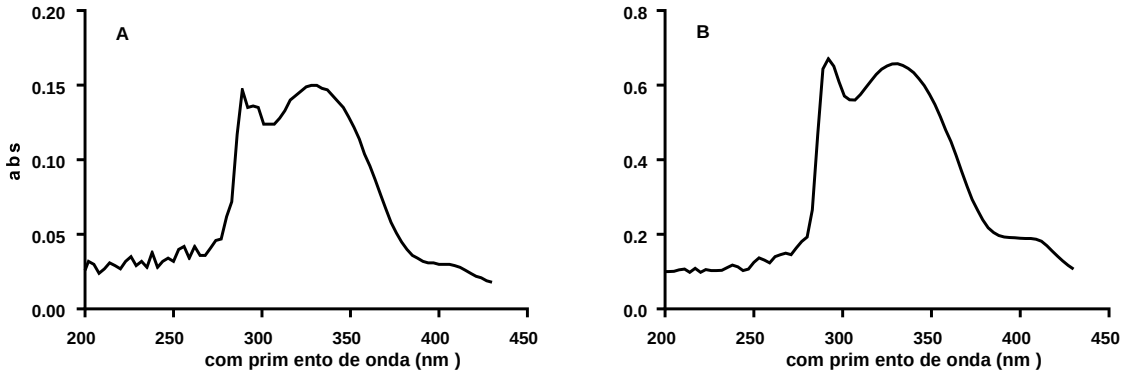
Em estudo dos constituintes químicos de espécies de *Piper*, Chandra *et al*. (2015) apontaram 13 compostos ativos de frutas e folhas de 10 espécies, por meio de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), onde foram apresentados os compostos piperina m/z 286 $[M+H]^+$, piperlonguminina m/z 274 $[M+H]^+$, que produziram o mesmo íon fragmento principal m/z 201,1, devido ao grupo amida em suas estruturas; similarmente o composto piperlogumina m/z 318 $[M+H]^+$ produziu íon de fragmento principal em m/z 221,1; o ácido protocatecuico com m/z 153 $[M-H]^-$ e o ácido cafeico m/z 179 $[M-H]^-$ produziram o íon do fragmento principal em m/z 109 e m/z 135, respectivamente, devido à perda de um grupo ácido carboxílico, ácido vanílico m/z 167 $[M-H]^-$ produziu fragmento em m/z 108 devido à perda de radicais metil, seguida pela perda do grupo de ácido carboxílico, ácido ferúlico com m/z 193 $[M-H]^-$, entre outros.

5.2.3 Análise por Espectroscopia na Região do UV-VIS

A espectroscopia na região do UV-VIS foi realizada para auxiliar a detectar e avaliar a presença de grupos funcionais característicos presentes no extrato aquoso e hidroalcoólico. A faixa de $\lambda_{máx}$ 200 a 700 nm correspondem à maioria das transições eletrônicas aplicadas a métodos espectroscópicos na região UV-VIS, essa faixa é a mais interessante experimentalmente, pois, substâncias orgânicas que apresentam cromóforos para essa transição são aromáticas, alcenos, alcinos, carbonila, amidas, azocompostos e nitrocompostos (PAVIA *et al*., 2010).

Na análise do extrato aquoso e hidroalcoólico de *P. amalago* foram observadas bandas de absorção relevantes, bandas de $\lambda_{máx}$ 250 a 350 nm. Com base nos dados químicos, tal absorbância pode ser relacionada com amidas e flavonoides característicos de *P. amalago* (Carrara *et a*l. 2012, 2013; Iwamoto *et al*. 2014; Arrigo *et al*. 2016).

Figura 10 - Espectro de UV-VIS (200 a 450 nm) do extrato aquoso (A) e hidroalcoólico (B) de *Piper amalago*.



Fonte: A autora

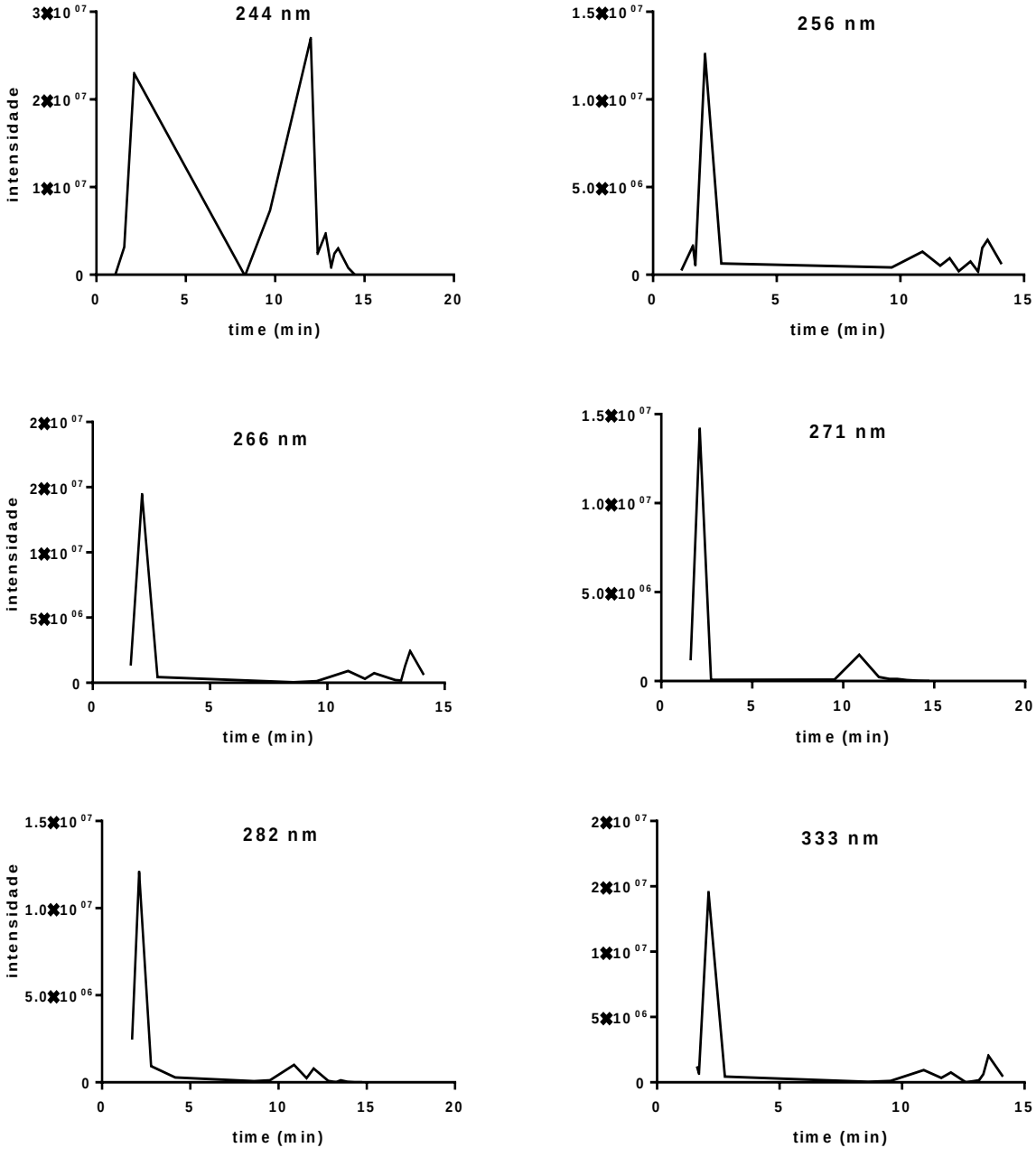
Pode-se perceber no espectro de UV-VIS que as duas formas de extrações possuem as mesmas substâncias com concentrações diferentes devido ao valor das absorbâncias nos espectros dos extratos.

5.2.4 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (UHPLC)

Esta análise foi realizada a fim de confirmar a classe de compostos através dos picos majoritários encontrados nos extratos de *P. amalago* por meio da UHPLC.

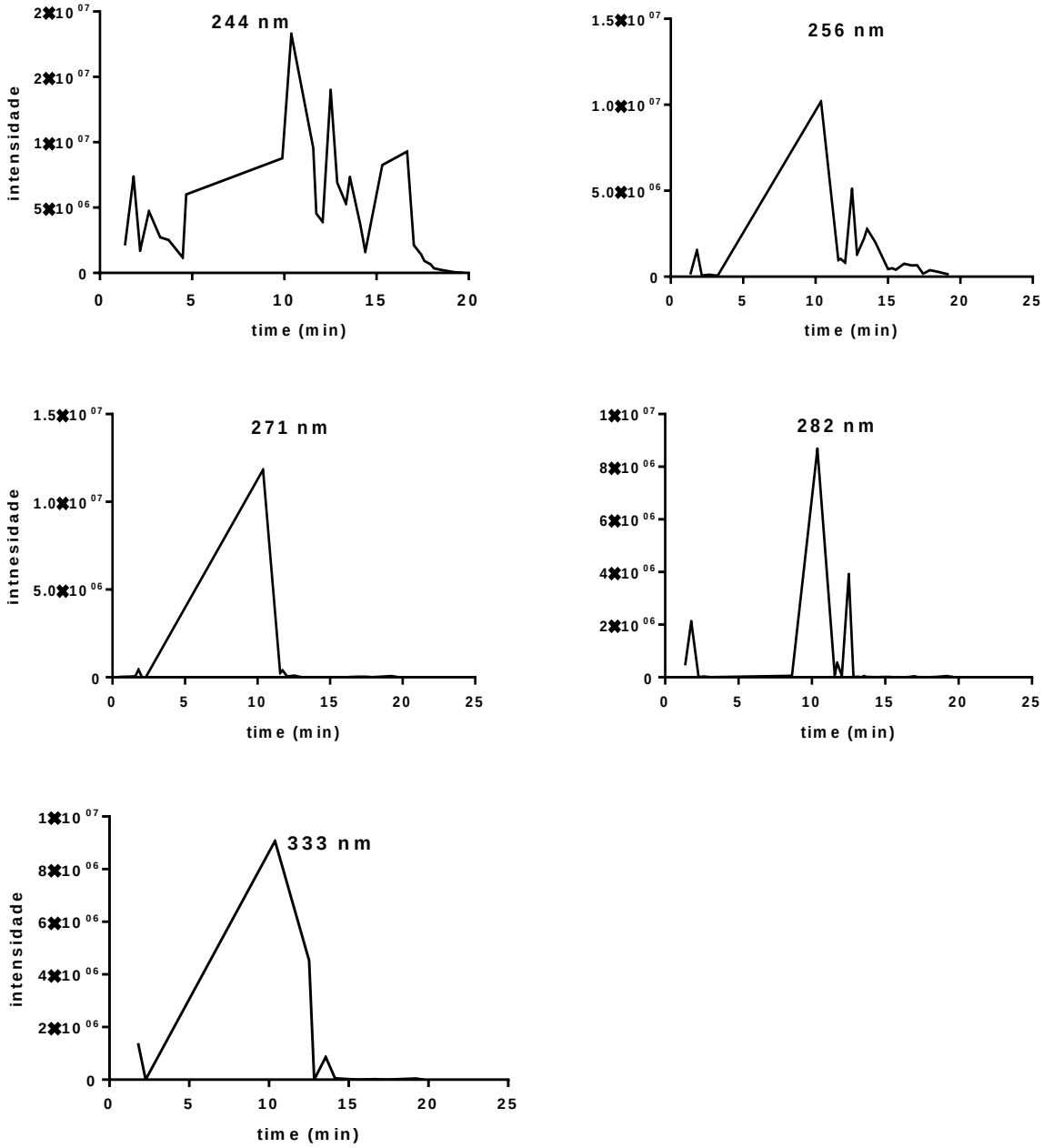
Como pôde-se observar seis bandas de absorção foram relevantes no extrato aquoso e hidralcoólico (figura 11 e 12) banda I ($\lambda_{máx}$244nm), II ($\lambda_{máx}$256nm), III ($\lambda_{máx}$266nm) IV (λmáx271nm), V ($\lambda_{máx}$282nm) e VI ($\lambda_{máx}$333nm).

Figura 11 - Análise do extrato aquoso de *Piper amalago* por UHPLC



Fonte: A autora

Figura 12 - Análise do extrato hidroalcoólico de *Piper amalago* por UHPLC



Fonte: A autora

Em estudo de Carrara *et al*. (2012, 2013 e 2017) e de Arrigo *et al*. (2016) foram evidenciadas a presença de flavonol e amidas.

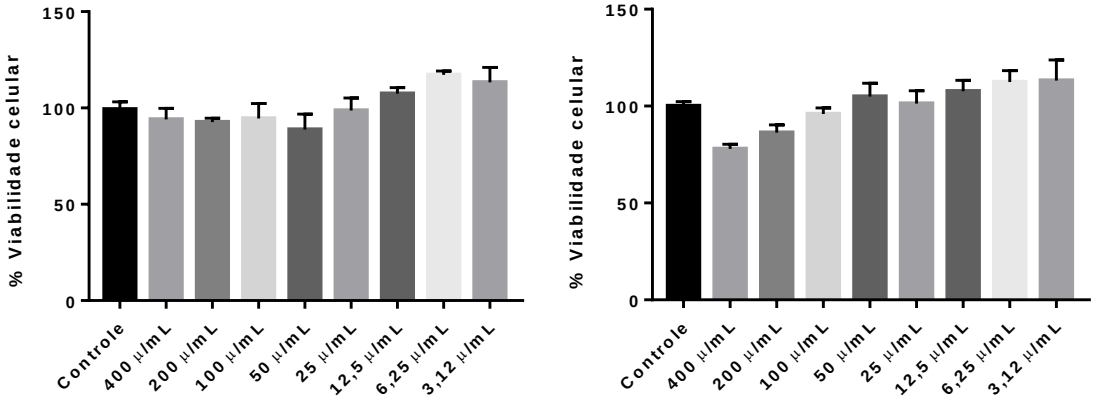
5.3 ESTUDO *IN VITRO*

O extrato aquoso, hidroalcoólico e o óleo essencial de *Piper amalago* foram avaliados quanto à citotoxicidade na linhagem celular de melanoma murino B16F10 e fibroblasto 3T3. Até o momento, não foram relatadas na literatura atividades de *P. amalago* frente a linhagens de células de melanoma e câncer de mama, ou ainda possíveis mecanismos relacionados a essas atividades.

Células de fibroblasto murino (3T3) foram utilizadas como controle para comparação da citotoxicidade em linhagem não tumoral. O método de MTT foi utilizado para a avaliação de citotoxicidade e tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem o MTT formando cristais insolúveis de formação de coloração violeta.

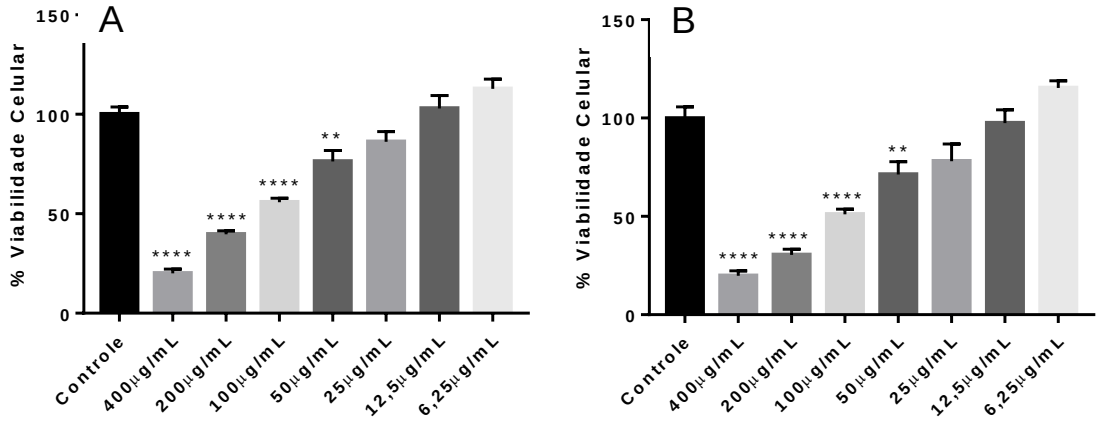
O extrato aquoso, mesmo nas maiores concentrações, não foi capaz de reduzir a viabilidade celular em nenhuma das linhagens testadas (Figura 13). Entretanto, o extrato hidroalcoólico e o óleo essencial foram citotóxicos frente as linhagens celulares testadas em diferentes concentrações, 72 h após o tratamento e em relação ao controle (Figuras 14 e 15).

Figura 13 - Viabilidade célular após 72 horas de exposição a diferentes concentrações do extrato aquoso de *Piper amalago* pelo método do MTT.



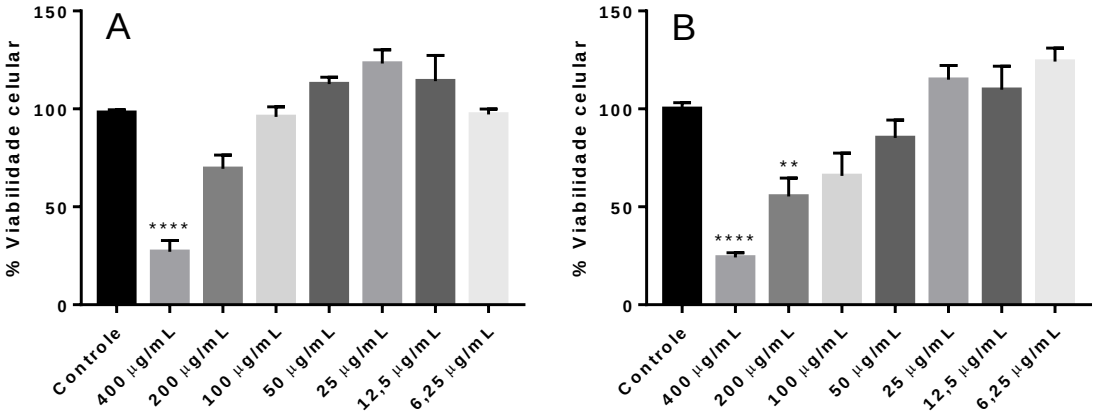
Fonte: A autora
Legenda: A= 3T3, B= B16-F10. Cada barra representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey.

