



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Amanda Amadeu

**A ação da *Piper nigrum* na apoptose e ciclo celular em
adenocarcinoma cervical**

São José do Rio Preto

2023

Amanda Amadeu

**A ação da *Piper nigrum* na apoptose e ciclo celular em
adenocarcinoma cervical**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: PIBIC/Reitoria Proc. 6320 (edital 4/2022)

Orientador: Prof^a. Dr^a. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni

Coorientador: Profa. Juliana Prado Gusson Zanetoni

São José do Rio Preto
2023

A481a

Amadeu, Amanda.

A ação da Piper nigrum na apoptose e ciclo celular em adenocarcinoma cervical / Amanda Amadeu. -- São José do Rio Preto, 2023
29 p. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
Coorientadora: Juliana Prado Gusson Zanetoni

1. Câncer. 2. Fitoterápico. 3. HeLa. I. Título.

Amanda Amadeu

**A ação da *Piper nigrum* na apoptose e ciclo celular em
adenocarcinoma cervical**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: PIBIC/Reitoria Proc. 6320 (edital 4/2022)

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Antonio Carlos Lofego
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
26 de janeiro de 2023

A Deus, que sempre me protegeu, fortaleceu e me direcionou desde o dia em que
cheguei a essa Terra.

À minha mãe, que sempre me apoiou com todo seu amor, carinho e cuidado, me
incentivando a persistir em meus projetos.

A ambos, que me inspiram a ser uma pessoa melhor e a nunca desistir dos meus
objetivos, mesmo quando tudo está difícil.

A todos que pesquisam e se dedicam em ajudar aqueles que mais necessitam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda proteção e capacitação que me concedeu para que uma nova etapa pudesse ser alcançada e concluída em minha vida.

Agradeço à minha mãe que sempre me incentivou e apoiou meus estudos, sendo meu maior exemplo de humildade, perseverança e companheirismo na vida.

Agradeço a todos que acreditaram em mim, quando eu mesma descreditei que seria capaz de continuar e conquistar meus objetivos.

Agradeço à minha orientadora que me acolheu e me orientou na realização deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Permanência Estudantil que durante todo o curso contribuiu para minha permanência na graduação, tornando possível sua conclusão.

Agradeço à Reitoria pela concessão da bolsa PIBIC RT, que viabilizou minha dedicação à pesquisa e a minha iniciação na carreira científica.

“Até ali a Tua mão me guiará e a Tua destra me susterá.”
Salmos 139:10

RESUMO

O câncer de colo de útero, ou câncer cervical, é um dos tumores que mais acomete a população mundial feminina, à medida que consiste no quarto tipo de câncer mais incidente e na quarta principal causa de mortes por câncer no mundo. As maiores taxas de incidência e mortalidade por câncer cervical no mundo ocorrem em países de baixa e média renda, principalmente devido ao acesso precário aos serviços de saúde destinados à triagem, detecção e tratamento precoce das lesões precursoras do câncer, os quais estão totalmente indisponíveis em alguns países. A infecção persistente pelo Vírus do Papiloma Humano é o principal fator associado à etiologia do câncer cervical, sobretudo em populações de baixa e média renda. Diversos fatores atuam induzindo o desenvolvimento do câncer cervical, sobretudo, quando associado aos genótipos carcinogênicos do Vírus do Papiloma Humano, entre eles estão os estrogênios. Nesse sentido, moléculas antiestrogênicas como os fitoestrógenos seriam capazes de inibir a proliferação celular descontrolada e induzir as células tumorais. Sendo assim, a busca por fitoterápicos que apresentem estes compostos têm sido de interesse para o desenvolvimento de terapias ou tratamento adjuvantes com efeitos menos agressivos do que aquele apresentado pelos quimioterápicos mais utilizados. Por isso, o presente estudo objetivou o estudo da ação do extrato bruto e da fração com acetato de etila das folhas da *Piper nigrum* sobre a linhagem celular HeLa (adenocarcinoma cervical) e HaCaT (queratinócitos humanos normais) para fins de comparação entre os efeitos que cada extrato exerceu sobre as células tumorais e saudáveis. Os resultados evidenciaram que os extratos da folha, assim como os do fruto, são eficientes no tratamento desse tipo de câncer ao atuar na parada do ciclo celular e induzir as células tumorais à morte por apoptose, o que revelou que esses extratos merecem mais estudos para que seus compostos ativos e mecanismos de atuação sejam melhores conhecidos para então serem utilizados como um fitoterápico seguro e efetivo.

Palavras-chave: câncer; fitoterápico; extrato de folha; HeLa; HaCaT.

ABSTRACT

The cervical cancer is one of the tumors that most affects the female population worldwide, as it is the fourth most common type of cancer and the fourth leading cause of cancer deaths in the world. The highest incidence and mortality rates for cervical cancer in the world occur in low- and middle-income countries, mainly due to precarious access to health services aimed at screening, detection and early treatment of cancer precursor lesions, which are totally unavailable in some countries. Persistent infection with the Human Papilloma Virus is the main factor associated with the etiology of cervical cancer, especially in low- and middle-income populations. Several factors act to induce the development of cervical cancer, especially when associated with the carcinogenic genotypes of the Human Papilloma Virus, among which are estrogens. In this sense, antiestrogenic molecules such as phytoestrogens would be capable of inhibiting uncontrolled cell proliferation and inducing tumor cells. Therefore, the search for herbal medicines that present these compounds has been of interest for the development of therapies or adjuvant treatments with less aggressive effects than those presented by the most used chemotherapeutics. Therefore, the present study aimed to study the action of the crude extract and the ethyl acetate fraction of the leaves of *Piper nigrum* on the cell line HeLa (cervical adenocarcinoma) and HaCaT (normal human keratinocytes) for the purpose of comparing the effects that each extract exerted on tumor and healthy cells. The results showed that extracts from the leaf, as well as those from the fruit, are efficient in the treatment of this type of cancer by acting in the arrest of the cell cycle and inducing tumor cells to die by apoptosis, which revealed that these extracts deserve further studies to be carried out. that its active compounds and mechanisms of action are better known so that they can be used as a safe and effective herbal medicine.

