



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**

**ESTUDO DA TOXICIDADE PRÉ CLÍNICA DO EXTRATO BRUTO
ETANÓLICO DE *Piper aduncum***

KATARINA MIRNA MARINHO TENÓRIO RODRIGUES

**PALMAS-TO
2023**

KATARINA MIRNA MARINHO TENÓRIO RODRIGUES

**ESTUDO DA TOXICIDADE PRÉ CLÍNICA DO EXTRATO BRUTO
ETANÓLICO DE *Piper aduncum***

Tese de doutorado apresentada ao Curso
de Doutorado do Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia da Rede BIONORTE, na
Universidade Federal do Tocantins.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Nobre L.
do Nascimento

Coorientadora: Prof. Dra. Juliana
Moreira Fonseca

PALMAS-TO
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

R696e Rodrigues, Katarina Mima Marinho Tenório.
 ESTUDO DA TOXICIDADE PRÉ CLÍNICA DO EXTRATO BRUTO
 ETANOLICO DE *Piper aduncum*. / Katarina Mima Marinho Tenório
 Rodrigues. – Palmas, TO, 2023.
 56 f.

 Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
 Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em
 Biodiversidade e Biotecnologia, 2023.
 Orientador: Guilherme Nobre L. do Nascimento
 Coorientador: Juliana Fonseca Moreira da Silva

 1. *Piper aduncum*. 2. Plantas Medicinais. 3. Toxicidade. 4. Bioensaios. I
 Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

KATARINA MIRNA MARINHO TENÓRIO RODRIGUES

ESTUDO DA TOXICIDADE PRÉ CLÍNICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *Piper aduncum*

Tese de doutorado apresentada ao Curso
de Doutorado do Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia da Rede BIONORTE, na
Universidade Federal do Tocantins.

Aprovada em 03/03/2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **GUILHERME NOBRE LIMA DO NASCIMENTO**
Data: 02/06/2023 13:49:15-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Guilherme Nobre do Nascimento (Orientador)
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 **ELISANDRA SCAPIN**
Data: 02/06/2023 19:51:22-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profª. Dra Elisandra Scapin
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 **PABLINNY MOREIRA GALDINO DE CARVALHO**
Data: 02/06/2023 18:57:57-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profª. Dra. Pablinny Moreira Galdino de Carvalho
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Documento assinado digitalmente
 **VICTOR RODRIGUES NEPOMUCENO**
Data: 03/06/2023 11:03:04-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Victor Rodrigues Nepomuceno
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 **WILSON JOSE ALVES PEDRO**
Data: 05/06/2023 11:38:37-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Wilson José Alves Pedro
Universidade Federal de São Carlos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora por terem me guiado nesta longa jornada de trabalho e pesquisa.

Aos meus pais Geneci e Elisa, minhas irmãs Cecília e Juliana que mesmo morando longe, estiveram sempre presentes, me apoiando e incentivando, a eles todo meu amor e muito obrigada por tudo.

Ao meu filho Heitor por toda paciência e colaboração. Tantas vezes me acompanhou nos experimentos no laboratório até à noite e sempre se comportou bem sem reclamar e participou ativamente das coletas da planta.

Ao meu marido, Gustavo por me dar apoio neste estudo. Agradeço pela compreensão por muitas vezes ter que estudar até tarde da noite e trabalhar nos fins de semana e me ausentar dos nossos programas em família.

Ao professor Guilherme Nobre, meu orientador, que ensinou e esteve presente nas longas análises.

Meu muito obrigada a todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES).

RODRIGUES, Katarina Mirna Marinho Tenório. **Estudo da toxicidade pré-clínica do extrato bruto etanólico de *Piper aduncum*** – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2023.

RESUMO

As plantas medicinais são bastante utilizadas mundialmente, o uso destas plantas é baseado no conhecimento das populações para fins profiláticos e terapêuticos, necessitando de comprovação das ações farmacológicas e segurança do uso. Devido a diversidade de compostos bioativos que possuem atividades biológicas e químicas, tornaram-se foco de pesquisas contribuindo para produção de novos medicamentos utilizados na atualidade. Os bioensaios são realizados para avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos produtos vegetais, sendo testes preliminares, *in vitro*, dos ensaios *in vivo*. A *P. aduncum* é uma planta utilizada de forma empírica em forma de chás, infusões, alimentação e como repelentes, porém o potencial toxicológico não parece totalmente elucidado. O objetivo deste trabalho foi de avaliar *in vitro* o potencial toxicológico do extrato bruto etanólico de *P. aduncum* através de ensaios pré-clínicos e determinar a menor dose tóxica possível em bioensaios para futuros testes em repelência e bioinseticida. Os ensaios foram realizados com extrato bruto etanólico nas concentrações de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml. Para determinar a CL₅₀, foi realizado testes com náuplios de *A. salina* que demonstrou o extrato bruto etanólico de *P. aduncum* pode ser considerado tóxico, pois na concentração de 10 µg/ml ocorreu letalidade de 56.6% dos náuplios, e à medida que as concentrações do extrato bruto aumentaram, observou-se maior letalidade dos microcrustáceos. O teste antiproliferativo de *Allium cepa* é indicado para avaliar alterações celulares, um importante bioindicador toxicológico inicial. Observou-se ação antiproliferativa no grupo de 100 µg/ml inibindo o crescimento radicular, apresentando assim potencial citotóxico. A fragilidade osmótica eritrocitária é utilizada como biomarcador do estresse oxidativo da membrana eritrocitária em contato com substâncias tóxicas. Testou-se a interação do extrato bruto de *P. aduncum* com a membrana de eritrócitos humanos em concentrações crescentes de NaCl de 0.12% a 0.9%. As concentrações testadas do extrato não apresentaram efeito tóxico na membrana dos eritrócitos. O potencial alelopático do extrato de *P. aduncum* sobre as sementes de alface foi determinado pela germinação total e índice de velocidade de germinação das sementes. As concentrações testadas do extrato de *P. aduncum* não apresentaram potencial alelopático significativo, havendo redução de germinação da raiz na maior concentração testada. As concentrações do extrato bruto etanólico de *P. aduncum* demonstraram potencial tóxico no desenvolvimento celular.

Palavras-chave: *Piper aduncum*; plantas medicinais; toxicidade; bioensaios.

ABSTRACT

Medicinal plants are worldwide used, the use of these plants is based on the knowledge of populations prophylactic and therapeutic purposes, requiring proof of pharmacological actions and safety of use. Due to the diversity of bioactive compounds that have chemical activities, they become the focus of research contributing to the production of new drugs used today. The bioassays are carried out to evaluate the possible toxic effects of the vegetal products, being preliminary test *in vitro*, of the *in vivo* assays. *P. aduncum* is a plant used empirically in forms of teas, infusions, food and as repellents, however, the toxicological potential does not seem to be fully elucidated. The objective of this work was to evaluate *in vitro* the toxicological potential of the ethanolic crude extract of *P. aduncum* through pre-clinical tests and to determine the lowest toxic dose in bioassays for future tests in repellency and bioinsecticide. The test was carried out with crude ethanolic extract at concentrations of 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml. To determine the LC₅₀, tests were performed with nauplii of *A. salina* and demonstrated the crude extract of *P. aduncum* can be considered toxic, since at a concentration of 10 µg/ml there was a lethality of 56.6% of the nauplii, and as the concentration of the crude extracts increased, there was a greater lethality of microcrustaceans. The *Allium cepa* antiproliferative test is indicated to evaluate cellular alterations, an important initial toxicological bioindicator. Moreover, there is antiproliferative action in the group of 100 µg/ml inhibiting root growth, presenting cytotoxic potential. Erythrocyte osmotic fragility is used as a biomarker of oxidative stress of the erythrocyte membrane in contact with toxic substances. It was tested the interaction of the crude *P. aduncum* extract with the membrane of human erythrocytes at increasing concentrations of NaCl from 0.12% to 0.9%. The concentrations of the analyzed extract do not have a toxic effect on the erythrocyte membrane. The allelopathic potential of crude *P. aduncum* extract against lettuce seeds through total seed germination and the germination speed index. Concentrations of the tested *P. aduncum* extracts do not present significant allelopathic potential, meaning they reduce the root germination process at the highest concentration tested. The concentrations of crude extract of *P. aduncum* demonstrate toxic potential in cell development.

Key words: *Piper aduncum*; medicinal plants; toxicity; bioassays.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 A- Aspecto da <i>Piper aduncum</i>	7
Figura 1B - Arbusto da <i>Piper aduncum</i> .	8
Figura 2 - Náuplios de <i>A. salina</i> .	9
Figura 3 - Letalidade de <i>A. salina</i> nas concentrações de extrato etanólico de <i>P. aduncum</i> .	18
Figura 4 – Fragilidade osmótica eritrocitária das amostras de sangue tratadas com concentrações do extrato etanólico de <i>P. aduncum</i> e solução salina (NaCl 0,9%) como controle.	20
Figura 5 – Comprimento do crescimento das raízes das plântulas de alface submetidas ao tratamento do extrato bruto de <i>P. aduncum</i> .	22
Figura 6 – Comprimento do crescimento das folhas das plântulas de alface submetidas aos tratamentos com o extrato de <i>P. aduncum</i> .	23
Figura 7 – Processo de extração da <i>Piper aduncum</i> pelo método de Soxhlet.	35
Figura 8 – Ensaio com náuplios de <i>A. salina</i> em contato com extrato etanólico de <i>P. aduncum</i> .	36
Figura 9 – Resultado do ensaio <i>A cepa</i> . Raízes das cebolas no grupo controle.	37
Figura 10 – Plântulas de alface em água após 7 dias de germinação em água destilada.	38
Figura 11 – Plântulas de alface após 7 dias de germinação em contato com extrato de <i>P. aduncum</i>	39
Figura 12 - Teste de fragilidade osmótica eritrocitária. Amostras após incubação.	40
Tabela 1 - Média do crescimento da raiz de <i>Allium cepa</i> , índice de crescimento relativo e índice de germinação.	19
Tabela 2 - Índice de velocidade de germinação (GSI) das sementes <i>Lactuca sativa</i> .	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GI: Índice de germinação.

RGI: Índice de crescimento relativo.

RLS: comprimento da raiz da amostra.

RLC: comprimento da raiz do controle.