Figura 14 - Viabilidade celular após 72 horas de exposição a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Piper amalago* pelo método do MTT.



Fonte: A autora
Legenda: A= 3T3, B= B16-F10. Cada barra representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. ** p < 0,01, **** p < 0,0001 em relação ao controle (células incubadas apenas com o meio de cultivo celular).

Figura 15 - Viabilidade celular após 72 horas de exposição a diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper amalago* pelo método do MTT.



Fonte: A autora
Legenda: A= 3T3, B= B16-F10. Cada barra representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. ** p < 0,01, **** p < 0,0001 em relação ao controle (células incubadas apenas com o meio de cultivo celular).

A partir dos dados de % de viabilidade celular obtidos, foram calculados os valores de IC_{50} para o óleo essencial e para o extrato hidroalcoólico. Com os dados de IC_{50}, obteve-se também o valor do índice de seletividade (IS) pela razão do IC_{50} de

cada extrato entre as linhagens não-tumoral (3T3) e a tumoral (B16F10), conforme descrito anteriormente. Os valores de IC_{50} e IS estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de IC_{50} para diferentes linhagens celulares incubadas com o extrato hidroalcoólico e com o OE de *Piper amalago* e o índice de seletividade (IS) para a linhagem tumoral (B16F10) em relação à linha não tumoral (3T3)

Amostras	**Linhagem celular**	**IC_{50} µg/mL**	**IS**
Óleo essencial (OE)	3T3	296,82 ± 113,73	1,34
	B16F10	221,08 ± 141,10	
Extrato hidroalcoólico	3T3	129,49 ± 13,88	1,23
	B16F10	104,31 ± 28,67	

Fonte: A autora

Considerando os resultados apresentados na Tabela 3, é possível notar que tanto o extrato hidroalcoólico como o óleo essencial, foram citotóxicos para a linhagem tumoral de melanoma murino (CI_{50} de 104,31 ± 28,67 e 221,08 ± 141,10 µg/mL, respectivamente). Os critérios de atividade citotóxica para que um extrato bruto seja considerado interessante à continuação dos estudos, conforme estabelecido pelo Instituto Nacional do Câncer (INC), é de um CI_{50} inferior a 30 µg/mL (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Nesse sentido, nenhum dos extratos utilizados no presente trabalho atingiu esse parâmetro para as linhagens e tempos testados. Entretanto, esses limites são convenções arbitrárias e extratos brutos podem conter componentes que mesmo em pequenas concentrações podem apresentar atividades biológicas interessantes.

O IC_{50} para as células não tumorais (3T3) foi maior que para as células tumorais (B16F10), demonstrando seletividade dos compostos para essa linhagem. Isso pode ser observado pelos valores de IS superiores a 1 (Tabela 3). O IS pode ser definido, segundo Lopes *et al.* (2014), como o número de vezes em que uma substância é mais tóxica para uma linhagem celular do que para outra. Assim, quanto maior o IS, mais efetiva é a citotoxicidade do extrato para uma determinada linhagem em relação à outra. No presente trabalho comparou-se o IC_{50} de uma linhagem não tumoral (3T3) com o IC_{50} da linhagem de melanoma (B16-F10). Ayesh, Abed e Faris (2014) e Suffness e Pezzuto (1990) sugeriram que para um composto ser considerado de baixa toxicidade e com boas chances de ser uma nova droga anticâncer, deve apresentar um IS superior a 2. Para Fernandes (2015), o valor do IS para um composto ser considerado seguro deve ser superior a 1, contudo, para ser considerado um bom composto antitumoral, esse índice deve ser superior a 2. No presente trabalho,

considerou-se um valor de IS maior ou igual a 2,0, ou seja, quando o composto for pelo menos duas vezes mais ativo na linhagem de células tumorais do que em células não tumorais, portanto IS ≥ 2,0. No presente estudo, nenhum dos compostos testados atingiu esse índice.

Em estudos com o extrato etanólico de *P. amalago,* Conter *et al.* (2015) mostraram efeitos citotóxicos (IC_{50} 53,6 ± 5,6) em linhagens celulares provenientes de adenocarcinoma de células não pequenas de pulmão (NCI-H460) e carcinoma de cólon retal (HT29) derivadas de humanos, na fração hexano (HT IC_{50} de 2,60 $\pm$ 0,88 e NCI-H460 IC_{50} 2,22 $\pm$ 0,66) e na fração clorofórmio (HT IC_{50} 0,62 $\pm$ 0,07 e NCI-H460, IC_{50} 0,66 $\pm$ 0,06).

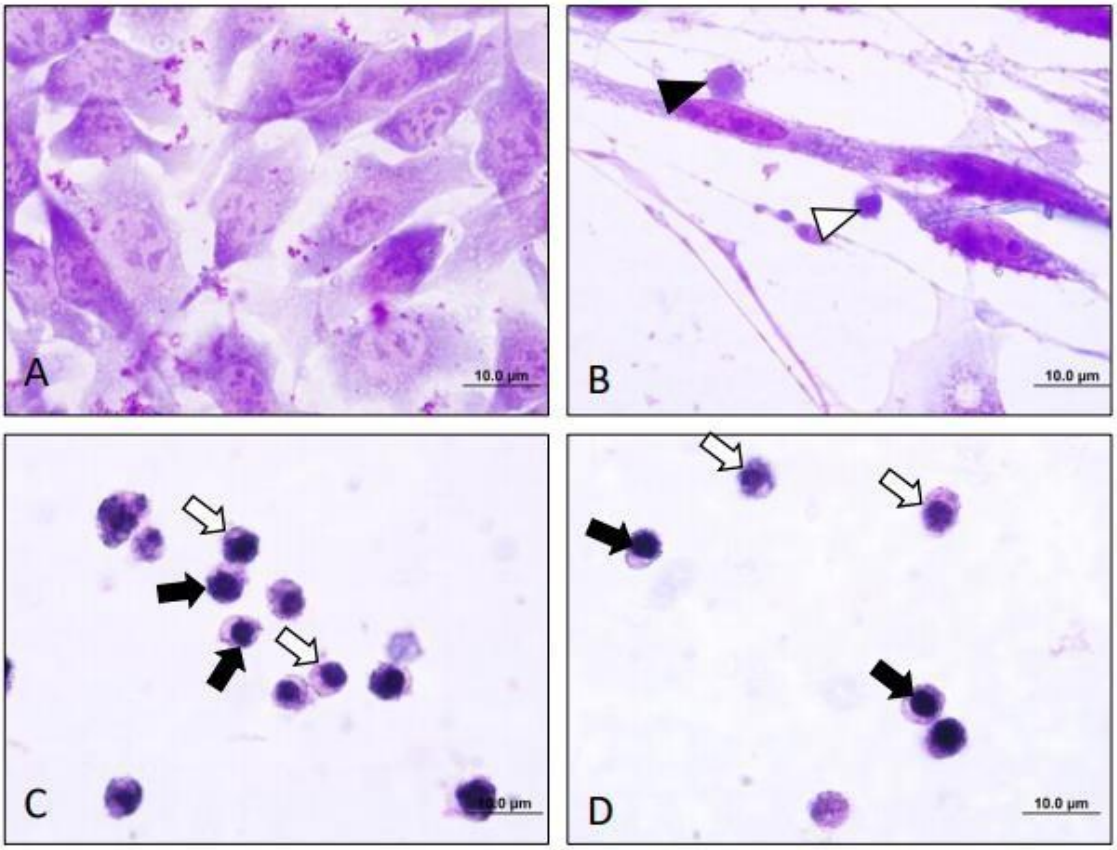
5.3.1 Análise Morfológica

Considerando os resultados anteriores é possível perceber que o óleo essencial foi citotóxico para a linhagem de melanoma murino, B16F10. Os efeitos adversos resultantes da interferência nos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e função celular é denominado citotoxicidade. Esses efeitos podem envolver diferentes fatores que mantêm a integridade celular, como alterações na permeabilidade da membrana e do citoesqueleto, metabolismo celular, síntese ou degradação de produtos celulares ou liberação de constituintes celulares ou produtos, regulação de íons e na divisão celular, o que podem desencadear um processo de morte. Estão dentre os processos de morte celular: necrose, apoptose, autofagia, citostase, cornificação e muitos outros (KROEMER *et al*, 2009; GALLUZZI; VITALE, 2018).

Com o objetivo de evidenciar qual o processo de morte celular poderia estar envolvido na citotoxicidade induzida pelo óleo essencial, foi realizado um ensaio de análise morfológica (figura 16). É possível verificar que, nas concentrações testadas nos experimentos, o óleo essencial induziu alterações morfológicas características de um processo de morte celular por apoptose, como formação de “*blebs*” ou “*budding*”, condensação de cromatina, arredondamento celular e formação de corpos apoptóticos (CRUCHTEN; BROECK, 2002; MEER *et al*, 2010). É importante considerar que a análise morfológica por microscopia ótica, por si só, não é suficiente para determinar um processo de morte celular específico. É necessário complementar essa análise com ensaios bioquímicos ou com microscopia eletrônica, por exemplo. A combinação

de eventos bioquímicos e morfológicos são necessários para a confirmação de um determinado processo de morte celular (ZHIVOTSKY, 2004). Entretanto, a análise morfológica, por microscopia ótica, é um método barato, simples e eficiente para a triagem e direcionamento da execução de outras técnicas mais sofisticadas.

Figura 16 - Alterações morfológicas encontradas nas células B16F10 após incubação com diferentes concentrações do óleo de *P. amalago* por 72 horas.



Fonte: A autora
Legenda: A – controle: células incubadas apenas com o meio RPMI suplementado. B, C e D: células tratadas com 250, 300 e 350 µg/mL do óleo essencial de *P. amalago*. Em B é possível perceber alteração na morfologia das células que se tornaram mais fusiformes, já em C e D uma grande redução no tamanho celular, além de condensação de cromatina (seta negra), arredondamento celular (seta branca), blebs (ponta de seta negra) e possível corpo apoptótico (ponta de seta branca). Aumento de 1000x, coloração de May GrünwaldGiemsa.

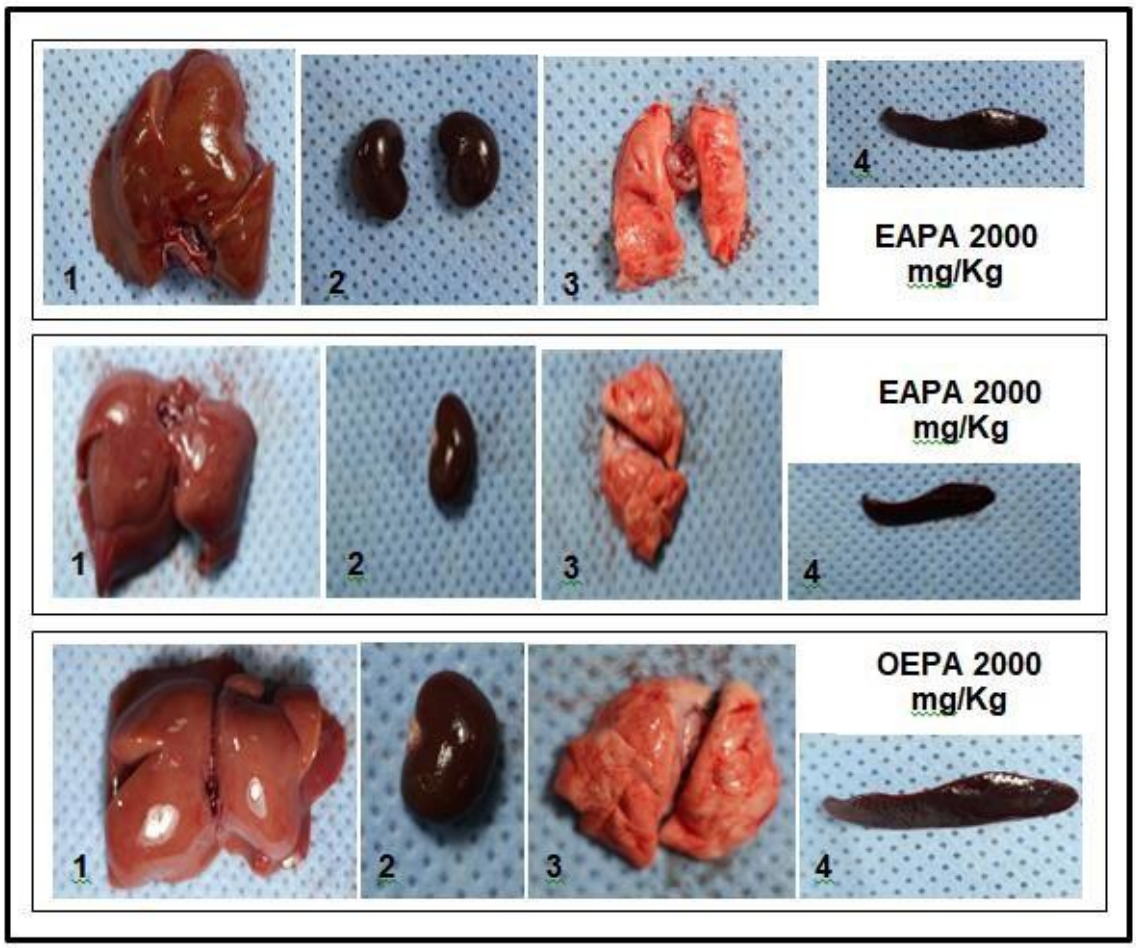
5.4 ESTUDOS *IN VIVO*

5.4.1 Avaliação da Toxicidade Aguda

Não foram observadas quaisquer alterações significativas na aparência ou no padrão de comportamento geral dos animais durante os 14 dias de observação. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao ganho de peso corporal, consumo de ração e água dos animais tratados com EAPA, EHPA ou OEPA. Em relação ao peso relativo (%) dos órgãos, nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos tratados com ambas as doses de EAPA, EHPA ou OEPA. O exame macroscópico não revelou sinais de toxicidade aguda (Figura 17). Nenhuma alteração morfológica sugestiva de inflamação, hemorragia, acúmulo de líquido ou outras alterações foram observadas nas amostras de órgãos submetidas à investigação histopatológica (Figura18). O fígado, rins, pulmões e baço foram escolhidos para análise histopatológica por serem órgãos alvo que permitem avaliar potencial efeito tóxico.

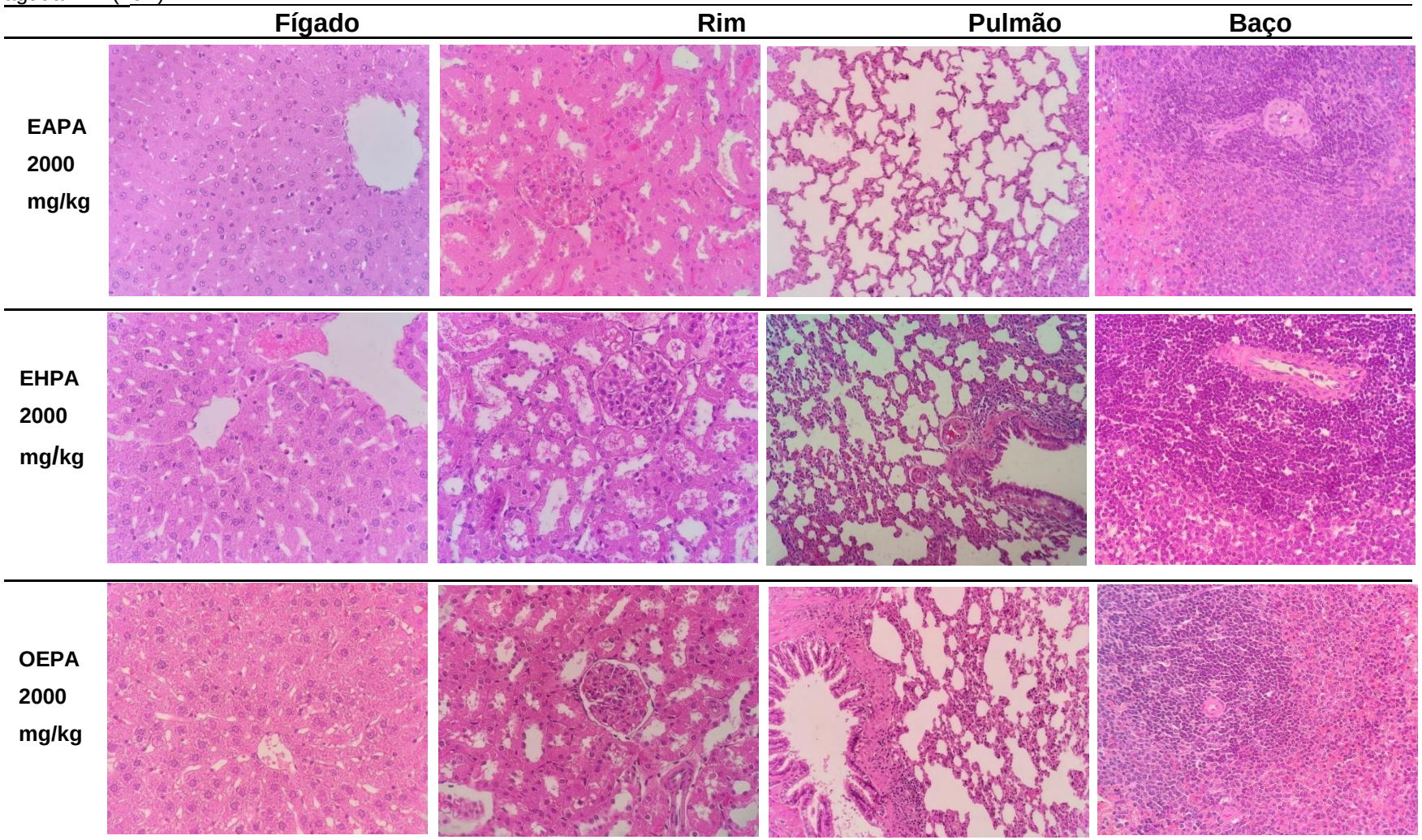
Estudos de toxicidade aguda são conduzidos para determinar os efeitos adversos de curto prazo de um medicamento (ANVISA, 2013). Desta forma, o EAPA, EHPA e OEPA podem ser consideradas seguros após a administração aguda neste modelo animal, pois suas doses letais medianas (DL_{50}) foram superiores a 2000 mg/kg. Esses dados corroboram com o estudo realizado por Lopes *et al*. (2012), em que extrato de *P. amalago* se mostrou seguro após administração aguda, com uma DL_{50} estimada em 2545 mg/kg. Além disso, em estudo realizado por Santos et al. (2018) não foram observados sinais de toxicidade aguda com o óleo essencial de *P. amalago* na dose de 2000 mg/kg.