Keywords: cancer; phytotherapy; leaf extract; HeLa; HaCaT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: O extrato bruto (TE PN) e a fração com acetato de etila (EA PN) 18
têm o potencial de alterar a morfologia das células HeLa (tumerais). É
possível verificar a ocorrência de vesículas de membrana (ponta de seta) e a
morfologia celular deformada (seta) nos tratamentos da linhagem HeLa.
DMSO: controle.

Figura 2: O extrato bruto (TE PN) e a fração com acetato de etila (EA) de 19
Piper nigrum pararam as células no ponto de checagem do ciclo celular nas
células HeLa e HaCaT. DMSO: controle. *vs controle, *vs controle, $p<0,05$, **
vs controle, $p<0,01$; **** vs controle, $p<0,0001$.

Figura 3: O extrato bruto (TE PN) e a fração com acetato de etila (EA PN) da 20
Piper nigrum induzem a morte celular por apoptose em células HeLa e
HaCaT. Nesse caso, Anexina V-PE (-) e 7-AAD (-) correspondem às células
viáveis (VC), Anexina V-PE (+) e 7-AAD (-) correspondem à apoptose precoce
(EA), e, Anexina V-PE (+) e 7-AAD (+) correspondem à apoptose tardia (LA)
ou necrose (N). DMSO: controle. ** vs controle, $p<0,01$; **** vs controle,
 $p<0,0001$.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-Aminoactinomicina D (corante fluorescente)
ANOVA	Análise de variância
ANXA5	Anexina A5
Anexina V-PE	Anexina A5 conjugado com corante fluorescente
ATCC	American Tissue Cell Culture
CO₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
E6	Oncoproteína do HPV E6
E7	Oncoproteína do HPV E7
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
H₂O	Monóxido de di-hidrogênio ou água?
HaCaT	Linhagem celular de queratinócitos normais humanos
HeLa	Linhagem celular de adenocarcinoma (originário da paciente Henrietta Lacks)
HPV	Vírus do Papiloma Humano
IARC	International Agency for Research on Cancer
ISTs	Infecções Sexualmente Transmissíveis
MEM-Earle	Minimum Essential Medium with Earles Balanced Salts
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
p53	Proteína 53 (proteína supressora tumoral)

pRb	Proteína retinoblastoma (proteína supressora tumoral)
G0	G-zero - Fase do ciclo celular
G1	G um - Fase de crescimento da célula – Fase do ciclo celular
G2	G dois - Fase de crescimento da célula – Fase do ciclo celular
S	Fase de Síntese de DNA – Fase do ciclo celular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
g	Grama
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
μM	Micromolar
mM	Milimolar
°C	Graus Celsius
μg/mL	Micrograma por mililitro
±	Plus/Minus
≤	Menor ou igual
p	Nível de significância
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Material	16
3.1.1 Linhagens celulares	16
3.1.2 Materiais vegetais e isolamento da fração acetato de etila	17
3.2 Métodos	17
3.2.1 Cultivo celular	17
3.2.2 Tratamento farmacológico	17
3.2.3 Análise da Apoptose e Ciclo Celular	17
3.2.4 Análise estatística	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero, ou câncer cervical, é um dos tumores que mais acomete a população mundial feminina. Ele é, atualmente, entre as mulheres, o quarto tipo de câncer mais incidente, com 604.127 casos, e, a quarta principal causa de óbitos por câncer, com 341.831 mortes. Conforme as estimativas da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, é previsto que, em 2040, a doença acometa em torno de 798.000 mulheres, e, eleve para 481.000 o número de óbitos por câncer de colo de útero (GLOBOCAN, 2020; SUNG *et al.*, 2021).

Em países de baixa e média renda, 88% dos casos e 91% das mortes por câncer de colo de útero (GLOBOCAN, 2020) ocorre, em grande parte, por conta do acesso precário aos serviços de saúde destinados ao rastreamento, detecção precoce, diagnóstico, e, tratamento do câncer cervical, os quais estão, por vezes, totalmente indisponíveis em algumas regiões (ALLANSON; SCHMELER, 2021; BRUNI *et al.*, 2021), o que é um agravante ao câncer cervical, visto que em países de baixa e média renda há maior prevalência de casos de infecção persistente com genótipos carcinogênicos do Vírus do Papiloma Humano (HPV), considerado um fator em potencial para o desenvolvimento do câncer de colo de útero (OPAS/OMS, 2013; CHEN *et al.*, 2017). Embora a vacina contra o HPV seja fundamental à imunização contra o Vírus do Papiloma Humano, estudos apontam que a adesão e a cobertura vacinal pelas vacinas disponíveis, principalmente em países de baixa e média renda, ainda são pouco abrangentes (DORJI *et al.*, 2021), o que contribui para o agravamento da alta incidência do HPV e de câncer cervical nesses países.

A neoplasia, cuja malignidade acomete o epitélio de revestimento do cérvix uterino, é classificada de acordo com o tipo histológico do tecido em que as lesões se desenvolvem (HULL *et al.*, 2020). O tipo mais frequente é o carcinoma de células escamosas, ou carcinoma epidermoide, que tem origem nas células epiteliais escamosas da ectocérvice, e, representa cerca de 80 a 85% dos casos de câncer de colo de útero. O segundo tipo mais frequente é o adenocarcinoma, que tem origem nas células epiteliais glandulares produtoras de muco da endocérvice, e, representa cerca de 10 a 25% dos casos de câncer cervical. E, menos frequentemente, há o carcinoma adenoescamoso, que tem origem em um misto de células escamosas e glandulares, e, representa cerca de 1 a 2% de todos os casos de câncer de colo do útero (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