IVG: Índice de velocidade de germinação

CL₅₀: Concentração letal à 50% da amostra.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 OBJETIVO	4
3 CAPÍTULO 1: ESTUDO TEÓRICO	5
3.1 PLANTAS MEDICINAIS medicinais	5
3.2 <i>Piper aduncum</i>	6
3.3 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS DE PLANTAS MEDICINAIS	8
3.3.1 Ensaio com <i>Artemia salina</i>	9
3.3.2 Teste antiproliferativo com <i>Allium cepa</i>	10
3.3.3 Potencial alelopático	10
3.3.4 Fragilidade osmótica eritrocitária humana	11
4 CAPÍTULO 2	12
Evaluation of the <i>in vitro</i> toxicological potential of crude <i>Piper aduncum</i> extract	12
5 CONCLUSÃO	28
6 PERSPECTIVAS	29
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
APÊNDICE	35
ANEXO 1 Identificação da amostra no Herbário do Núcleo de Estudos Ambiental da Universidade Federal do Tocantins	41
ANEXO 2: Comprovante de aceite do artigo: Evaluation of the <i>in vitro</i> toxicological potential of crude <i>Piper aduncum</i> extract	42
ANEXO 3: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	44
ANEXO 4: Artigo: Toxic and antimicrobial potential from <i>Piper aduncum</i> crude extract	46
ANEXO 5: Artigo: Particularidades da infecção por diferentes estirpes de coronavírus em animais domésticos e de produção	47

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é uma importante fonte de biodiversidade com diferentes ecossistemas como cerrado, mata atlântica e floresta amazônica e devido à grande diversidade, as plantas medicinais brasileiras não foram totalmente investigadas havendo necessidade de testar essas plantas a fim de descobrir novos metabólitos secundários (BOLZANI, 2012; MATHEUS et al. 2017, NEWMAN 2017). O conhecimento e uso destas plantas é adquirido de forma empírica, de geração em geração, muitas plantas necessitam de comprovação das ações farmacológicas e segurança do uso (SOUZA, 2016). As plantas medicinais são bastante utilizadas mundialmente e a Organização Mundial de Saúde (OMS) incentiva o uso, principalmente em países em desenvolvimento (MATOS et al. 2018).

Os metabólitos produzidos pelas plantas podem agir de forma farmacológica como toxicológica, portanto estudos são necessários para evidenciar essas características pois muitas plantas já utilizadas pela população apresentam efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos quando utilizadas em determinadas concentrações e podem ser potencialmente inseguro e causar efeitos adversos a curto ou longo prazo (BEZERRA et al. 2016; DRAGOS e GLICA, 2018). Sendo necessário testar o potencial toxicológico dos extratos vegetais juntamente com os ensaios de atividade biológica de uma espécie (LOPES et al. 2016).

Piper aduncum é uma planta da família Piperaceae, nativa da região amazônica e amplamente utilizada de forma empírica pela população em forma de chás, infusões, alimentação, apresentando diferentes efeitos farmacológicos contra dores gastrointestinais, infecções, febre, antiparasitária, antirreumática, antitumoral e também como repelente. O dilapiol é o principal metabólito caracterizado quimicamente (GAÍNZA et al. 2016; MGBEAHURUKE et al. 2017).

Portanto, é importante conhecermos os reais efeitos terapêuticos e tóxicos desta planta em estudo para proporcionar maior segurança de uso tanto para população quanto para os profissionais que a utiliza em suas condutas e prescrições. Para tanto, este trabalho foi realizado no formato de dois capítulos, sendo o primeiro uma parte teórica e o segundo capítulo a realização de testes com o extrato desta planta colhida na região de cerrado em Palmas, Tocantins.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi de avaliar *in vitro* o potencial toxicológico do extrato bruto etanólico de *P. aduncum* através de ensaios pré-clínicos e determinar a menor dose tóxica possível.

3 CAPÍTULO 1 - ESTUDO TEÓRICO

3.1 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais para tratamento de enfermidades está relacionado à evolução humana sendo parte da medicina popular baseada no conhecimento das populações para fins profiláticos e terapêuticos (FARIA et al. 2012; OLIVEIRA et al. 2015). A prática do uso destas plantas apresenta relevância para cuidado e promoção da saúde, são utilizadas para tratamento de diversas doenças e devido a diversidade de compostos bioativos que possuem atividades biológicas e químicas, tornaram-se foco de pesquisas contribuindo para produção de novos medicamentos utilizados na atualidade (SEN & SAMANTA, 2014; YANG et al. 2017; GOMES et al. 2021).

A Organização Mundial da Saúde (WHO) reconhece a importância da medicina tradicional como tratamento de saúde, tanto para manutenção da saúde, tratamento e prevenção de doenças e o uso das plantas medicinais vem sendo utilizada nos sistemas de atenção básica à saúde (WHO 2019). O uso das plantas medicinais é uma maneira eficaz de atenção primária à população que não possui acesso aos medicamentos convencionais (CALIXTO, 2005) e quando utilizadas de forma correta apresentam vantagens sobre os medicamentos convencionais devido à acessibilidade, baixo custo e geralmente, menos efeitos colaterais. Em países em desenvolvimento, pode ser uma alternativa aos tratamentos convencionais, porém não devem ser vistos como produtos não tóxicos, pois possuem componentes farmacologicamente ativos (OLIVEIRA et al. 2015; BHATTACHARYA, 2017, RIBEIRO, 2021).

Os metabólitos secundários das plantas, responsáveis pelo mecanismo de defesa e adaptação da planta ao ambiente, possuem atividades de repelência, antivirais antifúngicas, bactericidas (CARDOSO et al. 2019). O isolamento e identificação dos compostos bioativos permitem a obtenção dos compostos puros, aumentando suas propriedades e possibilitando a redução dos efeitos colaterais e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (CALIXTO, 2005; PERTINO et al. 2007).

As plantas medicinais podem apresentar efeitos tóxicos não conhecidos, mesmo sendo amplamente utilizada pela população, pois muitas vezes não há indicação médica para o uso e pode haver riscos à saúde (ZENI et al. 2017). Portanto, há necessidade de realização de pesquisas para esclarecer e confirmar as informações do uso popular da planta medicinal, isto

é, a eficácia, reduzindo os possíveis efeitos toxicológicos e colaterais a fim de tornar seguro o uso (FIRMO, 2011; BHATTACHARYA, 2017).

3.2 *Piper aduncum*

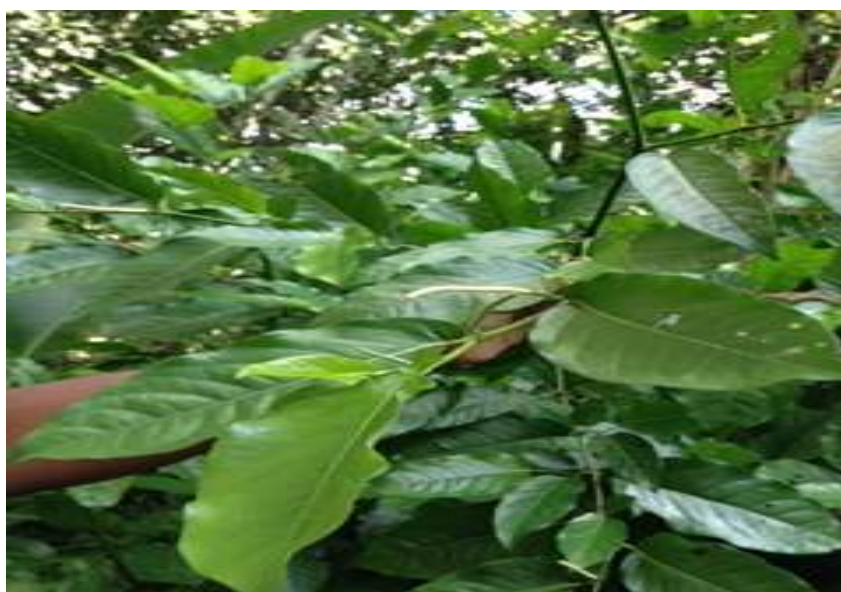
O gênero *Piper* é o maior da família Piperaceae, contendo aproximadamente 2000 espécies de plantas distribuídas em regiões úmidas tropicais e subtropicais, e classificada com planta aromática por possuir células com óleos em quase todas as espécies de *Piper* (DYER, 2004; BERNUCI et al. 2016). O gênero abrange muitas espécies que são amplamente utilizadas como alimentos, temperos culinários e na medicina tradicional, principalmente, para controle e tratamento de diversas enfermidades, como também repelente de insetos.

A *Piper aduncum*, figuras 1 A e 1B, conhecida com pimenta de macaco, aperta-ruão, jaborandi do mato, pimenta-do-fruto-ganchoso, aperta-joão, falso-jaborandi, matico e pimenta-longa (LORENZI & MATOS, 2002; SOUSA et al., 2008) é um amplamente distribuído na América Central e do Sul, cresce naturalmente no Brasil na região amazônica e floresta Atlântica (PAVAELA, 2016; LUCENA, 2017; LENTZ, 1998). *P. aduncum* é um arbusto que pode alcançar de 6 a 8 metros de altura, com maior incidência em solo arenoargiloso, possui folhas alternadas e pecíolos curtos, folhas ovais e alongadas que se afunilam. Todas as partes da planta apresentam aroma apimentado (AHMAD & RAHMANI 1993; dos SANTOS et al. 2015). É amplamente utilizada para fins medicinais para como tratar desordens gastrointestinais, anti-inflamatório, diurético, antiparasitário, antibacteriano e repelente de insetos (LUCENA et al. 2017, DURANT-ARCHIBOLD, 2018).

As folhas de *P. aduncum* contem compostos químicos como flavonoides, polifenóis e saponinas, no entanto, sabe-se que dependendo da região geográfica a ser coletada, a variedade de compostos químicos pode influenciar as propriedades biológicas dos extratos e óleo essencial (GUTIÉRREZ et al, 2016). O óleo essencial de *P. aduncum* possui compostos dos grupos químicos dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, sendo composto principalmente pelo fenilpropanoide dilapiol, cujos níveis pode variar de 31,5 a 91,1 % de acordo com a localização geográfica da planta (MAIA et al. 1998, MAISFORTE et al. 2022). Segundo FAZOLIN et al., (2016) a *P. aduncum* localizada na Amazônia Ocidental apresenta alto teor de dilapiol, o que possibilita a produção em escala comercial. O dilapiol é o principal composto inseticida do extrato e do óleo essencial das folhas de *P. aduncum*, estudos demonstram a baixa toxicidade de *P. aduncum* ao ambiente (BERNARD et al.1995).

RIDZUAN et al. (2019) demonstraram que o extrato etanólico de *P. aduncum* na concentração de 50 mg/ml foi eficaz como potente larvicida de *Aedes aegypti* em baixo tempo de exposição, menos de 10 minutos, mostrando assim uma alternativa do controle de larvas. SCALVENZI et al. (2019) testaram óleo essencial de *P. aduncum* contra larvas de mosquitos *A. aegypti* e após 24 horas de exposição, houve mortalidade de 100% das larvas. Estudos anteriores demonstraram que os óleos essenciais do gênero *Piper* são potenciais inseticidas biológicos (Da SILVA LIMA et al. 2014).

PICOLO (2014), através de estudos com extrato etanólico das folhas de *P. aduncum* demonstrou atividade contra leishmanias na forma amastigota de *L. amazonenses*, *L. shawi* e *L. braziliensis*.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 1A: Aspecto da *Piper aduncum*.



Fonte: Researchgate.net

Figura 1B: Arbusto de *P. aduncum*

3.3 Ensaio toxicológicos de plantas medicinais

Os ensaios de toxicidade laboratoriais são executados em condições controladas para avaliar a toxicidade das amostras testadas nos sistemas biológicos e determinar a toxicidade relativa das substâncias. Diferentes concentrações das amostras são testadas e os efeitos tóxicos provocados são quantificados (SÁNCHEZ-BAIN et al. 2004; COSTA et al. 2008).