Figura 17 - Vista macroscópica dos órgãos dos animais tratados com o EAPA, EHPA e OEPA (2000 mg/kg)



Fonte: A autora
Legenda: 1. Fígado; 2. Rim; 3. Pulmão e 4. Baço

Figura 18 - Avaliação histopatológica dos órgãos de ratos tratados com uma dose única oral (2000 mg/kg) do EAPA, EHPA e OEPA no teste de toxicidade aguda. HE (40X)



5.4.2 Avaliação da Atividade Diurética Aguda e Prolongada

5.4.2.1 Atividade diurética aguda

Os resultados referentes aos possíveis efeitos diuréticos de EAPA, EHPA e OEPA estão apresentados na Tabela 4. A menor dose (30 mg/kg) de EAPA e EHPA foi capaz de promover um aumento significativo do volume urinário, 8 h e 24 h após a administração oral, quando comparado com o controle. A maior dose (300 mg/kg) de EAPA e EHPA promoveu um aumento significativo no volume urinário 8 h após a administração oral quando comparados com o controle. Curiosamente, a menor dose (30 mg/kg) de OEPA promoveu um aumento significativo no volume urinário apenas 12 h após a administração, e retornou a valores semelhantes ao controle 24 h após o tratamento (Tabela 4). Como esperado, a HCTZ promoveu um aumento significativo do volume urinário 2 e 8 h após a administração, e retornou a valores similares ao controle 24 h após o tratamento.

Em relação ao pH urinário (Tabela 5), ambas as doses (30 e 300 mg/kg) de EAPA e EHPA promoveram uma redução significativa deste parâmetro principalmente 12 h e 24 h após a administração oral, quando comparados com o controle. Já o grupo tratado com a menor dose (30 mg/kg) de OEPA apresentou uma redução significativa do pH, 1 h e 12 h após a administração oral, ao passo que a maior dose (300 mg/kg) promoveu uma diminuição significativa deste parâmetro 24 h após o tratamento, quando comparado com o controle. Embora significativa, a redução do pH promovida pelas substâncias em estudo não foi capaz de promover significativa acidez urinária uma vez que os valores permaneceram entre 7-8.

Em relação à densidade urinária (Tabela 6), pode-se observar uma diminuição significativa nos valores obtidos em amostras de animais tratados com ambas as doses (30 e 300 mg/kg) de EAPA 12 e 24 h após o tratamento. EHPA promoveu resultados mais expressivos, uma vez que a menor dose (30 mg/kg) promoveu uma diminuição significativa da densidade 2, 4, 8, 12 e 24 h após o tratamento; e a maior dose (300 mg/kg) 8, 12 e 24 h após a administração quando comparados com o controle. Já em amostras de urina de animais tratados com OEPA, é possível observar um aumento significativo da densidade urinária 1 h (30 e 300 mg/kg) e 2 h (300 mg/kg) após o tratamento oral quando comparados com o controle. A HCTZ, como esperado,

também promoveu uma diminuição significativa na densidade urinária 12 e 24 h após a administração oral, quando comparado com o controle.

O perfil de excreção urinária de eletrólitos, ureia e creatinina após uma única administração oral de EAPA, EHPA e OEPA estão apresentados na Tabela 7. EAPA na dose de 30 mg/kg foi capaz de diminuir a excreção renal de ureia (4, 8 e 12 h após o tratamento), magnésio (4 h após o tratamento), creatinina (8 h após o tratamento), e potássio (12 h após o tratamento); ao passo que sua maior dose (300 mg/kg) diminuiu significativamente a excreção de ureia (4 e 12 h após o tratamento), potássio (12 h após o tratamento), e induziu um aumento significativo na eliminação renal de cálcio 12 e 24 h após a sua administração oral quando comparado com o controle.

A menor dose (30 mg/kg) de EHPA reduziu significativamente a excreção de ureia nos tempos de 2, 4, 8 e 12 h após a administração oral, bem como a eliminação renal de creatinina após 2 e 8 h. A eliminação renal de cálcio e magnésio também foi reduzida nos tempos de 2 e 4 h, bem como a de sódio (2 h após a administração), potássio (2, 8 e 12 h após a administração) e cloreto (2 h após a administração) quando comparado com o controle. O tratamento com a maior dose (300 mg/kg) de EHPA também foi capaz de induzir um decréscimo na eliminação de sódio e cloreto (2 h após a administração), ureia (4, 8 e 12 h após a administração), cálcio (4 h após a administração), magnésio (4 h após a administração), creatinina (8 h após a administração) e potássio (8 e 12 h após a administração) quando comparado com o controle.

Em relação ao grupo tratado com OEPA, pode-se observar que a menor dose (30 mg/kg) promoveu uma diminuição significativa na eliminação renal de cálcio 4 h após a administração oral, e um aumento significativo da excreção de ureia (1, 2 e 24 h), creatinina (1, 12 e 24 h após o tratamento), magnésio (1, 8 e 12 h após o tratamento), sódio (1 e 24 h após o tratamento), potássio (1 h após o tratamento) e cloreto (24 h após o tratamento) quando comparado com o controle. Já o grupo tratado com a maior dose (300 mg/kg) de OEPA apresentou uma diminuição significativa na excreção de cálcio (4 h após a administração), e um aumento significativo na excreção de ureia (1 e 2 h após o tratamento), creatinina (1 h após o tratamento), magnésio (1, 2 e 4 h após a administração), e potássio (1 h após o tratamento oral) quando comparado com o controle. A HCTZ, como esperado, promoveu uma redução significativa na excreção de ureia, cálcio (após 1, 8 e 12 h da administração oral), bem

como de creatinina (após 8 e 12 h da administração oral) quando comparado com o controle.

Neste estudo, pode-se observar que efeito diurético agudo do extrato aquoso (EAPA) e hidroalcoólico (EHPA) de *P. amalago* não é dose-dependente uma vez que a menor dose (30 mg/kg) de ambos foi capaz de significativamente aumentar a o volume urinário em 8 h e 24 h após administração oral, ao passo que a maior dose (300 mg/kg) promoveu apenas um aumento significativo do volume urinário 8 h após a administração.

A atividade diurética que a menor dose do extrato (30 mg/kg) apresentou pode estar associada ao fitocomplexo, que pode atuar no sítio de ação, principalmente por competição ou similaridade estrutural dos compostos. O fitocomplexo corresponde ao conjunto de todos os componentes, originados do metabolismo primário ou secundário, responsáveis, em conjunto, pelos efeitos biológicos de uma espécie vegetal medicinal ou de seus derivados (BRASIL, 2014).

A excreção renal de sódio é controlada pela alteração da filtração glomerular e/ou da reabsorção tubular de sódio. Sabe-se que a maioria dos diuréticos usados clinicamente atuam preferencialmente na diminuição na taxa de reabsorção tubular de sódio, causando natriurese e como consequência diurese (aumento do fluxo urinário). Isto é, na maioria dos casos ocorre secundariamente à inibição da reabsorção tubular do sódio, o qual fica remanescente nos túbulos e age osmoticamente diminuindo a reabsorção hídrica (CAMPOS *et al*., 2005).

Normalmente, 70-75% do volume de líquido e de íons filtrados são reabsorvidos no túbulo contorcido proximal, praticamente sem qualquer modificação na concentração de sódio nem na pressão osmótica do restante do líquido tubular. No restante do túbulo renal, as concentrações eletrolíticas e a pressão osmótica do filtrado variam muito em virtude da absorção diferencial dos sais e água e dos efeitos do hormônio antidiurético (ADH), dos mineralocorticoides e do sistema de contracorrente na medula (RANG; DALE; RITTER, 1997).

Quanto à reabsorção tubular de ureia, esta, será mais ou menos intensa de acordo com estado volêmico do paciente, estando aumentada quando houver depleção do volume extracelular (por ex., na insuficiência cardíaca congestiva e desidratação) e diminuída na vigência de expansão de volume (p. ex., infusão salina ou síndrome de secreção inapropriada do hormônio antidiurético). Adicionalmente, a

dosagem da creatinina sérica ou plasmática como método clínico de avaliação da TFG apresenta boa correlação com a determinação da TFG pela inulina, sendo que a excreção da creatinina é relativamente constante durante o dia (ABENSUR, 2011).

De fato, a densidade urinária fornece informações preliminares sobre a capacidade renal de reabsorver seletivamente substâncias essenciais e água a partir do filtrado glomerular, que é quantificada e influenciada pelo número e o tamanho de partículas presentes na amostra. Já o pH urinário sempre deve ser avaliado frente às condições clínicas do paciente, uma vez que alterações no pH podem estar associadas a alterações do equilíbrio ácido base, infecções no trato urinário, alterações de função renal e ingestão alimentar (alimentação rica em proteínas tendem a ocasionar urina ácida e alimentação rica e vegetais, em geral, ocasionam urinas alcalinas) (ABENSUR, 2011).

-

Tabela 4 - Efeitos da administração oral aguda do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* sobre o volume urinário(mL)

Grupo	**Volume de urina 1 h**	**Volume de urina 2 h**	**Volume de urina 4 h**	**Volume de urina 8 h**	**Volume de urina 12 h**	**Volume de urina 24 h**
Controle	2,00 ± 1,18	0,45 ± 0,05	1,05 ± 0,06	0,67 ± 0,02	0,88 ± 0,04	3,69 ± 0,30
EAPA (30 mg/kg)	2,47 ± 0,10	0,93 ± 0,08	0,61 ± 0,13	1,17 ± 0,16[a]	0,60 ± 0,07	7,77 ± 0,98[a]
EAPA (300 mg/kg)	2,06 ± 0,03	0,76 ± 0,06	1,21 ± 0,12	1,04 ± 0,02[a]	0,90 ± 0,06	5,06 ± 0,26
EHPA (30 mg/kg)	1,63 ± 0,32	1,10 ± 0,11	1,50 ± 0,14	1,29 ± 0,07[a]	0,84 ± 0,07	8,98 ± 0,86[a]
EHPA (300 mg/kg)	1,98 ± 0,30	0,94 ± 0,15	1,23 ± 0,15	1,18 ± 0,08[a]	0,64 ± 0,04	5,46 ± 0,62
OEPA (30 mg/kg)	1,82 ± 0,19	0,75 ± 0,08	0,65 ± 0,16	0,80 ± 0,06	3,25 ± 1,62[a]	2,80 ± 0,62
OEPA (300 mg/kg)	1,61 ± 0,16	0,72 ± 0,03	1,18 ± 0,06	0,85 ± 0,02	0,58 ± 0,03	4,70 ± 0,34
HCTZ (25 mg/kg)	2,78 ± 0,15	6,30 ± 3,21[a]	1,03 ± 0,04	1,20 ± 0,12[a]	0,38 ± 0,01	3,73 ± 0,48

Fonte: A autora

Legenda: Os valores são expressos como média ± erro padrão da média (n=6) em cada grupo em comparação com o controle usando ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett [a]p ≤0,05. Volume de urina expressos em mL/100g.

-

Tabela 5 - Efeito da administração oral aguda do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* no pH urinário

Grupo	**pH 1 h**	**pH 2 h**	**pH 4 h**	**pH 8 h**	**pH 12 h**	**pH 24 h**
Controle	8.47 ± 0.09	8.40 ± 0.11	8.17 ± 0.15	8.12 ± 0.12	8.52 ± 0.14	9.37 ± 0.02
EAPA (30 mg/kg)	-	8.03 ± 0.06[a]	8.04 ± 0.03	7.79 ± 0.04	7.83 ± 0.04[a]	8.40 ± 0.04[a]
EAPA (300 mg/kg)	-	8.21 ± 0.05	7.95 ± 0.01	7.70 ± 0.02	7.75 ± 0.07[a]	8.33 ± 0.13[a]
EHPA (30 mg/kg)	-	8.10 ± 0.01	7.96 ± 0.05	7.91 ± 0.06	7.89 ± 0.06[a]	7.96 ± 0.10[a]
EHPA (300 mg/kg)	-	8.03 ± 0.09[a]	7.98 ± 0.05	7.75 ± 0.05	7.8 ± 0.06[a]	8.30 ± 0.12[a]
OEPA (30 mg/kg)	7.01 ± 0.45[a]	8.09 ± 0.13	8.05 ± 0.13	7.67 ± 0.18	7.60 ± 0.14[a]	9.03 ± 0.21
OEPA (300 mg/kg)	8.11 ± 0.01	8.53 ± 0.08	8.35 ± 0.09	8.53 ± 0.05	8.28 ± 0.05	8.75 ± 0.22[a]
HCTZ (25 mg/kg)	8.13 ±0.06	8.20 ± 0.09	8.21± 0.07	7.99 ± 0.24	8.04 ±0.25	9.39 ± 0.02

Fonte: A autora

Legenda: Os valores são expressos como média ± erro padrão da média (n=6) em cada grupo em comparação com o controle usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett [a]≤0.05.

-

Tabela 6 - Efeito da administração oral aguda do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* na densidade urinária

Grupo	densidade 1 h	densidade 2 h	densidade 4 h	densidade 8 h	densidade 12 h	densidade 24 h
Controle	1011 ± 0.42	1014 ± 0.73	1019 ± 1.68	1027 ± 1.11	1033 ± 0.42	1041 ± 0.84
EAPA (30 mg/kg)	-	1013 ± 0.42	1015 ± 0.42	1021 ± 0.84	1025 ± 0.42[a]	1023 ± 11.8[a]
EAPA (300 mg/kg)	-	1013 ± 0.36	1016 ± 0.21	1023 ± 1.11	1028 ± 1.93	1032 ± 1.93[a]
EHPA (30 mg/kg)	-	1010 ± 1.17[a]	1015 ± 0.73[a]	1019 ± 0.42[a]	1023 ± 0.42[a]	1023 ± 1.68[a]
EHPA (300 mg/kg)	-	1011 ± 0.96	1016 ± 0.73	1021 ± 0.42[a]	1025 ± 0.42[a]	1027 ± 1.83[a]
OEPA (30 mg/kg)	1017 ± 1.22[a]	1019 ± 1.52[a]	1023 ± 2.1	1029 ± 3.37	1035 ± 3.45	1041 ± 2.95
OEPA (300 mg/kg)	1015 ± 0.42[a]	1016 ± 0.73	1020 ± 0	1027 ± 0.84	1030 ± 0.73	1037 ± 1.11
HCTZ (25 mg/kg)	1012 ± 0.73	1014 ± 1.26	1017 ± 0.42	1023 ± 1.52	1023 ± 1.11[a]	1033 ± 0.84[a]

Fonte: A autora

Legenda: Os valores são expressos como média ± erro padrão da média (n=6) em cada grupo em comparação com o controle usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett [a]$p \leq 0.05$.

-

Tabela 7 - Efeito da administração oral aguda do EAPA, EHPA e OEPA, sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 1, 2 4, 8, 12 e 24 horas

(continua)

	Ureia	**Creatinina**	**El$_{Ca2+}$**	**El$_{Mg2+}$**	**El$_{Na+}$**	**El$_{K+}$**	**El$_{Cl-}$**
1 HORA							
Controle	674,1 ± 9,94	8,00 ± 0,06	7,67 ± 0,68	3,65 ± 0,62	118,3 ± 4,98	66,08 ± 2,47	139,2 ± 6,08
EAPA 30 mg/kg	-	-	-	-	-	-	-
EAPA300 mg/kg	-	-	-	-	-	-	-
EHPA 30 mg/kg	-	-	-	-	-	-	-
EHPA 300mg/kg	-	-	-	-	-	-	-
OEPA 30 mg/kg	1200 ± 87,05[a]	12,13± 1,20[a]	4,70 ± 0,65[a]	7,75 ± 0,62[a]	158 ± 17,27[a]	86,61 ± 6,80[a]	185 ± 21,2
OEPA 300mg/kg	995,9 ± 33,15[a]	11,41 ± 0,57[a]	6,23 ± 0,68	10,01 ± 0,79[a]	127 ± 6,49	84,97±1,59[a]	154,3 ± 5,24
HCTZ 25 mg/kg	643,2 ± 67,96	6,93 ± 0,58	6,75 ± 0,30	5,63 ± 0,21	149 ± 10,09	63,2 ± 1,66	170,1 ±11,02
2 HORAS							
Controle	765,2 ± 73,93	8,36 ± 1,16	5,17 ± 0,80	3,79 ± 0,94	122,3 ± 9,34	74,53 ± 6,19	151,5 ± 9,84
EAPA 30 mg/kg	471,6 ± 21,02	5,84 ± 0,20	5,26 ± 0,15	3,47 ± 0,29	116,7 ± 2,34	56,59 ± 3,09	139,7 ± 4,65
EAPA 300mg/kg	554,4 ±20,54	5,73 ± 0,21	7,13 ± 0,22	2,67 ± 0,52	119,7 ± 3,50	72,45 ± 2,28	150,8 ± 2,14
EHPA 30 mg/kg	365 ± 49,94[a]	3,62 ± 1,06[a]	1,89 ± 0,41[a]	3,39 ± 0,18	61 ± 1,15[a]	32,21 ± 48[a]	74,65 ± 2,8[a]
EHPA 300mg/kg	466,4 ±88,48	5,31 ± 1,29	4,47 ± 1,04	1,67 ± 0,38	74,5 ± 7,21[a]	45,87 ± 9,75	88,9 ± 9,87[a]
OEPA 30 mg/kg	1198 ± 52,4[a]	11,45 ± 0,64	5,13 ± 0,88	4,45 ± 0,35	136 ± 5,37	86,64 ± 3,65	161,1 ± 6,91
OEPA 300mg/kg	1148 ±203,4[a]	12,35 ± 2,20	7,35 ± 0,38	7,90 ± 0,81[a]	159,3 ± 23,98	91,34 ± 9,58	191,1± 24,68
HCTZ 25 mg/kg	765,2 ± 73,93	7,28 ± 0,72	6,49 ± 0,61	4,70 ± 0,23	149 ± 10,09	71,13 ± 2,83	177,4 ± 8,06