Referente a cada um dos tipos de câncer cervical mencionados anteriormente pode-se dizer que o fator que os relacionam entre si diz respeito à principal etiologia comum a cada um deles: o Vírus do Papiloma Humano (HPV), considerado o principal agente etiológico das lesões precursoras do câncer cervical (CHEN *et al.*, 2017), sendo que quase 100% dos casos de carcinoma de células escamosas e cerca de 90 a 95% dos adecarcinomas cervicais são associados às infecções persistentes pelo HPV não tratado. Entre os mais de 150 tipos, os tipos oncogênicos mais comuns identificados no câncer cervical são os: HPV16, HPV18, HPV45, HPV31 e o HPV33, sendo os dois primeiros os mais recorrentes, correspondendo a 53% e 15% dos casos, respectivamente (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

Estudos evidenciaram que a carcinogênese do câncer cervical induzido pelo HPV muitas vezes está associada a cofatores, como: tabagismo, iniciação sexual precoce, gravidez precoce, multiparidade, multiplicidade de parceiros sexuais, uso de contraceptivos orais (International Collaboration Of Epidemiological Studies Of Cervical Cancer *et al.*, 2006; 2007; International Collaboration Of Epidemiological Studies Of Cervical Cancer, 2006a; 2006b; 2009), imunossupressão devido à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (STELZLE *et al.*, 2021) ou preexistência de outras Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs), como a clamídia (*Chlamydia trachomatis*) e a herpes (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic, 2007).

Conjuntamente ao HPV, outro aliado atua induzindo o desenvolvimento do câncer de colo de útero: os estrogênios, os quais têm o potencial de intensificar os efeitos das oncoproteínas virais sintetizadas pelos oncogênes E6 e E7 do HPV que, respectivamente, degrada a p53 e inibe a pRb das células cervicais, descontrolando a expressão de seus genes supressores tumorais (PAL; KUNDU, 2020). Com isso, os estrogênios enriquecem o microambiente tumoral cervical para que quimiocinas, citocinas e funções inflamatórias e imunológicas ligadas à carcinogênese atuem no desenvolvimento do câncer de colo de útero. Portanto, moléculas antiestrogênicas poderiam contribuir para o tratamento do câncer cervical (DE NOLA *et al.*, 2019).

Um tipo de moléculas antiestrogênicas são os fitoestrógenos (MACHADO *et al.*, 2021), que já demonstraram ter efeitos na inibição da proliferação celular (LECOMTE *et al.*, 2017). Eles consistem em polifenóis derivados de plantas, cujas propriedades biológicas e estrutura molecular são semelhantes aos estrogênios de humanos (GAYA *et al.*, 2017; KRISHNA; KURIAKOSE; LAKSHMI, 2022). Ao se ligar

nos estrógenos, esses compostos atuam como desreguladores endócrinos, impedindo a ligação desses esteroides a seus receptores, inviabilizando seus efeitos no organismo (YILMAZ *et al.*, 2019). Uma das classes de fitoestrógenos consiste nas lignanas (LIU *et al.*, 2017; JANG; KIM; CHO, 2022).

Um tipo de lignana bioativa é a cubebina, que demonstrou ter propriedades: anti-inflamatória (BASTOS *et al.*, 2001), antiproliferativa, apoptótica (YAM; KREUTER; DREWE, 2008) e anticancerígena (RAJALEKSHMI *et al.*, 2016) em distintas linhagens celulares, além de efeitos: citotóxico (NIWA *et al.*, 2016), clastogênico e genotóxico, conforme a concentração de cubebina utilizada no tratamento celular (MAISTRO *et al.*, 2011). Esse tipo de lignana ocorre em plantas do gênero *Piper*, estando presente tanto nos frutos como nas folhas da *Piper nigrum* e da *Piper cubeba*, respectivamente, conhecidas como pimenta-do-reino e pimenta-de-Java. Em relação às folhas da *Piper nigrum*, foi constatada a presença de (-)-cubebina, (-)-3,4-dimetoxi-3,4-desmetilenodioxibina e (-)-3-desmetoxicubebina, além de um elevado teor de compostos polifenólicos, os quais ainda não tiveram seus efeitos sobre o câncer tão bem investigados (MATSUDA *et al.*, 2004; HIRATA *et al.*, 2007a; HIRATA *et al.*, 2007b; HIRATA *et al.*, 2008).

Ao contrário da folha, o fruto da *Piper nigrum* é muito bem descrito, sobretudo pela sua importância comercial como especiaria e pelo seu uso na medicina tradicional chinesa, ayurvédica e tribal para o tratamento de diversas condições de saúde, como febre, asma e câncer, sendo associada pelo povo quilombola, no Brasil, ao tratamento de inflamações (DE SOUZA GRINEVICIUS *et al.*, 2016). No que se refere às propriedades farmacológicas da *Piper nigrum*, foi demonstrada atividade anti-inflamatória (NGO *et al.*, 2017), anti-hipertensiva (AZIZ; MEHMOOD; GILANI., 2013), antioxidante (TU *et al.*, 2015), antimicrobiana (NIKOLIĆ *et al.*, 2015), antidepressiva (HRITCU *et al.*, 2015) e antitumoral (SRIWIRIYAJAN *et al.*, 2016). A atividade antitumoral foi observada pelas propriedades citotóxicas (PRASHANT *et al.*, 2017), quimiopreventiva (MANAYI *et al.*, 2018), antiproliferativa (DENG *et al.*, 2016), apoptótica (SRIWIRIYAJAN *et al.*, 2017), anti-metástase (NANDAKUMAR *et al.*, 2017) e genotóxica (DE SOUZA GRINEVICIUS *et al.*, 2016), obtidos pelos extratos e metabólitos secundários extraídos do fruto da *Piper nigrum*.

Tendo em vista a propriedade apoptótica da *Piper nigrum* e que a resistência à apoptose é uma das características mais expressas no câncer (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007), estudos sobre a ação que os extratos das folhas

exercem na apoptose e ciclo celular de células cancerígenas podem corroborar com os resultados de estudos anteriores, realizados com o extrato do fruto. Atualmente, sabe-se que os alcaloides piperina e piperidina, encontrados na *Piper nigrum*, já demonstraram potencial terapêutico contra os cânceres de mama, de ovário, gástrico, glioma, pulmão, próstata, reto, cólon e leucemia, além do próprio câncer cervical (MITRA *et al.*, 2022). Sendo assim, uma melhor compreensão da ação dos fitoquímicos da *Piper nigrum* pode contribuir para o desenvolvimento de terapias mais precisas e menos agressivas, tendo a apoptose como um dos alvos terapêuticos para o tratamento de adenocarcinoma cervical.