Os bioensaios são realizados para avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos produtos vegetais, sendo testes preliminares, *in vitro*, dos ensaios *in vivo*. São importantes para determinar o potencial tóxico da substância a fim de evitar intoxicações. São testes de fácil execução, curta duração e acessíveis. Os testes de toxicidade aguda têm objetivo de indicar a concentração de uma substância que pode provocar danos nos indivíduos avaliados em um intervalo de tempo de 24 a 96 horas com resultados rápidos de imobilidade ou letalidade. Assim, estes testes garantem dados para outros estudos como testes de toxicidade crônica (RODRIGUEZ et al. 2009; VERRI et al. 2017).

3.3.1 Ensaio com *Artemia salina*

O teste com *Artemia salina* foi desenvolvido por MEYER et al. (1982) para detectar compostos bioativos de plantas que apresentam citotoxicidade. É um *screening* inicial para avaliar toxicidade de diversas substâncias vegetais. Os ensaios com *A. salina* apresentam baixo custo, são de simples manuseio e os efeitos tóxicos das amostras testadas causados sobre os náuplios são aplicados aos humanos, baseado na dose por unidade de superfície corporal, possibilitando relacionar possíveis riscos aos humanos. É amplamente utilizado com o teste de toxicidade aguda para determinar a Concentração letal para 50% da população (CL50) dos bioativos de extratos de plantas (ALVES et al. 2000, ROSYADI et al. 2020).



Fonte: researchgate.net

Figura 2: Náuplios de *A. salina*

3.3.2 Teste antiproliferativo com *Allium cepa*

O bioensaio toxicológico de *Allium. cepa*, padronizado por FISKEJÖ (1985), é aplicado para avaliar o potencial antiproliferativo, citotóxico, genotóxico e mutagênico de diversos agentes físicos, químicos e biológicos através da avaliação das células meristemáticas das raízes, pois estas ficam em contato direto com a amostra testada. E quando comparados os efeitos citotóxicos dos ensaios com *A. cepa* com testes de linhagens de células animais os resultados foram comparáveis e semelhantes (TEDESCO and LAUGHINHOUSE 2012). É um teste de baixo custo, de fácil reprodução, curta duração e alta sensibilidade (FISKEJÖ, 1985; BELCAVELLO et al. 2012). A avaliação citotóxica se dá pela análise dos parâmetros macroscópicos do tamanho, cor e formato da raiz (FRESCURA 2012).

3.3.3 Potencial alelopático

Os aleloquímicos são substâncias produzidas pelas plantas que possuem propriedades que podem afetar outras plantas de forma benéfica ou maléfica, devido ao efeito dos metabólitos secundários que podem afetar o desenvolvimento de microrganismos, a germinação, crescimento e desenvolvimento das plantas. Os compostos bioativos também podem apresentar efeitos tóxicos ou terapêuticos em humanos (KRUSE et al. 2000; FUONTES-GANDARA et al. 2019; BITENCOURT et al. 2021).

MILER (1996) classifica o efeito alelopático em autotoxicidade e heterotoxicidade, o primeiro é descrito com um mecanismo inespecífico da alelopatia que uma determinada espécie de planta libera aleloquímicos que afeta a germinação ou crescimento da própria espécie. O segundo efeito acontece quando o aleloquímico liberado tem potencial fitotóxico em outra espécie de planta. Estudos demonstram que os aleloquímicos podem ser usadas como alternativa biológica aos herbicidas sintéticos (KREMER et al. 2016, SCAVO 2019).

Sementes de alface (*Lactuca sativa*) são utilizadas como bioindicadores devido a rápida e uniforme germinação e a sensibilidade às concentrações baixas dos compostos alelopáticos testados (LIMA et al. 2018).

3.3.4 Fragilidade osmótica eritrocitária humana

A fragilidade osmótica eritrocitária é um teste de fácil execução e rápido que evidencia informações sobre a interação das substâncias testadas com a membrana celular (KHANNA et al. 2002). É amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de extratos vegetais que podem alterar a estrutura e fisiologia das hemácias (WACZUK et al. 2015). É um biomarcador do dano oxidativo da membrana em condições xenobióticas e tóxicas. Estima a hemólise diante estresse em variações de concentrações de cloreto de sódio, logo, o aumento da hemólise significa o aumento da fragilidade osmótica, e a diminuição significa estabilidade da membrana (SHARMA et al. 2010; IGBOKWE, 2016).

4 CAPÍTULO

Artigo submetido e aceito no Journal of Medicinal Plants Research

Evaluation of the *in vitro* toxicological potential of crude *Piper aduncum* extract

Rodrigues, K.M.M.T.¹, da Silva, J.F.M.²; do Nascimento, G.N.L.³

¹ Doutoranda Bionorte. Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde - LaCiBS, Universidade Federal do Tocantins 109 N, Av NS-15, ALCNO-14, Bloco L3 CEP: 77001-090, Palmas, Tocantins

² Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, - LMGA Universidade Federal do Tocantins, 109 N, Av NS-15, ALCNO-14, Bloco L3 CEP: 77001-090, Palmas, Tocantins

³ Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde - LaCiBS, Universidade Federal do Tocantins, 109 N, Av NS-

Abstract

Several substances derived from plant metabolism appear to have therapeutic effects, requiring toxicity and mutagenicity studies to determine their safe use capable of producing a satisfactory effect of the drug. Reports in the literature demonstrate that ethanolic extracts of *P. aduncum* leaves have antiprotozoal, antimalarial and insecticidal activity. The present study aimed to conduct pre-clinical toxicological tests of the ethanolic extract of *P. aduncum* to verify the possibility of using this extract in living beings without causing harmful effects. *P. aduncum* crude extract at the concentration of 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml and 1 µg/ml were used to perform toxicological tests. The *Artemia salina* assay was performed to determine LC₅₀ of plant extracts for nauplii, it can be considered toxic, since at a concentration of 10 µg/ml there was a lethality of 56.6% of the nauplii. Cellular alterations were evaluated in antiproliferative test with *Allium cepa* root alterations reducing the root growth as the extract concentration increases. The human erythrocyte osmotic frailty tested the interaction of the crude *P. aduncum* extract with the membrane of human erythrocytes, measuring free hemoglobin at increasing concentrations of NaCl from 0.12% to 0.9%. Allelopathic potential on germination and growth of *Lactuca sativa* determined the potential of crude *P. aduncum* extract against lettuce seeds through total seed germination and the germination speed index (GSI) it was observed that root growth (in mm) was reduced with increasing extract concentration. These concentrations of crude *P. aduncum* extract do not have a toxic effect on cell membrane, but they did demonstrate toxic potential in cell development.

Key words: *Piper aduncum*, bioassays, toxicology.

Introduction

Several substances derived from plant metabolism appear to have therapeutic effects, requiring toxicity and mutagenicity studies to determine their safe use capable of producing a satisfactory effect of the drug (Hemalswarya & Doble, 2006; Marsiglia et al., 2011). The compounds present in plants that may present toxicity vary in chemical properties (Simões 2004). Many phytotherapeutic and medicinal plants which are used by the population do not have a well-known toxicological and pharmacodynamic profile, as well as the secondary metabolites responsible for toxicity, without scientific proof of safety and efficacy (Veiga-Junior, 2008; Campos et al., 2016). The World Health Organization (WHO) recommends studies to determine the toxicity of plants for medicinal purposes to scientifically validate the toxic potential and thus reduce the adverse effects of consuming herbal medicines (WHO, 2014; Ohikhena et al., 2016).

Piper aduncum, of the *Piperaceae* family, is a shrub which can reach up to 8 meters in height, widespread in tropical and subtropical regions, occurs in sandy-clay wet soils, and is resistant to climate change. It is considered an opportunistic species in deforested areas, being native in the Brazilian territory in the Amazon, Cerrado and Atlantic Forest regions (Melo et al., 2016; Sousa et al., 2008; Flora do Brasil, 2020). It is used in traditional medicine to treat gastrointestinal and urinary disorders and as an insect repellent (Vieira, 1992). Reports in the literature demonstrate that ethanolic extracts of *P. aduncum* leaves have antiprotozoal, antimalarial and insecticidal activity (Hemiptera and Diptera) (Valadeau et al., 2009; Silva et al., 2007).

Bioassays with plants are important to detect toxic agents and contamination of the environment, being highly sensitive and simple to monitor the toxic effects of chemical compounds at the cellular level in order to evaluate the mutagenic potential and possible harm to humans (Sabini et al., 2011). Therefore, such studies using medicinal plants by popular knowledge with *P. aduncum* need to have their therapeutic actions proven, as well as the possibility of side effects and toxic effects.

In view of this, the present study aimed to conduct pre-clinical toxicological tests of the ethanolic extract of *P. aduncum* to verify the possibility of using this extract in living beings without causing harmful effects.

MATERIAL AND METHODS

Collect of samples and Preparation of the ethanolic extract

Healthy *P. aducum* leaves were collected at Chácara São Raimundo, in Palmas-Tocantins, Brazil, in March 2019 and 2020, which is the rainy season in the region. The specimen has a registration number in the herbarium of the Nucleus of Environmental Studies (NEAMB) of the Federal University of Tocantins (HTO: 11,134) through identifications of the exsiccate sent.

The leaves were sanitized and the dry material was obtained by drying in an oven at 38°C, then crushed and placed in a recipient protected from light. The moisture percentage (M%) of the sample was calculated based on the methods of the Instituto Adolfo Lutz (2005).

The crude extract was prepared using a Soxhlet extractor, the dry leaves were directly weighed into the cellulose cartridges and placed in the extractor. Ethanol 99% was used as a solvent in a 5-hour extraction process, with a condenser water cooling system at 18°C. After extraction, the solvent was removed by rotary evaporator. According to Oliveira (2016), ethanol is a solvent with low toxicity and capable of extracting groups of polar and non-polar compounds, such as essential oils, lipids, organic acids and pigments.

The yield (Y%) of the extract was calculated based on dry matter, according to the equation:

$$Y\% = [OM/Bm - (Bm \cdot M)/100] \cdot 100$$

In which: *OM* is the mass of the extract (g), *Bm* is the plant biomass (g), *M* is the moisture and 100 is the conversion factor for the percentage.

Toxicological assays

Toxicological tests were performed at the Laboratory of Basic Health Sciences (LACIBS) at the Federal University of Tocantins.

Toxicity evaluation

The assay was performed following the method proposed by Meyer et al. (1982) with modifications. *Artemia salina* eggs were incubated in 3% saline solution under aeration for 48 h until hatching. Crude extracts were diluted in 3% saline solution at concentrations of 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml and 1 µg/ml, and the control group used 3% saline solution. Next,

1 ml of the standard solution of each extract was placed and completed with 4 ml of saline water for a total volume of 5 ml and 10 nauplii were transferred to each test beaker using a Pasteur pipette. After 24 hours, the surviving nauplii were counted. The test was performed in triplicate to determine the dose-response relationship.

Antiproliferative activity determination

In this test, we followed the methodology of Fiskej  (1985) and Meneguetti (2014) based on germination and alteration of *Allium cepa* meristems. Fifteen healthy onions of the same origin and size were used. Three *A. cepa* bulbs were partially submerged in 20 ml of crude extract at the concentration of 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml and 1 µg/ml, and in the control group with distilled water, and germinated at 25°C for 72h after bulb growth in the control group. The number of germinated bulbs was counted and the three largest roots of each sample were measured with a caliper, for a total of 9 roots per group. The test was performed in triplicate. The germination index (GI) and the relative growth index (RGI) were calculated according to the method of Young (2012). These indices were obtained by the following equations:

$$RGI = SRL/CRL$$

In which: SRL is the sample root length and CRL is the control root length.

$$GI\% = (SRL/RGS)/(CRL \times RGC) \times 100$$

In which: RGS is the number of roots germinated in the sample and RGC is the number of roots germinated in the control. The results are evaluated according to the RGI result.

Human erythrocyte osmotic frailty

This test was previously approved by the Institutional Ethics Committee 066/2013. Blood samples were collected by intravenous puncture in EDTA vacuum tubes from nine healthy volunteers. Then, 1 ml of blood was pipetted into tubes (Eppendorf®) containing 1 ml of the crude extract at concentrations of 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml and 1 µg/ml, and 1 ml of 0.9% NaCl from the control group, and were pre-incubated at 37°C for 1 hour. Next, the tubes were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes, the supernatant was removed and the samples were washed with 1 ml of 0.9% NaCl and centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. From this, 1 ml of 0.9% NaCl was added to the sample and homogenized. Then 50 µL were transferred to tubes containing different concentrations of saline solution (0.12%, 0.24%, 0.48%, 0.60%, 0.72% and 0.9%) and incubated at 37°C for 1 hour. Erythrocyte lysis was measured by the absorbance of

the supernatant at 540nm. The tests were performed in triplicate, with three replications. The data obtained were submitted to the Tukey's test at 5% significance.

Allelopathic potential evaluation

Lettuce (*L. sativa*) seeds were used as bioindicators to evaluate the allelopathic effect of crude extracts at concentrations of 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml and 1 µg/ml. A total of 50 seeds were used in each treatment to germinate with three replications. The seeds were sown in previously sanitized germination boxes, lined with filter paper moistened with 4 ml of each concentration of the extract, and distilled water in the control group. The experiment was maintained in a BOD incubator at 25°C for 7 days, counting the germinated seeds and watering daily. The germination speed index (GSI) was analyzed after 7 days of germination, according to the equation proposed by Maguire (1962), calculated using the formula:

$$GSI = G1/N1 + G2/N2 + G3/N3 + \dots GN/ Nn$$

In which: G1, G2... are the number of seedlings germinated during monitoring, and N1, N2... are equivalent to counting days, in this case, 7 days. Seeds with 2 mm of root protrusion were considered germinated. Finally, 10 seedlings were randomly selected per concentration of each extract to measure root and shoot length. The results were submitted to analysis of variance and compared by the Tukey's test at 5% significance.

RESULTS AND DISCUSSION

The growing increase in the consumption of medicinal plants and herbal medicines in recent years has been accompanied by concern about the quality of the raw material offered for use of these plants by professionals in the areas of human and animal health, as well as the search for plants which have test results to prove its real therapeutic indication. Many of the plants used today have a popular appeal with several therapeutic indications, but lack experimental evidence for this purpose and have unknown cytotoxicity level. Thus, preclinical and clinical tests are necessary to define its indication as well as its safety for use (Yunes, 2001; Parvenn et al., 2015; Khan et al., 2019).

Although *P. aduncum* is widely used by traditional medicine in an empirical way, its natural origin and use does not guarantee its safety (Herrera-Calderon et al., 2019). Few preclinical toxicological tests are available in the literature, which leads us to discuss the results of these tests with other species of the *Piper* genus in order to contribute to its safety for consumption.

The *Artemia salina* toxicological test is a simple and low-cost method for researching natural products and capable of detecting a broad spectrum of bioactivity in plant extracts. It presents good correlation with other *in vivo* oral acute toxicity tests and also showed a good correlation between the LC₅₀ of plant extracts for nauplii and the LD₅₀ of the same extracts administered orally in rats, which may be an indicator of potential antitumor, insecticidal and fungicidal activity (Parra et al., 2001; McLaughling et al., 1998; Albuquerque et al., 2014). Preliminary toxicological evaluations of plants with medicinal purposes through tests with *Artemia salina* nauplii have been used in the last 30 years. The lethality test is more appropriate for preliminary screening of plant toxicity as it has advantages due to the sensitivity of nauplii to toxins (Carballo et al., 2002; Caldwell et al., 2003; Otang et al., 2013).

The lethality of nauplii at concentrations of 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml and 100 µg/ml of crude *P. aduncum* extracts after 24 hours of incubation in order to determine the LC₅₀ are shown in Figure 3. When evaluating the test result, we observed that there was no mortality of the nauplii in the control group, and we observed lethality of 33%, 56.6%, 80% and 93.3% at concentrations of 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, respectively.

According to Meyer et al. (1982), the cytotoxicity result against *A. salina* follows a toxicity criterion: extracts with LC₅₀ values > 1000 µg/ml are considered non-toxic, values between 500 µg/ml and 1000 µg/ml are considered to have low toxicity, values between 100 and 500 µg/ml are moderately toxic, and values < 100 µg/ml are toxic. Following this guideline, the crude extract of *P. aduncum* can be considered toxic, since at a concentration of 10 µg/ml there was a lethality of 56.6% of the nauplii, and as the concentration of the crude extracts increased, there was a greater lethality of microcrustaceans. In bioassays of *A. salina* with *P. arboresensis* and *P. caninum* essential oils, Daniel et al. (2019) showed moderate toxicity of *P. arboresensis* with an LC₅₀ value of 57.97 µg/ml, while the *P. caninum* essential oil presented LC₅₀ 249.74 µg/ml, being classified as non-toxic. Some essential oils and plant extracts considered toxic (LC₅₀ < 100 µg/ml) may suggest an antitumor potential, not always indicating toxicity to humans, as suggested by Del Socorro et al. (2014). These results are in agreement with tests performed with plant extracts for medicinal purposes that report that cytotoxicity is concentration-dependent (Kosasih et al., 2019; Talukder et al., 2020).

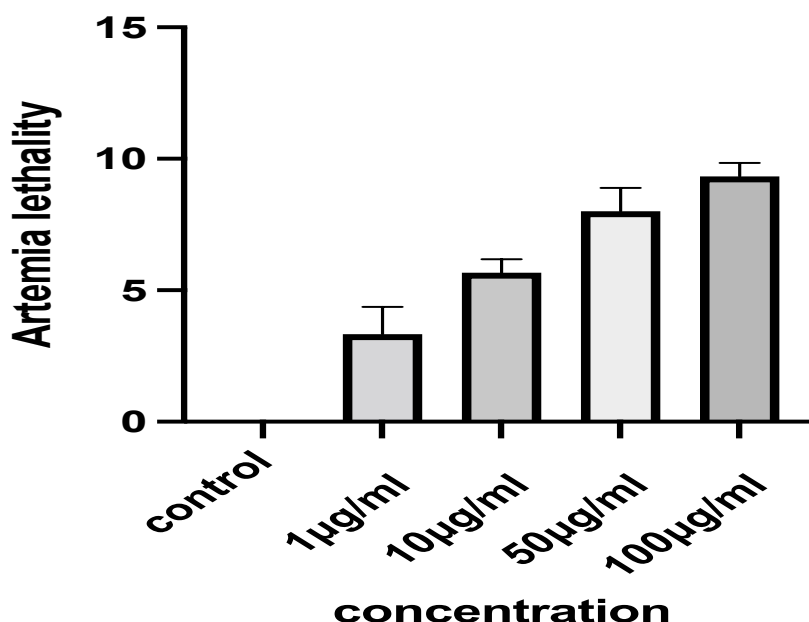


Figure 3: *A. salina* lethality at *P. aduncum* ethanolic extracts concentrations.

The results obtained in the *Allium cepa* test are shown in Table 1; the average root growth in the control group and in the extract concentrations of 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml and 100 µg/ml were 13.66 mm, 23 mm, 23.66 mm, 12 mm and 4 mm, respectively, demonstrating that as the extract concentration increases, there is a reduction in root growth. When evaluating the relative growth index (RGI) according to Young's method (2012), it is observed that there is a stimulus of root growth at low concentrations, while the concentration of 50 µg/ml has no significant effect on the roots of onions. Moreover, there is antiproliferative action in the group of 100 µg/ml with a value of 0.292, inhibiting root growth, presenting cytotoxic potential. The *Allium cepa* test is a method used to evaluate cellular alterations with satisfactory results in the evaluation of the antiproliferative, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of several substances. It has low cost and equivalent sensitivity to other toxicological tests, being an important initial bioindicator to evaluate the toxicity of plant extracts. Onion roots are sensitive to detect harmful substances to the environment and human health, and the results of these tests are good indicators to warn the population about the use of natural or synthetic medicines and foods (Fachinetto et al., 2007; Da Silva, 2015). The antiproliferative effect is observed when onion roots are exposed to the action of the extract (Tedesco & Laghinghouse, 2012; Meneguetti, 2014). Cytotoxicity tests are used to determine the amount of cells that die after exposure to the compound. The most important macroscopic parameter evaluated in the antiproliferative *Allium cepa* test is root growth, which enables observing the turgidity and color change (Fiskejö, 1985; Meneguetti et al., 2014).

Table 1: *Allium cepa* root growth average, relative growth index and germination index.

Concentration	Average growth	Average of germinated roots	GI	RGI	
Control	13,66 mm	21,33	100	1	
1 µg/ml	23 mm	24,66	194,66	1,683	S
10 µg/ml	23,66 mm	15,33	124,484	1,732	S
50 µg/ml	12 mm	8	32,917	0,878	NSE
1 00µg/ml	4 mm	17,66	24,244	0,292	I

RGI results: Root growth inhibition (I): $0,0 < x < 0,8$; no significant effect on the roots (NSE): $0,8 < x < 1,2$; root growth stimulation: $x > 1,2$.

Erythrocyte osmotic fragility is a rapid, easy-to-replicate test that provides information on the interaction of natural or synthetic compounds on cell membranes. This test is characterized by the resistance to hemolysis of red blood cells and can be measured by free hemoglobin in saline solutions at decreasing concentrations of NaCl (Khanna et al., 2002; Jain, 1973). It is used as a biomarker of oxidative stress of the erythrocyte membrane in contact with toxic substances, xenobiotics and membrane permeability studies (Sharma et al., 2010). Many medicinal products can affect cell membranes causing denaturation, altering the morphological and osmotic effects of erythrocytes (Maiworm et al., 2008). Therefore, *in vitro* tests to evaluate the effects of medicinal products on the stability of the erythrocyte membrane should be carried out given the increased consumption of these products.

In this experiment we tested the interaction of the crude *P. aduncum* extract with the membrane of human erythrocytes at increasing concentrations of NaCl from 0.12% to 0.9%. The Tukey's test showed no significant difference between the control group and the tested samples, observed in figure 4, with no increase in the absorbance curve as the NaCl concentration increases, so the concentrations of the analyzed extract do not have a toxic effect on the erythrocyte membrane, meaning they did not induce hemolysis due to membrane instability. These results differ from Barros (2016) who tested increasing concentrations of 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, and 200 µg/ml of *P. aduncum* essential oil, which showed a protective effect at concentrations below 50 µg/ml, and a disruptive effect on erythrocytes, inducing toxic effects and greater potential for hemolysis in erythrocyte membranes, depending on the concentration tested.