-

Tabela 7 - Efeito da administração oral aguda dos extratos obtidos de *Piper amalago*, controle negativo e positivo, sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 1, 2 4, 8, 12 e 24 horas

(continuação)

	Ureia	**Creatinina**	**El$_{Ca2+}$**	**El$_{Mg2+}$**	**El$_{Na+}$**	**El$_{K+}$**	**El$_{Cl-}$**
4 HORAS							
Controle	1248 ± 162,1	13,46 ±1,74	7,76 ± 0,39	3,48 ± 0,70	147,7±11,26	97,03±10,38	178 ± 13,98
EAPA 30 mg/kg	795,1 ± 121,9[a]	9,12 ± 1,18	6,82 ± 0,52	1,59 ± 0,31[a]	170,3±27,22	82,24±13,93	198,2 ± 32,46
EAPA 300mg/kg	756,4 ± 25,95[a]	8,28 ± 0,09	5,57 ± 0,25	1,79 ± 0,08	135,5 ± 2,02	75,27 ± 0,10	148,8 ± 2,28
EHPA 30 mg/kg	742,2 ± 78,9[a]	9,49 ± 0,98	5,4 ± 0,69[a]	1,49 ± 0,37[a]	107,3 ± 6,78	65,81 ± 4,64	120,4 ± 6,37
EHPA 300mg/kg	778,7 ± 44,05[a]	8,73 ± 0,63	4,95 ± 0,53[a]	0,80 ± 0,12[a]	110,3 ± 12,08	68,23 ± 4,50	123,2 ± 9,99
OEPA 30 mg/kg	1623 ± 186,8	15,36 ± 2,78	4,80 ± 0,76[a]	4,17 ± 0,46	166 ± 28,47	104,7±13,39	193,3 ± 28,84
OEPA 300mg/kg	1324 ± 64,08	14,55 ± 1,28	4,65 ± 0,23[a]	5,57 ± 0,81[a]	152 ± 9,21	98,79 ± 7,31	183 ± 7,95
HCTZ 25 mg/kg	849,3 ± 3,14	8,08 ± 0,17	4,38 ± 0,31[a]	4,14 ± 0,25	134,3 ± 1,47	74,24 ± 2,58	160,9 ± 3,15
8 HORAS							
Controle	2141 ± 58,01	25,29 ± 0,18	9,90 ± 0,27	2,99 ± 0,66	163,7±12,55	149,2 ± 2,06	200,7±10,93
EAPA 30 mg/kg	1366 ± 148,6[a]	16,96 ±1,18[a]	6,84 ± 1,00	2,39 ± 1,40	175 ± 1,89	116,1±10,48	201,3 ± 4,69
EAPA 300mg/kg	1663 ± 118,9	19,73 ±0,95	9,51 ± 1,04	4,13 ± 1,23	172,3 ± 6,58	132,1 ± 8,15	194,7 ± 6,52
EHPA 30 mg/kg	1237 ± 11,81[a]	15,81 ± 0,26[a]	9,27 ± 2,37	3,68 ± 1,70	154,5 ± 5,48	106 ± 0,36[a]	171,7 ± 3,32
EHPA 300mg/kg	1434 ± 40,9[a]	17,83 ± 0,78[a]	6,98 ± 0,66	1,25 ± 0,36	135 ± 11,82	111,8 ± 4,75[a]	156,1 ± 11,79
OEPA 30 mg/kg	2676 ± 259,6	29,52 ± 4,14	7,09 ± 0,60	7,87 ± 0,70[a]	202,3 ± 27,26	153,9 ±13,89	233,3 ± 30,96
OEPA 300mg/kg	2181 ± 148,1	27,67 ±1,47	7,98 ± 0,59	6,07 ± 0,81	157,3 ± 3,14	142,3 ± 9,82	189,7 ± 1,99
HCTZ 25 mg/kg	1442 ±164,5[a]	16,06 ±1,92[a]	7,51 ± 0,14	5,98 ± 0,89	169,3 ± 4,86	110 ± 7,99[a]	194,2 ± 9,20

-

Tabela 7 - Efeito da administração oral aguda dos extratos obtidos de *Piper amalago*, controle negativo e positivo, sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 1, 2 4, 8, 12 e 24 horas

(conclusão)

	Ureia	**Creatinina**	**El$_{Ca2+}$**	**El$_{Mg2+}$**	**El$_{Na+}$**	**El$_{K+}$**	**El$_{Cl-}$**
12 HORAS							
Controle	2598 ±75,99[a]	26,21 ±0,86	5,8 ± 0,24	0,26 ± 0,02	153,3 ± 13,39	199,4 ± 4,26	210,5 ± 10,4
EAPA 30 mg/kg	1694 ±124,3[a]	22,23 ±0,45	7,35 ± 0,77	1,25 ± 0,69	169,3 ± 1,68	148,1 ± 5,19[a]	205,6 ± 4,79
EAPA 300mg/kg	1974 ±134,5[a]	25,03 ±1,40	9,48 ± 1,19[a]	2,22 ± 0,69	162,3 ± 6,24	167,6 ± 9,73	199,4 ± 6,80
EHPA 30 mg/kg	1616 ±39,53[a]	20,07 ±0,66	8,15 ± 1,27	0,50 ± 0,10	141,3 ± 4,75	139,6 ± 2,6[a]	174,1 ± 7,14
EHPA 300mg/kg	1857 ±66,09[a]	22,23 ±0,93	7,44 ± 1,01	0,76 ± 0,30	143,7 ± 9,72	150,3 ± 3,24[a]	181,6 ± 7,96
OEPA 30 mg/kg	2606 ± 346,4	34,12±4,59[a]	6,16 ± 0,73	3,79 ± 1,84[a]	175,7±22,41	185,4±21,76	221,2±26,12
OEPA 300mg/kg	2129 ± 0	29,65 ± 0	3,98 ± 0	0,15 ± 0	150 ± 0	179,5 ± 0	203,7 ± 0
HCTZ 25 mg/kg	1548 ± 92,2[a]	16,53±1,37[a]	5,17 ± 0,82	0,58 ± 0,15	154 ± 2,28	133,5±4,35[a]	195,1 ± 4,60
24 HORAS							
Controle	2156 ± 112,3	20,67 ±1,48	4,07 ± 0,21	0,68 ± 0,06	94,67 ± 11,11	170,7 ± 7,88	154,6 ± 11,25
EAPA 30 mg/kg	1788 ± 176,8	17,14 ±1,22	4,11 ± 0,24	0,58 ± 0,27	89,33 ± 6,11	142,5 ± 12,41	124,1 ± 9,46
EAPA 300mg/kg	2659 ± 293,8	25,23 ± 2,10	7,18 ± 1,08[a]	0,53 ± 0,11	117,3 ± 7,88	204,9 ± 19,94	162,1 ± 9,86
EHPA 30 mg/kg	1851 ± 222,5	14,54 ± 3,52	5,95 ± 0,59	1,41 ± 0,68	89 ± 7,95	144,9 ± 177,2	124,7±10,54
EHPA 300mg/kg	2281 ± 236,7	21,03 ±1,38	5,23 ± 0,61	0,30 ± 0,06	104 ± 10,48	177,2 ± 18,68	151,1±14,31
OEPA 30 mg/kg	3211 ± 251,5[a]	36,88 ±7,64[a]	4,83 ± 0,65	1,08 ± 0,32	155,3 ± 28,05[a]	224,1 ± 25,02	217,9 ± 35,26[a]
OEPA 300mg/kg	2445 ± 185,6	25,29 ±1,65	3,94 ± 0,43	1,60 ± 0,67	98,67 ± 0,91	178,6 ± 2,30	151,6 ± 2,42
HCTZ 25 mg/kg	1952 ± 78,57	17,06 ±0,70	3,59 ± 0,37	0,51 ± 0,02	84,33 ± 1,05	148,4 ± 7,09	130,6 ± 3,06

Fonte: A autora

5.4.2.2 Atividade diurética prolongada

Os efeitos da administração prolongada de EAPA, EHPA e OEPA sobre o volume urinário 8 h após o tratamento oral estão apresentados na Tabela 8. É possível observar uma diminuição significativa do volume urinário no 3º dia após tratamento com EAPA, EHPA e OEPA, quando comparados com o controle. Curiosamente, apenas a menor dose (30 mg/mL) de OEPA foi capaz de promover um aumento significativo do volume urinário no sétimo dia após tratamento prolongado.

-

Tabela 8 - Efeitos da administração oral prolongada de 8 horas do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* sobre o volume urinário (mL)

GRUPO	**DIA 1**	**DIA 2**	**DIA 3**	**DIA 4**	**DIA 5**	**DIA 6**	**DIA 7**
Controle	0,68 ± 0,03	1,33 ± 0,01	6,37 ± 1,34[a]	1,40 ± 0,15	1,12 ± 0,06	2,68 ± 0,38	3,68 ± 0,68
EAPA (30 mg/kg)	1,17 ± 0,15	1,42 ± 0,07	2,34 ± 0,08	1,99 ± 0,21	2,51 ± 0,29	0,98 ± 0,02	1,36 ± 0,03[a]
EAPA (300 mg/kg)	1,04 ± 0,03	1,28 ± 0,08	2,16 ± 0,09	0,82 ± 0,20	1,76 ± 0,22	1,15 ± 0,11	1,65 ± 0,29[a]
EHPA (30 mg/kg)	1,29 ± 0,08	1,41 ± 0,05	2,17 ± 0,31	1,67 ± 0,19	2,01 ± 0,07	1,22 ± 0,09	1,20 ± 0,10[a]
EHPA (300 mg/kg)	1,18 ± 0,09	1,22 ± 0,15	1,8 ± 0,16	1,25 ± 0,17	2,01 ± 0,18	1,20 ± 0,11	1,27 ± 0,15[a]
OEPA (30 mg/kg)	0,79 ± 0,06	1,03 ± 0,31	1,07 ± 0,38	1,27 ± 0,48	1,49 ± 0,18	3,08 ± 0,64	12,82 ± 2,28[a]
OEPA (300 mg/kg)	0,85 ± 0,03	1,48 ± 0,05	1,61 ± 0,22	2,40 ± 0,35	1,31 ± 0,07	2,41 ± 0,05	1,84 ± 0,26[a]
HCTZ (25 mg/kg)	1,20 ± 0,12	1,8 ± 0,14	2,44 ± 0,17	5,20 ± 0,94[a]	2,04 ± 0,40	3,25 ± 0,48	4,10 ± 0,44

Fonte: A autora

Legenda: Efeitos da administração oral prolongada (coleta de urina 8 horas após cada tratamento) dos diferentes extratos obtidos de *Piper amalago* sob o volume urinário produzido durante os 7 dias de tratamento. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n=6). [a]$p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Os efeitos da administração prolongada de EAPA, EHPA e OEPA sobre o volume urinário excretado após 24 h do tratamento oral estão apresentados na Tabela 9. A HCTZ, como esperado, promoveu um aumento significativo da excreção urinária 24 h após a administração oral nos dias 4, 6 e 7. A administração prolongada com a menor dose (30 mg/kg) de EAPA promoveu um aumento significativo na excreção urinária nos dias 5, 6 e 7, ao passo que a sua maior dose (300 mg/kg) aumentou significativamente a excreção urinária apenas no 6º dia de tratamento. Ambas as doses de EHPA (30 e 300 mg/kg) aumentaram significativamente o volume urinário no 5º dia de tratamento, sendo este efeito novamente observado no 6º dia apenas para o grupo tratado com a maior dose (300 mg/kg) de EHPA. Já o óleo essencial de *P. amalago* (OEPA) promoveu um aumento significativo do volume urinário excretado por ambas as doses (30 e 300 mg/kg) no 6º e 7º dia após o início do tratamento.

É possível observar que houve um aumento significativo da excreção urinária nos dias 5, 6 e 7. De fato, isso é um efeito comum de diuréticos. Como eles causam desidratação durante o efeito agudo, existe uma retenção urinária compensatória (para manter a osmolaridade sérica) quando o diurético é eliminado. Dessa forma, o efeito só volta aparecer quando os metabólitos secundários presentes nos extratos atingirem o estado de equilíbrio dinâmico (em média após 3 administrações), e os mecanismos contrarreguladores serem ajustados a nova condição de diurese sustentada (DUARTE; COOPER-DEHOFF, 2010).

-

Tabela 9 - Efeitos da administração oral prolongada de 24 horas do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* sobre o volume urinário (mL)

GRUPO	**DIA 1**	**DIA 2**	**DIA 3**	**DIA 4**	**DIA 5**	**DIA 6**	**DIA 7**
Controle	3,69 ± 0,29	6,37 ± 1,34	6,16 ± 0,66	6,72 ± 0,64	3,94 ± 1,32	2,68 ± 0,38	3,68 ± 0,68
EAPA (30 mg/kg)	7,77 ± 0,99	4,74 ± 1,00	5,17 ± 0,22	7,84 ± 0,928	12,37 ± 2,43[a]	10,53 ± 0,25[a]	9,87 ± 1,94[a]
EAPA (300 mg/kg)	5,06 ± 0,26	4,27 ± 0,39	4,08 ± 0,11	5,29 ± 0,38	5,66 ± 0,49	9,43 ± 1,62[a]	8,26 ± 2,49
EHPA (30 mg/kg)	8,98 ± 0,87	7,22 ± 0,51	6,64 ± 0,39	6,49 ± 0,28	10,98 ± 1,19[a]	7,02 ± 0,26	5,76 ± 0,76
EHPA (300 mg/kg)	5,47 ± 0,62	5,17 ± 0,67	3,32 ± 0,29	6,21 ± 1,04	10,91 ± 2,93[a]	8,20 ± 0,61[a]	4,43 ± 0,45
OEPA (30 mg/kg)	2,80 ± 0,62	7,29 ± 3,26	2,46 ± 0,59	11,14 ± 3,28	3,94 ± 1,06	12,82 ± 2,28[a]	15,67 ± 1,46[a]
OEPA (300 mg/kg)	4,70 ± 0,34	6,85 ± 1,89	4,14 ± 0,09	7,64 ± 1,33	6,48 ± 1,16	9,87 ± 2,35[a]	10,24 ± 2,48[a]
HCTZ (25 mg/kg)	3,73 ± 0,49	10,37 ± 2,36	6,35 ± 1,05	12,33 ± 1,73[a]	4,677 ± 1,4	8,19 ± 0,61[a]	13,54 ± 2,05[a]

Fonte: A autora

Legenda: Efeitos da administração oral prolongada (coleta de urina 24 horas após cada tratamento) dos diferentes extratos obtidos de *Piper amalago* sob o volume urinário produzido durante os 7 dias de tratamento. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n=6). [a]$p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Em relação ao pH urinário das amostras coletadas as 8 h (Tabela 10), podese observar que ambas as doses (30 e 300 mg/kg) de EAPA diminuíram significativamente o valor de pH entre o 2º e 6º dia de tratamento. A menor dose (30 mg/kg) de EHPA promoveu uma diminuição significativa nos valores de pH entre o 2º e 6º dia, ao passo que sua maior dose (300 mg/kg) diminuiu significativamente o pH entre o 3º e 6º dia de tratamento. Apenas a menor dose (30 mg/kg) de OEPA foi capaz de promover uma redução significativa do pH urinário no 4º dia de tratamento quando comparado com o controle. Já em relação ao valor de pH as 24 h após tratamento (Tabela 11), é possível observar que EAPA nas doses de 30 e 300 mg/kg diminuíram significativamente os valores de pH entre o 1º e o 5º dia, e entre o 1º e o 3º dia de administração, respectivamente. Ambas as doses (30 e 300 mg/kg) de EHPA promoveram uma diminuição significativa do valor de pH entre o 1º e o 5º dia após tratamento prolongado. Já as amostras de urina provenientes de animais tratados com a menor dose de OEPA apresentaram uma diminuição significativa nos valores de pH nos dias 1, 4 e 6, ao passo que as amostras pertencentes ao grupo tratado com a maior dose de OEPA apresentaram diminuição significativa no valor de pH apenas no 1º dia do tratamento prolongado. A HCTZ apresentou redução significativa nos valores de pH apenas no 4º dia do tratamento quando comparado com o controle.

Os valores obtidos sobre a densidade urinária no tempo de 8 horas obtiveram decréscimo nos grupos tratados com EAPA 30 e 300 mg/kg (5º dia), EHPA 30 e 300 mg/kg (5º, 6º e 7º dia), OEPA 30 mg/kg (4º dia) e 300 mg/kg (4º e 7º dias) e HCTZ no 3º, 4º e 5º dias (Tabela 12).