Em decorrência do grande enfoque de estudos dado ao fruto da *Piper nigrum* devido a fins comerciais, pouco se sabe sobre as outras partes, como o pericarpo, caules e folhas dessa planta, que são tratadas como resíduos nas áreas de plantio (YU *et al.*, 2022). Conforme a demanda pela sustentabilidade ambiental e evidências de muitas atividades farmacológicas associadas às plantas, que representam mais de 50% dos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (NEWMAN; CRAGG, 2020), o estudo desses subprodutos é de grande interesse, demonstrando a importância de investigar novos extratos para fins medicinais.

2. OBJETIVOS

Diante da importância da busca por produtos naturais com fins medicinais e da escassez de estudos envolvendo a folha da *Piper nigrum*, foi desenvolvido o presente trabalho, que tem como objetivo investigar se o extrato bruto e a fração acetato de etila da folha da *Piper nigrum* possuem efeito antitumoral *in vitro*, a partir da parada do ciclo celular e da indução da apoptose, para seu possível uso como tratamento coadjuvante no câncer de colo de útero.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas duas linhagens da American Tissue Cell Culture (ATCC): uma de adenocarcinoma cervical (HeLa) infectada pelo HPV18 (MACVILLE *et al.*, 1999) e uma não tumorigênica derivada de queratinócitos da pele humana (HaCaT), com o objetivo de comparação.

3.1.2 Materiais vegetais e isolamento da fração acetato de etila

As folhas da *Piper nigrum* foram coletadas no município de Palmeira d'Oeste (20°22'18" S 50°49'02" W) e após secas e pulverizadas (50g), foram solubilizadas em etanol aquoso 70% (400mL) durante 7 dias. Após isso, a solução foi filtrada e rotaevaporada sob vácuo para obter o extrato hidroalcoólico bruto. O extrato bruto (4g) foi inserido em um funil de separação, ao qual foi adicionado acetato de etila. Esse extrato de acetato de etila foi diluído em 50% DMSO e 50% H₂O. As concentrações de DMSO máximas foram inferiores a 0,1%, não sendo considerada citotóxica para as linhagens celulares (REZK *et al.*, 2015; SIENIAWSKA *et al.*, 2019).

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo celular

A linhagem celular HeLa foi semeada em meio completo MEM-Earle (Cultilab, Br) e a HaCaT em meio DMEM (Cultilab, Br), ambos os meios com pH 7,5, suplementados com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico / antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 1% de L-glutamina (200 µM) (Sigma Aldrich, EUA) e 1% de aminoácidos não essenciais (10mM) (Sigma Aldrich, EUA) a 37°C em incubadora de CO₂ umidificada até atingirem 70% de confluência. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, ou, até ter se tornado confluyente. As células foram avaliadas diariamente em microscópio invertido e, quando a densidade celular se mostrou alta, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em três réplicas.

3.2.2 Tratamento farmacológico

O extrato bruto e a fração acetato de etila da *Piper nigrum* foram aplicados nos experimentos na concentração de 50µg/mL, e, o DMSO aplicado no volume máximo de 50%, sendo utilizado como controle. Os tratamentos foram realizados em triplicatas experimentais (CARDOSO *et al.*, 2019).

3.2.3 Análise de Apoptose e Ciclo Celular

As células foram analisadas pela citometria de fluxo (Guava Easy Cyte, MILLIPORE) para investigar a apoptose e o ciclo celular, após o tratamento com o extrato bruto e a fração acetato de etila da *Piper nigrum*. Para a análise de apoptose e necrose celular, as suspensões de células (1x10⁶) foram incubadas com anticorpo monoclonal ANXA5 conjugado com fluorocromo PE e com 7-ADD (BD Pharmingen,

San Diego, EUA), por 15 minutos e analisadas. Para a análise do Ciclo celular, as suspensões de células (1×10^6) foram fixadas com etanol 70% e ressuspensas na solução Guava® Cell Cycle Reagent (MILLIPORE, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

3.2.4 Análise estatística

Após os ensaios, os dados foram submetidos à análise estatística com média $\pm$ desvio padrão e submetidos à análise de variância a dois critérios (ANOVA). Também foram aplicados os testes de Tukey e Dunnett para múltipla comparação. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

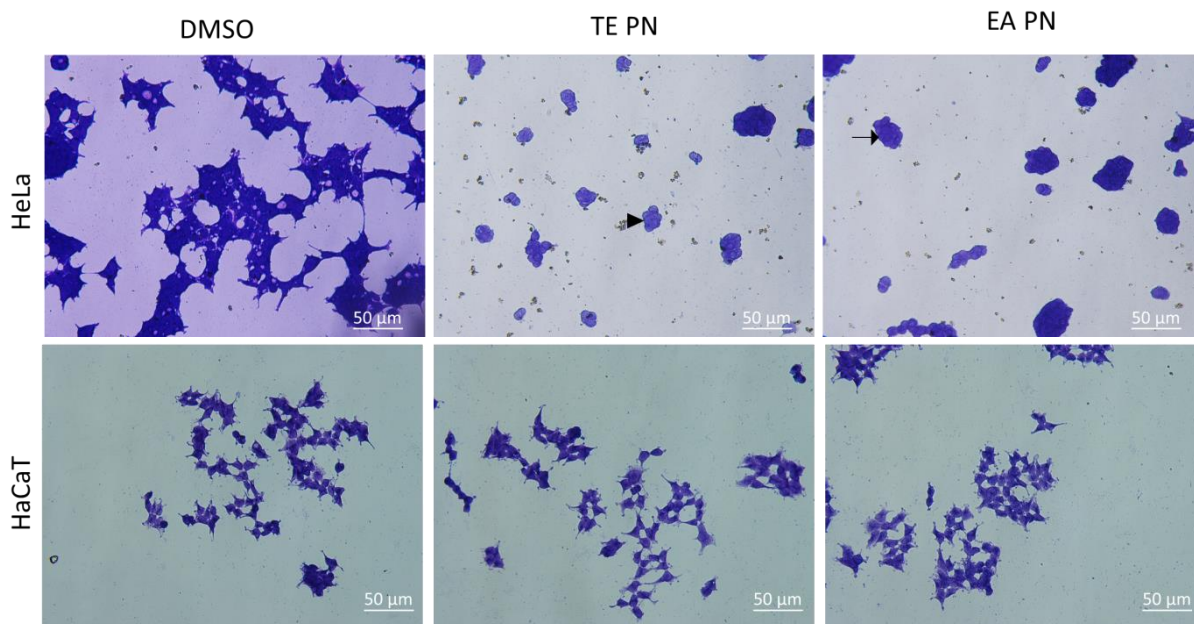
Duas das principais marcas do câncer são: a proliferação descontrolada de células anormais e a resistência à apoptose (HANAHA; WEINBERG, 2011). Devido a isso, essas duas características são alvo nas opções de tratamentos em diversos tipos de tumor, sendo a parada do ciclo celular e a indução à apoptose fatores de interesse em numerosos estudos sobre o câncer (VLADU *et al.*, 2022; GRIVICICH; REGNER.; DA ROCHA, 2007).