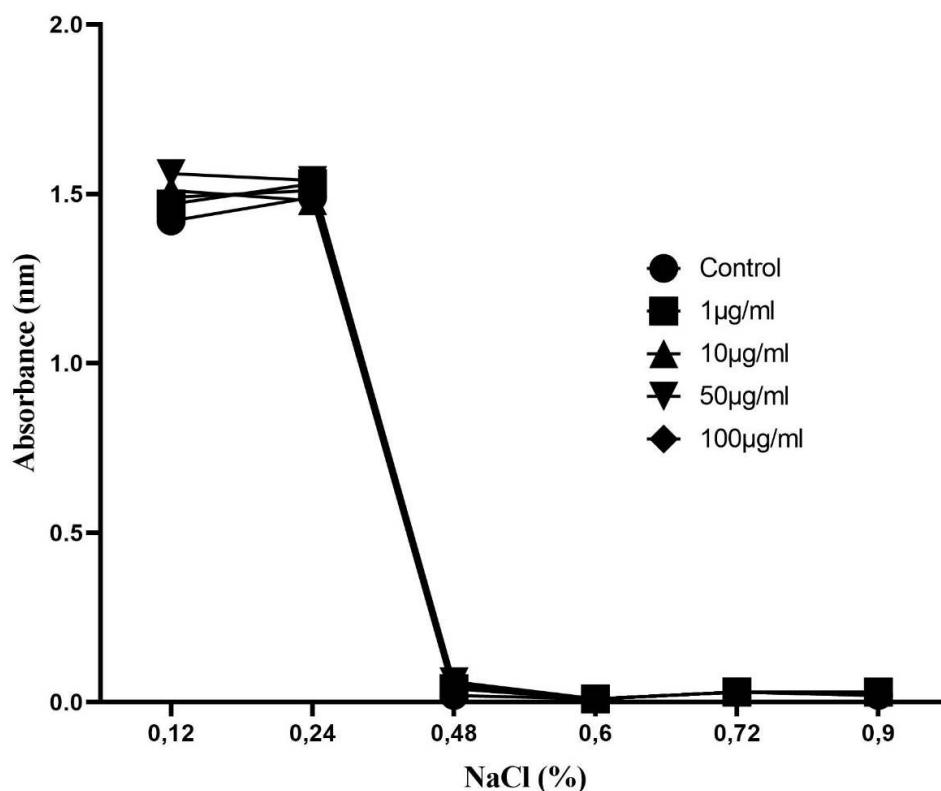


Figure 4: Erythrocyte osmotic fragility of blood samples treated with *P. aduncum* ethanolic extract concentrations and saline (NaCl 0,9%) as a control.

As described by Rice (1992), allelopathy is defined as any direct or indirect beneficial or harmful effect that a plant, including microorganisms, exerts on another organism through the production of chemical compounds (allelochemicals). Allelochemicals come from secondary metabolism related to plant defense against attacks by microorganisms and insects, and they can be absorbed by other plants when released into the environment, influencing the germination, growth and development process, and can be used as bioherbicides in new drugs (Weir et al., 2004; Einhellig, 2002; Ferreira, 2004).

In this study, we determined the allelopathic potential of crude *P. aduncum* extract against lettuce seeds through total seed germination and the germination speed index (GSI). The crude extract at a concentration of 100 µg/ml showed a reduction in the germination speed index (GSI) of the seeds compared to the other treatments and control, as shown in Table 2. Seedling growth was not inhibited by the action of the extracts at the tested concentrations.

When submitting the data to the Tukey's test, it was observed that root growth (in mm) was reduced with increasing extract concentration, with a significant difference between the control group and the concentration of 100 µg/ml, and between the concentration of 1 µg/ml with a concentration of 100 µg/ml, as shown in Figure 5. In the statistical analysis of the growth of leaves submitted to the crude extract treatments, there was a statistical difference between

the treatments of the control group with the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, with no significant difference between the other treatments, as shown in Figure 6. We observed that the concentrations of the tested *P. aduncum* extracts do not present significant allelopathic potential, meaning they reduce the root germination process at the highest concentration tested (100 $\mu\text{g/ml}$ of the crude extract); however, it stimulated the shoot and root growth of the lettuce seeds in the other tested treatments. These results are not in agreement with Lima et al. (2017), who showed that the leaf extracts showed greater allelopathic potential when evaluating the allelopathic potential of the crude aqueous leaf and root extract of *P. aduncum* at concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.5% against lettuce seeds, inhibiting the root germination process of lettuce seedlings. Miura (2021) tested different concentrations of essential oil of *P. aduncum* (0,1, 1, 10 and 100 mgL^{-1}) on the growth of lettuce seedlings, and also observed no adverse effect was observed on *L sativa* seeds.

Table 2: Germination speed index (GSI) of *Lactuca sativa* seeds.

	control	1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	1 00 $\mu\text{g/ml}$
GSI	94,8	99,7	91,51	97,83	80,46

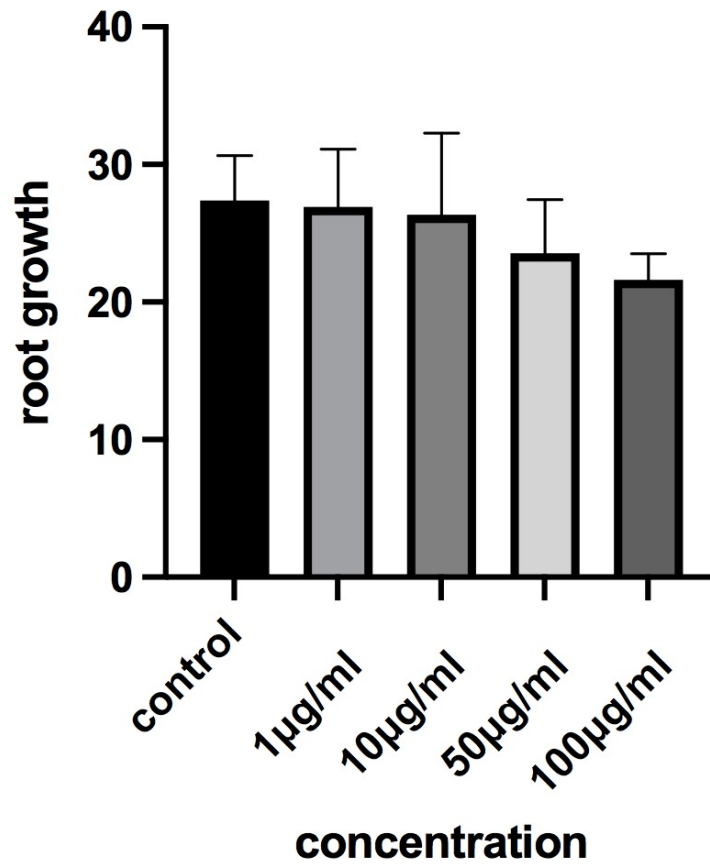


Figure 5: Root growth length of lettuce seedlings submitted to the *P. aduncum* crude extract treatments.

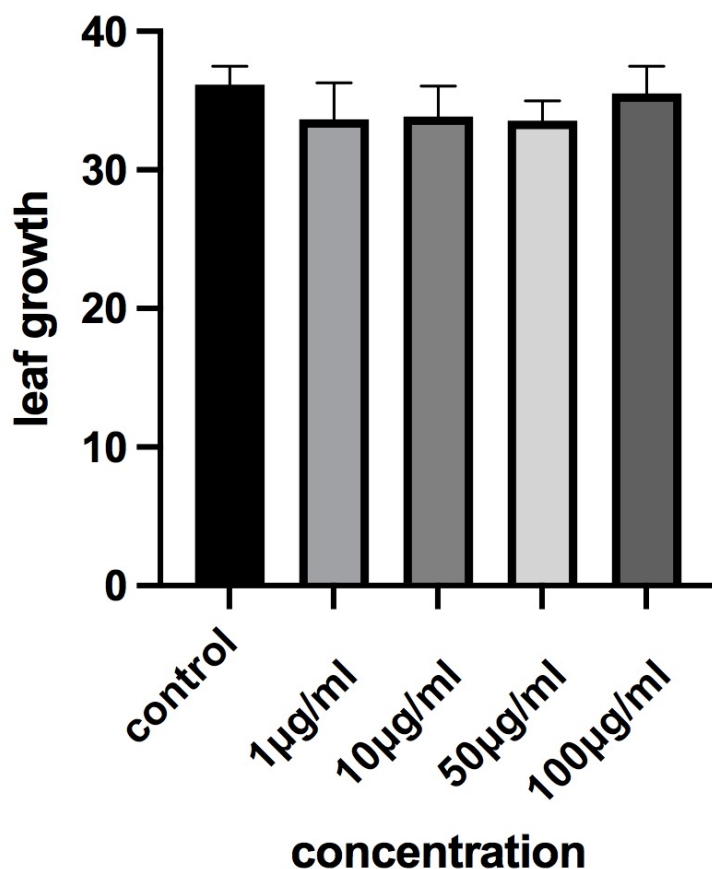


Figure 6: Leaves growth length of lettuce seedlings submitted to the *P. aduncum* crude extract treatments.

CONCLUSION

It is concluded that the tested concentrations of crude extract obtained from *P. aduncum* do not show allelopathic potential on lettuce seeds, and do not have a toxic effect on cell membranes. However, they did demonstrate toxic potential in cell development, which may suggest an antitumor potential, thus requiring further studies.

CONFLICT OF INTERESTS

The author have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

Albuquerque LP, Pontual EV, de Sá Santana GM (2014). Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta Tropica*, 138: 23-27.

Barros FJ, Costa RJO, Cesário FRAS (2016). Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of

erythrocytes. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(4): 505-512. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.02.011>

Caldwell GS, Bentley MG and Olive PJW (2003). The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*, 42: 301-306. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00147-8)

Campos SC, Silva CG, Campana PRV (2016). Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, 18(1): 373-382.

Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P and Garcia-Gravalos MD (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2: 10.1186/1472-6750-2-17.

Da Silva LM, Peron AP, da Silva FRC, Martins L (2015). Antiproliferative effect of the hydroalcoholic extract of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (*Fabaceae*, *Caesalpinioideae*) on the meristematic cells of *Allium cepa* L. roots. *Revista Biotemas*, 28: 1.

Daniel NA, Ahmad FB, Assim Z, Pin CH (2019). Chemical constituents, antioxidant, and cytotoxicity of essential oils of *Piper arborescens* and *Piper caninum*. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15(6): 825-830. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v15n6.1245>

Del Socorro MML, Bendoy CP Clifford PB (2014). Cytotoxic effects of Betel vine, *Piper betle* Linn. leaf extracts using *Artemia salina* leach (brine shrimp lethality assay). *Journal of Multidisciplinary Studies*, 3(1): 100-111. <http://dx.doi.org/10.7828/jmds.v3i1.629>

Einhelling FA (2002). The physiology of allelochemical action: clues and views. In: Reigosa M, Pedrol N. *Allelopathy from molecules to ecosystems*. Vigo: Universidade de Vigo; 1-23.[Link].

Fachineto JM, Bagatini MD, Durigon ACFS, Tedesco SB (2007). Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (*Asteraceae*) sobre o ciclo de celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba 17:49-54. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100011>

Ferreira AG (2004). Interferência: competição e alelopatia. In: Ferreira AG, Borghetti F. (eds.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre Artmed Editora. 251-64.

Fiskesjö G (1985). The Allium test as standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102:99-112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>

Flora do Brasil (2020). Piperaceae [WWW Document]. *Piper aduncum* L var. *aduncum*. URL <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil>

Helmalswarya S. & Doble, M. (2006). Potential Synergism of natural products in the treatment of cancer. *Phytotherapy Research* 20:239-249. <https://doi.org/10.1002/ptr.1841>

Herrera-Calderon O, Chacaltana-Ramos L, Yuli-Posadas RÁ, Pari-Olarte B, Enciso-Roca E, Tinco-Jayo JA, Rojas-Armas JP, Feliz-Veliz LMV, Franco-Quino, C. (2019). Antioxidant and cytoprotective effect of piper *aduncum* L. against sodium fluoride (NaF)-induced toxicity in albino mice. *Toxics*, 7(2), 28. <https://doi.org/10.3390/toxics7020028>

Instituto Adolfo Lutz, (2005). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos, Série A—Normas e Manuais Técnicos, Ministry of Health, National Health Surveillance Agency, Brasília, Brazil, 4th edition.

Khan T, Ali M, Khan A, Nisar P, Jan SA, Afridi S, Shinwari ZK, Anticancer plants: A review of the active phytochemicals, applications in animal models, and regulatory aspects. *Biomolecules*. 2020;10(1) <https://doi.org/10.3390/biom10010047>

Khanna R, Chang SH, Andrabi S, Azam M, Kim A, Rivera A, Brugnara C, Low PS, Liu SC, Chishti AH (2002). Headpiece domain of dematin is required for the stability of the erythrocyte membrane. *Proceedings of the National Academic of Science U.S.A.*: 6637-6642. <https://doi.org/10.1073/pnas.052155999>

Kosasih K, Sumaryono W, Supriono A, Mudhakhir D (2019). Cytotoxicity of ethyl acetate extract of cantigi (*Vaccinium varingiaefolium* (Blume) Miq.) young leaves on *Artemia salina* L. larvae, MCF-7, T47D, and VERO cell lines. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(4):24-33.

Jain NC (1973). Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. *Cornell Veterinarian*, 63(3) :411-423.

Lima JS, Rocha VD (2018). Potencial alelopático de *Piper aducum* L, visando uso da espécie como bioherbicida. *Cadernos de Agroecologia*, 13(1).

Maiworm AI, Presta GA, Santos-Filho SD (2008). Osmotic and morphological effects on red blood cell membrane: action of an aqueous extract of *Lantana camara*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18 (1):42-46. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100010>

McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal* 32:513–524. <https://doi.org/10.1177%2F009286159803200223>

Maguire JD (1962). Speed of germination-aid in section evaluation for seeding emergence and vigour. *Crop Science*, Madison, 2(2): 176-177. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

Marsiglia JDC, Loss AC, Stage VS, Belcavello L, Luz AC & Batitucci MCP (2011). Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. *Natureza online* 9(1):30-34.

Melo A, Guimarães AF, Alves M (2016). Synopsis of the genus *Peperomia* Ruiz & Pav. (*Piperaceae*) in Roraima state, Brazil. *Hoehnea*, 43 (1):119-134. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-75/2015>

Meneguetti DUO, Lima RA, Silva JB, Silva RP, Pagotto RC, Facundo VA (2014). Analysis cytotoxic and mutagenic the aqueous extract of *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá). *Revista Ciência e Natura*, 36(3): 301-309. <https://doi.org/10.5902/2179460X13343>

Meyer BN, Ferrigini NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34.

Miura PT, Jonsson CM, Queiroz SCDND, Chagas EC, Chaves FCM, Reyes FGR. (2021). Ecological risk assessment of *Piper aduncum* essential oil in non-target organisms. *Acta Amazonica*, 51:71-78.

Ohikhena Franklin Uangbaoje, Wintola Olubunmi Abosede; Afolayan Anthony Jide (2016). Research article toxicity assessment of different solvent extracts of the medicinal plant, phragmanthera capitata (Sprengel) Balle on Brine Shrimp (*Artemia salina*). *International Journal of Pharmacology*, 12:701-710.

Oliveira AIT, Mahmoud TS, Nascimento GNL (2016). Chemical composition and antimicrobial potential of palm leaf extracts from babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), and Macaúba (*Acrocomia aculeata*), *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2016/9734181>

Otang MW, Grierson SD and Ndip NR (2013) Assessment of potential toxicity of three South African medicinal plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) assay. *African Journal of Pharmacy. Pharmacology.*, 7: 1272-1279.

Parra AL, Yhebra RS, Sandiñas IG and Buella LI (2001) Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5):395-400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>

Parveen, A., Parveen, B., Parveen, R., & Ahmad, S. (2015). Challenges and guidelines for clinical trial of herbal drugs. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 7(4), 329. doi: [10.4103/0975-7406.168035](https://doi.org/10.4103/0975-7406.168035)

Rice EL (1992) Allelopathy effects on nitrogen cycling. In: RIZVI, S.J.H. & RIZVI, H. *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall, 31-58.

Sabini MC, Cariddi LN, Escobara FM, Bachetti RA, Sutil SB., Contigiani MS, Zanon SM, Sabini LI (2011) Evaluation of cytogenotoxic effects of col aqueous extract from *Achyrocline satureioides* by *Allium cepa* L test. *Natural Products Communications*, Westerville, 6(7):995-998. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1100600718>

Sharm B, Rai DK, Rai PK, Rizvi SI & Watal G (2010) Determination of erythrocyte fragility as a mrker of pesticide-induced membrane oxidative damage. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II: Methods. Molecular Biology*, 594(1):123-128.

Silva WC, Ribeiro JD, Souza HEMS & Corrêa RS (2007) Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion sp.* (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. *Acta Amazonica*, 37(2): 293-298. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672007000200017>

Simões CMO (2004) *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis: Editora UFSC, 1102.

Sousa, PJC, Barros CAL, Rocha JCS (2008) Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18 (2):217-221. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200013>

Talukder ME, Momen F, Barua R, Sultana S, Yesmin F, Islam MS, *et al* (2020) *In vitro* assessment of cytotoxic activity of hybrid variety of *Momordica charantia* (Bitter Gourd). The Journal of Phytopharmacology. 9(6):445-8.

Tedesco S, Laughinghouse H (2012) Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. Environmental contamination, 137-156.

Valedeau CA, Pabon E, Deharo J, Alban-Castilho Y, Estevez FA, Lores R, Rojas D, Gamboa M, Sauvain D, Castilho G, Bourdy (2009). Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. Journal of Ethnopharmacology, 123(3): 413-422. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.041>

Veiga-Junior VF (2008) Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18(2) :308-313. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200027>

Vieira S (1992) .In: Agronômica Ceres (Ed.), Fitoterapia na Amazônia - Manual de Plantas Medicinais, p. 347. São Paulo.

Weir TL, Park SW, Vivanco JM (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated allelochemicals. Current Opinion in Plant Biology. 7(4):472-9. ISSN: 1369-5266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.007>

WHO (2014) guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Young BJ, Beily ME, Bres PA, Crespo CD, Ronco AE (2012) Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. Ecotoxicology and Environmental Safety 76(2): 182-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.019>

Yunes RA, Pedrosa RC and Cechinel FV (2001). Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Química Nova, 24 (1): 147-152. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000100025>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante os resultados obtidos nos ensaios toxicológicos com as diferentes concentrações do extrato bruto etanólico de *P. aduncum* testados, pode-se concluir que não houve efeito tóxico sobre as membranas celulares, não induziu hemólise dos eritrócitos, como também não apresentou efeito alelopático sobre as sementes de alface. Porém demonstrou potencial tóxico no desenvolvimento celular, no qual apresentou aumento da letalidade dos náuplios de *A. salina* nas concentrações crescentes, e inibição do crescimento celular das raízes das cebolas na mais alta concentração do extrato, sugerindo potencial antitumoral e ou larvicida, necessitando assim de estudos futuros.

6 PERSPECTIVAS

- Avaliar potencial inseticida do extrato etanólico de *P. aduncum* em diferentes fases de vida de insetos.
- Testar ação de repelência do extrato da planta em seres humano.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Farediah; RAHMANI, Mawardi. Chemical constituents of *Piper aduncum* Linn (Piperaceae). **Pertanika J Sci Technol**, v. 1, p. 85-188, 1993.

ALVES, Tânia Maria de Almeida et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

BERNANRD, C.B., H.G. KRISHNAMURTY, D. CHAURET, T. DURST, B.J.R. PHILOGÈNE, P. SANCHEZ-VINDAS, C. HASBUN, L. POVEDA, L. SAN ROMAN and J.T. ARNASON. Insecticidal defenses of Piperaceae from the Neotropics. **J. Chem. Ecol.** 21:801-814, 1995.

BERNUCI, K.Z., IWANAGA, C.C., FERNANDEZ-ANDRADE, C.M., LORENZETTI, F.B., TORRES-SANTOS, E.C. FAIÕES, V.D.S., GONÇALVES, J.E., Do AMARAL, W., DESCHAMPS, C., SCODRO, R.B.D.L., CARDOSO, R.F., BALDIN, V.P. & CORTEZ, D.A.G. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, v.21, n.12, p. 1698, 2016.

BEZERRA, Cleirton Martins; OLIVEIRA, Maria Auxiliadora Silva. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de Malva-Santa (*Plectranthus barbatus*-Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 4, p. 220-228, 2016.

BHATTACHARYA, Sanjib. Medicinal plants and natural products in amelioration of arsenic toxicity: a short review. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 349-354, 2017.

CALIXTO, João B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

COSTA, Carla Regina et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

DA SILVA BOLZANI, Vanderlan et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

DA SILVA LIMA, Aldilene et al. Acaricide activity of different extracts from *Piper tuberculatum* fruits against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 107-112, 2014.

DA SILVA OLIVEIRA, Fernanda Granja; LEHN, Carlos Rodrigo. Riscos e perspectivas na utilização de fitoterápicos no Brasil. **Opará: Etnicidades, Movimentos Sociais e Educação**, v. 3, n. 4, p. 35-44, 2015.

DAL PICCOLO, Camilla R. et al. Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from *Piper aduncum* L. **Fitoterapia**, v. 97, p. 28-33, 2014.

DE ARAUJO BITENCOURT, Gislayne et al. Fitoquímica e Alelopatia da Aroeira-Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na Germinação de Sementes. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 02-08, 2021.

DRAGOS, Dorin; GILCA, Marilena. Taste of phytochemicals: A better predictor for ethnopharmacological activities of medicinal plants than the phytochemical class?. **Journal of ethnopharmacology**, v. 220, p. 129-146, 2018.

DYER, Lee A.; PALMER, Aparna DN (Ed.). **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution**. New York: Kluwer academic/Plenum publishers, 2004.

DOS SANTOS, Vera LP et al. Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 85-91, 2015.

DURANT-ARCHIBOLD, Armando A.; SANTANA, Ana I.; GUPTA, Mahabir P. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 217, p. 63-82, 2018.

FARIA, Marcos V. et al. Desempenho agrônomo e heterose de genótipos de cebola. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 220-225, 2012.

FAZOLIN, Murilo et al. Potencial sinérgico do óleo de *Piper aduncum* para inseticidas formulados com misturas de princípios ativos. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 4, p. 362-369, 2016.

FIRMO, Wellyson da Cunha Araújo et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. 2011.

FISKESJÖ, Geirid. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FRESCURA, Viviane Dal Souto et al. Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae). 2012.

FUENTES-GANDARA, F. et al. Selective fractionation and isolation of allelopathic compounds from *Helianthus annuus* L. leaves by means of high-pressure techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 32-41, 2019.

GAÍNZA, Yousmel Alemán et al. *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 383-393, 2016.

GOMES, Bárbara Ingrid Rodrigues et al. Quintal da saúde: plantas medicinais na promoção do cuidado. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 32567-32542, 2021.

GUTIÉRREZ, Yamilet et al. Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 12, p. 1715-1719, 2016.

IGBOKWE, N. A.; OJO, N. A.; IGBOKWE, I. O. Effects of sex and age on the osmotic stability of Sahel goat erythrocytes. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 1, p. 15-22, 2016.

KHANNA, Richie et al. Headpiece domain of dematin is required for the stability of the erythrocyte membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 10, p. 6637-6642, 2002.

KREMER, Teli Cristiane Briekowiec et al. Atividade alelopática de extrato aquoso de *Croton glandulosus* L. na germinação e no desenvolvimento inicial de alface. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 1, p. 890-898, 2016.

KRUSE, Marianne; STRANDBERG, Morten; STRANDBERG, Beate. Ecological effects of allelopathic plants-a review. **NERI technical report**, v. 315, 2000.

LENTZ, David L. et al. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 63, n. 3, p. 253-263, 1998.

LIMA, Joameson dos Santos et al. Potencial alelopático de *Piper aduncum* L, visando uso da espécie como bioherbicida. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

LOPES, Grazielle; DA SILVA, Tânia Maria S.; ECHEVARRIA, Aurea. Atividade Tóxica Frente à *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de Extratos Brutos e Frações Glicoalcaloidais de *Solanum* spp. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 141-156, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2002. 512p.

LUCENA, Daiane C. et al. Biological activity of piper aduncum extracts on *anticarsia gemmatilis* (hübner)(Lepidoptera: erebidae) and *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1869-1879, 2017.

MAIA, José Guilherme S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 269-272, 1998.

MAISFORTE, N. da S.; MONTEIRO, André Fábio Medeiros; FAZOLIN, Murilo. Frações do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizadas como sinérgicas de inseticidas fosforado e benzoilureia. 2022.

MATHEUS, Miele T. et al. Seed longevity and physical dormancy break of two endemic species of *Dimorphandra* from Brazilian biodiversity hotspots. **Seed Science Research**, v. 27, n. 3, p. 199-205, 2017.

MATTOS, Gerson et al. Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 3735-3744, 2018.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MGBEAHURUIKE, Eunice Ego et al. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54-69, 2017.

MILLER, Darrell A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, v. 88, n. 6, p. 854-859, 1996.

NEWMAN, David J. The influence of Brazilian biodiversity on searching for human use pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 402-414, 2017.

PAVELA, R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects: a review. **Plant Protection Science**, 52(4), 229–241, 2016.

PERTINO, Mariano et al. Gastroprotective effect and cytotoxicity of semisynthetic jatropholone derivatives. **Planta medica**, v. 73, n. 10, p. 1095-1100, 2007.

RIBEIRO, J. C. Qualidade de plantas medicinais de uso popular no Brasil: uma visão experimental: roteiro de práticas. **São João da Boa Vista: Editora Universitária UNIFAE**, 2021.

RIDZUAN, P. M. et al. The efficacy of piper aduncum extract as natural larvicides against aedes aegypti larvae. **International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine**, v. 22, n. 1and2, p. 154-159, 2019.

RODRIGUEZ, Armando Garcia et al. Bioensaio dom Artemia Salina para Detecção de Toxinas em Alimentos Vegetais. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 36, n. 4, p. 795-808, 2009.

ROSYADI, Afrian et al. Anticancer properties of methanolic extract of Piper crocatum leaf using BST and cytotoxicity on HeLa cell lines. 2020.

SÁNCHEZ-BAIN, Andrés et al. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. 2004.

SCALVENZI, Laura et al. Larvicidal activity of Ocimum campechianum, Ocotea quixos and Piper aduncum essential oils against Aedes aegypti. **Parasite**, v. 26, 2019.

SCAVO, Aurelio et al. The extraction procedure improves the allelopathic activity of cardoon (Cynara cardunculus var. altilis) leaf allelochemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 479-487, 2019.

SHARMA, Bechan et al. Determination of erythrocyte fragility as a marker of pesticide-induced membrane oxidative damage. In: **Advanced Protocols in Oxidative Stress II**. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 123-128.

SEN, Tuhinadri; SAMANTA, Samir Kumar. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. **Biotechnological applications of biodiversity**, p. 59-110, 2014.

SOUSA, P. J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de Piper aduncum L. **Brazilian**

Journal of Pharmacognosy, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 217-221, abr./jun. 2008.

SOUZA, Diogo Rodrigues et al. Medicinal plants: traditional healers' indications for the treatment of wounds. **Revista Brasileira em Promocao da Saude**, v. 29, n. 2, p. 197, 2016.

TEDESCO, S.; LAUGHINGHOUSE IV, Haywood. Bioindicator of genotoxicity: the Allium cepa test. **978-953-51-0120-8**, 2012.

VERRI, ANDRÉ MORADORE; MOURA, ANGÉLICA² DE ALMEIDA; DE MOURA, VAGNER MARQUES. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Uningá Review**, v. 30, n. 1, 2017.

WACZUK, Emily Pansera et al. Euphorbia tirucalli aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. **Toxicology Research**, v. 4, n. 3, p. 739-748, 2015.

World Health Organization (WHO). (2019). Global Report on Traditional and Complementary Medicine. 228.

YANG, Rui et al. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 5-18, 2017.

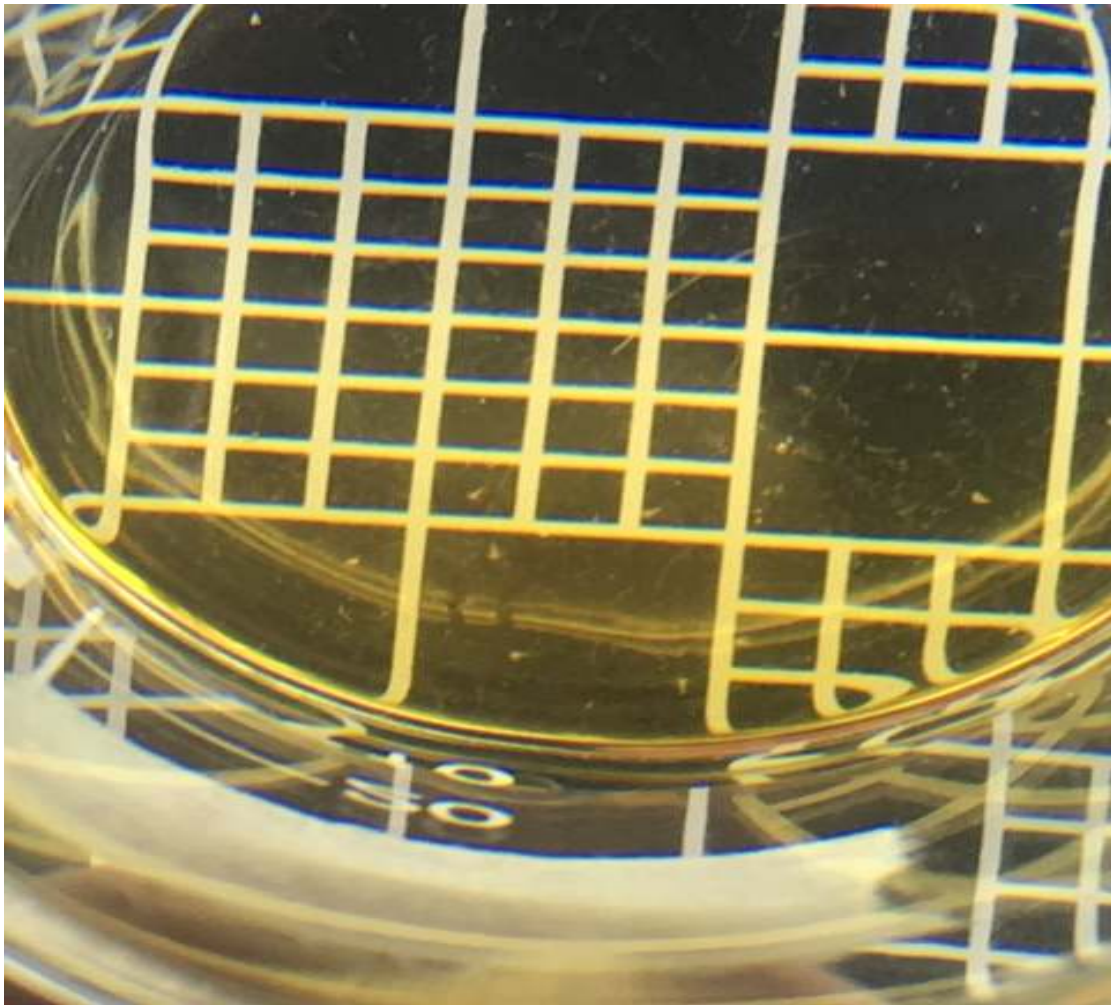
ZENI, Ana Lúcia Bertarello et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703-2712, 2017.

APÊNDICE:



Fonte: acervo pessoa

Figura 7: Processo de extração da *Piper aduncum* pelo método se Soxhlet.



Fonte: acervo pessoal

Figura 8: Ensaio com náuplios de *A. salina* em contato com extrato etanólico de *P. aduncum*.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 9: Resultado do ensaio *A cepa*. Raízes das cebolas no grupo controle.



Fonte acervo pessoal

Figura 10: Plântulas de alface em água após 7 dias de germinação em água destilada.



Fonte acervo pessoal

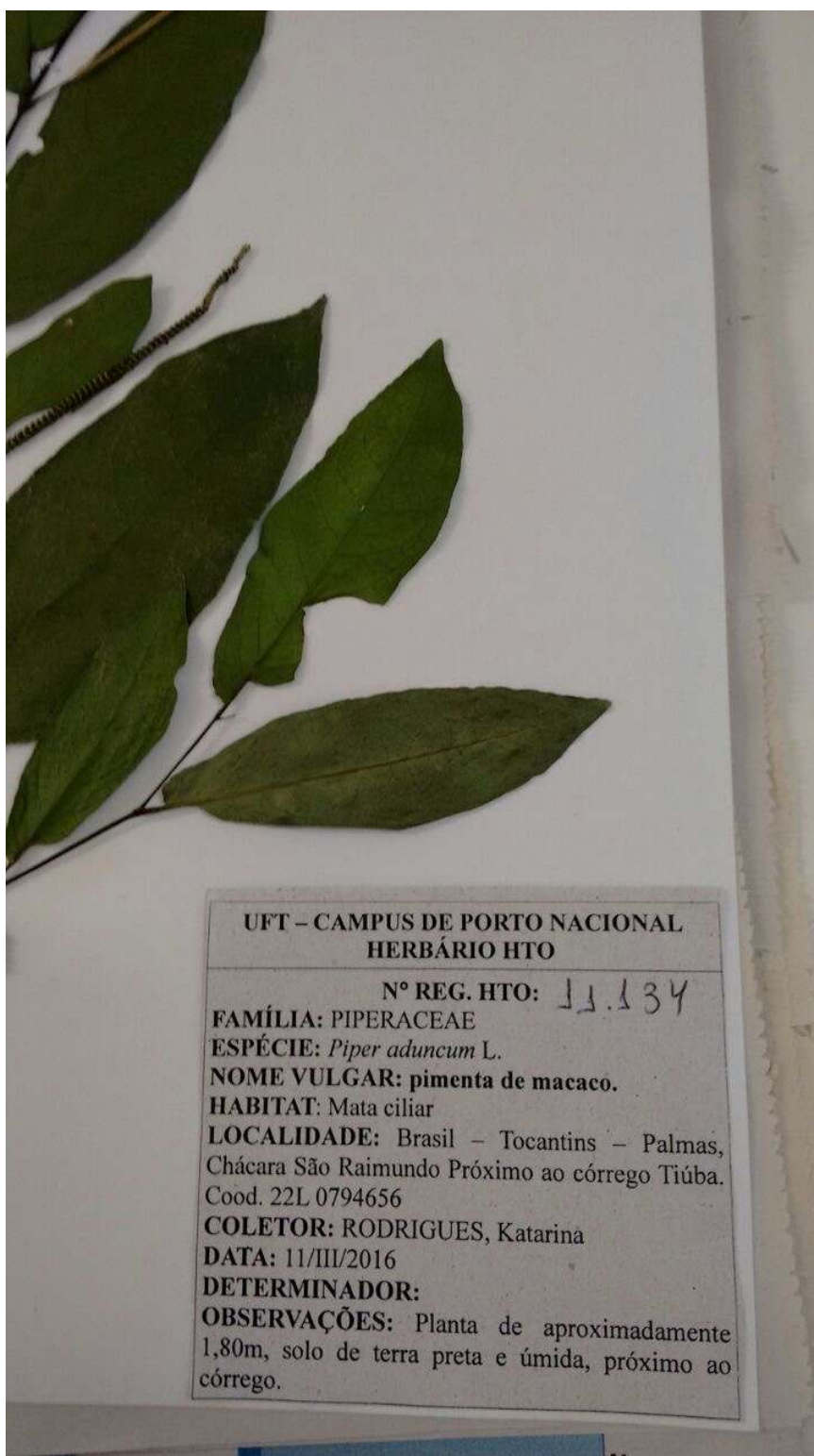
Figura11: Plântulas de alface após 7 dias de germinação em contato com extrato de *P. aduncum*



Fonte: acervo pessoal

Figura 12: Teste de fragilidade osmótica eritrocitária. Amostras após incubação.

ANEXO 1: Identificação da amostra no Herbário do Núcleo de Estudos Ambiental da Universidade Federal do Tocantins.



ANEXO 2: Comprovante de aceite do artigo: **Evaluation of the *in vitro* toxicological potential of crude *Piper aduncum* extract.**

- Dashboard - Submit Manuscript - My Manuscripts - Message History - Make Payment - Payment History - Authors Agreement - Refund Policy - View/Edit Profile - Contact Helpdesk - Logout	Manuscript Info	
	Journal	Journal of Medicinal Plants Research
	Authors	Mrs Rodrigues Katarina Mirna Marinho Tenório
	Manuscript number	JMPR/15.09.22/7266
	Title	Evaluation of the in vitro toxicological potential of crude Piper aduncum extract
	Last Updated	February 1st, 2023
	Current Status	PROOF REMINDER We are yet to receive the response to the galley proof sent to you from the Editorial Office. Kindly respond to enable us include your article in the next publication issue currently being processed. Kindly login to our portal ms.academicjournals.org and make payment using our online payment system if you are yet to make payment Best regards
	Reviewer's Comments	
	Proof	
	Proof	
Upload Revised Manuscript(s)	Escolher Arquivo nenhum arquivo selecionado	

Journal of Medicinal Plants Research

Dear Mrs Rodrigues Katarina Mirna

Marinho Tenório

I am happy to inform you that your manuscript has been accepted and it is currently undergoing publication process. Kindly login to our portal <http://ms.academicjournals.org> and make payment using our online payment system

Manuscript handling fee:
600.00(USD)

Thank you for submitting your manuscript to our journal.

Best regards

Date	29-Dec-2022
Manuscript Number	JMPR/ 15.09.22/7266
Manuscript Title	Evaluation of the in vitro toxicological potential of crude Piper aduncum extract
Payment Status	Payment Request

ANEXO 3: Parecer do Comitê de Ética

	CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
---	--

PARECER CONSUBSTANCIADO	PROCESSO Nº <u>066/2013</u>
PROJETO DE PESQUISA OU TIPO DE TRABALHO:	

O parecer consubstanciado do relator será utilizado como subsídio para o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Universidade Federal do Tocantins elaborar seu parecer final.

1 – Identificação da Proposta de Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso

Título: Investigação do efeito do etanol e de plantas medicinais sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos.

Coordenador do Projeto ou Professor Orientador do TCC:
 Prof. Guilherme Nobre L. do Nascimento

Pesquisadores: Prof. Guilherme Nobre L. do Nascimento

Curso/ Departamento/Faculdade:
 Curso de Nutrição e Enfermagem da Universidade Federal do Tocantins-Campus Palmas

2 – Análise do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso

O objetivo do estudo é avaliar o efeito nocivo de etanol e de plantas medicinais em eritrócitos humanos. O projeto está bem escrito e possui relevância científica, pois há poucos estudos nesta área no estado do Tocantins.

2.1 – Objetivos e Adequação metodológica (Verificar a exequibilidade da proposta, isto é, se existe clareza do objeto, compatibilidade entre os objetivos, a fundamentação teórica e a metodologia ou plano de ação, evidenciando consistência entre objetivos, procedimentos, ações de execução da pesquisa e capacidade do proponente, demonstrada por outros trabalhos similares.)

Adequado ao estudo

2.2 – Avaliação do Questionário a ser aplicado e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

OTCLE está escrito de forma clara e atende ao projeto.

2.3 – Revisão Bibliográfica

A revisão bibliográfica está de acordo com a proposta.

3 – Qualificação do Pesquisador/Orientador (Indicar os atributos do Pesquisador/Orientador, salientando a titulação e experiência compatível com a

função de orientação; qualidade e regularidade da produção científica/tecnológica/artística, compatível com o projeto de pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

O pesquisador do projeto possui experiência na área do projeto.

4 – Parecer conclusivo, recomendações e/ou sugestões:

Projeto aprovado.

5 – Pendências: (Enumerar sucintamente as pendências a serem sanadas pelo Coordenador do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

Não há pendências.

6 – Parecer Consubstanciado

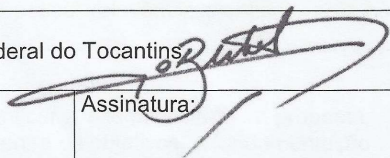
Aprovado: **X**

Não aprovado:

Aprovado e
encaminhado para à
CONEP:

Pendências

7 – Dados do CEP-UFT

Nome Completo:		Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	
Telefone(s):	63 3232-8023	Instituição:	Universidade Federal do Tocantins
Local:	Palmas/TO	Data:	24/05/2013
Assinatura do Coordenador do CEP:		Assinatura: 	
Assinatura do Coordenador do CEP:		Data da reunião: 24/05/2013	

Prof. Dr. Aparecido O. Bertoli,
Presidente do Comitê de Ética
em Pesquisa CEP-UFT

ANEXO 4: Artigo: Toxic and antimicrobial potential from *Piper aduncum* crude extract

ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 12, Issue, 10, pp. 59689-59692, October, 2022

<https://doi.org/10.37118/ijdr.25355.10.2022>

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

TOXIC AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL FROM PIPER ADUNCUM CRUDE EXTRACT

Rodrigues, K.M.M T*¹, Costa Pimenta, R.S.², da Silva, J.F.M² and do Nascimento, G. N. L¹¹Laboratório Ciências Básica e da Saúde – LaCiBS, Universidade Federal do Tocantins, 109 N, Av NS-15, ALCNO-14 CEP: 77001-090, Palmas, Tocantins, Brasil²Laboratório Microbiologia Geral e Aplicada- LMGA, Universidade Federal do Tocantins, 109 N, Av NS-15, ALCNO-14, Bloco L3 CEP: 77001-090, Palmas, Tocantins, Brasil

ANEXO 5: Artigo publicado na revista Desafios:

PARTICULARIDADES DA INFECÇÃO POR DIFERENTES ESTIRPES DE CORONAVIRUS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E DE PRODUÇÃO

Infection particularities by different strains of Coronavirus in domestic and production animals

Particularidades de la infección con diferentes cepas de Coronavirus en animales domésticos y de producción



Katarina Mirna Marinho Tenório Rodrigues¹, André Carloto Vielmo²,
Alberto Corrêa Mendonça³, Pablinny Moreira Galdino de Carvalho²,
Adryano Augusto Valadão de Carvalho²

Artigo Original
Original Article
Artículo Original

¹Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Brasil.

²Laboratório de Fisiopatologia, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Brasil.

³Laboratório de Anatomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

*Laboratório de Ciências Básicas de Saúde (LaCiBS) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Brasil.
e-mail: katmirmatr@gmail.com.

Artigo recebido em --/--/---- aprovado em --/--/---- publicado em --/--/----

RESUMO

Infecções por COVID-19 estão difundidas mundialmente e pesquisadores de todo o mundo buscam elucidar a forma de transmissão, controle, severidade dos casos como também o papel dos animais neste cenário. Sabendo que os animais podem ser contaminados por Coronavirus que causam doenças espécie específica. Porém alguns casos isolados de COVID-19 foram confirmados em alguns animais (cães e felinos), e pessoas que possuem animais domésticos temem pela contaminação. Sabe-se que a transmissão é de humano a humano, e que os animais podem ser contaminados pelo contato com pessoas. Nesta revisão apresentamos o papel dos animais na infecção.

Palavras-chave: Coronavirus; animais, COVID-19

ABSTRACT

COVID-19 infections are worldwide distributed and researchers around the world seek to elucidate the transmission form, control, severity of cases as also the role of animals in this scenario. As it is known animals can be contaminated by coronavirus which causes specific species diseases. However, some isolated cases of COVID-19 have been confirmed in some animals (dogs and cats), and people who have pets fear contamination. Human to human transmission is known, and animals can be infected by human contact. In this review we present the role of animals in this infection.

Keywords: Coronavirus, animals, COVID-19

RESUMEN

Las infecciones por COVID-19 están muy extendidas en todo el mundo y los investigadores buscan dilucidar la forma de transmisión, control, gravedad de los casos y el papel de los animales en este escenario. Sabiendo que los animales pueden estar contaminados por Coronavirus que causan enfermedades específicas de especies. Sin embargo, algunos casos aislados de COVID-19 se han