-

Tabela 10- Efeitos da administração oral prolongada de 8 horas obtido do EHPA e OEPA sob o pH urinário nos 7 dias de tratamentos

Grupo	**pH (dia 1)**	**pH (dia 2)**	**pH (dia 3)**	**pH (dia 4)**	**pH (dia 5)**	**pH (dia 6)**	**pH (dia 7)**
Controle	8,12 ± 0,12	9,55 ± 0,02	9,44 ± 0,05	8,75 ± 0,16	9,47 ± 0,01	9,16 ± 0,03	9,31 ± 0,05
EAPA 30 mg/kg	7,79 ± 0,04	8,74 ± 0,02[a]	7,97 ± 0,04[a]	8,20 ± 0,02[a]	7,82 ± 0,18[a]	7,91 ± 0,17[a]	8,92 ± 0,10
EAPA300mg/kg	7,70 ± 0,02	8,83 ± 0,07[a]	8,26 ± 0,19[a]	8,28 ± 0,09[a]	7,42 ± 0,16[a]	7,72 ± 0,09[a]	8,99 ± 0,08
EHPA 30 mg/kg	7,91 ± 0,06	8,71 ± 0,05[a]	8,37 ± 0,19[a]	8,26 ± 0,08[a]	7,12 ± 0,04[a]	7,82 ± 0,07[a]	9,11 ± 0,01
EHPA300mg/kg	7,75 ± 0,04	9,33 ± 0,20	7,58 ± 0,15[a]	7,97 ± 0,03[a]	7,14 ± 0,12[a]	7,73 ± 0,16[a]	9,13 ± 0,00
OEPA 30 mg/kg	7,67 ± 0,18	9,81 ± 0,15	9,60 ± 0,04	7,90 ± 0,24[a]	9,16 ± 0,05	9,15 ± 0,12	8,96 ± 0,14
OEPA300mg/kg	8,53 ± 0,05	9,33 ± 0,07	9,41 ± 0,02	8,65 ± 0,09	9,28 ± 0,03	9,12 ± 0,04	9,34 ± 0,04
HCTZ	7,99 ± 0,24	9,56 ± 0,01	9,45 ± 0,02	8,29 ± 0,30	9,19 ± 0,09	9,29 ± 0,04	9,25 ± 0,04

Fonte: A autora

Legenda: Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). [a]p≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle, a análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Dunnett [a]p ≤0,05.

-

Tabela 11 - Efeitos da administração oral prolongada de 24 horas obtido do EAPA, EHPA e OEPA sob o pH urinário nos 7 dias de tratamentos

Grupo	**pH (dia 1)**	**pH (dia 2)**	**pH (dia 3)**	**pH (dia 4)**	**pH (dia 5)**	**pH (dia 6)**	**pH (dia 7)**
Controle	9,37 ± 0,02	9,53 ± 0,03	9,62 ± 0,04	9,45 ± 0,03	9,54 ±0,01	9,19 ± 0,03	9,46 ± 0,05
EAPA 30 mg/kg	8,40 ± 0,04[a]	8,98 ± 0,02[a]	8,53 ± 0,02[a]	8,94 ± 0,02[a]	8,13 ± 0,02[a]	9,04 ± 0	9,20 ± 0,02
EAPA300mg/kg	8,33 ± 0,13[a]	9,09 ± 0,04[a]	8,81 ± 0,02[a]	9,14 ± 0,03	9,40 ± 0,04	9,16 ± 0,07	9,22 ± 0,03
EHPA 30 mg/kg	7,96 ± 0,10[a]	8,99 ± 0,01[a]	8,85 ± 0,07[a]	9,18 ± 0,01	8,97 ± 0,01[a]	9,08 ± 0,05	9,31 ± 0,00
EHPA300mg/kg	8,30 ± 0,12[a]	9,17 ± 0,01[a]	8,85 ± 0,07[a]	9,13 ± 0,02	9,04 ± 0,06[a]	9,18 ± 0,05	9,26 ± 0,04
OEPA 30 mg/kg	9,03 ± 0,21[a]	9,53 ± 0,04	9,56 ± 0,09	8,69 ± 0,27[a]	9,42 ± 0,06	8,83 ± 0,19[a]	9,54 ± 0,20
OEPA300mg/kg	8,75 ± 0,22[a]	9,37 ± 0,05	9,61 ± 0,03	9,26 ± 0,06	9,44 ± 0,06	9,18 ± 0,09	9,72 ± 0,21
HCTZ	9,39 ± 0,02	9,48 ± 0,01	9,60 ± 0,06	9,03 ± 0,14[a]	9,46 ± 0,04	9,26 ± 0,08	9,69 ± 0,06

Fonte: A autora

Legenda: Para os tratamentos (EAPA, EHPA, OEPA, controle e HCTZ) a análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). [a]p≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle.

-

Tabela 12 - Efeito da administração oral prolongada de 8 horas obtido do EAPA, EHPA e OEPA sobre a densidade urinária nos 7 dias de tratamento

Grupo	densidade (dia 1)	densidade (dia 2)	densidade (dia 3)	densidade (dia 4)	densidade (dia 5)	densidade dia 6)	densidade (dia 7)
Controle	1027 ±1,11	1041 ± 0,84	1031 ± 2,23	1037 ± 2,10	1045 ± 1,11	1023 ± 1,68	1013 ± 2,10
EAPA 30 mg/kg	1021 ± 0,84	1034 ± 0,73	1032 ± 0,55	1032 ± 1,17	1024 ± 1,46[a]	1031 ± 4,02	1029 ± 3,60[a]
EAPA 300 mg/kg	1023 ± 1,11	1039 ± 1,68	1038 ± 2,43	1041 ± 0,42	1029 ± 0,84[a]	1031 ± 2,76	1033 ± 3,60[a]
EHPA 30 mg/kg	1019 ± 0,42	1037 ± 2,10	1033 ±1,83	1039 ± 1,52	1029 ± 3,04[a]	1034 ± 2,53[a]	1033 ± 0,84[a]
EHPA 300 mg/kg	1021 ± 0,42	1041 ± 4,02	1035 ± 2,56	1045 ± 0,42	1029 ± 5,85[a]	1035 ± 2,95[a]	1034 ± 2,19[a]
OEPA 30 mg/kg	1029 ± 3,37	1038 ± 3,79	1033 ± 2,34	1027 ± 5,85[a]	1043 ± 2,10	1025 ± 2,34	1015 ± 1,83
OEPA 300 mg/kg	1027 ± 0,84	1032 ± 3,79	1019 ± 3,45[a]	1023 ± 4,02[a]	1042 ± 2,19	1025 ± 2,10	1024 ± 5,26[a]
HCTZ	1023 ± 1,52	1041 ± 3,29	1015 ± 1,11[a]	1016 ± 3,86[a]	1033 ± 1,52[a]	1030 ± 2,19	1014 ± 1,46

Fonte: A autora

Legenda: Para os tratamentos (EAPA, EHPA, OEPA, controle e HCTZ) a análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). [a]p≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle. Densidade expressa em mg/mL.

Fonte: A autora.

-

Tabela 13 - Efeito da administração oral prolongada de 24 horas obtido do EAPA, EHPA e OEPA sobre a densidade urinária nos 7 dias de tratamento

Grupo	densidade (dia 1)	densidade (dia 2)	densidade (dia 3)	densidade (dia 4)	densidade (dia 5)	densidade (dia 6)	densidade (dia 7)
Controle	1041 ± 0,84	1037 ± 4,86	1037 ± 4,27	1027 ± 1,68	1042 ± 4,44	1023 ± 0,84	1010 ± 1,26
EAPA 30 mg/kg	1023 ± 1,83[a]	1040 ± 3,65	1043 ± 1,11	1034 ± 1,93	1030 ± 1,82	1029 ± 1,52	1035 ± 4,02[a]
EAPA 300 mg/kg	1032 ± 1,93	1044 ± 1,93	1048 ± 1,26	1041 ± 2,76[a]	1035 ± 1,52	1038 ± 3,65[a]	1036 ± 5,26[a]
EHPA 30 mg/kg	1023 ± 1,68[a]	1035 ± 1,68	1038 ± 1,93	1039 ± 0,42	1033 ± 3,19	1035 ± 1,11	1036 ± 1,93[a]
EHPA 300 mg/kg	1027 ± 1,83	1040 ± 1,26	1047 ± 2,76	1043 ± 3,45[a]	1040 ± 4,83	1035 ± 5,85	1042 ± 3,86[a]
OEPA 30 mg/kg	1041 ± 2,95	1033 ± 7,0	1044 ± 3,79	1030 ± 6,96	1044 ± 2,63	1019 ± 4,15	1009 ± 0,84
OEPA 300 mg/kg	1037 ± 1,11	1033 ± 6,62	1037 ± 4,46	1023 ± 4,75	1035 ± 5,18	1024 ± 5,11	1021 ± 6,12
HCTZ	1033 ± 0,84	1028 ± 7,19	1032 ± 2,92	1013 ± 2,34[a]	1033 ± 4,46	1026 ± 4,06	1010 ± 0

Fonte: A autora

Legenda: Para os tratamentos (EAPA, EHPA, OEPA, controle e HCTZ) a análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Dunnett. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). [a]p≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle. Densidade expressa em mg/mL

Em relação a densidade urinária de 24 h após o tratamento prolongado (Tabela 13), é possível observar que a menor dose (30 mg/kg) de EAPA e de EHPA promoveram uma diminuição significativa da densidade urinária no 1º dia e aumentou no 7º dia de tratamento. Animais tratados com a maior dose (300 mg/kg) de EAPA e EHPA apresentaram uma diminuição significativa na densidade urinária no 4º, 6º e 7º dia e no 4º e 7º dia, respectivamente. A HCTZ promoveu uma diminuição significativa da densidade urinária apenas no 4º dia de tratamento, quando comparado com o controle.

O perfil de excreção urinária dos eletrólitos, ureia e creatinina está apresentado na Tabela 14. O EAPA (30 mg/kg) promoveu uma redução significativa de sódio, potássio e cloreto urinário no 5º dia após a administração oral, e um aumento na eliminação de ureia, sódio, potássio e cloreto no 7º dia. Na maior dose utilizada (300 mg/kg), o EAPA promoveu um aumento na excreção de cálcio (1º, 3º e 6º dia), potássio e de cloreto (4º e 6º dias), quando comparados ao controle.

Em relação ao grupo tratado com EHPA (30 mg/kg), pode-se observar um aumento significativo na excreção renal de cálcio (2º dia), cloreto (4º e 7º dia) e de sódio, potássio e cloreto (7º dia); ao passo que houve uma redução na eliminação urinária de potássio e cloreto no 5ºdia após a administração. Na maior dose utilizada (300 mg/kg) o EHPA induziu um aumento significativo na eliminação renal de cálcio (2º dia), potássio (3º, 4º, 5º e 6º dia), cloreto (4º, 5º e 6º dia), ureia e sódio (6º dia).

A administração oral do OEPA (30 mg/kg) induziu significativamente a um aumento na excreção renal de sódio (1º e 2º dia), creatinina (2º, 3º dia), ureia (3º e 5º dia), magnésio (4º e 5º dia), potássio (2º e 3º dia), cloreto (2º dia) e cálcio (5º e 6º dia), reduzindo significativamente a excreção de cálcio (7º dia). Contudo, como esperado, a administração prolongada de HCTZ promoveu uma significativa diminuição da eliminação urinária de cálcio (7º dia).

O fluxo urinário interfere diretamente com a secreção de potássio, isto é, quanto maior o fluxo, menor será a concentração luminal, o que favorece o movimento do potássio da célula para o túbulo renal. Adicionalmente, a carga excretada de potássio também é dependente do teor de sódio, devido a reabsorção distal de sódio ser dependente de bombas sódio-potássio, as quais também promovem secreção de potássio e, em segundo lugar, a reabsorção distal de sódio aumenta a eletronegatividade da luz tubular e isto é um forte fator que estimula a secreção de potássio (CAMPOS *et al*., 2005).

Assim sendo, os efeitos adversos dos diuréticos são perturbações que ocorrem nas concentrações dos eletrólitos, particularmente potássio sérico, que pode ser aumentado pelas tiazidas e diuréticos de alça, e reduzidos pelos antagonistas da aldosterona e bloqueadores de canais de sódio no epitélio renal, considerados diuréticos poupadores de potássio (ROUSH; KAUR; ERNST, 2013).

Novaes *et al.* (2014) demonstraram que a administração oral do extrato etanólico obtido de *P. amalago* aumentou a excreção urinária de sódio e potássio, o volume urinário, bem como a turbidez. Além disso, apresentou atividade antilitiásica, reduzindo o tamanho dos cristais de oxalato cálcio.

Em comparação a esse estudo, os resultados demonstraram que na administração oral do óleo essencial e do extrato aquoso e hidroalcoólico de *P. amalago* aumentou o volume urinário, assim como o extrato aquoso e hidroalcoólico aumentou a excreção urinária de sódio e potássio efetivamente no (7º dia) tratamento prolongado, tanto quanto a densidade em algumas amostras.

Tabela 14 - Efeito da administração oral prolongada do EAPA, EHPA e OEPA sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 24 horas durante os 7 dias de tratamento

(continua)

Grupo	Eletrólitos (µEq/min/100g)						
	Ureia	**Creatinina**	**El$_{Ca++}$**	**El$_{Mg++}$**	**El$_{Na+}$**	**El$_{K+}$**	**El$_{Cl-}$**
DIA 1							
Controle	2156±112,3	20,67 ± 1,48	4,07 ± 0,21	0,68 ± 0,06	94,67 ±11,11	170,7 ± 7,88	154,6±11,25
EAPA 30 mg/kg	1788±176,8	17,14 ± 1,22	4,11 ± 0,24	0,58 ± 0,27	89,33 ± 6,11	142,5±12,41	124,1 ± 9,46
EAPA 300mg/kg	2659±293,8	25,23 ± 2,10	7,18 ± 1,08[a]	0,53 ± 0,11	117,3 ± 7,88	204,9±19,94	162,1 ± 9,86
EHPA 30 mg/kg	1851±222,5	14,54 ± 3,52	5,95 ± 5,23	1,41 ± 0,68	89 ± 7,95	144,9±13,36	124,7±10,54
EHPA 300mg/kg	2281±236,7	21,03 ± 1,38	5,23 ± 0,61	0,30 ± 0,06	104 ± 10,48	177,2±18,68	151,1±14,31
OEPA 30 mg/kg	3211±251,5	36,88 ± 7,64	4,83 ± 0,65	1,08 ± 0,32	155,3±28,05[a]	224,1±25,02	217,9±35,26
OEPA 300mg/kg	2445±185,6	25,29 ± 1,65	3,94 ± 0,43	1,6 ± 0,67	98,67 ± 0,91	178,6 ± 2,30	151,6 ± 2,42
HCTZ 25mg/kg	1952±78,57	17 ,06 ± 0,70	3 ,59 ± 0,37	0 ,51 ± 0,02	3 ,59 ± 0,37	148,4 ± 7,09	130,6 ± 3,06
DIA 2							
Controle	2708 ± 346	4,83 ± 0,38	1,90 ± 0,65	0,27 ± 0,03	94,67±11,44	243,7±31,88	191,8±28,61
EAPA 30 mg/kg	1788±176,8	17,14 ± 1,22	4,11 ± 0,24	0,26 ± 0,03	89,33 ± 6,11	142,5±12,41	124,1 ± 9,46
EAPA 300mg/kg	2659±293,8	25,23 ± 2,10	2,63 ± 0,17	0,53 ± 0,11	117,3 ± 7,88	204,9 19,94	162,1 ± 9,86
EHPA 30 mg/kg	1851±222,5	14,54 ± 3,52	5,95 ± 0,59[a]	0,17 ± 0,01	89 ± 7,95	144,9±13,36	124,7±10,54
EHPA 300mg/kg	2281±236,7	21,03 ± 1,38	5,23 ± 0,61[a]	0,30 ±0,06	104 ± 10,48	177,2±18,68	151,1±14,31
OEPA 30 mg/kg	4296 ±1627	63,55±33,53[a]	3,58 ± 1,06	0,50 ± 0,08	163 ± 53,58[a]	312,8±98,67	282,6±94,51[a]
OEPA 300mg/kg	2899±598,6	18,1 ± 7,71	2,04 ± 0,53	0,40 ±0,02	86,67±19,56	207,7±49,71	156,5 ±38,23
HCTZ 25 mg/kg	2441±738,2	7,12 ± 2,96	1,21 ± 0,51	0,36 ± 0,02	71,33 ±11,95	190,8±45,37	139,3 ±28,11

Tabela 14 - Efeito da administração oral prolongada dos extratos obtidos de *Piper amalago*, controle negativo e positivo, sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 24 horas durante os 7 dias de tratamento

(continuação)

Grupo	Eletrólitos (µEq/min/100g)						
	Ureia	**Creatinina**	**El $_{Ca++}$**	**El$_{Mg++}$**	**El$_{Na+}$**	**El $_{K+}$**	**El$_{Cl-}$**
DIA 3							
Controle	3370±228,3	8,62 ± 0,92	1,01 ± 0,17	0,37 ± 0,04	71 ± 4,56	203,9±13,76	122,5 ± 3,87
EAPA 30 mg/kg	4001±113,7	3,64 ± 0,33	3,3 ± 0,33	0,26 ± 0,03	77 ± 6,22	277,7 ± 8,53	153, 5 ± 8,25
EAPA 300mg/kg	5020±234,9	9,25 ± 3,18	2,63 ± 0,17	0,22 ± 0,02	105 ± 75,33	340,6 ±9,57[a]	200,2 ±14,61
EHPA 30 mg/kg	3777±141,1	11,69 ± 5,68	2,28 ± 0,14	0,17 ± 0,01	75,33 ± 5,85	267,6±11,98	154,8 ± 8,40
EHPA 300mg/kg	4566±295,6	28,16 ± 5,57	3,42 ± 0,36	0,17 ± 0,02	99,33 ± 6,98	320,9±23,18[a]	208 ± 16,55
OEPA 30 mg/kg	5724±931,6[a]	71,64±31,06[a]	2,2 ± 0,43	0,41 ± 0,08	111,7±18,34	332,7±58,56[a]	179,1±25,76
OEPA 300mg/kg	4519 ± 110	22,04 ± 3,23	2,25 ± 0,11	0,25 ± 0,05	91,33 ± 1,72	262,7 ± 1,04	160 ± 1,68
HCTZ 25 mg/kg	2853 ±322,4	8 ,65 ± 1,53	1 ,12 ± 0,44	1 ,03 ± 0,38	52 ,67 ± 4,93	152 ± 18,1	81 ,83 ± 9,53
DIA 4							
Controle	2917 ±323,3	24,1 ± 5,08	2,25 ± 0,40	0,50 ± 0,04	78,67 ± 8,20	197,6 ±17,73	121,8 ± 9,36
EAPA 30 mg/kg	3025 ±257,2	2,82 ± 0,39	3,24 ± 0,75	0,13 ± 0,03	72 ± 4,42	243,5 ±17,79	175,2 ±10,29
EAPA 300mg/kg	3433 ±418,7	2,36 ± 0,47	3 58 ± 0,43	0,31 ±0,02	97,67 ± 7,12	302,8 ±20,45	232,3±14,51[a]
EHPA 30 mg/kg	3127 ±59,98	2,53 ± 0,28	4,12 ± 1,10	0,24 ± 0,01	88 ± 3,48	273 ± 7,35	216,4 ± 7,75[a]
EHPA 300mg/kg	3313 ±387,6	11,24 ± 4,03	3,87 ± 0,68	0,47 ± 0,05	106 ± 11,49	315,4±33,67[a]	258,4±29,09[a]
OEPA 30 mg/kg	3064 ±788,9	34,46 ± 6,5	2,97 ± 1,08	1,82 ± 0,49[a]	47 ± 14,74	154,1±40,68	68,53 ±20,28
OEPA 300mg/kg	2210 ±515,6	26,95 ± 4,66	2,28 ± 0,90	0,4 ± 0,10	52 ± 13,21	136,6 ±36,94	80,77 ±21,83
HCTZ 25 mg/kg	1709 ±633,9	21,01 ± 4,00	1,38 ± 0,31	0,44 ± 0,06	47,67 ±14,84	106,5 ±39,02	67,8 ± 21,28