Nesse sentido, a existência dos pontos de checagem G1/G0, S, G2/M no ciclo celular é fundamental para o controle da proliferação celular e para manter a integridade tecidual (LAIHO; LATONEN, 2003), sendo esses pontos responsáveis pela verificação da viabilidade do ciclo e pela decisão da sua continuidade ou cessação, seja pela via intrínseca, extrínseca ou perforina/granzima da apoptose (KASTAN; BARTEK, 2004).

Conforme isso, os extratos da folha da *Piper nigrum* demonstrou, no presente estudo, ter atuado na parada do ciclo celular de células *in vitro* de adenocarcinoma cervical e levado as células tumorais à apoptose, evidenciando sua contribuição na redução da progressão tumoral. Essas mudanças no ciclo e no metabolismo celular, primeiramente, foram observadas na forma de alterações morfológicas na estrutura celular da linhagem tumoral, tratada separadamente com cada um dos extratos da *Piper nigrum*.

Figura 1: O extrato bruto (TE PN) e a fração com acetato de etila (EA PN) têm o potencial de alterar a morfologia das células HeLa (tumorais). É possível verificar a ocorrência de vesículas de membrana

(ponta de seta) e a morfologia celular deformada (seta) nos tratamentos da linhagem HeLa. DMSO: controle.

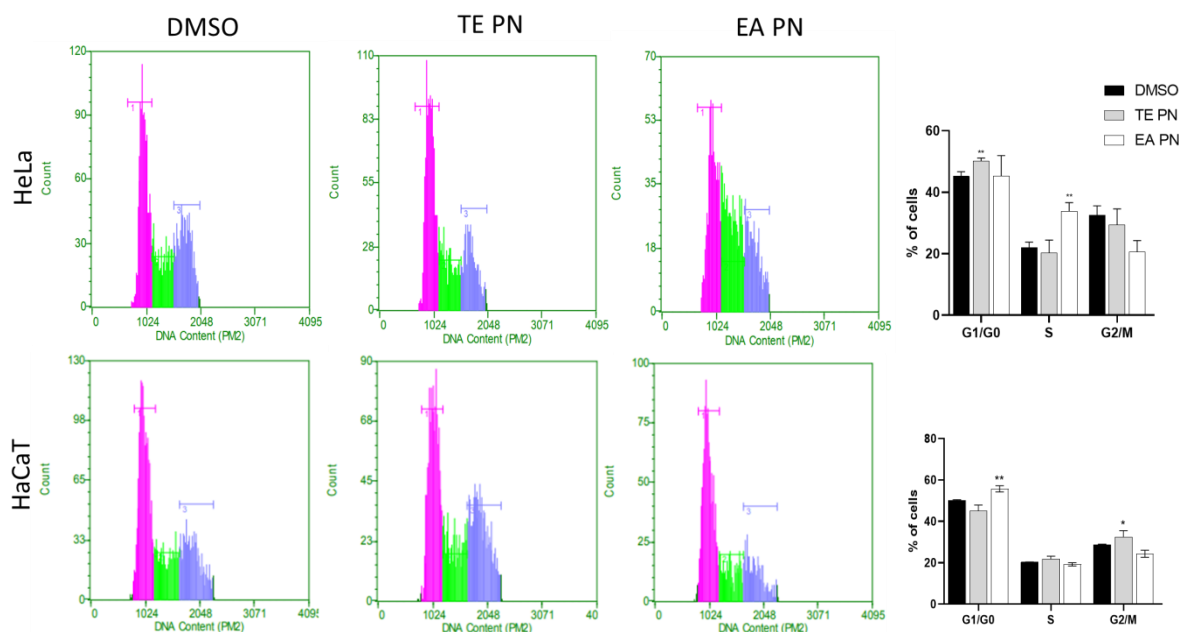


Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 1, foi observado que após ser submetida ao tratamento com o extrato bruto e com a fração acetato de etila, a linhagem celular HeLa, cuja as células apresentavam formato fusiforme e estrelado, sofreu alterações em sua morfologia, adquirindo formato arredondado e com vesículas citoplasmáticas.

Por outro lado, a linhagem celular HaCaT mesmo após ter sido submetida ao tratamento com o extrato bruto da *Piper nigrum* e com a fração acetato de etila não apresentou alterações morfológicas aparentes, continuando com formato estrelado. Essas mudanças na morfologia da linhagem HeLa demonstraram aspectos físicos típicos que caracterizam a morte celular por apoptose (YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020), enquanto a ausência de alterações morfológicas na linhagem HaCaT indicou a inocorrência da apoptose em células não tumorais.