Tabela 14 - Efeito da administração oral prolongada dos extratos obtidos de *Piper amalago*, controle negativo e positivo, sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 24 horas durante os 7 dias de tratamento

(continuação)

Grupo	Ureia	Creatinina	Eletrólitos (µEq/min/100g) El $_{Ca++}$	El$_{Mg++}$	El$_{Na+}$	El $_{K+}$	El$_{Cl-}$
DIA 5							
Controle	3346 ±353,8	5,36 ± 0,32	2,29 ± 0,75	0,78 ± 0,13	98,33 ± 9,00	299,8 ±29,64	215,3 ± 20,1
EAPA 30 mg/kg	1760 ± 382	19,68 ± 2,87	2,76 ± 0,59	0,26 ± 0,06	47 ± 10,61[a]	139,7 ± 35[a]	82,93±20,17[a]
EAPA 300mg/kg	3356 ±118,2	28,44 ± 2,07	3,12 ±0,31	0,28 ± 0,05	71,33 ± 2,43	232,3 ± 5,21	129,9 ± 5,66
EHPA 30 mg/kg	2586 ±382,9	20,6 ± 2,13	2,76 ± 0,21	0,37 ± 0,07	57,67 ± 9,28	178,4±26,87[a]	102,7±16,89[a]
EHPA 300mg/kg	2517 ±726,2	24,75 ± 5,84	2,07 ± 0,51	0,18 ± 0,06	54,67 ±16,57	158,9±53,07[a]	87,17±26,54[a]
OEPA 30 mg/kg	4561 ±578,8	33,22 ± 6,85[a]	7,12 ± 3,18[a]	3,89 ± 1,96[a]	110 ± 13,53	289,2 ±25,25	209,8±27,45
OEPA 300mg/kg	3049 ±479,3	9,38 ± 1,97	2,46 ± 0,78	0,45 ± 0,02	70 ± 10,56	224,6 ±34,67	143,9 ±24,11
HCTZ 25 mg/kg	3086 ±227,3	7 ,96 ± 2,34	2 ,45 ± 0,23	0 ,69 ± 0,28	63 ,33 ± 9,42	236,2 ±29,75	139,2 ±26,37
DIA 6							
Controle	1981 ±70,56	14,08 ± 1,38	2,05 ± 0,96	0,56 ± 0,11	71 ± 7,72	138,7 ± 7,40	109,6 ± 9,56
EAPA 30 mg/kg	2426 ±214,7	3,82 ± 1,00	2,70 ± 0,67	0,18 ± 0,02	58,67 ± 3,60	197,2 ± 8,01	130,6 ± 8,8
EAPA 300mg/kg	2855 ±222.6	15,16 ± 4,20	3,52 ± 0,32	0,24 ± 0,01	75,67 ± 8,40	256,1±26,78[a]	173,2±24,27[a]
EHPA 30 mg/kg	2723 ±155,1	2,40 ± 0,25	3,32 ± 0,18	0,22 ± 0,03	81 ± 4,74	246,3 ±12,37	168,5 ±12,65
EHPA 300mg/kg	3021 ±472,3	23,43 ± 4,19	2,70 ± 0,70	0,23 ± 0,02	75 ± 19,24	241,7 ±52,97	173,2 ±47,34
OEPA 30 mg/kg	1707 ±395,8	17,21 ± 2,14	5,12 ± 1,34[a]	1,29 ± 0,25	44,67 ± 10,7	113,8 ±30,43	68,67 ±20,63
OEPA 300mg/kg	2199 ±501,3	16,35 ± 2,43	2,66 ± 0,89	0,23 ± 0,01	51,33 ±12,96	135,2 ±37,18	81,67 ±21,06
HCTZ 25 mg/kg	2172 ±320,7	13,66 ± 1,37	2,97 ± 0,73	0,71 ± 0,21	53 ± 8,99	150,4 ±28,73	90,6 ± 20,89

Tabela 14 - Efeito da administração oral prolongada dos extratos obtidos de *Piper amalago*, controle negativo e positivo, sobre a excreção de eletrólitos nos tempos de 24 horas durante os 7 dias de tratamento

(conclusão)

Grupo	Ureia	Creatinina	Eletrólitos (µEq/min/100g) El $_{Ca++}$	El$_{Mg++}$	El$_{Na+}$	El $_{K+}$	El$_{Cl-}$
DIA 7							
Controle	848,5±119,3	13,27 ± 1,44	4,64 ± 1,34	0,26 ± 0,04	14 ± 1,67	27,64 ± 1,76	20,47 ± 2,48
EAPA 30 mg/kg	2544±441,9[a]	3,82 ± 1,00	2,02 ± 0,72	0,3 ± 0,08	83,33 ± 7,69[a]	248,9±20,22[a]	180,6±14,37[a]
EAPA 300mg/kg	2081 ±383,6	2,37 ± 0,31	2,24 ± 0,28	0,25 ± 0,07	83,67±12,27[a]	258,9±38,22[a]	198 ± 29,38[a]
EHPA 30 mg/kg	2325 ±166,3	2,45 ± 0,35	2,12 ± 0,37	0,26 ± 0,01	76 ± 6,70[a]	279,4±17,49[a]	199,5±11,02[a]
EHPA 300mg/kg	3000±185,1[a]	4,36 ± 0,82	3,81 ± 0,71	0,60 ± 0,17	97,33±11,78[a]	317,1±35,84[a]	230,8±30,25[a]
OEPA 30 mg/kg	773,1 84,11	13,23 ± 2,69	0,6 ± 0,03[a]	0,19 ± 0,01	14,33 ± 1,47	29,92 ± 5,04	19 ± 2,26
OEPA 300mg/kg	1747 ±533,4	11,11 ± 1,71	2,05 ± 1,09	0,32 ± 0,08	42,67 ±16,27	107,4 ±47,14	71,7 ± 31,51
HCTZ 25 mg/kg	878, ± 36,38	11.62 ± 2,75	0,49 ± 0,03[a]	0,23 ± 0,03	22,67 ± 1,52	38,03 ± 2,99	30,5 ± 3,10

Fonte: A autora

Legenda: Os valores são expressos como média ± erro padrão da média (n=6) em cada grupo em comparação com o controle usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett. [a]p ≤ 0.05. El: carga excretada; HCTZ: hidroclorotiazida. Eletrólitos expressos em µEq/min/100g.

Tabela 15 – Efeitos dos tratamentos prolongados com o EAPA, EHPA e OEPA sobre parâmetros bioquímicos séricos de ratas Wistar

Parâmetro	**Controle**	**EAPA 30 mg/kg**	**EAPA 300 mg/kg**	**EHPA 30 mg/kg**	**EHPA 300 mg/kg**	**OEPA 30 mg/kg**	**OEPA 300 mg/kg**	**HCTZ**
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,07	0,35 ± 0,04	0,35 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,35 ± 0,005	0,40 ± 0,06	0,46 ± 0,04	0,36 ± 0,04
Uréia (mg/dL)	43,06 ± 2,04	37,17 ± 3,59	38,90 ± 2,52	40,46 ± 4,34	38,58 ± 1,07	41,82 ± 2,13	40,23 ± 1,51	42,46 ± 2,64
Sódio (mmol/L)	128,60 ± 4,20	132,20 ± 2,60	136,70 ± 2,29	136,40 ± 1,94	137,20 ± 1,53	130,30 ± 3,25	134,20 ± 1,40	135,20 ± 4,20
Cálcio (mg/dL)	9,42 ± 0,73	9,41 ± 0,26	10 ± 0,18	9,77 ± 0,38	9,92 ± 0,46	9,28 ± 0,56	10 ± 0,24	9,39 ± 0,52
Potássio (mmol/L)	4,16 ± 0,25	4,58 ± 0,40	4,50 ± 0,12	4,42 ± 0,35	4,73 ± 0,51	4,86 ± 0,33	4,20 ± 0,19	4,09 ± 0,28
Magnésio (mg/dL)	2,16 ± 0,15	2,46 ± 0,21	2,50 ± 0,08	2,42 ± 0,15	2,40 ± 0,19	2,34 ± 0,13	2,26 ± 0,10	2,43 ± 0,15

Fonte: A autora

Legenda: Os valores são expressos como média ± erro padrão da média (n=6) em cada grupo em comparação com o controle usando ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. [a]$p \leq 0.05$.

Tabela 16 **-** Efeitos dos tratamentos prolongados com o EAPA, EHPA e OEPA sobre parâmetros eletrocardiográficos de ratas Wistar

	Controle	EAPA 30 mg/kg	EAPA 300 mg/kg	EHPA 30 mg/kg	EHPA 300 mg/kg	OEPA 30 mg/kg	OEPA 300 mg/kg	HCTZ
Segmento PR (ms)	42 ± 5,51	41,80 ± 3,05	50 ± 7,97	39,50 ± 2,60	42,20 ± 4,83	38 ± 2,51	35,40±5,66	37 ± 3,14
Segmento QRS (ms)	43 ± 0,95	39,40 ± 1,50	38,83 ± 1,70	41,50 ± 1,19	42 ± 1,67	40,75 ± 1,49	42 ± 2,07	44,33±2,11
Segmento QT (ms)	77± 6,23	74,80 ± 1,74	76,67 ± 4,93	70,25 ± 3,79	85,60 ± 4,23	72,75 ± 1,03	82,20 ± 2,76	81 ± 4,22
Segmento QTC (ms)	145,40±12,02	145,80± ,95	141,70±10,37	134,80±9,01	175,60±11,46	135 ± 1,47	143,60±4,91	146,20±5,73
Onda P (mV)	0,046 ± 0,007	0,058± 0,014	0,036±0,007	0,072±0,021	0,054 ± 0,012	0,040±0,007	0,058±0,007	0,036±0,008
Onda Q (mV)	-0,022 ± 0,005	-0,010±0,006	-0,00±0,006	-0,010±0,004	-0,032±0,003	-0,032±0,014	-0,016±0,008	-0,016±0,005
Onda R (mV)	± 0,027 0,025	0,286 ± 0,304	0,275±0,016	0,272±0,021	0,338 ± 0,046	0,320±0,049	0,296±0,040	0,236±0,023
Onda S (mV)	± 0,025 0,032	0,012 ± 0,004	0,074±0,029	0,065±0,025	0,065 ± 0,025	0,0425±0,023	0,044±0,027	-0,040±0,026

Fonte: Autora

Legenda: Os valores são expressos como média ± erro padrão da média (n=6) em cada grupo em comparação com o controle usando ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. [a]p≤0.05.

5.4 ELETROCARDIOGRAMA

Com o uso do ECG é possível detectar alterações tanto no tempo quanto na intensidade das ondas elétricas cardíacas, bem como identificar lesões no músculo cardíaco. Além disso, alterações funcionais refletem mudanças na propagação do potencial de ação no músculo cardíaco, ocasionando consequentemente mudanças nas ondas do próprio ECG (PEZOLATO *et al.,* 2017).

Avaliando as ondas e intervalos eletrocardiográficos (ECG), bem como as análises estatísticas (Tabela 16), não observamos diferenças significativas nos dados do ECG entre todos os grupos experimentais. Os segmentos PR, QRS, QT e QTc, bem como as ondas P, Q, R e S não foram alteradas pelos tratamentos com o EAPA, EHPA, OEPA, controle positivo (HCTZ) ou com o veículo (controle negativo).

5.6 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL (PA)

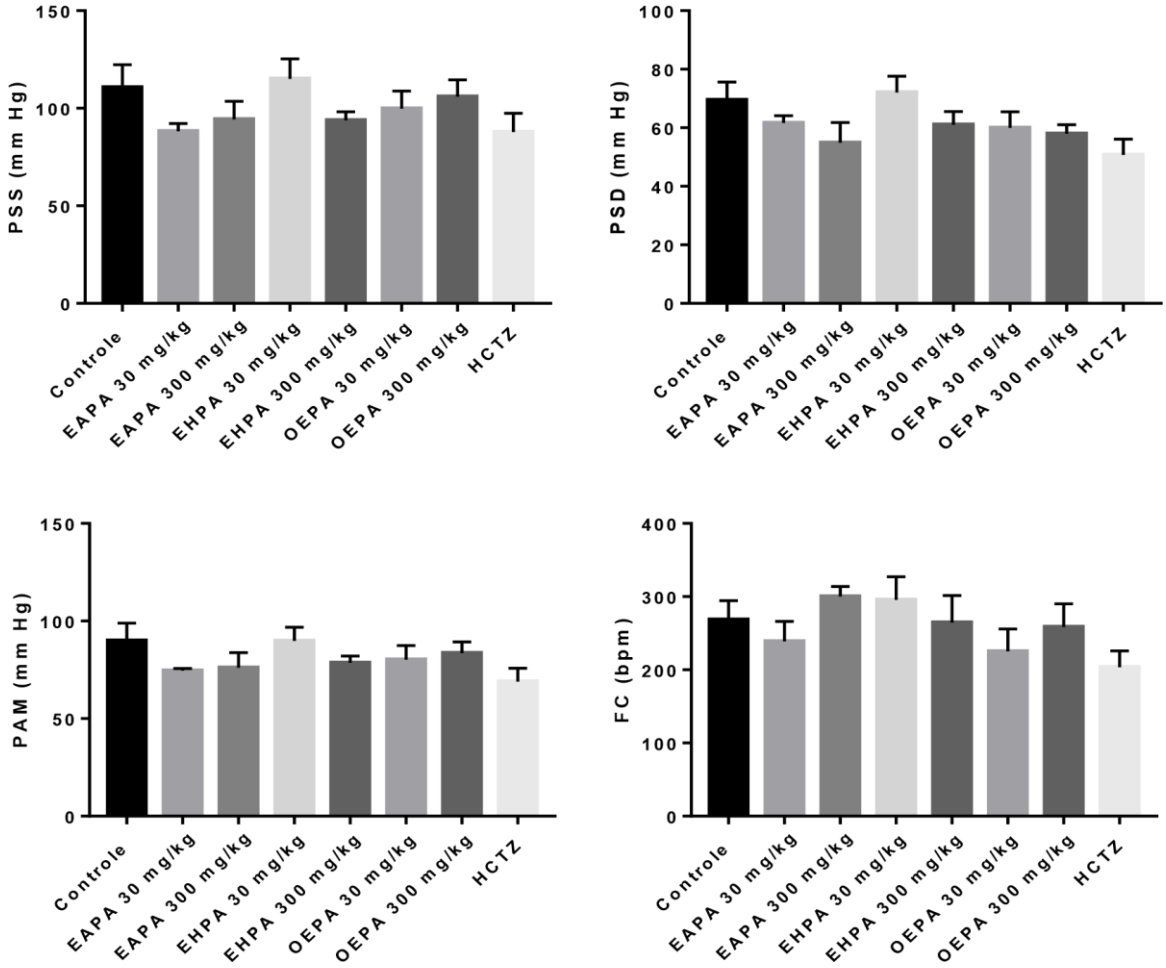
O controle da PA é complexo e envolve vários mecanismos: neural, hormonal e renal. O rim é um órgão efetivo na regulação da PA, pois excreta água e sal e através desse mecanismo regula a volemia e, consequentemente, a PA. Além disso, vale destacar que a redução na pressão arterial pode ser influenciada pela vasodilatação e, consequentemente, alterações na resistência vascular periférica (CAMPOS *et al*., 2005).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de diurese, decidimos avaliar os efeitos do EAPA, EHPA e OEPA sobre a pressão arterial, uma vez que vários antihipertensivos clássicos são diuréticos, incluindo a HCTZ, que geralmente, têm efeito pouco significativo na redução da pressão arterial de indivíduos normotensos (DUARTE; COOPER-DEHOFF, 2010).

Nenhum dos extratos (EAPA, EHPA e OEPA) testados foi capaz de reduzir os níveis de pressão arterial dos animais submetidos a este estudo (Figura 19). De fato, nem mesmo a HCTZ foi capaz de mostrar resposta hipotensora após 7 dias de tratamento oral. Na verdade, a maioria dos anti-hipertensivos clássicos precisam de aproximadamente 4 semanas para reduzir de forma significativa os níveis pressóricos. Isso decorre de diferentes mecanismos contrarreguladores endógenos, incluindo o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Além disso, a PA de pacientes normotensos nem sempre é significativamente reduzida como ocorre em pacientes hipertensos.

Isso pode ser explicado pelo fato das vias bioquímicas pressoras serem mais ativas em pacientes hipertensos. Portanto, esse estudo não é definitivo, pois em um eventual tratamento prolongado (acima de dois meses), utilizando modelos animais de hipertensão, a resposta pode ser diferente da observada (GOODMAN & GILMAN, 2010). De fato, Iwamoto *et al*. (2014) mostraram efeitos anti-hipertensivo e vasodilatador de um composto isolado de *P. amalago* (N-[7-(3',4'-Methylenedioxyphenyl)-2 (Z), 4 (Z)-heptadienoyl] pyrrolidine), em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Figura 19 - Efeitos da administração oral prolongada do EAPA, EHPA e OEPA obtido de *Piper amalago* na pressão arterial sistêmica e na frequência cardíaca de ratas Wistar.



Fonte: A autora
Legenda: A análise estatística foi realizada usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Dunnett. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). HCTZ: hidroclorotiazida; PSS: pressão sanguínea sistólica; PSD: pressão sanguínea diastólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca.

5.7 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

A Tabela 15 apresenta os resultados para as análises bioquímicas de ratas Wistar tratadas por 7 dias com o EAPA, EHPA, OEPA, HCTZ e com o controle (água). Os resultados obtidos não mostraram quaisquer alterações estatisticamente significantes quando comparados aos animais tratados com o grupo controle.

5.8 INVESTIGAÇÕES DO ESTADO REDOX TECIDUAL

A atividade da enzima SOD no grupo tratado com EAPA (30 e 300 mg/kg) apresentou valores significativamente maiores quando comparados ao grupo controle, ou com a HCTZ, nos tecidos cardíaco e renal. A atividade da SOD no grupo tratado por 7 dias com o EHPA (30 e 300 mg/kg) apresentou valores estatisticamente superiores no tecido renal. Por outro lado, esse parâmetro foi significativamente elevado com a dose de 300 mg/kg somente na artéria aorta.

Assim como, no tecido cardíaco, os níveis de LPO apresentaram-se significativamente menores nos grupos EAPA e EHPA (30 e 300mg/kg) quando comparado com o controle, na artéria aorta, os valores foram menores, mas não significativos, já no tecido renal os valores aumentaram significativamente nos extratos testados em ambas as concentrações (Tabela 17).

A SOD catalisa a dismutação do O_2^- a oxigênio com a formação de H_2O_2. O aumento na atividade desta enzima é geralmente correlacionado com a elevação nos níveis de radicais livres (KARUPPANAPANDIAN et al. 2011). A reação dos radicais livres com os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) (LIMA; ABDALA, 2001). A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente L•, LO• e LOO•, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996).

Visto que em nosso trabalho, a atividade enzimática de SOD apresentou um aumento relevante, em comparação com o grupo controle, após o tratamento com o com os extratos, acredita-se que o efeito pode ser decorrente de uma atividade

antioxidante de espécies de *Piper* (SILVA *et al*. 2014), inclusive *Piper amalago*, como já evidenciado nos estudos de Rovani et al. (2013) e Boone e Mota (2010).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. De fato, os antioxidantes mostram uma importante função como fator de proteção à saúde. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a sua estrutura química (SOARES, 2002; SOUSA *et al*., 2007).

Tabela 17 - Estado redox dos tecidos em todos os grupos no final do tratamento

	Controle	**APA 30 mg/kg**	**APA300 mg/kg**	**HPA 30 mg/kg**	**HPA 300 mg/kg**	**HCTZ**
Coração						
SOD	13.29 ± 1.67	18.13 ± 1.10[a]	23.91 ± 0.60[ab]	14.16 ± 0.63[c]	26.64 ± 0.44 [abd]	14.70 ± 0.71[ce]
LPO	285.40 ± 12.10	175.20 ± 18. 60[a]	102.40 ± 9.32[ab]	57.54 ± 6.64[abce]	110.80 ± 24.29[ab]	47.40 ± 3.50[abcde]
Aorta						23.48 ± 1.25[be]
SOD	22.62 ± 0.82	14.82 ± 1.17	30.29 ± 2.03[b]	27.03 ± 0.65[b]	34.00 ± 6.79[ab]	
LPO	97.79 ± 4.95	51.55 ± 13.41	78.10 ± 25.08	71.90 ± 20.88	83.79 ± 4.08	178.00 ± 7.22[abce]
Rim						16.22 ± 1.17[bc]
SOD	18.17 ± 4.54	35.74 ± 5.16[a]	74.58 ± 31.28[ab]	30.83 ± 4.23[a]	35.35 ± 4.90[a]	
LPO	108.4 ± 7.53	251.3 ± 24.81[a]	330.3 ± 20.90[ab]	317.7 ± 22.47[a]	192.2 ± 23.23[acd]	276.6 ± 18.30[ae]

Fonte: A autora

Legenda: As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Os valores são expressos como média ± SEM (erro padrão da média). n = 6 ratos por grupo em comparação com o grupo controle ([a]p <0,05), grupo EAPA 30 ([b]p <0,05), grupo EAPA 300 ([c]p <0,05), grupo EHPA 30 ([d]p <0,05) ou grupo EHPA 300 ([e]p < 0,05). HCTZ: animais tratados com 25 mg kg de hidroclorotiazida; LPO: peroxidação lipídica (nmol de hidroperóxidos/g de tecido); Controle: animais tratados com veículo (água); SOD: superóxido dismutase (Unidade de SOD/g de tecido).

5.9 AVALIAÇÕES DA ATIVIDADE VASODILATADORA E MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS

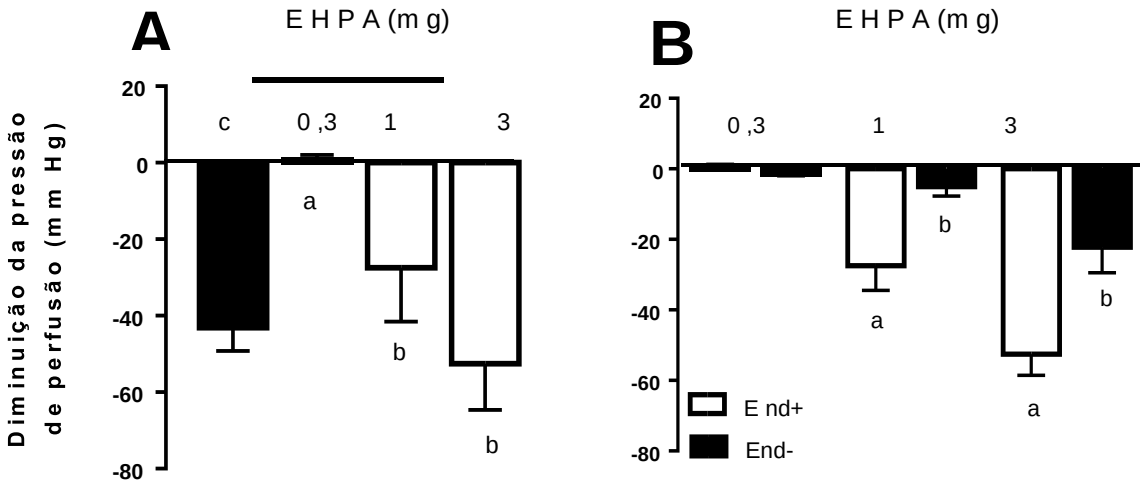
A administração do EHPA (0,3, 1 e 3 nmol) nos MVBs induziu um efeito relaxante dependente da dose (Figura 20A). Os dados obtidos revelaram que o efeito vasorrelaxante do EHPA (nas doses de 1 e 3 mg) apresentou o mesmo perfil de efeito que a administração de 1 nmol de ACh. O tratamento com desoxicolato de sódio atenuou os efeitos da ACh em 97% ± 2% nos MVBs. Da mesma forma, os efeitos de todas as doses do EHPA foram expressivamente reduzidos em preparações que foram tratadas com desoxicolato de sódio (Figura 20B). O pré-tratamento com LNAME em preparações com endotélio intacto também evitou o efeito vasodilatador do EHPA (Figura 20A). Em preparações com endotélio funcional que foram perfundidas com indometacina, os efeitos vasorrelaxantes do EHPA permaneceram inalterados (Figura 21B). A perfusão das preparações com uma solução nutritiva com KCl (40 mM) ou 4-AP (10 mM) aboliu os efeitos do EHPA (Figura 21C e F). No entanto, apenas efeitos não significativos foram observados após a infusão de TEA e glibenclamida (Figuras 21D e E). Nenhum dos outros extratos testados (EAPA e OEPA) induziu qualquer resposta vasodilatadora nos MVBs (dados não mostrados).

Os dados obtidos nesse estudo nos permitem conjecturar que apesar do mecanismo de ação da atividade diurética do EHPA ser desconhecida, é possível teorizar que pode ocorrer uma vasodilatação da arteríola aferente renal, amentando a pressão hidrostática glomerular e a taxa de filtração. Destaca-se ainda que, para o EHPA, todo o processo ocorre na dependência do oxido nítrico e da ativação de canais de potássio dependentes de voltagem.

Os canais de potássio são conhecidos por seu papel na regulação da excitabilidade da membrana. São importantes reguladores do potencial de membrana de várias células, incluindo células do músculo liso vascular (MLV). No MLV, quando ocorre a abertura dos canais de potássio, o efluxo de potássio aumenta, causando hiperpolarização da membrana e, consequentemente, fechamento dos canais de cálcio ativados por voltagem, e diminuição da entrada de cálcio, resultando em vasodilatação. Consequentemente, o fechamento dos canais de potássio provoca despolarização da membrana e abertura dos canais de cálcio ativados por voltagem, aumentando a concentração de cálcio no citoplasma e, por conseguinte, vasoconstrição (TOLOUEI *et al*., 2018).

Há evidências crescentes de que a função de vários tipos de canais vasculares de potássio é alterada durante as principais doenças cardiovasculares, como hipertensão crônica, diabetes e aterosclerose. A vasoconstrição e o comprometimento da capacidade de dilatação de uma artéria são consequências prováveis da função defeituosa do canal de potássio nos vasos sanguíneos durante esses estados de doença. Em alguns casos, o aumento da função do canal de potássio pode ajudar a compensar o aumento do tônus vascular. A disfunção das células endoteliais está comumente associada à doença cardiovascular e à atividade alterada do óxido nítrico, prostaciclina e fator de hiperpolarização derivado do endotélio também podem contribuir para mudanças na atividade do canal de potássio em repouso, e consequentemente, na resposta vasodilatadora (SOBEY, 2001).

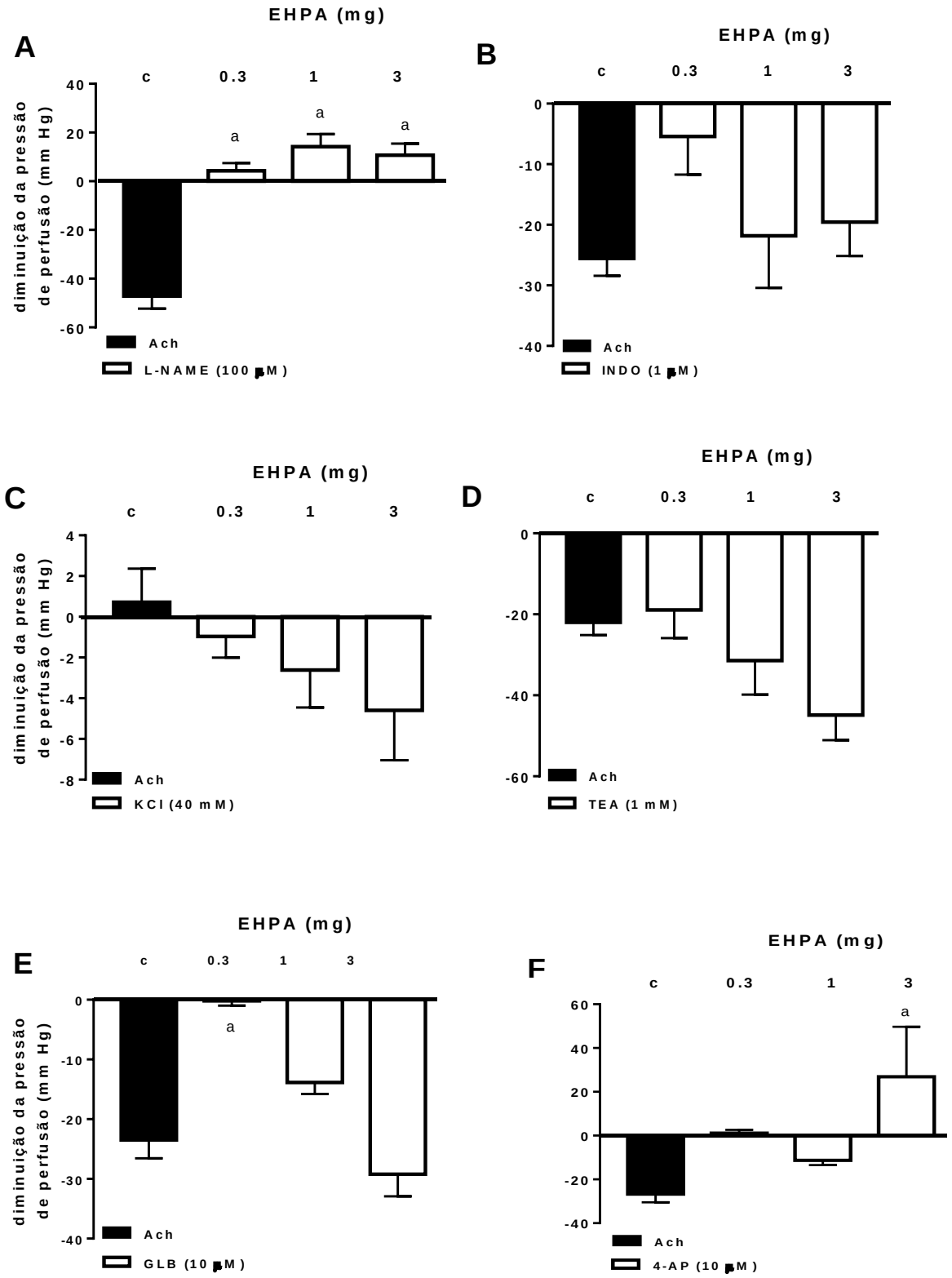
Figura 20 - Efeitos do EHPA sobre o tônus vascular dos leitos vasculares mesentéricos (MVBs) na presença e ausência de endotélio.



Fonte: A autora

Legenda: MVBs foram perfundidos com PSS contendo Ach (3 μM) no endotélio intacto (A) ou desnudado (B) e o efeito vasorrelaxante do EHPA foi avaliado. Os resultados mostram a média ± erro padrão da média de 4 ou 5 preparações. No gráfico A a letra a indica $p<0,05$ em comparação com o grupo de controle (Ach), b indica $p<0,05$ em comparação com a respectiva dose anterior. No gráfico B a letra a indica $p < 0,05$ em comparação com a respectiva dose anterior, b indica $p<0,05$ em comparação com os efeitos do EHPA no endotélio intacto. End - e End +: endotélio desnudado e intacto, respectivamente. Ach: Acetilcolina.

Figura 21 - Efeitos do EHPA sobre o tônus vascular dos leitos vasculares mesentéricos (MVBs).



Fonte: A autora

Legenda: (MVBs) na presença e ausência de L-NAME (100 µM) (A), indometacina (1 µM) (B), KCl (40 mM) (C), TEA (10 µM) (D), glibenclamida (10 µM) (E) e 4-AP (10 µM) (F), MVBs foram perfundidos com PSS contendo Phe (3 µM) e o efeito vasorrelaxante do EHPA na presença ausência dos inibidores foram avaliados. Os resultados mostram a média ± erro padrão da média de 4 ou 5 preparações. A letra a indica $p < 0,05$ em comparação com o respectivo grupo controle (na ausência do inibidor).

6 CONCLUSÃO

A composição química do OE de *Piper amalago* evidenciou como compostos majoritários, o biciclogermacreno (11%), espatulenol (9,21%), β-felandreno (8,12%) e α-pineno (6,17%), enquanto que nos extratos aquoso e hidroalcoólico os compostos sugeridos são: ácido cinâmico, ácido cafeico, ácido quínico, 2-metoxi-4,5-metilenotrans-cinamolisobutilamida, N-[7- (3,4-metilenodioxifenil) -2Z,4Z-heptadienoico] pirrolidina, Di-O-hexosídeo, guinensina, vitexina e apigenina-6,8-di-C-glicosídeo.

O extrato hidroalcoólico e o óleo essencial apresentaram toxicidade para a linhagem tumoral de melanoma murino (CI_{50} de 104,31 ± 28,67 e 221,08 ± 141,10 µg/mL, respectivamente), no entanto, os valores ficaram fora do estabelecido pelo Instituto Nacional do Câncer (INC).

Em relação à toxicidade, EAPA, EHPA e OEPA podem ser considerados seguros após administração aguda em ratas, uma vez que não causaram mortalidade nem alterações significativas no comportamento, no ganho de peso corporal, no consumo de ração e água bem como alterações significativas no peso relativo dos órgãos vitais ou sinais de toxicidade nas análises histopatológicas.

Já em relação à eficácia da espécie em estudo, nossos dados demonstraram que ambas as doses (30 e 300 mg/kg) de EAPA e EHPA, bem como a menor dose (30 mg/kg) de OEPA apresentaram atividade diurética aguda significativas. No entanto, a atividade diurética prolongada de EAPA, EHPA e OEPA apresentaram valores mais expressivos do 5º ao 7º dia de tratamento, mais precisamente as 24 h após administração.

Avaliando as ondas e intervalos eletrocardiográficos (ECG), bem como através das análises estatísticas, não foram observadas diferenças significativas nos dados do ECG entre todos os grupos experimentais.

Nenhum dos extratos ou o OE foram capazes de promover efeitos hipotensores, contudo, para o estado redox tecidual, o extrato aquoso e hidroalcoólico apresentaram resultados antioxidantes estatisticamente significativos.

Somente o EHPA promoveu efeitos vasodilatadores em vasos de resistência. Os efeitos aparentam serem dependentes da liberação de NO endotelial e da ativação de canais de potássio dependentes de voltagem.

Baseado nos resultados apresentados nesse estudo pode-se tomar como hipótese alguns mecanismos farmacológicos pelo qual os extratos e o óleo essencial de *P. amalago* podem exercer efeitos renais e cardiovasculares. Estudos posteriores serão necessários para esclarecer estes possíveis mecanismos e ajudar a confirmar ou refutar essas pospostas e, através de ensaios pré-clínicos, validar os efeitos renais e cardiovasculares desta espécie.

Os dados apresentados destacam a eficácia do extrato de *P. amalago* e mostram que esta espécie pode ser uma forte candidata ao desenvolvimento de um novo fitoterápico para o tratamento de doenças cardiovasculares, quando houver necessidade de atividade diurética, especialmente pela ausência de toxicidade nas doses avaliadas.