Figura 2: O extrato bruto (TE PN) e a fração com acetato de etila (EA PN) de *Piper nigrum* pararam as células no ponto de checagem do ciclo celular nas células HeLa e HaCaT. DMSO: controle. *vs controle, *vs controle, $p < 0,05$, ** vs controle, $p < 0,01$; **** vs controle, $p < 0,0001$.



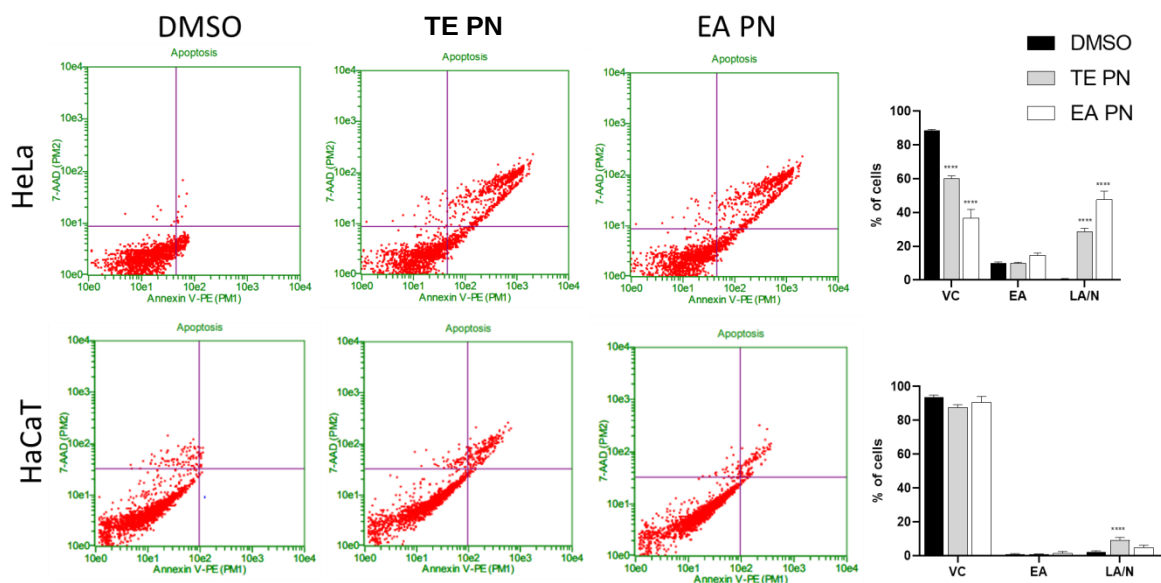
Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 2, os resultados obtidos com base na análise do ciclo celular visaram avaliar se o extrato bruto e a fração acetato de etila ocasionaram a parada do ciclo nos seus pontos de checagem G1/G0, S, G2/M.

Conforme isso foi observado que quando aplicado sobre a linhagem HeLa, o extrato bruto levou ao maior acúmulo de células pela parada do ciclo celular no ponto de checagem G1/G0, enquanto a fração acetato de etila levou a um maior acúmulo de células pela parada do ciclo na fase S da intérfase.

Por outro lado, quando aplicado sobre a linhagem HaCaT, a fração acetato de etila parou o ciclo celular, principalmente, no ponto G1/G0, enquanto o extrato bruto promoveu essa maior parada do ciclo no ponto de checagem G2/M, que antecede a mitose. Estudos sobre os extratos do fruto da *Piper nigrum* também demonstraram a parada do ciclo celular em células de carcinoma de mama e cólon (GRINEVICIUS *et al.*, 2016) e em células de carcinoma pancreático (JEONG *et al.*, 2021) no ponto de checagem G1/G0, levando as células tumorais, posteriormente, à apoptose, o que corrobora com os resultados aqui obtidos.

Figura 3: O extrato bruto (TE PN) e a fração com acetato de etila (EA PN) da *Piper nigrum* induzem a morte celular por apoptose em células HeLa e HaCaT. Nesse caso, Anexina V-PE (-) e 7-AAD (-) correspondem às células viáveis (VC), Anexina V-PE (+) e 7-AAD (-) correspondem à apoptose precoce (EA), e, Anexina V-PE (+) e 7-AAD (+) correspondem à apoptose tardia (LA) ou necrose (N). DMSO: controle. ** vs controle, $p < 0,01$; **** vs controle, $p < 0,0001$.



Fonte: Elaborado pela autora.

A hipótese de que as alterações morfológicas observadas na Figura 1 foram ocasionadas devido à apoptose foi comprovada pela análise de morte celular pela citometria de fluxo, apresentada na Figura 3.

Essa análise revelou que tanto o extrato bruto como a fração acetato de etila levou à linhagem HeLa à apoptose precoce e tardia, havendo no entanto, uma maior porcentagem das células tumorais em apoptose tardia ou necrose.

Também foi observado que a fração acetato de etila é relativamente mais bioativa do que o extrato bruto na linhagem tumoral HeLa, diferentemente do que foi observado na linhagem não tumoral HaCaT, na qual a fração acetato de etila não desencadeou esse mesmo efeito, sendo levadas à apoptose tardia apenas quando submetidas ao tratamento com o extrato bruto.

Logo, isso evidencia uma maior seletividade da fração acetato de etila pelas células tumorais, sem que haja o comprometimento de células saudáveis, o que é uma característica fundamental aos fitoquímicos de potenciais fitoterápicos, tendo sido destacada em estudos anteriores (LIU *et al.*, 2021).

Pesquisas com extratos das folhas da *Piper nigrum* também demonstraram propriedades farmacológicas e cardioprotetora em ratos (MBALLA *et al.*, 2021) e propriedades neuroprotetora e antioxidante em células neurológicas (YU *et al.*, 2022) corroborando com o potencial terapêutico dos extratos da folha da *Piper nigrum* em outras condições de saúde, que não seja o câncer.

Possivelmente, o efeito antitumoral de ambos os extratos analisados no presente estudo se deva às propriedades antioxidantes, visto que esse efeito atua na regulação de diversos mecanismos que implicam na progressão do câncer (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). No mais, outro estudo com tecidos cultivados *in vitro* relatou que os calos, brotos, raízes e plântulas de *Piper nigrum* apresentam propriedades antioxidantes, provavelmente devido à presença de flavonoides e conteúdo fenólico nessas partes da planta (AHMAD *et al.*, 2010).

Os resultados aqui obtidos devem-se à participação de lignanas como a cubebina e, possivelmente, de alcalóides como piperina e piperamida. No entanto, não foram delimitados com exatidão os compostos bioativos envolvidos em cada um desses processos nem foram identificados todos os fitoquímicos presentes nas frações, não sendo por isso, descritos a fundo no presente trabalho. Logo, isso evidencia a necessidade de que mais estudos sejam desenvolvidos para melhor elucidação dos compostos presentes nos extratos da folha da *Piper nigrum* e para que haja uma melhor compreensão sobre como cada um dos fitoquímicos presentes atuam na parada do ciclo celular e na indução das células tumorais do adenocarcinoma cervical à apoptose.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que tanto o extrato bruto como a fração acetato de etila mostraram ser eficientes no tratamento de células de adenocarcinoma cervical, sendo pouco agressivos às células não tumorais. Essa eficiência de ambos os extratos foram evidenciadas pela da parada do ciclo celular em seus pontos de checagem e pela indução das células tumorais à morte celular por apoptose sendo, portanto, um fitoterápico promissor para o tratamento do câncer cervical.

Conforme isso e tendo em vista a demanda pelo desenvolvimento de terapias menos agressivas para o tratamento do câncer, deve ser ressaltada a necessidade de que mais estudos sejam realizados utilizando os extratos da folha, não só para maior elucidação de quais fitoquímicos atuam nesses processos, mas para uma melhor compreensão sobre quais mecanismos e vias são empregados por cada um destes extratos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. *et al.* Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated tissues of *Piper nigrum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 1, p. 129-134, 2010.
- ALLANSON, E.R.; SCHMELER, K. M. Cervical cancer prevention in low and middle income countries. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 501-518, 2021.
- AZIZ, N; MEHMOOD, M. H.; GILANI, A. H. Studies on two polyherbal formulations (ZPTO and ZTO) for comparison of their antidyslipidemic, antihypertensive and endothelial modulating activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n.371, p. 01-09, 2013.
- BASTOS, J. K. *et al.* Anti-inflammatory activity of cubebin , a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 75, n. 2-3, p. 279-282, 2001.
- BRUNI, L. *et al.* **Human Papillomavirus and Related Diseases Report: WORLD**. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre), Barcelona - Espanha, 2021.
- CARDOSO, L. P. *et al.* **Efeito Antitumorigênico do Extrato Total da Folha de *Piper nigrum* em Diferentes Linhagens Celulares**. Orientadora: Flavia Cristina Rodrigues Lisoni. 2019. TCC (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2019.
- CHEN, L. *et al.* APOBEC-mediated genomic alterations link immunity and viral infection during human papillomavirus-driven cervical carcinogenesis. **BioScience Trends**. [s.l.], v. 11, n. 4, p. 383-388, 2017.
- DE NOLA, R. *et al.* The crowded crosstalk between cancer cells and stromal microenvironment in gynecological malignancies: Biological pathways and therapeutic implication. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 10, p. 01-29, 2019.
- DE SOUZA GRINEVICIUS, V. M. A. *et al.* *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 189, p. 139–147, 2016.

DENG, Y *et al.* Anti-cancer effects of *Piper nigrum* via inducing multiple molecular signaling in vivo and *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 188, p. 87-95, 2016.

DORJI, T. *et al.* Human papillomavirus vaccination uptake in low-and middle-income countries: a meta-analysis. **EClinicalMedicine**, v. 34, n. 100836, p. 01-11, 2021.

GAYA, P. *et al.* Incomplete metabolism of phytoestrogens by gut microbiota from children under the age of three. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s.l.], v. 69, n. 3, p. 334-343, 2017.

GLOBOCAN. **Global Cancer Observatory**, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 04 de janeiro de 2023.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s.l.], v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HIRATA, N *et al.* Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 14, p. 4897-4902, 2007a.

HIRATA, N *et al.* Testosterone 5alpha-reductase inhibitory active constituents of *Piper nigrum* leaf. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. [s.l.], v. 30, n. 12, p. 2402-2405, 2007b.

HIRATA, N. *et al.* Histamine release inhibitory activity of *Piper nigrum* leaf. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 31, n. 10, p. 1973-1976, 2008.

HRITCU, L *et al.* Anxiolytic and antidepressant profile of the methanolic extract of *Piper nigrum* fruits in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease. **Behavioral and Brain Functions**, [s.l.], v. 11, n. 13, p. 01-13, 2015.

HULL, R. *et al.* Cervical cancer in low and middle-income countries (Review). **Oncology Letters**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 2058–2074, 2020.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human Papillomaviruses**, Lyon - França, v. 90, p. 01-689, 2007.

International Collaboration Of Epidemiological Studies Of Cervical Cancer *et al.* Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13.541 women with carcinoma of the cervix and 23.017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 118, n. 6, p. 1481-1495, 2006.

International Collaboration Of Epidemiological Studies Of Cervical Cancer *et al.* Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16.573 women with cervical cancer and 35.509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **The Lancet**, [s.l.], v. 370, n. 9599, p. 1609-1621, 2007.

International Collaboration Of Epidemiological Studies Of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16.563 women with cervical carcinoma and 33.542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 119, n. 5, p. 1108-1124, 2006a.

International Collaboration Of Epidemiological Studies Of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15.461 women with cervical carcinoma and 29.164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 1060-1069, 2009.

International Collaboration Of Epidemiological Studies Of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8.097 women with squamous cell carcinoma and 1.374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 120, n. 4, p. 885-891, 2006b.

JANG, W. Y.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Menopausal, and Anti-Cancer Effects of Lignans and Their Metabolites. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 01-19, 2022.

JEONG, J. H.; RYU, J. H.; LEE, H. J. *In Vitro* Inhibition of *Piper nigrum* and Piperine on Growth, Migration, and Invasion of PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. **Natural Product Communications**, [s.l.], v. 16, n. 11, p. 01-08, 2021.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, [s.l.], v. 432, n. 7015, p. 316-323, 2004.

KRISHNA, S. S.; KURIAKOSE, B. B.; LAKSHMI, P. K. Effects of phytoestrogens on

reproductive organ health. **Archives of Pharmacal Research**, [s.l.], v. 45, n. 12, p. 849-864, 2022.

LAIHO, M.; LATONEN, L. Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer. **Annals of Medicine**, [s.l.], v. 35, n. 6, p. 392-397, 2003.

LECOMTE, S *et al.* Glyceollins trigger anti-proliferative effects through estradiol-dependent and independent pathways in breast cancer cells. **Cell Communication and Signaling**, [s.l.], v. 15, n. 26, p. 1-18, 2017.

LIU, H. *et al.* Enterolactone has stronger effects than enterodiol on ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, [s.l.], v. 10, n. 49, p. 01-09, 2017.

LIU, Y. Q. *et al.* Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 80, n. 153402, p. 01-60, 2021.

MACHADO, T. S. *et al.* Fitoestrógenos no climatério: proposição de um cardápio rico em fitoestrógenos para mulheres climatéricas. **Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento**, Porto Alegre, v. 26, n. 2, p. 59-84, 2021.

MACVILLE, M. *et al.* Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. **Cancer research**, v. 59, n. 1, p. 141-150, 1999.

MAISTRO, E. L. *et al.* Genotoxic effects of (-)-cubebin in somatic cells of mice. **Journal of Applied Toxicology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 185-189, 2011.

MANAYI, A. *et al.* Piperine as a Potential Anti-cancer Agent: A Review on Preclinical Studies. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 37, p. 4918-4928, 2018.

MATSUDA, H. *et al.* Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by *Piper nigrum* leaf extract and its lignan constituents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 27, n. 10, p. 1611-1616, 2004.

MBALLA, D. L. E. *et al.* Cafeteria Diet-Induced Metabolic and Cardiovascular Changes in Rats: The Role of *Piper nigrum* Leaf Extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1-14, 2021.

MITRA, S. *et al.* Anticancer Applications and Pharmacological Properties of Piperidine and Piperine : A Comprehensive Review on Molecular Mechanisms and

Therapeutic Perspectives. **Frontiers in Pharmacology**, [s.l.], v. 12, n. 772418, p. 01-19, 2022.

NANDAKUMAR, N. *et al.* Synthesis of coumapherine derivatives: Their NF- κ B inhibitory effect, inhibition of cell migration and their cytotoxic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 125, p. 1076-1087, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NGO, Q. M. T. *et al.* Alkaloids from *Piper nigrum* Exhibit Antiinflammatory Activity via Activating the Nrf2/HO-1 Pathway. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 663-670, 2017.

NIKOLIĆ, M. *et al.* Could essential oils of green and black pepper be used as food preservatives?. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 52, n. 10, p. 6565-6573, 2015.

NIWA, A. M. *et al.* Evaluation of lignan (-)-cubebin extracted from *Piper cubeba* on human colon adenocarcinoma. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, [s.l.], v. 79, n. 2, p. 92-100, 2016.

OPAS/OMS. **NOTA DE ORIENTAÇÃO DA OPAS/OMS: Prevenção e controle de amplo alcance do câncer do colo do útero: um futuro mais saudável para meninas e mulheres**. Washington, D.C., p. 01-16, 2013.

PAL, A; KUNDU, R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 3116, p. 01-15, 2020.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, v. 387, p. 95-105, 2017.

PRASHANT, A. *et al.* *In vitro* anticancer activity of ethanolic extracts of *Piper nigrum* against colorectal carcinoma cell lines. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 67-72, 2017.

RAJALEKSHMI, D. S. *et al.* Anticancer activity studies of cubebin isolated from *Piper cubeba* and its synthetic derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 26, n. 7, p. 1767-1771, 2016.

REZK, A. *et al.* Assessment of cytotoxicity exerted by leaf extracts from plants of the genus *Rhododendron* towards epidermal keratinocytes and intestine epithelial cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 364, p. 01-18, 2015.

SIENIAWSKA, E. *et al.* Microemulsions of essentials oils - Increase of solubility and antioxidant activity or cytotoxicity?. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 129, p. 115-124, 2019.

SRIWIRIYAJAN, S. *et al.* (-)-Kusunokinin and piperloguminine from *Piper nigrum*: An alternative option to treat breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 92, p. 732-743, 2017.

SRIWIRIYAJAN, S. *et al.* Anti-cancer and cancer preventive effects of a piperine free *Piper nigrum* extract on N-nitrosomethylurea induced mammary tumorigenesis in rats. **Cancer Prevention Research**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 74-82, 2016.

STELZLE, D. *et al.* Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. **The Lancet Global Health**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. e161-e169, 2021.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TU, Y. *et al.* Anticholinesterases and antioxidant alkalamides from *Piper nigrum* fruits. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 30, n. 17, p. 1945-1949, 2015.

VLADU, A. F. *et al.* Combination Therapy Using Polyphenols: An Efficient Way to Improve Antitumoral Activity and Reduce Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 18, p. 01-36, 2022.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. **World Cancer Report: Cancer research for cancer prevention**. International Agency for Research on Cancer, Lyon - França, 2020.

YAM, J.; KREUTER, M.; DREWE, J. *Piper cubeba* targets multiple aspects of the androgen-signalling pathway. A potential phytotherapy against prostate cancer growth?. **Planta Medica**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 33-38, 2008.

YAN, G.; ELBADAWI, M.; EFFERTH, T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). **World Academy of Sciences Journal**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 39-48, 2020.

YILMAZ, B *et al.* Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 127-147, 2019.

YU, L. *et al.* Amide alkaloids characterization and neuroprotective properties of *Piper nigrum* L.: A comparative study with fruits, pericarp, stalks and leaves. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 368, n. 130832, p. 01-08, 2022.