Adicionalmente, o presente estudo vem corroborar com o uso de folhas de *P. amalago* como diurética na medicina tradicional.

REFERÊNCIAS

ABENSUR, H. **e-book-Biomarcadores na Nefrologia**. Associação Brasileira de Nefrologia. 2011. Disponível em: https://arquivos.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf. Acesso em: 21 fev. 2021.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. Ed. Illinois: Allured Publishing Corporation. 2017.

ALCASENA, M. S.; MARTINEZ, J.; ROMERO, J. Hipertensión arterial sistémica: Fisiopatoligía. **ANALES Sin San Navarra,** v. 21, p.7-18, 1998.

ALEXANDRE, R.F; BAGATINI, F; SIMÕES, C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 18, n. 1, p. 117-126, mar. 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. - **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos** – Versão 2. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, Brasília (Brasil): Ministério da Saúde; 2013.

ARRIGO, J. S. *et al*. Anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritic activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 101-109, 2016.

AYESH, B. M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. In vitro inhibition of human leukemia THP1cells by *Origanum syriacum* L, and *Thymus vulgaris* L, extracts. **BMC Research Notes,** v. 7, n. 1, p. 612, 2014.

BATISTA, J. M. *et al*. Further monoterpene chromane esters from Peperomia obtusifolia: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters,** v. 53, n. 45, p. 6051-6054, 2012.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, 1996.

BERTOCCO, A. R. P. *et al*. Microscopic diagnosis of the leaf and stem of *Piper solmsianum* C.D.C. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, n. 8, p. 831-837, 2017.

BOONE, C. V.; MOTA, J. S. **Avaliação da atividade antioxidante e citotóxica uma amida pirrolidínica isolada das folhas de *Piper amalago***. Anais do Enic, n. 2, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram 1qquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v, 72, p. 248-54, 1976.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014.

BRASIL**.** Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.

BUDEL, J. M. *et al*. Essential Oils of Five *Baccharis* Species: Investigations on the Chemical Composition and Biological Activities**. Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2620, 2018.

CAMPOS, K.E.; BALBI, A.P.C.; ALVES, M.J.Q.F. Efeitos do extrato aquoso de cebola (Allium cepa L.) sobre a função renal e a pressão arterial em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 1, p. 24-29, 2005.

CARRARA, V. S. *et al*. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 447-454, 2013.

CARRARA, V., et al. HPLC analysis of supercritical carbon dioxide and compressed propane extracts from *Piper amalago* L. with antileishmanial activity. **Molecules***,* v.17, p.15-33, 2012.

CARRARA V. S. *et al*. Supercritical fluid extraction of pyrrolidine alkaloid from leaves of *Piper amalago* L. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-6, 2017.

CHANDRA, P. *et al*. Quantitative determination of chemical constituents of *Piper* spp. using UPLC–ESI–MS/MS. **Industrial Crops and Products,** v. 76, p. 967-976, 2015.

CONTER, L. U. *et al*. **Screening de plantas nativas de Rio Grande do Sul quanto ao seu potencial citotóxico na linhagem celular de carcinoma epiderme de boca KB.** Revista de Iniciação Científica da Ulbra, n. 13, 2015.

CRUCHTEN, S. V.; BROECK, W. V. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. **Anatomy,Histology and Embryology**, v. 31, n. 4, p. 214–223, 2002.

DOMINGUEZ, X. A.; ALCORN, J. B. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of northeastern Mexico**. Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 139-156, 1985.

DORIGONI, P. A. *et al*. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 4, p. 69-79, 2001.

DOS SANTOS, A. L. *et al*. Chemical characterisation of *Piper amalago* (Piperaceae) essential oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry (GC×GC/qMS) and their antilithiasic activity and acute toxicity. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 5, p. 432–445, 2018.

DOS SANTOS V. L. P. *et al*. Review of *Piper* species growing in the Brazilian State of Paraná with emphasize on the vegetative anatomy and biological activities. **The *Botanical Review*,** v. 87, n. 1, p. 23-54, 2021.

DUARTE, J. D.; COOPER-DEHOFF, R. M. Mechanisms for blood pressure lowering and metabolic effects of thiazide and thiazide-like diuretics. **Expert Review of Cardiovascular Therapy,** v. 8, n. 6, p. 793-802, 2010.

FAN, L. S. Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*. **International Journal pf Agricultural and Biological**, v. 13, n. 4, p. 517-522, 2011.

FERNANDES, T. B. Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de compostos arilsulfonil-hidrazônicos. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

FERRAZ, A. B. F. *et al*. Acaricidal activity and chemical composition of the essencial oil from three *Piper* species. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 243-248, 2010.

FERREIRA, F. S. **Drug interactions of phytotherapy used in the insonnia treatment: A brief review**. Visão Acadêmica, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 60-71, 2019.

FERREIRA, S.H.; Barata, L.E.S.; Salles-Filho, S.L.M.; Queiroz, S.R.R.; Corazza, R.; Farias, R.C. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998, p. 131.

GALLUZZI, L. *et al*. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GAO, S. J. *et al.* Antioxidant effects of superoxide dismutase and horseradish peroxidase on lipid peroxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 864, n. 1, p. 284-287, 1998.

GASPAROTO JUNIOR, A. *et al*. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 210-215, 2011.

GASPAROTTO JUNIOR, A. *et al.* Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus (Tropaeolaceae)* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 517-522, 2009.

GIULIETTI, A. M. *et al*. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GOGOSZ, A. M. *et al*. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (*Piperaceae*). **Acta Botanica Brasilica**, v. 63, n. 2, p. 405-417, 2012.

TAKEARA, R. *et al.* Biological Properties of Essential Oils from the *Piper* Species of Brazil: A Review. **Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature,** 2017. Doi.org/10.5772/66508

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. ed. 11, p. 655- 686; 705-734, Mc Graw Hill, 2010.

GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G. Larvicidas ecológicos de plantas indianas: Eficácia do acetato de lavandulila e biciclogermacreno na malária, dengue e vetores de mosquito da encefalite japonesa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 395-402, 2016.

GRAIDIST, P.; MARTLA, M.; SUKPONDMA, Y. Cytotoxic Activity of *Piper cubeba* Extract in Breast Cancer Cell Lines. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2707-2718, 2015.

GUARNIER, L. P. *et al*. Development of a predictive model to induce atherogenesis and Hepato-Renal impairment in female rats. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 664, 2019.

GUIMARÃES, A.G. *et al.* Atividade farmacológica de monoterpenos. **In Farmacognosia: Coletânea Científica**; Souza, G.H.B., Mello, J.C.P., Lopes, N.P., Eds.; UFOP: Ouro Preto, Brazil, 2011, 372 p.

GUIMARÃES, E.F., VALENTE, C. Piperaceae – *Piper*. In: Reitz, R. (Ed**.), Flora ilustrada catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 2001.

GUIMARÃES, E.F.; CARVALHO-SILA, M. Piperaceae In: Wanderley, M.G.L., Martins, S.E., Romanini, R.P., Melhem, T.S., Shepherd, G.J., Giulietii, A.M., Pirani, J.R., Kirizawa, M., Melo, M.M.R.F., Cordeiro, I., Kinoshita, L.S. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 7, p. 263320, 2012.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. HOYO-VADILLO, N. Alkaloids from *Piper*: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. N. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 163-193, 2013.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HERNANDEZ, O. C. *et al.* Actividade inseticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* spp.) em Drosophila melanogaster**. Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v. 30, p. 67-73, 2014.

IWAMOTO, R. D. *et al*. The Hypotensive and Vasorelaxant Effect of *Piper amalago* L. (Piperaceae) Leaves Extract in Rats. **Archives of Pharmacal Research.** 2014.

JACOBS, H. *et al. Amides of Piper amalago var, nigrinodum.* **Indian Chemical Society**, v. 76, n. 11, p. 713-717, 1999.

JUSTO, S. C.; SILVA, C. M. *Piper methysticum* G. Forster: (KAWA-KAWA): A general approach. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 1, 73-82, 2008.

KARUPPANAPANDIAN, T. *et al*. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709-725, 2011.

KAU, S. T. *et al.* A method for screening diuretic agents in the rat, **Journal of Pharmacological Methods**, v. 11, n. 1, p. 67-75, 1984.

KAWASAKI, H. *et al.* Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. **Nature**, v. 335, n. 6186, p. 164-167, 1988.

KAWASAKI, H. *et al.* NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries. **American Journal of Physiology**, v. 261, n. 3, p. 683-90, 1991.

KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A.; DESCHAMPS, C. Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian *Piper* species: controlling *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidae) at the initial stage of development. **Acta Scientiarum. Agronomy,** v. 40, n.1, p. 327-345, 2018.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recomendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

LIMA, E. S.; ABDALA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LOPES, E. O. *et al*. Determinação da atividade antitumoral in vitro dos complexos de coordenação contendo os metais Zn (II) e Co (III). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, 2014.

LOPES, G. A. D. *et al*. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão**, v. 6, n. 2, p. 143-155, 2010.

LOPES, J. J. *et al*. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNSacting medicinal plants of *Piper* genus. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 1-2, p. 9-14, 2012.

MALACHIAS, M. V. B. *et al*. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 7 - Tratamento Medicamentoso. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1-83, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2016004800035&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 fev. 2021.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materiais. **Journal of Natural Products.** Lloydia, v. 25, n. 4, p. 320-331, 1962.

MALTA, D. C. *et al*. Prevalência da hipertensão arterial segundo diferentes critérios diagnósticos, Pesquisa Nacional de Saúde Prevalence of arterial hypertension according to different diagnostic criteria. National Health Survey. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, n. 1, p. 327-345, 2018.

MARTÍNEZ-BAUTISTA, B. G. *et al.* Traditional Uses of the Family Piperaceae in Oaxaca, Mexico. **Tropical Conservation Science**, v. 12, p. 194008291987931, 2019.

MARTINS, R. C. C. *et al*. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper* solmsianum. **Phytochemistry,** v. 64, n. 2, p. 667-670, 2003.

MEER, F. J. VAN DER. *et al*. Apoptosis and necrosis induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers in Medical Science,** v. 25, n. 2, p. 259-267, 2010.

MESQUITA, J. M. O. *et al.* Comparative study of the essential oils of some species of Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 6-12, 2005.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, J. S. *et al*. Identification of the Volatile Compounds of Leaf, Flower, Root and Stem Oils of *Piper amalago* (Piperaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants,** v. 16, n. 1, p. 11-16, 2013.

MULLALLY, M. *et al*. Anxiolytic activity and active principles of *Piper amalago* (Piperaceae), a medicinal plant used by Q'eqchi' Maya to treat susto, a culture-bound illness. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 147-154, 2016.

NAVICKIENE, H. M. D. *et al*. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *P. arboreum* and *P. tuberculatum*, **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2005.

NICOLUSSI, S. *et al*. Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. **Pharmacological Research,** v. 80, p. 52-65, 2014.

NOVAES, A. S. *et al*. Diuretic and antilithisiac activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). **Phytomedicine,** v. 21, n. 4, p. 523-528, 2014.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425. In: OECD (ed.). **Acute Oral Toxicity** – Upanddown-procedure (UDP). Paris, France, p. 1-27. 2008.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v.** 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 4ª ed. 2010. 716 p.

PARMAR, V. S. *et al*. Phytochemistry of the Genus *Piper*, Review. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 591-673, 1997.

PEREIRA, R.; GUEDES, A.; DA SILVA, G. E. O extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Piper caldense* C.DC. na redução do consumo de álcool em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.17, n. 1, p.157-163, 2015.

PEZOLATO, V. A. *et al*. Acompanhamento eletrocardiográfico no desenvolvimento de ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 69, n. 1, p. 39-48, 2017.

Piperaceae **in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora,jbrj,gov,br/reflora/floradobrasil/FB190>. Acesso em: 06 out, 2020.

Piper *amalago* L. no Secretariado do GBIF (2019). **Taxonomia de backbone do GBIF**. Conjunto de dados da lista de verificação. Doi.org/10.15468/39omei acessado via GBIF.org em 15-02-2021.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 246-251, 2006.

QUÍLEZ, A. *et al*. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpunya,* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 128, n. 3, p. 583-589, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M.M. e RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RODRIGUES, T. S. *et al*. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *Plectranthus ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, p. 587-590, 2011.

ROUSH, G. C.; KAUR, R.; ERNST, M. E. Diuréticos. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n. 1, p. 5-13, 2013.

ROVANI, G.T. *et al*. Antioxidant and phytochemical investigation of the aerial vegetative *Piper amalago* L. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v. 2, p. 164-177, 2013.

SALEHI, B. *et al*. Review *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry. Biological Activities and Applications. **Molecules,** v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.

SANTOS, R. F. *et al.* Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, p. 224-234, 2012.

SANTOS, V. L. P. *et al.* Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 85-91, 2015.

SANTOS, V. L. P. dos *et al*. Anatomy and microscopy of *Piper caldense*, a folk medicinal plant from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 28, 9-15, 2018.

SANTOS, V. L. P. *et al*. The wound healing effect of aqueous extract from *Piper amalago* L. in diabetic patient. **Explore**, v. 16, n. 6, p. 368-371, 2020.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Departamento de Hipertensão Arterial. VII Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 107, n. 3, 2016.

SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. Estimation of Total Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 1192-1205, 1968.

SILVA, J. A. *et al*. Atividade antioxidante de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* and *Piper divaricatum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 31, p. 700-706, 2014.

SILVA J. K. *et al*. Diversidade química, atividade biológica e aspectos genéticos de três espécies de Ocotea da Amazônia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1081-1095, 2017.

SILVA, L. E.; QUADROS, D. A.; MARIA NETO, A. J. Estudo etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas na região de Matinhos – PR. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 2, p. 266-276, 2015.

SINGI, G. *et al*. Efeitos agudos dos extratos hidroalcoólicos do alho (*Allium sativum* L.) e do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre a pressão arterial média de ratos anestesiados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 94-97, 2005.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição,** v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOBEY. C. B. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 1, p. 28-38, 2001.

SORENSEN, C. M. *et al*. Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 302, n. 5, F505–518, 2012.

SOUSA, C. M. M. *et al*. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n.2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, P. J. C. *et al*. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 217-221, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 703 p.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. **In: Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity.** Hostettmann K. editor. London: 6: Academic Press, Assays related to cancer drug discovery, p. 71–133, 1990.

THIN, D.B. *et al*. Chemical analysis of essential oils of *Piper laosanum* and *Piper acre* (Piperaceae) from Vietnam. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 1, p. 181–188, 2018.

TIRLONI, C. A. S. *et al*. Ethnopharmacological approaches to kidney disease prospecting an indigenous species from Brazilian Pantanal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 47-57, 2018.

TOLOUEI, S. E. L. *et al*. *Celosia argentea* L. (Amaranthaceae) a vasodilator species from the Brazilian Cerrado – An ethnopharmacological report. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 229, p. 115-126, 2018.

VERCEZI, G. D. *et al.* Condição de saúde e utilização da árvore dos problemas em pacientes hipertensos na atenção primária. **Saúde Coletiva**, v. 9, n. 49, 2019.

ZHIVOTSKY, B. Apoptosis, Necrosis and Between. **Cell Cycle**. v. 3, n. 1, p. 64-66, 2004.

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELO COMITÊ DE ÉTICA

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Dourados-MS, 20 de Abril de 2020.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação etnofarmacológica de *Piper amalago* L. (Piperaceae)", registrada sob o protocolo de nº 28/2019, sob a responsabilidade de Arquimedes Gasparotto Junior – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontrase de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 08/11/2019.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2021 a 31/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus – Wistar
Nº de animais	105
Peso/idade	3 meses
Sexo	15 fêmeas e 90 machos
Origem	Biotério Central da UFGD

Melissa Negrão Sepulvida Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso. Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br

ANEXO B – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO PELO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (CGEN/SISGEN)

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

Certidão

Cadastro nº A14F6AF

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

Número do cadastro:	**A14F6AF**
Usuário:	**UEPG**
CPF/CNPJ:	**80.257.355/0001-08**
Objeto do Acesso:	**Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:	**Pesquisa**

Espécie

Piper amalago
Piper caldense Piper corcovadensis

Título da Atividade:

Análise microscópica, química e biológica de três espécies de *Piper*: *P. amalago*, *P. caldense* e P. corcovadensis

Equipe

JANE MANFRON BUDEL	**UEPG**
Vera Lucia Pereira dos Santos	**Uninter**
Luciane Mendes Monteiro	**UEPG**
Arquimedes Gasparotto Júnior	**UFGD**

Parceiras Nacionais

07.775.847/0001-97 / Universidade Federal da Grande Dourados

Parceiras no Exterior

CAMAG Scientific, Inc

Envios de Amostra

Espécie: **Piper amalago**
Tipo do Patrimônio Genético: **-**
Forma do Patrimônio Genético: **Amostra sólida em tubo de microcentrífuga (eppendorf)**
Instituição Destinatária: **CAMAG Scientific, Inc** Sede da Instituição Destinatária: **515 Cornelius Harnett Drive, Wilmington, Carolina do Norte, 28401, Estados Unidos**

Espécie: **Piper caldense**
Tipo do Patrimônio Genético: **-**
Forma do Patrimônio Genético: **Amostra sólida em tubo de microcentrífuga (eppendorf) CAMAG Scientific, Inc**
Instituição Destinatária:

Sede da Instituição Destinatária: **515 Cornelius Harnett Drive, Wilmington, Carolina do Norte, 28401, Estados Unidos**

Espécie: **Piper corcovadensis**

Tipo do Patrimônio Genético: **-**

Forma do Patrimônio Genético: **Amostra sólida em tubo de microcentrífuga (eppendorf)**

Instituição Destinatária: **CAMAG Scientific, Inc**

Sede da Instituição Destinatária: **515 Cornelius Harnett Drive, Wilmington, Carolina do Norte, 28401, Estados Unidos**

Data do Cadastro: **07/10/2019 12:38:19**
Situação do Cadastro: **Concluído**
Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:29** de **17/11/2020**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN