



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

WILKA MARIA DO NASCIMENTO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAIS ANTIOXIDANTE E
ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium salutare* (KUNTH) O.
BERG**

Recife
2019

WILKA MARIA DO NASCIMENTO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium salutare* (KUNTH) O.
BERG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Dr.^a Márcia Vanusa da Silva

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Silva, Wilka Maria do Nascimento

Caracterização química e potenciais antioxidante antinociceptivo do óleo essencial de *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg / Wilka Maria do Nascimento. – 2019.

55 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Caatinga. 3. Plantas da Caatinga. I. Correia, Maria Tereza Dos Santos (Orientadora). II. Silva, Marcia Vanusa da (Coorientadora). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020 - 043

WILKA MARIA DO NASCIMENTO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Psidium salutare* (KUNTH) O.
BERG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Bioquímica

Aprovada em: 27/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Alexandre Gomes da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Marília Cavalcanti Coriolano (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

*Aos meus avós que mesmo não estando mais presente fisicamente, viverão para sempre em
minha memória, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos e livramentos diários, e por ter me guiado até aqui.

À minha família, principalmente meus pais e minhas tias por toda a base que me oferecem, pelo investimento e incentivo a sempre continuar em frente.

À minha orientadora, professora Maria Tereza dos Santos Correia, pela confiança em meu potencial e por ter me aceito como aluna orientanda. Da mesma forma, agradeço também à professora Márcia Vanusa da Silva, minha coorientadora, por todo o apoio para prosseguimento desta pesquisa, assim como as ideias para elaboração do trabalho.

Ao meu noivo, Thyago Nepomuceno, que sem dúvida alguma foi um dos principais responsáveis por ter chegado até aqui. Agradeço por todo incentivo, “empurrões” e apoio que me trouxeram até este ponto. Assim como pelo companheirismo e presença em todos os meus momentos.

Às minhas amigas, Eloá Regina e Tábatta Carneiro, sempre presentes na minha vida, compartilhando momentos de alegria e tristeza, derrotas e vitórias, desespero e felicidade, sempre oferecendo um ombro amigo, conselhos e me ajudando a seguir em frente.

À Katharina Diniz, a quem tive o privilégio de conhecer durante essa jornada acadêmica e tanto me ajudou e apoiou durante a realização de todos os trabalhos. Igualmente agradeço ao Bruno Oliveira por todo apoio e ajuda na elaboração dos experimentos e realização deste trabalho.

Finalmente, porém não menos importante desejo agradecer ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de estudo, auxílio financeiro essencial para a realização das atividades laboratoriais e realização dessa pesquisa.

RESUMO

Psidium salutare (Kunth) O. Berg conhecida popularmente como araçá é utilizada na medicina tradicional no tratamento de dores de estômago e diarreias. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar quimicamente o óleo essencial extraído das folhas de *P. salutare* (PsEO) assim como realizar os ensaios antioxidantes e antinociceptivo para avaliar seu potencial quanto a estas atividades biológicas. A caracterização química foi realizada através do método de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS), seguido dos ensaios antioxidantes realizados através do método do DPPH e fosfomolibdênio (capacidade antioxidante total), e dos ensaios antinociceptivos realizados em modelo *in vivo* através dos testes de contorção abdominal e formalina. O possível mecanismo por qual ocorre a antinocicepção também foi realizado através do uso de bloqueadores específicos das principais vias, e o teste de toxicidade aguda em modelo *in vivo*. O óleo essencial apresentou rendimento de 0,527% possuindo 58 compostos distintos sendo 56 deles identificados, dentre os quais 1,8- cineol (14,05%), E- cariofileno (8,86%), Selina-3,7(11)- dieno (5,94%), α -eudesmol (6,51%), α -Panasinsen (6,39%) e α -pinene (4,38%) se destacaram como sendo os compostos majoritários. Os ensaios de DPPH e fosfomolibdênio exibiram uma baixa capacidade antioxidante, sendo esta de 27.68 ± 0.16 de sequestro do radical DPPH e $22,57 \pm 0,073$ de formação do complexo fosfomolibdênio numa concentração de 5,000 $\mu\text{g/ml}$ do óleo em ambos os testes. Por outro lado, o teste de contorção abdominal exibiu uma atividade antinociceptiva pela redução das contorções em 73.52% numa dose de 250 mg/kg. O teste da formalina apresentou uma típica resposta bifásica (1° fase: de 0-5 min; 2° fase: de 15-30 min) onde o PsEO numa concentração de 250 mg/kg trouxe uma redução significativa na lambida da pata de 57,76% na fase inicial (dor neurogênica) e 80,31% na fase tardia (dor inflamatória). O uso da naloxona demonstrou que o possível mecanismo de ação envolvido na nocicepção ocorre através da participação do sistema opióide por via central. Os resultados aqui apresentados demonstram uma variedade na composição química do óleo essencial obtido a partir das folhas de *P. salutare*; como também um potencial deste como agente antinociceptivo e antioxidante podendo ser empregado para a elaboração de novos fármacos para inibição da dor.

Palavras-chave: Araçá. Óleo essencial. Nocicepção. Antioxidante.

ABSTRACT

Psidium salutare (Kunth) O. Berg popularly known as “araçá” is used in traditional medicine to treat stomach ache and diarrhea. The objective of the present work was to characterize the essential oil extracted from the leaves of *P. salutare* (PsEO) chemically as well as to carry out the antioxidant and antinociceptive tests to evaluate its potential for these biological activities. The chemical characterization was carried out using the gas chromatography method coupled to the mass spectrometer (GC-MS), the antioxidant assays were obtained by the DPPH and phosphomolybdenum (total antioxidant capacity) method, and the antinociceptive tests performed in an in vivo model through abdominal contortion and formalin tests. The possible mechanism by which antinociception occurs was also performed through the use of specific blockers of the main pathways, and the acute toxicity test in an in vivo model. The essential oil showed a yield of 0.527%, with 58 distinct compounds, 56 of which were identified, including 1,8-cineol (14.05%), E-caryophyllene (8.86%), Selina-3,7 (11) - diene (5.94%), α -eudesmol (6.51%), α -Panasinsen (6.39%) and α -pinene (4.38%) stood out as the major compounds. The DPPH and phosphomolybdenum assays exhibited a low antioxidant capacity, which was (27.68 ± 0.16) sequestration of the DPPH radical and (22.57 ± 0.073) phosphomolybdenum complex formation at a concentration of 5,000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of the oil in both tests. The abdominal contortion test exhibited antinociceptive activity by reducing the contortions by 73.52% at a dose of 250 mg / kg. The formalin test showed a typical biphasic response (1st phase: 0-5 min; 2nd phase: 15-30 min) where PsEO at a concentration of 250 mg / kg brought a significant reduction in paw licking of 57 , 76% in the initial phase (neurogenic pain) and 80.31% in the late late phase (inflammatory pain). The naloxone use has demonstrated that the possible mechanism of action involved in nociception occurs through the participation of the opioid system via the central route. The results here presented demonstrate a variety in the chemical composition of the essential oil obtained from the leaves of *P. salutare*; as well as its potential as an antinociceptive and antioxidant agent that can be used for the development of new drugs to inhibit pain.

Key words: Araçá. Essential oil. Nociception. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1 –	Distribuição da Caatinga no território brasileiro.....	14
Figura 2 –	Estrutura química dos monoterpenos.....	17
Figura 3 –	Estrutura química dos compostos aromáticos.....	17

Chemical characterization, antioxidant and antinociceptive potentials of essential oil from *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg

Figure 1 –	Effects of PSEO on acetic acid induced writhing in mice.....	43
Figure 2 –	Effects of PsEO on formalin test in mice.....	43

LISTA DE TABELAS

Referencial teórico

Tabela 1 –	Composição química dos óleos essenciais obtidos de algumas espécies do gênero <i>Psidium</i>	22
------------	--	----

Chemical characterization, antioxidant and antinociceptive potentials of essential oil from *Psidium salutare* (Kunth) O.

Berg

Table 1 –	List of all the compounds identified in the GC-MS analysis of essential oil of <i>Psidium salutare</i>	41
Table 2 –	Formalin Test- Efect of <i>P. salutare</i> essential oil and action mechanisms involved in antinociception.....	42
Table 3 –	Antioxidant activity of essential oil of <i>Psidium salutare</i> at various concentrations.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

APA's	Área de Proteção Ambiental
RPPN's	Reserva Particular do Patrimônio Natural
UC'S	Unidades de Conservação
OE's	Óleos Essenciais
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
SP	Substância P
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene Da Calcitonina
TrKA	Tirosina quinase
NGF	Fator que Crescimento do Nervo
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
PsEO	Óleo Essencial de <i>Psidium salutare</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa Associada ao Espectrômetro de Massa
GC-FID	Cromatografia Gasosa Associada ao Detector de Ionização de Chama
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
v.o.	Via Oral
i.p.	Intraperitoneal
LD ₅₀	Dose Letal
CED ₅₀	Dose de Efeito Colateral
Ind	Indometacina
Mor	Morfina
Glib	Glibenclamida
Nal	Naloxona
Atr	Atropina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivo Geral.....	13
1.1.2	Objetivos Específicos.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	CAATINGA	14
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS (OE's).....	15
2.3	FAMÍLIA MYRTACEAE.....	18
2.3.1	Gênero <i>Psidium</i>.....	19
2.4	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	21
2.4.1	Dor.....	21
2.4.2	Nocicepção.....	24
2.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	25
3	CHEMICAL CHARACTERIZATION, ANTIOXIDANT AND ANTINOCICEPTIVE POTENTIALS OF ESSENTIAL OIL FROM <i>Psidium salutare</i> (KUNTH) O. BERG.....	27
4	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXO A- PHYTOTHERAPY RESEARCH: INSTRUÇÕES PARA AUTORES.....	50
	ANEXO B- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	55

1 INTRODUÇÃO

Por se tratar de um país com dimensões continentais, o Brasil apresenta uma vasta diversidade capaz de oferecer matérias-primas tais como folhas, frutos ou flores de árvores nativas que podem se tornar alvos para realização de pesquisas relacionadas às suas possíveis aplicações tanto nos segmentos farmacêutico ou de cosméticos. O uso de plantas com fins medicinais é realizado de forma empírica, por conhecimento tradicional, através da preparação de infusos ou extratos, entre outras maneiras (FIRMO et. al., 2011). Este potencial tem atraído cada vez mais atenção para realização de pesquisas que identifiquem os compostos químicos presentes nos materiais vegetais (MORAIS et al., 1996; SENNA et al., 2011).

De ocorrência exclusivamente brasileira, a Caatinga é um bioma que apresenta uma ampla biodiversidade, porém ainda pouco conhecida e explorada. Composta por uma vegetação do tipo xerófita, as espécies vegetais que lá ocorrem são adaptadas ao clima seco e árido e à baixa disponibilidade de água tendo adquirido mecanismos adaptativos que permitiram sua sobrevivência em condições tão adversas (SILVA, 2016).

A família Myrtaceae compreende cerca de 121 gêneros com um número de espécies entre 3800-5800 distribuídas no mundo (STEFANELLO et al., 2011). Myrtaceae possui uma ampla distribuição no Brasil, sendo composta por plantas aromáticas que produzem frutos utilizados na alimentação da fauna local, ou por populações humanas para o consumo *in natura*, na produção de sucos, geleias e doces que tem grande aceitação ao paladar do público. Várias espécies dessa família também são reconhecidas por possuírem folhas com glândulas produtoras de óleos empregados na medicina popular como antidiarreico, antimicrobiano, antioxidante, antirreumático, analgésico, anti-inflamatório, entre outras aplicações (STEFANELLO et al., 2011).

O gênero *Psidium* possui uma ampla distribuição nas distintas regiões do Brasil sendo a Caatinga um dos biomas de sua ocorrência, atualmente conta com 61 espécies aceitas presentes no país das quais 44 são endêmicas (FLORA, 2018). *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. é uma das espécies pertencente a esse gênero, mas pouco se sabe sobre a constituição química de seus componentes e seu possível potencial biológico. Entretanto, o óleo essencial das folhas de *P. salutare* coletadas numa área de Cerrado no Ceará foi obtido, caracterizado e avaliado quanto ao seu potencial antifúngico (MACEDO et al., 2018).

Óleos essenciais são compostos voláteis produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e possui entre suas funções a defesa destas. Podem ser extraídos de folhas, frutos,

cascas e rizomas através de técnicas como arraste a vapor ou prensagem do pericarpo (BIZZO et al., 2009). Na literatura estes óleos vêm sendo extraídos de diversas plantas e utilizados em variados seguimentos industriais como perfumaria, cosméticos, alimentos e farmacêuticos (GALLUCCI et al., 2010; GUTIERREZ et al., 2009; BIZZO et al., 2009). O uso destes óleos está associado a seus potenciais antibacteriano, antifúngico e antioxidante que lhes confere uma diversidade de aplicações (GUTIERREZ et al., 2009; MORAIS et al., 2006; LIMA et al., 2006).

Visto que não há registros sobre a constituição química do óleo essencial obtido a partir de *P. salutare* (Kunth) O. Berg em regiões da Caatinga e quais as potenciais atividades biológicas deste, o presente trabalho teve como objetivo investigar a composição química do óleo essencial obtido das folhas de *P. salutare* coletadas no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco), assim como seu potencial antinociceptivo e antioxidante.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Caracterizar a composição química do óleo essencial extraído das folhas de *P. salutare* (Kunth) O. Berg (PsEO) do Parna Catimbau, e avaliar suas possíveis atividades antinociceptiva e antioxidante.

1.1.2 Específicos

- Caracterizar quimicamente o óleo essencial das folhas de *P. salutare* por Cromatografia Gasosa associada ao Espectrometro de massa (GC-MS);
- Avaliar o potencial antioxidante através dos métodos de formação do complexo Fosfomolibdênio e de redução do radical livre DPPH;
- Investigar a Toxicidade aguda em modelos *in vivo*.
- Investigar o efeito antinociceptivo do óleo essencial por meio de modelos agudos de nocicepção: dor induzida por ácido acético e por formalina
- Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva através da participação dos sistemas opióide, muscarínico e K⁺ ATP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CAATINGA

Como um dos principais centros de diversidade genética do mundo, o Brasil se destaca através de seus biomas como Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Campos do Sul e Pantanal (FRANZON *et al.*, 2009). O Bioma Caatinga ocupa uma área de aproximadamente 845.000 km² (cerca de 11% do território nacional) englobando os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (Figura 1) e se destaca por ser o único de ocorrência exclusiva brasileira (BRASIL, 2018a).

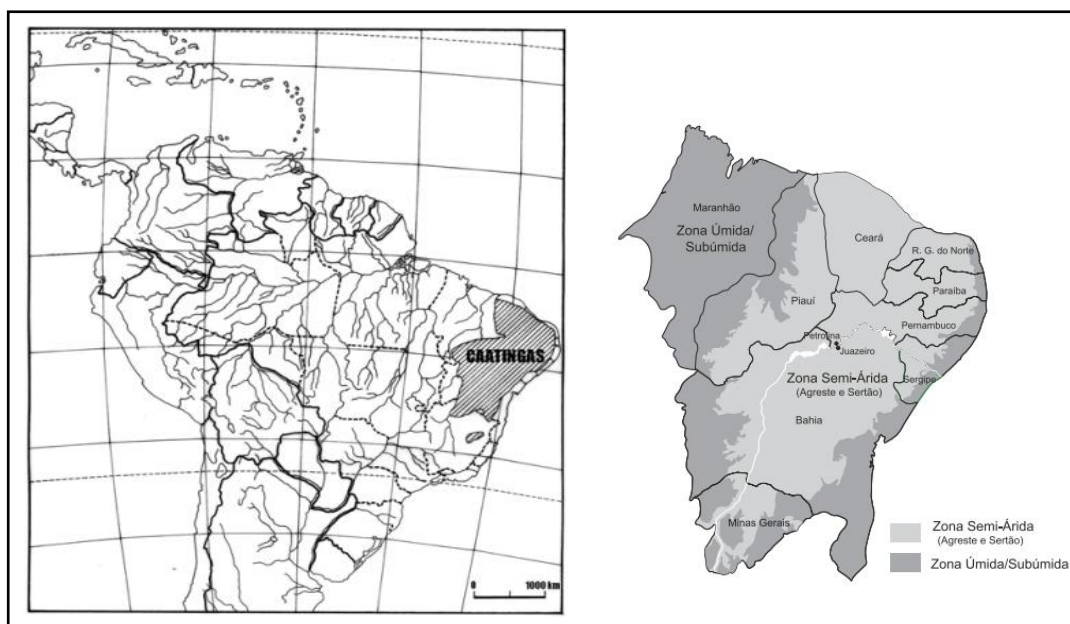


Figura 1. Distribuição da Caatinga no território brasileiro. Fonte: adaptado de Prado (2003) e Kiill et al. (2007).

De acordo com Prado (2003) a Caatinga apresenta características extremas dentre os parâmetros meteorológicos tais como: alta radiação solar, baixa nebulosidade, alta temperatura média anual, baixas taxas de umidade relativa, evapotranspiração elevada, assim como precipitações mais baixas e irregulares limitadas a um período muito curto no ano com uma média anual variando de 500 a 800 mm. Esta baixa precipitação ou até mesmo a sua completa ausência em alguns anos é mais comum que a ocorrência de um nível pluviométrico muito alto, sendo então responsável pelas secas que acontecem ciclicamente e caracterizam a região modelando as vidas animal e vegetal existentes nesse bioma.

A Caatinga apresenta uma ampla biodiversidade, onde é possível encontrar cerca de 178 espécies de mamíferos, 591 de aves, 177 de répteis, 79 espécies de anfíbios, 241 de peixes e 221 abelhas. É estimada a ocorrência de 932 espécies vegetais na região sendo 318 delas endêmicas. A preservação e manutenção dessa biodiversidade são cruciais não apenas pelo fator ambiental, mas também pelo social, desde que cerca de 27 milhões de pessoas vivem na região da Caatinga e a maioria delas não possuem recursos financeiros suficientes para seu sustento, dependendo dos recursos oferecidos pelo bioma para sobreviver (BRASIL, 2018a).

Entretanto, mesmo se tratando de um bioma com alta diversidade biológica e grande taxa de endemismo, a vegetação da Caatinga é uma das que mais sofre interferências humanas no Brasil devido ao consumo de lenha nativa, explorada ilegalmente e de maneira insustentável para fins domésticos e industriais, ao sobrepastoreio e a conversão para pastagens e agricultura. Além do mais, ela apresenta a menor extensão protegida dentre todos os biomas brasileiros, com uma pequena porcentagem das unidades de conservação sendo de Proteção Integral (BRASIL, 2018a; PRADO, 2003).

Existem, atualmente, 35 Unidades de Conservação no bioma Caatinga sendo elas: 5 APA's (Área de Proteção Ambiental); 4 Estações Ecológicas; 6 Florestas Nacionais; 1 Monumento Natural; 8 Parques Nacionais; 1 Reserva Biológica; 1 Reserva Extrativista; 1 Refúgio de Vida Silvestre e 8 RPPN's (Reserva Particular do Patrimônio Natural); todas somando um total de 9% de áreas protegidas (BRASIL, 2019).

O Parque Nacional do Catimbau (Parna Catimbau) é uma dessas UC's criado em dezembro de 2002 através de decreto presidencial. Com uma área de 62.294,14 hectares localizada entre os municípios de Buíque, Ibimirim, Sertânia e Tupanatinga, no Estado de Pernambuco, tem como objetivo a preservação dos ecossistemas naturais possibilitando a realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades de educação e interpretação ambiental, de recreação em contato com a natureza e de turismo ecológico (BRASIL, 2018b).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS (OE's)

Os óleos essenciais são compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, sendo uma mistura lipofílica complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e compostos carbonílicos que podem ser sintetizados por vários órgãos vegetais como flores, folhas, galhos, raízes, cascas e caules e são armazenados em células secretoras especializadas como

os tricomas glandulares, cavidades e canais secretores (BAKKALI *et al.*, 2008). Podem ser definidos como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação e sua principal característica é a volatilidade. A maioria possui odor agradável, intenso e são solúveis em solventes orgânicos apolares. É importante salientar que os OE's são muito instáveis e podem sofrer inúmeras reações de degradação na presença de luz, calor, umidade, oxigênio e metais, o que dificulta a sua conservação e altera propriedades dos mesmos, fazendo com que o processo de armazenamento seja fundamental para a manutenção de sua qualidade (SIMÕES e SPITZER, 2003).

Algumas condições ambientais tais como luminosidade, temperatura, quantidade de chuvas, altitude, umidade e pH do solo podem modificar o teor e a composição de óleo essencial. Aos fatores climáticos agrega-se a variabilidade genética das plantas, o que origina diversos quimiotipos de plantas aromáticas, indivíduos da mesma espécie que se diferenciam por sua composição química (SAWAMURA, 2010). Atualmente, existem várias pesquisas sobre OE's abordando sua composição química, aplicações na biotecnologia e aromaterapia, e a avaliação das atividades biológicas tanto dos OE's quanto dos componentes majoritários. Seus constituintes podem apresentar atividades antissépticas, antibacteriana, e anti-inflamatória (SIMÕES e SPITZER, 2003), atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antialérgicas (BAKKALI *et al.*, 2008), analgésicos, sedativos, antiespasmódicos e remédios para anestesia local, funcionando também como antihelmínticos, antiprotozoários e inseticidas (YORK; VANVUUREN; DEWET, 2012).

Segundo Bakkali *et al.* (2008) os óleos essenciais são extraídos de várias plantas aromáticas presentes nos climas temperados ou tropicais. Para a extração diversos métodos podem ser empregados como o uso de dióxido de carbono líquido ou micro-ondas e destilação a baixa ou alta pressão utilizando água fervente ou vapor quente. A escolha do melhor método depende da finalidade para a aplicação do óleo: em aplicações com fins farmacêuticos e alimentares a extração por destilação é preferida por preservar as propriedades fungicidas e bactericidas; enquanto que para perfumaria a extração com solventes lipofílicos ou com dióxido de carbono supercrítico é utilizada.

No que tange à sua composição química, os OE's geralmente apresentam cerca de 20-60 componentes em concentrações distintas entre terpenos e compostos aromáticos como álcoois, ácidos, ésteres, epóxidos, aldeídos, cetonas, aminas e sulfetos (CALO *et al.*, 2015). Entretanto, estes óleos são geralmente caracterizados por dois ou três componentes majoritários que possuem concentrações bastante elevadas em comparação com outros componentes que aparecem em quantidades vestigiais; os compostos majoritários representam

20-70% do total das substâncias constituintes e geralmente são os principais responsáveis pelas atividades biológicas conferidas aos OE's (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos são os principais grupos de hidrocarbonetos que constituem os OE's e são formados por combinações de estruturas com cinco bases de carbono (C5) chamadas isoprenos. Através da quantidade de isoprenos presentes na molécula, os terpenos podem ser classificados em monoterpenos (C₁₀H₁₆), sesquiterpenos (C₁₅H₂₄), diterpenos (C₂₀H₃₂) e tetraterpenos com oito unidades de isoprenos; os monoterpenos (Fig 2) são as principais classes de terpenos encontradas nos OEs com uma taxa de até 90% (BAYALA et al., 2014).

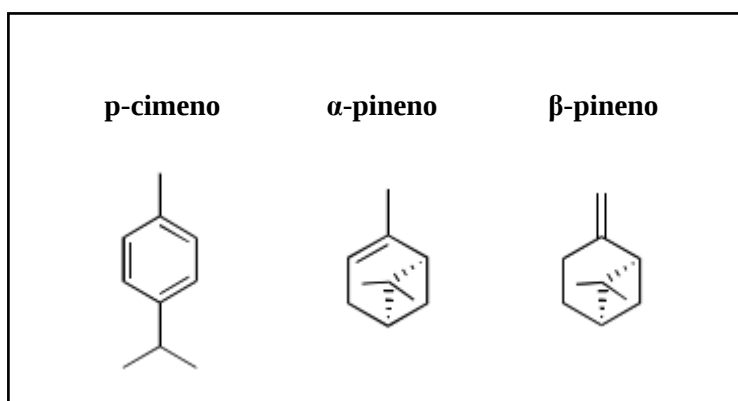


Figura 2- Estrutura química dos monoterpenos, as principais classes constituintes dos OE's. Fonte: adaptado de Bakkali et al. (2008).

Os compostos aromáticos são derivados a partir do fenilpropano (Figura 3) e são menos abundantes que os terpenóides (BAYALA et al., 2014). Sua biossíntese ocorre de maneira independente aos terpenos, porém sua síntese pode coexistir em algumas plantas.

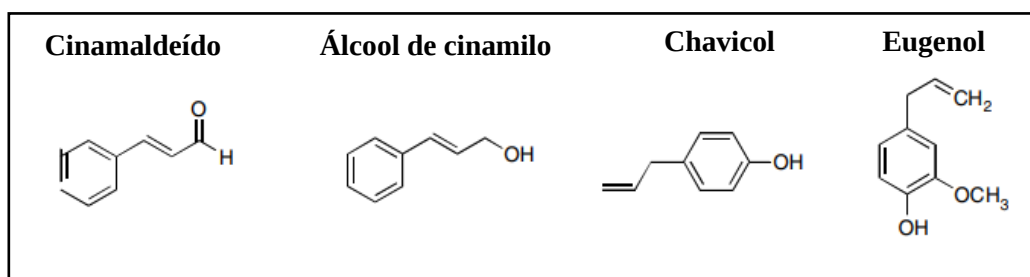


Figura 3- Estrutura química dos compostos aromáticos encontrados em óleos essenciais. Fonte: adaptado de Bakkali et al. (2008).

2.3 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae compreende cerca de 130-140 gêneros com aproximadamente 4000 espécies possuindo uma distribuição no hemisfério sul com concentrações nos Neotrópicos e na Austrália, com uma ocorrência um pouco mais rara nos trópicos da Australásia, e muito rara nos trópicos africanos. Um único gênero (*Myrtus*) ocorre na região do Mediterrâneo (SYTSMA et al., 2004). Para o Brasil são descritas 1034 espécies distribuídas em 23 gêneros, dentre quais 4 gêneros com 797 espécies são de origem endêmica (SOBRAL et al., 2015). Myrtaceae é tradicionalmente dividida em duas subfamílias Myrtoideae e Leptospermoideae (SOUZA; LORENZI, 2005).

As espécies neotropicais são majoritariamente pertencentes à subtribo Myrtoideae e podem ser encontradas como arbustos a árvores com glândulas oleíferas presentes. Possuem indumento unicelular com tricomas simples ou em formato de “T”. As folhas são opostas e simples com superfície glandular-punctada, margem inteira e venação marginal presente. As inflorescências são axilares ou terminais do tipo panícula, racemo, dicásio ou com flores solitárias. As flores são actinomorfas e bissexuais tendo o hipanto presente e fundido ao ovário que pode estar prolongado ou não acima do mesmo. As sépalas são de 4-5, abertas no botão floral ou formando uma caliptra com abertura regular ou irregular e as pétalas são de 4-5 de coloração branca a raro avermelhada. Os frutos são carnosos com as sépalas persistentes ou decíduas e as sementes de uma a várias, com endosperma ausente e embrião diferenciado (SAMPAIO, 2011).

No Brasil, as Myrtaceae são uma das mais importantes famílias de Angiospermae, consideradas um dos grupos arbóreos que predominam na Mata Atlântica. Além do elevado número de espécies dessa família, ela também exerce um importante papel na fitossociologia de matas do Sul e Sudeste brasileiro. Ocupam para fins comerciais o terceiro lugar dentre as famílias de Angiospermas (CRUZ; KAPLAN, 2004).

Em termos econômicos essa família possui grande importância, algumas espécies como *Eucalyptus* spp. são cultivadas e apresentam uso na indústria madeireira, cosmética, farmacêutica, de celulose entre outras; algumas espécies são ornamentais enquanto outras são utilizadas como especiarias tal qual *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, conhecido como cravo-da-índia. Várias espécies produzem frutos comestíveis que são utilizados para fazer sucos, geleias e doces, como *Psidium guajava* L. (goiaba), *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg (jabuticaba), *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) ou *Syzygium* spp. ("Jambo") (CASCAES et al., 2015).

Espécies de Myrtaceae também são utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças ou desordens, para esta finalidade partes distintas das plantas podem ser empregadas como folhas, caule, raiz, frutos ou brotos (CRUZ et al., 2005). O gênero *Eugenia* possui uma diversidade de aplicações, *E. uniflora* L. é usada para tratamento de febre e diarreia, também apresenta atividades antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, hipotensiva, tripanocida e propriedades diuréticas (LUNA et al., 2005). Folhas de *E. citrifolia* Poiret (araçá-verdadeiro) são descritas como tratamento para enxaqueca e problemas cardíacos (ALBUQUERQUE et al., 2007). O óleo essencial extraído das flores secas de *E. caryophyllata* L. Merr. & Perry é tradicionalmente utilizado nos tratamentos dentários como aplicação tópica para alívio da dor sendo considerado como analgésico e antisséptico, possuindo também propriedades ativas contra bactérias orais associadas a carie e doenças periodontais (CHAIEB et al., 2007).

Myrcia é outro gênero descrito por ter propriedades medicinais, composto por espécies como *Myrcia puniceifolia* (Kunth) DC., *M. speciosa* (Amsh.) Mc Vaugh, *M. amazonica* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. guianensis* (Aubl.) DC., *M. multiflora* (Lam.) DC., *M. salicifolia* DC., *M. sylvatica* (G. Mey) DC., *M. uniflora* DC., conhecidas tradicionalmente como pedra-hume-caá ou insulina vegetal. Estas plantas são assim chamadas, pois suas folhas ou a planta inteira são utilizadas em infusões para o tratamento de diabetes. A pedra-hume-caá também é utilizada para tratamento de diarreia, enterite, hemorragia e afta. Outras espécies com uso na medicina tradicional são: *M. bracteata* DC. usada para tratar dispepsia; *M. ovata* Cambess. utilizada no tratamento de doença gástrica, gastrite e diarreia; e *M. guianensis* cujas folhas maceradas são empregadas pelos habitantes da região amazônica para neutralizar os venenos de cobra (CASCAES et al., 2015).

2.3.1 Gênero *Psidium*

O gênero *Psidium* L. é composto por cerca de 100 espécies com uma distribuição natural do México e do Caribe até o Uruguai e norte da Argentina nos continentes americanos, se estendendo até algumas ilhas do leste do Pacífico (como Galápagos). Outras espécies daninhas ou cultivadas foram espalhadas por seres humanos em todo o mundo para regiões tropicais e subtropicais (LANDRUM, 2003). No Brasil existem 64 espécies aceitas com 47 sendo endêmicas tendo distribuição confirmada em todas as regiões do país (FLORA DO BRASIL, 2018).

As espécies presentes nesse gênero são caracterizadas por possuírem folhas simples opostas com venação broquidódroma típicas e pontos glandulares que podem ser visualizados com uma lente manual; as flores são solitárias, axilares ou em racemos pequenos, dicásio ou botrióides, são pentâmeras e os botões variam entre 4-15 mm; o cálice possui morfologia variável, oscilando de cupiliforme até caliptrato, raramente apendiculado; as pétalas são livres e alternadas de cor branca ou creme; possuem muitos estames, variando de 60 até 320, arranjados em 3 a 12 verticilos; ovário ínfero, com 2 a 5 lóculos e alguns a muitos óvulos por lóculos com placentação intrusiva; frutos com muitas sementes; sementes com testa óssea e embrião coclear com cotilédones apicais (SOARES-SILVA; PROENÇA, 2008).

P. salutare é um complexo que se diferencia das outras espécies do gênero por possuir: 1) um hábito usual de subarbusto ou arbusto, podendo atingir o tamanho de árvore em algumas populações; 2) um habitat principalmente de pastagens ou baixo crescimento arbustivo (cerrado) que é frequentemente queimado; 3) uma capacidade de brotar em costas rochosas a partir de galhos subterrâneos mesmo após incêndios; 4) folhas com venação broquidiódroma com uma veia marginal bem marcada que segue de perto a margem e veias terciárias que formam um padrão reticulado-dendrítico; 5) botões florais relativamente pequenos (4-9 mm) com o cálice aberto; e 6) uma placenta peltada com uma ou duas filas de óvulos na borda de cada lâmina (LANDRUM, 2003).

De Macêdo e colaboradores (2018) realizaram um estudo sobre a influência da sazonalidade na composição química do óleo essencial de *P. salutare* coletado numa área de Cerrado na Chapada do Araripe, Ceará, e testaram seu potencial antifúngico contra *Candida albicans*. Em seu trabalho encontraram no óleo 40 substâncias diferentes nos períodos de coleta sendo o γ -terpineno o constituinte predominante; também reportaram uma ação contra as cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, demonstrando também um efeito potencializador do fluconazol quando em associação com o óleo essencial. Os resultados encontrados por eles revelam um potencial dessa espécie para a produção de fitoterápicos.

Outras espécies desse gênero também foram testadas com relação a sua composição química e bioatividades. Uma das espécies mais estudadas é *P. guajava* L, popularmente conhecida como goiaba. Na literatura é possível encontrar uma série de trabalhos testando as mais diversas atividades com essa planta, enquanto que na medicina tradicional é utilizada para tratamento de diferentes doenças no mundo inteiro. As formas tradicionais de uso geralmente ocorrem por via oral ou tópica dependendo do tipo de doença que se pretende tratar. Infusões e decocções são comumente utilizadas para tratamentos de distúrbios como reumatismo, diarreia, diabetes mellitus e tosse na Índia, China, Paquistão e Bangladesh; no

sudoeste da Ásia a decocção é usada como gargarejo para úlceras orais e como antibacteriano na Nigéria; Para a pele e aplicações em feridas, o emplastro é usado externamente no México, Brasil, Filipinas e Nigéria, além de ser mascado na Nigéria para higiene bucal (DÍAZ-DECERIO et al., 2017).

Um trabalho realizado com *P. pohlium* Berg utilizou o óleo essencial extraído das folhas desta planta para teste da atividade antinociceptiva. Foram utilizados três métodos distintos de nocicepção, o teste da formalina, placa quente em baixa temperatura ($51 \pm 1^\circ\text{C}$) e compressão caudal; no teste de formalina foi observada uma redução das lambidas da pata em ambas as fases do teste (dor neurogênica e dor inflamatória) utilizando as concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg e apresentando redução de 25, 45 e 84% na primeira fase e 31, 95 e 100% na segunda fase para as respectivas doses; o teste da placa quente mostrou uma extensão do tempo de reação nos intervalos observados tendo o óleo sido administrado nas mesmas concentrações do teste de formalina; o teste de compressão caudal mostrou resultado significativo apenas com a concentração de 400 mg/kg administrada oralmente; estes resultados corroboram com o uso popular de espécies de *Psidium* para tratar dores (SANTOS; RAO; SILVEIRA, 1996).

A tabela 1 elenca os compostos majoritários encontrados nos óleos de algumas espécies de *Psidium*. Como pode ser observado, os óleos essenciais obtidos de espécies pertencentes a este gênero possuem uma diversidade de aplicações. As bioatividades relacionadas a estes podem ser justificadas pela riqueza de componentes presentes nos óleos essenciais.

2.4 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

2.4.1 Dor

O termo dor deriva do latim *dolor*, significando sofrimento; deriva das palavras *paine*, do grego e *poena* do latim que significam punição ou pena (BONICA, 2010). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a definição para este termo é “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tais lesões”. Dessa forma, experienciar um fenômeno doloroso pode envolver diferentes dimensões: o evento sofrimento, a sensação original somada às reações que esta provoca, associado a uma sensação específica, assistida por estruturas neurofisiológicas particulares (GUTSTEIN et al., 2006).

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais obtidos de algumas espécies do gênero *Psidium*.

Espécie	Parte da planta	Componentes majoritários (> 5%)	Ref.
<i>P. acutangulum</i> DC.	Folhas e caules finos	α -pineno (14.8%), 1,8-cineol (12.9%) e β -pineno (10.1%).	SILVA et al., 2003
<i>P. cattleianum</i> Sabine	Folhas	α -thujene (25.2%), 1,8-cineol (16.4%) e β -cariofileno (10.2%)	MARQUES et al., 2008
<i>P. guajava</i> L.	Folhas e caules finos	α -pineno (23.9%), 1,8-cineol (21.4%) e β -bisabolol (9.2%)	SILVA et al., 2003
<i>P. guineense</i> SW.	Folhas	limoneno (0.3-47.4%), α -pineno (0.13-5.6%), β -cariofileno (0.1-24.0%), epi- β -bisabolol (6.51-8.1%), óxido cariofileno (0.3-14.1%), β -bisaboleno (0.1-8.9%), α -copaene (0.3-8.1%), mirceno (0.1-7.3%), muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol (1.6-5.8%), β -bisabolol (2.9-5.6%), e ar-curcumene (0.1-5.0%)	FIGUEIREDO et al. 2018
	Frutos	β -cariofileno (8,6%), selin-11-en-4a-ol (5,9%)	PERALTA-BOHÓRQUEZO et al, 2010
<i>P. laruotteanum</i> Cambess	Folhas	p-cimeno (24.8%), 1,8-cineol (19.2%), α -pineno (13.4%), Terpinen-4-ol (6.3%)	MEDEIROS et al., 2018
<i>P. myrsinites</i> DC.	Folhas e inflorescências	óxido cariofileno (26.1%), humuleno epoxido II (8.8%), β -cariofileno(7.4%) e α -cariofileno (5.4%).	MEDEIROS et al., 2015
<i>P. myrsinoides</i> O. Berg	Folhas	β -cariofileno (22,4%), óxido cariofileno (19,7), α -humuleno (8,4%), mirceno (5,4%)	FREITAS et al., 2002
<i>P. salutare</i> (Kunth) O. Berg	Folhas	Linalool (4,72-7,26%), p-cimeno (5,05-17,83), terpinolene (6,4-16,99%), γ -terpinene (5,9-17,09%) e τ -Cadinol (10,35-15,2%)	MACÊDO et al., 2018
<i>P. striatulum</i> DC.	Folhas e caules finos	β -cariofileno (28.6%), α -selineno (7.7%), óxido cariofileno (7.6%), β -selineno (7.4%) e selin-11-en-4 α -ol (6.0%)	SILVA et al., 2003

Portanto, a dor pode ser interpretada como um evento que envolve tanto a transdução dos estímulos nocivos e prejudiciais, quanto o processamento emocional pelo encéfalo, sendo constituída por dois componentes: um componente fisiológico ou sensorial, chamado sensorial-discriminativo; e outro psicológico ou emocional definido como afetivo-emocional (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A palavra dor traz uma ideia negativa e desagradável ao ser mencionada, porém o organismo se utiliza desse mecanismo como um poderoso sistema de alerta, e tem como principal função informar sobre um perigo real ou iminente de dano, acionando respostas adequadas de proteção até que a causa tenha sido identificada e suprimida (KLAUMANN et al., 2008). A dor pode ser classificada de maneiras distintas, sendo uma delas de acordo com a sua duração. A dor aguda se dá pela ativação direta de nociceptores (estruturas especializadas na detecção de estímulos nocivos) após um estímulo nocivo capaz ou não de causar alguma lesão. Quando persiste por semanas ou meses, é classificada como dor crônica que muitas vezes permanece mesmo após a recuperação da lesão. Além disso, ela também é caracterizada pela incapacidade do organismo restabelecer suas funções fisiológicas (MILLAN, 1999).

Outra forma de caracterizar a dor é através de sua origem, a nociceptiva ocorre devido a uma ativação excessiva de nociceptores com terminações na pele, vísceras e outros órgãos; a neurogênica surge da lesão do tecido neuronal e a consequente liberação de neuropeptídios levando a dor tanto por estímulo central ou periférico; a neuropática é a que ocorre após a lesão ou disfunção de um nervo ou grupo de nervos; a dor de origem psicológica e que não possui um fator somático identificável é denominada dor psicogênica (ALMEIDA et al., 2006).

Segundo Verri et al. (2006) quando a dor acontece em decorrência de uma lesão tecidual significativa, uma inflamação pode ser desencadeada por uma série de eventos em cascata. Dessa maneira os nociceptores são sensibilizados de tal forma que uma estimulação leve conduz a uma sensação dolorosa. Geralmente em seres humanos, esta sensibilização sensorial primária dos nociceptores é chamada de hiperalgesia (uma resposta exacerbada a um estímulo previamente nocivo, devido a uma sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas e a facilitação central da transmissão ao nível do corno dorsal e do tálamo) ou alodinia, quando um estímulo previamente não-nocivo é capaz de causar dor, aproveitando-se do menor limiar necessário para disparo do nociceptor e início da transmissão nociceptiva.

2.4.2 Nocicepção

A dor sentida por humanos envolve diversos aspectos sendo eles neurais, fisiológicos, comportamentais, psicológicos e emocionais. A dor sentida por um animal também pode envolver diferentes aspectos, entretanto só os mecanismos neurais e fisiológicos são passíveis de mensuração. O termo nocicepção surgiu com o objetivo de diferenciar esses dois aspectos, derivando do latim, *nocere*, significa ferir. Assim, a nocicepção é definida como a parte fisiológica da dor, onde os aspectos emocionais e psicológicos não são considerados, tornando-se então possível de se mensurar. Em consequência disso os modelos animais para investigação da dor, são na verdade, modelos de nocicepção (BASBAUM & JULIUS, 2006).

A existência do nociceptor foi proposta no início do século XX, um neurônio sensorial primário que seria ativado por um estímulo capaz de causar dano tecidual. De acordo com este modelo os nociceptores teriam limiares ou sensibilidades características que os distinguiriam de outras fibras nervosas sensoriais. Estudos eletrofisiológicos realizados posteriormente comprovaram a existência de neurônios sensoriais primários que podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa, ou irritantes químicos, mas não por estímulos inócuos, tais como um contato morno ou um leve toque. Assim a dor aguda pode ser definida como uma modalidade sensorial semelhante à visão ou olfato, onde um estímulo de certa qualidade ou intensidade é detectado por células especializadas (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Quando um estímulo térmico, mecânico ou químico ativa os neurônios sensoriais primários nociceptivos, inicia-se o processo doloroso. Os nociceptores conduzem informações nociceptivas da pele, órgãos e tecidos internos para a medula espinhal. Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários estão localizados nos gânglios da raiz dorsal. Os neurônios do gânglio da raiz dorsal emitem projeções axonais em duas direções, para a periferia e ao corno dorsal da medula espinhal (BESSON, 1999).

Os nociceptores são classificados de acordo com suas características anatômicas, de velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização. As fibras de pequeno diâmetro são as que originam a maioria dos nociceptores. Neste grupo, encontram-se as fibras do tipo C e do tipo A δ que são responsáveis pela transmissão do estímulo nociceptivo sob condições fisiológicas. As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde diferenciam-se pela temperatura de ativação. As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras

Aδ é a chamada primeira dor, e ocorre em uma velocidade entre 12 e 30 m/s (JACOBSON & GAO, 2006).

As fibras C, que são também conhecidas como fibras polimodais por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, a chamada segunda dor, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina (PLEUVRY & LAURETTI, 1996). Estas fibras são classificadas em dois grandes grupos. O grupo chamado peptidérgico expressa o peptídeo neurotransmissor substância P (SP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e receptores tirosina quinase A (TrKA) que possuem alta afinidade ao fator de crescimento do nervo (NGF). Este grupo envia suas terminações para regiões superficiais do corno dorsal da medula, nas lâminas I e II. O segundo grupo de fibras C expressa o receptor P2X3, um subtipo de receptor iônico para ATP. Além disso, envia suas terminações nervosas quase que exclusivamente para a lâmina II, que juntamente com a lâmina I, constituem a substância gelatinosa (VERRI et al., 2006).

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O termo radical livre se refere a um átomo ou uma molécula apresentando um elétron desemparelhado na última camada eletrônica, tal característica possibilita uma alta instabilidade e reatividade, como também um alto poder oxidante. Embora possa ser encontrado no átomo de hidrogênio, o elétron desemparelhado encontra-se mais comumente no átomo de oxigênio, sendo então classificados como espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas espécies reativas, tais como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), o ânion radical superóxido ($\text{O}_2\bullet$), o radical hidroperoxila ($\text{HO}_2\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são produzidas como intermediários reativos do metabolismo aeróbio, quando o O_2 sofre redução tetravalente. As EROs desempenham papel fundamental em processos fisiológicos como fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas (BARREIROS et al., 2006).

Porém, a alta reatividade das EROs possibilita que estas ataquem alvos celulares diversos, causando uma desestabilização das demais estruturas moleculares. Essas reações causam lesões celulares variadas como inativação enzimática, mutações, ruptura de membranas, morte celular, podendo causar doenças, envelhecimento precoce e falta de proteção dos organismos (WINTENBOURN, 2008). Para evitar tais danos, os organismos possuem mecanismos de controle de radicais livres que são os responsáveis pela neutralização

destes antes de atacarem alvos biológicos nas células, chamados antioxidantes. Com o termo antioxidante se define qualquer substância que, mesmo se presente em baixas concentrações é capaz de prevenir ou desacelerar significativamente a oxidação do substrato ou regenerá-lo (Valko et al., 2007). Estes antioxidantes podem ser produzidos pelo próprio organismo, denominados endógenos, como macromoléculas (proteínas enzimáticas) ou micromoléculas que também podem ser absorvidas na dieta (exógenos). O crescente número de situações que ativam reações oxidantes no organismo faz com que a suplementação seja um bom mecanismo de ação contra as possíveis lesões causadas por estas espécies reativas (BARREIROS et al., 2006) Sendo assim, a busca de produtos naturais com elevado teor dessas substâncias está se tornando a cada dia mais importante.

Há diferentes técnicas de quantificação da atividade antioxidante, variando conforme a especificidade do composto estudado, como o método de formação do complexo fosfomolibdênio (que mede a capacidade antioxidante total) ou a atividade antioxidante em relação à redução de um radical. Uma das mais difundidas consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila, também chamado de DPPH, esse reagente apresenta coloração violeta que absorve a 515 nm, e quando é reduzido, por ação de uma substância antioxidante, forma difenilpicril-hidrazina, de coloração amarela. O decréscimo da absorbância é utilizado para monitorar a redução do radical e dessa forma avaliar o poder antioxidante como quantidade de DPPH remanescente na solução.

3 CHEMICAL CHARACTERIZATION, ANTIOXIDANT AND ANTINOCICEPTIVE POTENTIALS OF ESSENTIAL OIL FROM *PSIDIUM SALUTARE* (KUNTH) O. BERG

Wilka Maria do Nascimento Silva^{1*}; João Ricardhis¹; Wêndeo Kennedy Costa¹; Katharina Marques Diniz¹; Bruno Oliveira de Veras²; Alexandre Gomes da Silva³; Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro⁴; Vera Lúcia de Menezes Lima¹; Márcia Vanusa da Silva¹; Maria Tereza dos Santos Correia¹.

¹*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife 50670-420, Pernambuco, Brasil;*

²*Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco;*

³*Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco;*

⁴*Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco.*

* Correspondence author: Wilka Maria do Nascimento Silva, Department of Biochemistry, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, University City, Recife, 50670-420, Pernambuco, Brasil. nascimento.wilka@gmail.com.

ABSTRACT

In this work we investigated the antinociceptive and antioxidant potentials of essential oil from *P. salutare* (PsEO) and determined a possible mechanism of anti-nociception. The chemical composition was accessed by GC-MS and GC-FID, the antinociceptive effect was obtained by tests acetic acid and formalin, and antioxidant activity was conducted against DPPH and phosphomolybdenum method. The analysis of composition of PsEO revealed the identification of 56 compounds having as majority 1,8-cineole (14.05%), E- caryophyllene (8.86%), α -eudesmol (6.51%), α -pasinsen (6.39%), Selina- 3,7 (11)- diene (5.94%) and α -

pinene (4.38%). PsEO demonstrated strong antinociceptive potential acting on the central pathway of nociception. The antinociceptive tests showed that the essential oil at a concentration of 250 mg/kg v.o. reduced 73.52% of writhes in the acetic acid test, while in the formalin test exhibited a reduction in paw licking of 57.76% in early phase and 80.31% in late phase. The antioxidant assays reveal a low capacity of the essential oil from *P. salutare* where in a concentration of 5.000 µg/ml presented a percent inhibition (I%) of $27.68\% \pm 0.16$ in the DPPH test. These results suggest that PsEO is a rich source of bioactive compounds with a strong antinociceptive and antioxidant potential.

Keywords: *Psidium salutare*; essential oil; chemical composition; antinociception; antioxidant.

1. INTRODUCTION

The search for new compounds for the elaboration of medicines brings an interest to the field of traditional medicine. Herbal medicine has been used in various forms including the decoction, powdered sample, oleoresins, crude extracts, fixed oils, essential oils, etc (Firmo et al., 2011).

Essential oils are volatile compounds produced by the secondary metabolism of plants whose function is associated with their defence. They can be extracted from leaves, fruits, bark and rhizomes by means of techniques like steam drag or pericarp pressing (Bakkali et al., 2008). Essential oils have properties described as antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, among others, generally associated with its rich chemical composition (De Macêdo et al., 2018; Liapi et al., 2007; Santos et al., 1998).

In Brazil, Myrtaceae are one of the most important families of Angiospermae, and some species belonging to this family are used to obtain essential oils, among them, species

belonging to the genus *Psidium* (de Macêdo et al., 2018; Cascaes et al., 2015); Santos et al., 1998). *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg., popularly known in the Northeast region of Brazil as a “araçá black” is used in the traditional medicine to treat stomach ache and diarrhea. The use of medicines for pain treatment is performed globally by a large number of people (Zarin et al., 2005). The most common are nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) widely used to treat pain and inflammation, but the use of these drugs is associated with a number of undesirable side effects.

As an alternative, the use of drugs of natural origin is considered safe and with few or no side effects, which makes it important to the search for new compounds for therapeutic purposes (Rates, 2001).

Based on this facts, the current investigational study is arranged to isolate the *P. salutare* essential oil (PsEO), analyze the chemical composition and to evaluate for the antinociceptive and antioxidant potentials, besides investigating the possible mechanisms involved in nociception. The results here described may be useful for the preparation of new drugs.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Extraction of Essential oil

Leaves of *P. salutare* were collected from National Park of Catimbau, Pernambuco, Brazil, in an area from Caatinga. The plant identification was realized and a plant voucher specimen (IPA 95.347) was deposited in the herbarium from the Institute Agronomic of Pernambuco (IPA/PE). Leaves (500g) were ground to a fine powder and then submitted for extracted by hydro distillation 1:10 (w/v) in Clevenger type apparatus for 4 h . The essential oil was collected and stored in amber colored vials at -5° C for further analysis. The yield

obtained was calculated as the quotient between the mass of the oil collected and the fresh weight of the leaves.

2.2. Chemical Composition Essential Oil

The gas chromatography-mass spectroscopy (GC–MS) analysis was conducted in an Agilent 5975C Series GC/MSD equipment (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with a DB-5 Agilent J & W fused silica capillary column - 30m×0.25 mm film; thickness: 0.25 μ m- (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). For each sample (performed in triplicate) 1 μ L was injected in divided mode (50: 1) with the injector temperature set at 250°C. The oven temperature was adjusted for 40°C (isothermal for 2 min); with an increase of 4°C/min, to 230°C, maintained for 5 min. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min, maintained at a constant pressure of 7.0 psi. The MS source and the quadrupoles temperatures were set respectively at 230°C and 150°C. Mass spectra were performed at 70 eV (in EI mode) with a scanning speed of 1.0 scans of m/z 35-350. The identification of the individual components was performed in comparison with previously reported retention indices obtained by co-injection of oil samples and a set of C9-C30 linear hydrocarbons, calculated according to the Van Den Dool & Kratz (1963) equation. Subsequently, the MS data acquired for each component were combined with the data available in the mass spectral library of the GC-MS system (Mass Finder 4, scientific consulting Dr. Hochmuth, Hamburg, Germany); Mass Spectral Library NIST08 (Chem SW Inc. Fairfield, CA, USA); Mass Spectral Ratio 9th Edition from Wiley Registry™ (Wiley, Hoboken, NJ, USA) and with other published mass spectral data (Adams, 2009). The oil samples were quantified in gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), under the same GC-MS conditions, in triplicate for calculation of standard deviation of peak area percentage of each compound in the chromatogram. This was used to determine the proportion of the compounds in the oil.

2.3. Antioxidant Assays

2.3.1. Phosphomolybdenum Complex Formation

To measure the total antioxidant capacity of PsEO was used the method of Prieto, Pineda, & Aguilar (1999). A solution of essential oil and methanol was prepared at a concentration of 5.000 µg/mL and then was diluted serially to obtain different concentrations from 156.25 to 5.000 µg/mL. An aliquot of 0.1 mL sample solution was combined with 1 mL of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). In the case of the blank, 0.1 mL of methanol was used in place of sample. The tubes were capped and incubated in a boiling water bath at 95 °C for 90 min. After the samples had cooled to room temperature, the absorbances were obtained on 96-well flat-bottomed microplates by spectrophotometer reading at a wavelength of 695 nm. The antioxidant capacity of the samples was expressed as relative antioxidant activity in relation to ascorbic acid, used as a standard.

2.3.2. DPPH radical scavenging activity

The DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazila) test was realized as described by Blois (1958). The DPPH solution (0.004%) in methanol was prepared which appeared with a deep violet color. A stock solution of essential oil with a concentration of 5.000 µg/mL was prepared in methanol, then, this solution was diluted serially to obtain different concentrations from 156.25 to 5.000 µg/mL. Afterward, 0.04 mL of the serially diluted concentration was added into a 96-well microplate along with 0.25 mL of the DPPH solution. The microplate was stored at a dark place for 30 min, after this time the absorbance was measured by using a microplate reader at a wavelength of 517 nm. Ascorbic acid served as a positive control. All the samples were tested in triplicate; the percent activity was recorded as mean ± SEM. The percent inhibition (I%) was calculated using the following equation: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1) /$

$\text{Abs0}] \times 100$, where Abs0 is the absorbance of the control and Abs1 is the absorbance of the compounds.

2.4. Antinociceptive activity

2.4.1. Animals

Male Swiss albino mice obtained from the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA) were housed at 22 ± 2 °C under a 12 h light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. The experiments were performed according to the Ethics Committee on the Animals Use at the Federal University of Pernambuco (CEUA/UFPE N° 0051/2018). For experimentation, mice were starved for 15 h before the specific tests. Six animals were included in each group and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the drug treatments.

2.4.2. Acute Toxicity

Toxicity was investigated by the method of Lorke's described by Chinedu et al., (2013) with modifications. This method consists in two-phase, in the first one the animals were divided into three groups receiving different doses of PsEO (10, 100 and 1000 mg/kg/ v.o.), then they were observed for 24 h for hypersensitivity, abnormal behavior, and death. In the second phase, the animals divided into three groups received high doses of the oil (1.600, 2.900 and 5.000 mg/kg/ v.o.) and hypersensitivity, abnormal behavior and death were observed for 24 h. After testing the LD₅₀ (lethal dose) and CED₅₀ (collateral effects dose).

2.4.3. Acetic Acid-Induced Writhing Test

Writhing activity was determined by the method of Collier et al. (1968) with modifications. The animals were treated (dose of 100 mg/kg/ v.o.) with vehicle (negative control group, 0,9% saline), Indomethacin (standard group 20 mg/kg v.o.) and PsEO at concentrations of 40, 100 and 250 mg/kg/ v.o. 1 hour before the nociceptive agent.

Nociception was induced by 0.8% acetic acid intraperitoneally i.p in a volume of 100 mg/kg, after this injection, the number of abdominal writhes was recorded between 5 - 15 minutes (Queiroz et al., 2010).

2.4.4. Formalin-Induced Pain

The formalin test was carried out as described by Vaz et al. (1996). The essential oil was given orally (P/O) to the experimental animals at various concentrations (PsEO 40, 100 e 250 mg/kg). Vehicle (0,9% saline, 0,1 mL/10 g), was administered as a negative control. Morphine (10 mg/kg), a standard drug and Indomethacin (20 mg/kg) was administered as a standard group. After 30 min, 20 µl 2.5% formalin (v/v in distilled water) was injected subcutaneously (S/C) into the plantar surface of the hind paw and the total time taken in the behavioral changes of the mice responses to nociception was recorded, such as licking and/or biting of the injected paw. The lick time was timed taking into account two phases, the first phase (0-5 min) occurs shortly after administration of formalin and concerns the direct chemical stimulation of nociceptors; the second phase (15-30 min) is recognized by an inflammatory process, leading to the release of chemical mediators (Shibata et al., 1989).

2.4.5. Action Mechanisms Involved in Nociception

Participation of the different pathways involved in nociception was assessed by administering the following drugs (15 min prior to treatment): naloxone (5 mg/kg) a non-selective opioid antagonist, atropine (5 mg/kg) a non-selective muscarinic receptor antagonist and glibenclamide (5 mg/kg) a K^+_{ATP} channel blocker. The tests were performed with oral administration (P/O) of PsEO (100 and 250 mg/kg), vehicle (0,9% saline) and morphine (10 mg/kg) as standard group, after 30 minutes the animals were submitted to the formalin test (as described) and the licking time recorded and computed for analysis (Tjolsen et al., 1992).

2.5. Statistical Analysis

Data have been expressed as the mean $\pm$ SEM. Significant differences of the percent inhibitions of various test samples were analyzed via one way ANOVA using GraphPad Prism software in which the $P < 0.05$ were considered significant.

3. RESULTS

3.1. Chemical composition of *P. salutare*

The extraction of the essential oil of *Psidium salutare* showed yield of 0.5271%. The chemical constituents were identified and are shown in table 1. Fifty-eight components were encountered, amongst them fifty-six were identified accounting for 92.37% of the total composition. Among the major constituents was found 1,8-cineole (14.05%), E-caryophyllene (8.86%), α -eudesmol (6.51%), α -pasinsen (6.39%), Selina- 3,7 (11)- diene (5.94%) and α -pinene (4.38%), resulting 46.13% of identified compounds.

3.2. Acute Toxicity

Mortality was observed at a dose of 5.000 mg/kg v.o. and a behavioral change was observed at a dose of 2.900 mg/kg v.o. The LD₅₀ calculated was 3.807 mg/kg and the CED₅₀ was 2.154 mg/kg. According to the assay, dose down to 2.000 mg/kg v.o. was considered as safe for essential oil of *Psidium salutare*.

3.3. Writhing Test

The results encountered do not reveal a dose-dependent response. The mean writhes of the Indomethacin at 20 mg/kg, was 6.50 ± 1.310 with 85.66% pain inhibition. The essential oil sample exhibited a mean writhe of 16.167 ± 2.344 with 64.35% pain inhibition at a dose of 40 mg/kg, while, at a dose of 100 mg/kg it exhibited mean writhes of 14.833 ± 1.249 with 67.28% pain inhibition and at 250 mg/kg it exhibited mean writhes of 12.0 ± 1.211 with 73.52% pain inhibition. Data are shown in Figure 1.

3.4. Formalin Test

The formalin test revealed a typical biphasic licking response that is shown in Figure 2 (A and B). In the vehicle group, the mean time of paw licking was 89.16 ± 4.12 in the first phase (0-5 min) and 189.66 ± 4.03 in the second phase (15-30 min). The morphine group and indomethacin group presented respectively a reduction in paw licking of 77.75% and 0% in the first phase; in the second phase, they presented 90.59% and 61.59% of reduction of time respectively (Table 2). Various concentrations of PsEO were tested and showed distinct results, at a concentration of 40 mg/kg no significant reduction was observed on early phase (neurogenic pain) while 56.23% of reduction was detected on late phase (inflammatory pain). At a dose of 100 mg/kg v.o. was observed 46.16 and 78.99% of reduction in the first and second phase respectively. A dose of 250 mg/kg of PsEO brought a significant reduction in paw licking of 57.76 and 80.31% in early and late phase respectively.

3.5. Mechanism of Action in Antinociception

The results obtained from this test are shown in Table 2 and Image 2 (C and D). As can be seen, the main route by which nociception is induced is the opioid pathway tested here by administration of the naloxone antagonist. When applied together with this drug, PsEO had its activity completely inhibited, obtaining results similar to that of morphine in the first phase. In the second phase it is possible to observe a percentage of inhibition of 52.10 and 59.05% with the oils + naloxone in the concentrations of 100 and 250 mg/kg v.o. respectively. Involvement of K^+_{ATP} channels and muscarinic receptors was also tested. When associated with glibenclamide, the essential oil at a concentration of 250 mg/kg exhibited a percent inhibition of 44.11 and 77.68% in the first and second phases, respectively. Together with naloxone, the oil at a concentration of 250 mg/kg demonstrated an inhibitory activity of 57 and 81.63% in the first and second phases respectively, showing that even with these blocked pathways, PsEO did not inhibit its activity.

3.6. Antioxidant Assays

The antioxidant potential of PsEO using DPPH and phosphomolybdenum complex formation are shown in Table 3. The observed percent inhibitions for the essential oil using DPPH free radicals was 9.12 ± 3.50 , 12.77 ± 5.01 , 14.16 ± 3.00 , 24.36 ± 1.75 , 27.47 ± 0.00 , $27.68\% \pm 0.16$ at concentrations of 156.25, 312.50, 625, 1.250, 2.500 and 5.000 $\mu\text{g/ml}$ respectively. In comparison, the standard drug ascorbic acid exhibited $85.73\% \pm 0.56$ inhibition at a concentration of 5.000 $\mu\text{g/ml}$. The measure of the total antioxidant capacity of PSEO expressed as relative antioxidant activity in relation to ascorbic acid was $22,57\% \pm 0,073$ at a concentration of 5.000 $\mu\text{g/ml}$. Both assays reveal a low antioxidant capacity of the essential oil from *Psidium salutare*.

4. DISCUSSION

In this paper was evaluated the chemical composition, the antinociceptive and antioxidant potentials from essential oil of *Psidium salutare*. The essential oils (EO's) obtained from plants present a variety of bioactive compounds that give them properties applicable to the various therapies (Santos, Rao, & Silveira, 1998).

Some components of essential oil can easily get distributed to different compartments of the human body including the central nervous system (Vyas, Shahiwala, & Amiji, 2008). In this current study, the antinociceptive potential of essential oil was registered with significant results. The possible mechanism of antinociceptive activity of PsEO was figured out as the central pathway due to involvement of opioid receptors. The antinociceptive potential of PsEO may be due to the presence of the bioactive compounds found in the chromatographic analyses; some of them were previously reported with analgesic and antiinflammatory potentials. The 1,8-cineole was described as antiinflammatory and antinociceptive, inhibiting the acetic acid-induced increase in peritoneal capillary permeability and the chemical

nociception induced by intraplantar formalin and intraperitoneal acetic acid in rats (Santos & Rao, 2000). α -eudesmol is a sesquiterpenoid described as an inhibitor of the release of neuropeptides such as CGRP (calcitonin gene-related peptide) and SP (substance P) from sensory nerve; this neuropeptides have been suggested to cause neurogenic inflammation (Asakura et al., 2000). α -pinene has demonstrated antinociception in formalin test using mice (Santos et al., 1998) and exerted supraspinal antinociceptive actions in rats (Liapi et al., 2007).

The chemical composition of the essential oil here described differs from that encountered in the literature (De Macêdo et al., 2018), this can be justified due to the environmental and climatic differences of the places where the samples were collected. Essential oils can vary in quality, quantity and in composition according to climate, soil composition, plant organ, age and vegetative cycle stage (Bakkali et al., 2008).

The writhing assay and the formalin test are commonly employed as model of pain, both tests use noxious chemical stimulus but the site stimulated and the response induced are different. The writhing assay is used as visceral pain model in experimental animals (Gebhart & Ness, 1991), while the formalin test is employed as a model for clinical pain (Tjolsen et al., 1992). The essential oil obtained from *P. salutare* exhibited a potent activity in the writhing test at a dose of 250mg/kg and in the second phase in the formalin test, indicating the possibility that it can alleviate the visceral pain and in the clinical pain associated with inflammation, these results corroborate with the popular use of *P. salutare* infusions for treatment of stomach ache and diarrhea (De Macêdo et al., 2018).

Some investigations were carried out using essential oils from plants belonging to the genus *Psidium*. The essential oil extracted from the leaves of *Psidium guajava* L. var. *Pommiferum* presented a reduction in the number of writhings in 62% and 85% when administered orally in the concentrations of 200 and 400 mg/kg respectively; whereas in the

formalin test there was a reduction in the number of paw licking only in the second phase of 72% and 76% in the concentrations of 100 and 200 mg/kg (Santos et al., 1998).

The oil obtained from *P. pohlianus* Berg was used for testing through three different nociceptive methods, formalin, low temperature hot-plate ($51 \pm 1^\circ\text{C}$) and caudal compression; the formalin test presented reduction of paw licking in both phases, in concentrations of 100, 200 and 400 mg/kg presented 25, 45 and 84% in the first phase whereas in the second phase presented 31, 95 and 100% for the respective doses; the hot-plate test showed an extension of the reaction time at the observed intervals when the oil was administered at the same doses of formalina test; the caudal compression test showed significant results only in the group of animals that received orally a dose of 400mg/kg (Santos, Rao, & Silveira, 1996).

In conclusion, the data obtained in this study suggest that the PsEO possesses a considerable antinociceptive activity that can suggest the use to treat the visceral pain and in the clinical pain associated with inflammation. The data also showed a low antioxidant capacity. Further studies are required to explore the potential from *P. salutare* essential oil and lead to the possible development of new analgesic drugs.

5. ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Brazilian National Research Council (CNPq) and CAPES for the financial support to this work.

6. CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

7. REFERENCES

- Adams, R. P. (2009). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Carol Stream, IL: Allured Publishing.
- Asakura, K., Kanemasa, T., Minagawa, K., Kagawa, K., Yagami, T., Nakajima, M., &

- Ninomiya, M. (2000). α -Eudesmol, a P/Q-type Ca^{2+} channel blocker, inhibits neurogenic vasodilation and extravasation following electrical stimulation of trigeminal ganglion. *Brain Research*, 873(1), 94–101. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02527-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02527-0)
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.2307/3280933>
- Cascaes, M., Guilhon, G., Andrade, E., Zoghbi, M., Santos, L., Cascaes, M. M., ... Santos, L. D. S. (2015). Constituents and Pharmacological Activities of Myrcia (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23881–23904. <https://doi.org/10.3390/ijms161023881>
- Chinedu, E., Arome, D., & Ameh, F. (2013). A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology International*, 20(3), 224. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.121674>
- Collier, H. O., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., & Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal Pharmacology Chemotherapy*, 32, 295–310.
- de Macêdo, D. G., Souza, M. M. A., Morais-Braga, M. F. B., Coutinho, H. D. M., dos Santos, A. T. L., da Cruz, R. P., ... de Menezes, I. R. A. (2018). Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. *PeerJ*, 6, e5476. <https://doi.org/10.7717/peerj.5476>
- Firmo, W. D. C. A., Menezes, V. A. M. De, Passos, C. E. D. C., Dias, C. N., Alves, L. P. L., Dias, I. C. L., ... Olea, R. S. G. (2011). Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq.*, 18(n. especial), 90–95.
- Gebhart, G. F., & Ness, T. J. (1991). Central mechanisms of visceral pain. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 69, 627–635.
- Liapi, C., Anifantis, G., Chinou, I., Kourounakis, A., Theodosopoulos, S., & Galanopoulou, P. (2007). Antinociceptive Properties of 1,8-Cineole and β -Pinene, from the Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Leaves, in Rodents. *Planta Medica*, 73(12), 1247–1254. <https://doi.org/10.1055/s-2007-990224>
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.
- Queiroz, A. C., Lira, D. P., Dias, T. L. M. F., Souza, E. T., Matta, C. B. B., Aquino, A. B., ... Moreira, A. M. S. (2010). The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 377–383.
- Rates, S. M. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, (39), 603–613. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00154-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00154-9)

- Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, 14(4), 240–244. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200006\)14:4<240::AID-PTR573>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200006)14:4<240::AID-PTR573>3.0.CO;2-X)
- Santos, F. A., Rao, V. S. N., & Silveira, E. R. (1996). Naloxone-resistant antinociceptive activity in the essential oil of *Psidium pohlianum* Berg. *Phytomedicine*, 3(2), 197–201. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80036-5](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80036-5)
- Santos, F. A., Rao, V. S. N., & Silveira, E. R. (1998). Investigations on the antinociceptive effect of *Psidium guajava* leaf essential oil and its major constituents. *Phytotherapy Research*, 12(1), 24–27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(19980201\)12:1<24::AID-PTR181>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(19980201)12:1<24::AID-PTR181>3.0.CO;2-B)
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., & Inoki, R. (1989). Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38, 347–352.
- Tjolsen, A., Berge, O., Hunskaar, S., Rosland, J. K., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51, 5–17.
- Van Den Dool, H., & Kratz, P. . (1963). A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *Journal Chromatography A*, 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- Vaz, Z. R., Cechinel-Filho, V., Yunes, R. A., & Calixto, J. B. (1996). Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociceptive in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278, 304–312.
- Vyas, T. K., Shahiwala, A., & Amiji, M. M. (2008). Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *Int. J. Pharm*, 347, 93–101.
- Zarin, D. A., Tse, T., Ide, N. C. (2005). Trial registration at ClinicalTrials. gov between May and October 2005. *N. Engl. J. Med*, 353, 2779–2787. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa053234>

TABLE 1. List of all the compounds identified in the GC-MS analysis of essential oil of *Psidium salutare*

No.	Compound (Database)	RI Kratz	RT Kovatz	Area(%)
1	Tricyclene	915	918	0,05
2	α -thujene	925	928	0,56
3	α-pinene	930	934	4,38
4	Camphene	945	949	0,04
5	β -Pinene	973	977	1,71
6	Myrcene	991	992	0,96
7	α -Phellandrene	1002	1003	0,59
8	α -Terpinene	1015	1017	0,26
9	1,8-Cineole	1034	1037	14,05
10	(Z)- β -Ocimene	1039	1042	0,62
11	(E)- β -Ocimene	1048	1052	0,43
12	γ -terpinene	1058	1061	0,87
13	Terpinolene	1087	1088	0,25
14	Linalool	1101	1101	1,71
15	Endo-Fenchol	1112	1113	0,01
16	Alloocimene	1129	1131	0,02
17	Pinocarvone	1161	1164	0,01
18	δ -Terpineol	1166	1168	0,07
19	Terpinene-4-ol	1176	1178	0,77
20	α -Terpineol	1192	1192	2,75
21	Verbenone	1208	1208	0,07
22	Nerol	1226	1228	0,02
23	Geraniol	1255	1257	0,58
24	α -Cubebene	1349	1351	0,04
25	α -Ylangene	1371	1373	0,27
26	α -Copaene	1376	1377	0,95
27	β -Bourbonene	1385	1386	0,78
28	[cis]-Eudesma-6,11-diene	1393	1393	0,66
29	α -Gurjunene	1410	1411	0,30
30	E-Caryophyllene	1426	1427	8,86
31	β -Copaene	1430	1432	0,20
32	γ -Elemene	1435	1436	0,58
33	Aromadendrene	1441	1442	1,13
34	α -humulene	1456	1457	1,84
35	[allo]-Aromadendrene	1462	1463	0,22
36	γ -Muurolene	1478	1479	2,14
37	β -Selinene	1490	1490	3,21
38	α -Selinene	1498	1498	2,66
39	α -Muurolene	1502	1502	0,37
40	(Z)- α -Bisabolene	1505	1505	0,18
41	δ -Amorphene	1509	1510	0,40
42	δ -Cadinene	1517	1518	0,61
43	Zonarene	1524	1525	3,28
44	α -cadinene	1528	1529	1,92
45	Selina-3,7(11)-diene	1541	1542	5,94
46	α-Panasinsen	1549	1550	6,39
47	Germacrene B	1561	1562	1,42
48	Caryophyllene oxide	1587	1588	2,84
49	Viridiflorol	1594	1594	0,39

50	Guaiol	1601	1601	1,58
51	5-epi-7-epi- α -Eudesmol	1611	1611	1,12
52	Ni	1620	1621	1,36
53	1-epi-cubenol	1631	1631	1,81
54	Ni	1635	1636	1,13
55	Selina-3,11-dien-6- α -ol	1648	1649	2,28
56	α-eudesmol	1658	1659	6,51
57	ni	1669	1670	0,80
58	Eudesm-7(11)-en-4- α -ol	1699	1699	1,37
				96,32
Identified		92,37%		
Unidentified		7,63%		

RI, Retention Index; RT, Retention Time; Ni, not identified.

TABLE 2. Formalin Test- Effect of *P. salutare* essential oil and action mechanisms involved in antinociception.

Samples	Dose (mg/kg)	Total time of paw licking			
		0-5 min	%inhibition	15-30 min	%inhibition
Vehicle	-	89.16 $\pm$ 4.126	-	189.66 $\pm$ 4.039	-
Ind	20	91.00 $\pm$ 2.47	-	72.83 $\pm$ 9.85	61.59
Mor	10	19.83 $\pm$ 2.40	77.75	17.83 $\pm$ 3.04	90.59
PsEO	40	91.00 $\pm$ 2.59	-	83.00 $\pm$ 3.43	56.23
PsEO	100	48.00 $\pm$ 2.42	46.16	39.83 $\pm$ 7.33	78.99
PsEO	250	37.66 $\pm$ 2.36	57.76	37.33 $\pm$ 2.51	80.31
Glib	5	87.33 $\pm$ 3.70	-	191.83 $\pm$ 2.96	-
Glib+PsEO	5 + 100	63.83 $\pm$ 2.13	28.40	41.66 $\pm$ 1.28	78.03
Glib+PsEO	5 + 250	49.83 $\pm$ 2.00	44.11	42.33 $\pm$ 2.02	77.68
Nal	5	85.16 $\pm$ 1.42	-	187.66 $\pm$ 4.752	-
Nal+PsEO	5 + 100	88.66 $\pm$ 2.39	-	90.83 $\pm$ 5.33	52.10
Nal+PsEO	5 + 250	86.50 $\pm$ 2.47	-	77.66 $\pm$ 3.00	59.05
Nal + Mor	5 + 10	84.00 $\pm$ 2.06	-	189.66 $\pm$ 4.03	-
Atr	5	89.00 $\pm$ 1.949	-	180.33 $\pm$ 2.52	-
Atr +PsEO	5 + 100	35.83 $\pm$ 1.19	59.81	40.33 $\pm$ 1.14	78.73
Atr +PsEO	5 + 250	38.33 $\pm$ 1.08	57.00	34.83 $\pm$ 1.64	81.63

Ind, Indomethacin; Mor, Morphine; Glib, Glibenclamide; Nal, Naloxone, PsEO, *Psidium salutare* essential oil; Atr, Atropine; Total time is represented as mean $\pm$ SEM.

TABLE 3. Antioxidant activity of essential oil of *Psidium salutare* at various concentrations.

Sample	Test	Conc.	Conc.	Conc.	Conc.	Conc.	Conc.
		156.25 μ g/ml	312.50 μ g/ml	625 μ g/ml	1,250 μ g/ml	2,500 μ g/ml	5,000 μ g/ml
PsEO	DPPH	9.12 $\pm$ 3.50	12.77 $\pm$ 5.01	14.16 $\pm$ 3.00	24.36 $\pm$ 1.75	27.47 $\pm$ 0.00	27.68 $\pm$ 0.16
A.A.	DPPH	82.62 $\pm$ 2.99	86.59 $\pm$ 5.80	87.55 $\pm$ 1.09	84.98 $\pm$ 2.13	85.41 $\pm$ 4.09	85.73 $\pm$ 0.56
PsEO	Phospho	14,18 $\pm$ 0,612	14,78 $\pm$ 0,345	17,08 $\pm$ 0,243	19,51 $\pm$ 1,474	19,38 $\pm$ 0,429	22,57 $\pm$ 0,073

PsEO, *Psidium salutare* Essential Oil; A.A., Ascorbic Acid; Phospho, Phosphomolybdenum complex expressed as relative antioxidant activity in relation to ascorbic acid.

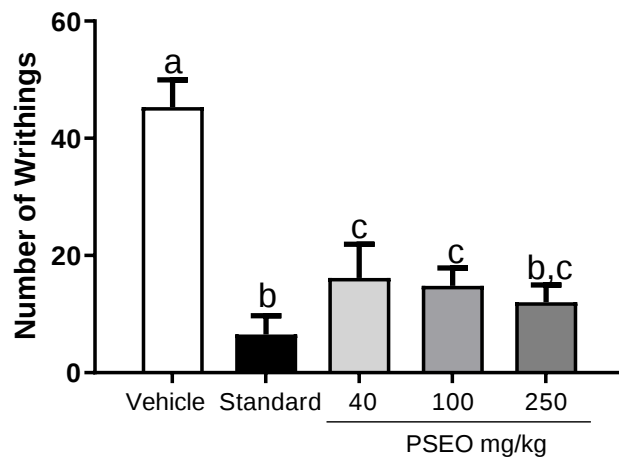


Figure 1- Effects of PSEO on acetic acid induced writhing in mice. Each column represents mean $\pm$ SEM (n=6). $p < 0.001$ vs control (ANOVA).

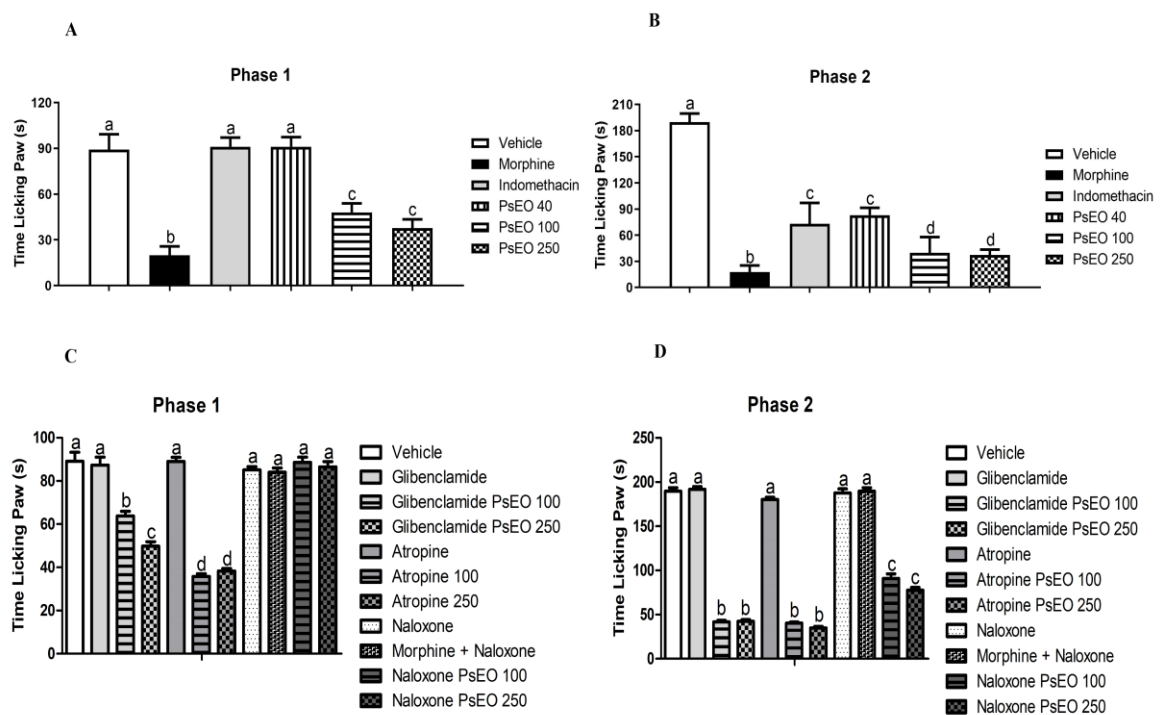


Figure 2- Effects of PSEO on formalin test in mice. Each column represents mean $\pm$ SEM (n=6). $p < 0.001$ vs control (ANOVA).

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho sugere que potencial antinociceptivo do óleo essencial obtido de folhas da espécie *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg do Parna Catimbau se deve aos compostos químicos previamente caracterizados, em especial, os majoritários. Assim, PsEO se mostrou como possível alternativa para formulação de medicamentos com fins analgésicos. Entretanto, estudos mais detalhados se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P. U.; MEDEIROS, P. M.; LUIZ, A.; ALMEIDA, S.; MONTEIRO, M.; FREITAS, E. M.; NETO, L.; MELO, J. G. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALMEIDA, T. P.; MAIA, J. Z.; FISCHER, C. D. B.; PINTO, V. M.; PULZ, R. S.; RODRIGUES, P. R. C. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 2, p. 107-118, 2006.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAYALA, B.; BASSOLE, I. . N.; SCIFO, R.; GNOULA, C.; MOREL, L.; LOBACCARO, J. M. A.; SIMPORE, J. Anticancer activity of essential oils and their chemical components-a review. **American Journal of Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 591-607, 2014.
- BASBAUM, A. I.; JULIUS D. Toward better pain control. **Scientific American**, v. 294, p. 60-67, 2006
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v.353, n.9164, May 8, p.1610-5. 1999.
- BONICA, J. J. The management of pain. **History of pain concepts and therapies**, v. 1, p. 1-17, 2010.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Caatinga**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>> Acesso em: 10 de dezembro de 2018a.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Parque Nacional do Catimbau**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga/2135-parna-do-catimbau>> Acesso em: 10 de dezembro de 2018b.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Unidades de Conservação – Caatinga**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga>> Acesso em: 20 de Janeiro de 2019.
- CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.
- CASCAES, M.; GUILHON, G.; ANDRADE, E.; ZOGHBI, M.; SANTOS, L.; CASCAES, M. M.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. DE A.; ZOGHBI, M. D. G. B.; SANTOS, L. D. S. Constituents and Pharmacological Activities of Myrcia (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881-23904, 9 out. 2015.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. BEN; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 501–506, 1 jun. 2007.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso Medicinal de espécies da família Myrtaceae e Melastomaceae no Brasi. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

DÍAZ-DE-CERIO, E.; VERARDO, V.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. **Health effects of *Psidium guajava* L. Leaves: An overview of the last decade.** [s.l: s.n.]. v. 18

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq.*, v.18, n. especial, 2011.

FRANZON, R. C.; CAMPOS, L. Z. DE O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C. **Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos.** 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009.

FREITAS, M. O.; DE MORAIS, S. M.; SILVEIRA, E. R. Volatile Constituents of *Psidium myrsinoides* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, v.14, n.5, p. 364–365, 2002.

GUSTEIN, H. B.; AKIL, H. Analgésicos opióides. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da Terapêutica**, ed. 11, p. 487- 526, 2006.

JACOBSON, K. A. E Z. G. GAO. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v.5, n.3, Mar, p.247-64. 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KIILL, L. H. P.; DRUMOND, M. A.; LIMA, P. C. F.; ALBUQUERQUE, S. G.; OLIVEIRA, V. R. **Preservação e uso da Caatinga.** Embrapa Informação Tecnológica; Embrapa SemiÁrido. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 39 p. ISBN 978-85-7383-399-7.

LANDRUM, L. R. A REVISION OF THE *PSIDIUM SALUTARE* COMPLEX (MYRTACEAE). **BRIT Press, The Botanical Research Institute of Texas**, v. 20, n. 4, p. 1449–1469, 2003.

LUNA, J. S.; SANTOS, A.; LIMA, M.; OMENA, M. MENDONÇA, F.; BIEBER, L.; SANT'ANA, A. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n.2, p. 199-206, 2005.

MACÊDO, D. G.; SOUZA, M. M. A.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; COUTINHO, H. D. M.; SANTOS, A. T. L. DOS; CRUZ, R. P. DA; COSTA, J. G. M. DA; RODRIGUES, F. F. G.;

- QUINTANS-JUNIOR, L. J.; SILVA ALMEIDA, J. R. G. DA; MENEZES, I. R. A. DE. Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. **PeerJ**, v. 6, p. e5476, 1 nov. 2018.
- MARQUES, F. A.; WENDLER, E. P.; SALES MAIA, B. H. L. N.; COFFANI-NUNES, J. V.; CAMPANA, J.; GUERRERO, P. G. Volatile Oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 6, p. 519–520, 2008.
- MEDEIROS, F. C. M. DE, DEL MENEZZI, C. H. S., BIZZO, H. R., & VIEIRA, R. F. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n.4, p. 289–292, 2015.
- MEDEIROS, F. C. M., DEL MENEZZI, C. H. S., VIEIRA, R. F., FERNANDES, Y. F. M., SANTOS, M. C. S., & BIZZO, H. R. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from *Psidium laruotteanum* Cambess (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.30, n.4, p. 253–257, 2018.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, n.1, Jan, p.1-164. 1999.
- MORAIS, S.M.; CRAVEIRO, A.A., MACHADO, M.I.L.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J. Volatile Constituents of *Eugenia uniflora* Leaf Oil from Northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**. v. 8, n. 4, p. 449-451, 1996.
- PAULINO DE ALBUQUERQUE, U.; MUNIZ DE MEDEIROS, P.; LUIZ, A.; ALMEIDA, S. DE; MONTEIRO, M.; MACHADO DE FREITAS, E.; NETO, L.; GOMES DE MELO, J. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.
- PERALTA-BOHÓRQUEZO, A. F.; PARADA, F.; QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Analysis of Volatile Compounds of Sour Guava (*Psidium guineense* Swartz) Fruit. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n.6, p. 493–498, 2010.
- PLEUVRY, B. J. E G. R. LAURETTI. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol Ther**, v.71, n.3, p.313-24. 1996.
- PRADO, D. 2003. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife: Editora Universitária, 2003. pp. 3-73
Psidium in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10853>>. Acesso em: 11 de dezembro de 2018.
- S. LUNA, J. DE; SANTOS, A. F. DOS; LIMA, M. R. F. DE; OMENA, M. C. DE; MENDONÇA, F. A. C. DE; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199–206, 28 fev. 2005.
- SAMPAIO, B. **MYRTACEAE NA FLORESTA ATLÂNTICA DE TERRAS BAIXAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2011.

SAWAMURA, M. Introduction and overview. IN: SAWAMURA, M. (Ed). Citrus essential oils: flavor and fragrance. New Jersey: WILEY, 2010. 1-36

SENNA, L.M.; SOUZA, G.R.; BIZZO, H.R.; MOREIRA, D.L. Composição volátil das folhas de *Eugenia racemulosa* O. Berg. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, v, 92, n. 2, p. 51-54, 2011.

SILVA, J. D. DA; LUZ, A. I. R.; SILVA, M. H. L. DA; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. DAS G. B.; MAIA, J. G. S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 3, p. 240–243, 1 maio 2003.

SILVA, M.F. Uma análise do bioma caatinga no município de Gado Bravo- PB através do índice de vegetação por diferença normalizada. 2016 Disponível em <<http://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/2293>>. Acesso em 09/04/18 às 11:00h.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003, p. 468-495.

SOARES-SILVA, L. H.; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, n. 1, p. 51–54, 1 set. 2008.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2015 Myrtaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 11 de dezembro de 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Nova Odessa**, São Paulo: Instituto Plantarum, p. 160-162, 2005.

STEFANELLO, M. E. A; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**. v. 8, p. 73-94, 2011.

SYTSMA, K. J.; LITT, A.; ZJHRA, M. L.; CHRIS PIRES, J.; NEPOKROEFF, M.; CONTI, E.; WALKER, J.; WILSON, P. G. Clades, Clocks, and Continents: Historical and Biogeographical Analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and Relatives in the Southern Hemisphere. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. S4, p. S85–S105, jul. 2004.

VALÉRIA DE MELLO CRUZ, A.; AUXILIADORA, M.; KAPLAN, C. **USO MEDICINAL DE ESPÉCIES DAS FAMÍLIAS MYRTACEAE E MELASTOMATACEAE NO BRASIL**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://s3.amazonaws.com/host-article-assets/floram/588e2208e710ab87018b460c/fulltext.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44– 84, 2007.

VERRI, J. W.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.

WINTENBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278-276, 2008.

YORK, T.; VANVUUREN, S.F.; DEWET, H. An antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 144, p. 118–127, 2012.

ANEXO A- PHYTOTHERAPY RESEARCH: INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Author Guidelines

Phytotherapy Research is a monthly, international journal for the publication of original research papers, short communications, reviews and letters on medicinal plant research. Key areas of interest are pharmacology, toxicology, and the clinical applications of herbs and natural products in medicine, from case histories to full clinical trials, including studies of herb-drug interactions and other aspects of the safety of herbal medicines. Papers concerned with the effects of common food ingredients and standardised plant extracts, including commercial products, are particularly welcome, as are mechanistic studies on isolated natural products.

Short communications dealing with the pharmacology and screening of crude or uncharacterised extracts will be considered for publication only if they are clearly of interest to our international readership and are not deemed more suitable for a regional audience.

Phytotherapy Research does not publish agricultural, phytochemical, structure elucidation, quality control or botanical identification papers unless directly pertinent to the pharmacological effects or overall safety of plant based medicines currently in use.

Manuscript Submission. *Phytotherapy Research* operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click <http://mc.manuscriptcentral.com/ptr> to navigate to the *Phytotherapy Research* online submission site.

All papers must be submitted via the online system.

Authors are welcome to submit the names and contact details of up to three suggested reviewers, using the online system. Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are *.doc, *.docx and *.rtf. Figures must be provided in *.tiff or *.eps format.

Upon acceptance, authors **must** supply by e-mail to the Production Editor: permission grants, quoting the manuscript code. If the manuscript contains extracts, including illustrations, from other copyright works (including material from on-line or intranet sources) it is the author's responsibility to obtain written permission from the owners of the publishing rights to reproduce such extracts using the Wiley Permission Request Form.

Manuscript Style. The language of the journal is English. Please ensure that your manuscript has been checked by an English language expert if there is concern for grammatical or other errors. All submissions including book reviews must have a title, be double-line spaced with type no smaller than 12 point, and have a margin of 3cm all round. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate Image files.

- The **title page** must list the full title, short title of up to 60 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs.

- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.
- Supply an **abstract** of up to 200 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.
- Authors may suggest up to 3 potential reviewers
- A concise **introduction** is required of the background to the subject, its significance and its relationship to earlier works, with references.
- **Materials and methods** should be presented with clarity and detail. State the original and important findings in the **results**. Illustrate these with figures or tables where necessary but keep these to a minimum.
- **Results and discussion** may be combined as one section. Discuss the principal conclusions drawn from the results and their important implications.
- **Convention on biodiversity.** Authors must indicate that they have obtained authority to access plant samples (other than freely available commercial crops or herbal products) used for research and that this has been authorised by the appropriate agent of the government of the source country as required under the framework of the United Nations Convention on Biodiversity.
- **Botanical aspects.** Plant materials used must be adequately described using the Latin binomial for the plant, author of the name, plant family, source (e.g. country and region of collection, name of the collector and collection number) means of unambiguous identification (e.g. name and affiliation of expert botanist or the results of comparison with a published monograph and/or authenticated reference specimen). The reference number and place of deposition of a voucher specimen of the plant material must be given. For papers relating to crude plant extracts, the method of extraction and the yield of dried extract as a percentage weight of the starting fresh or dried plant material must also be stated. These should be submitted as short communications (see below).
- **Experimental procedures.** Bioassay data for plant extracts or isolated compounds must be accompanied by data for positive and negative controls. All animal experiments should be conducted in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, the EEC Directive of 1986 (86/609/EEC) or the NIH guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publication No. 80-23; revised 1978). The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal procedures used.
- Use Chemical Abstracts nomenclature for chemical names and structures. Use proper or proprietary names with caution. Common acronyms for biomedical names are acceptable but define all others when first mentioned. Define abbreviations when first mentioned and do not use in the title or abstract. Define non-standard units.
- Keep acknowledgements brief and place them at the end of the paper.

Original Papers. These should not exceed five printed pages including a maximum of four figures and/or four tables and 30 references, (where one page comprises 800 words or the equivalent in illustrative and tabular material).

Short Communications. These must be complete, self-contained papers, and not preliminary reports. These should not exceed two printed pages including a maximum of two figures and/or two tables and 10 references. To exceed the limit may delay acceptance or publication of the paper.

Reviews and Keynote Lecture Transcripts. These will usually be written at the invitation of the Editors. Unsolicited reviews and manuscripts based on Conference Keynote Lectures will be welcome but authors wishing to submit these are requested to consult the Editor beforehand, ideally prior to commencement of writing. Reviews should include a Table of Contents and will normally be limited to 10,000 words including references and should be submitted via the online system.

Correspondence. Items submitted for the **correspondence columns**, which need have no fixed format are intended for constructive comments on published work or for putting forward new ideas and are published at the discretion of the Editors.

Pre-Submission English Language Editing Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals.editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Reference style. The APA system of citing sources should be used in all submissions. Citations should indicate the author's last name and the date, in parenthesis, within the text of the paper.

Journals: Wright C.W., & Phillipson J.D. (1990). Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytotherapy Research*, 4(2), 127-139.

Books: Wagner H., & Bladt S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (2nd edn). Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Chapters in Books: Kips R.H. (1985). Environmental aspects. In *Pesticide Application: Principles and Practice*, Haskel PT (ed). Oxford University Press: Oxford; 1-34.

Illustrations. Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, with the lead author's name, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Please supply artwork at the intended size for printing, sized to the text width of 84mm/single column, 176mm/double column. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc. - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum

- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

The cost of printing **colour** illustrations in the journal will be charged to the author. If colour illustrations are supplied electronically in either TIFF or EPS format, they **may** be used in the PDF of the article at no cost to the author, even if this illustration was printed in black and white in the journal. The PDF will appear on the *Wiley Online Library* site.

OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Copyright Transfer Agreement. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement. If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions

For authors choosing OnlineOpen. If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on **Wiley Author Services** and visit **<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>**.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: **<http://www.wiley.com/go/funderstatement>**.

Further Information. Proofs will be sent to the author for checking. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only (unless otherwise stated). Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Reprints of your article and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Authors Resources: Manuscript now accepted for publication?

If so, check out our suite of tools and services for **authors** and sign up for:

- Article Tracking
- E-mail Publication Alerts
- Personalization Tool

PEER Project

This journal is participating in the **PEER Project**, an EU-funded initiative to examine the impact on scholarly journals of depositing accepted manuscripts in web-based repositories. If the corresponding author is based in an EU country, we will deposit the accepted manuscript into a central project repository (DRIVER). The article's availability will be subject to a post-publication embargo. This project has no effect on your rights or obligations under the terms of the copyright agreement pertaining to this journal.

Conflict of Interest. All authors must declare financial/commercial conflicts of interest. Even if there is none, this should be stated in a separate paragraph following on from the Acknowledgements section. This is a mandatory requirement for **all** articles.

Guidelines for Cover Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please **follow these general guidelines**.

Video Abstracts

Bring your research to life by creating a video abstract for your article! Wiley partners with Research Square to offer a service of professionally produced video abstracts. Learn more about video abstracts at **www.wileyauthors.com/videoabstracts** and purchase one for your article at **https://www.researchsquare.com/wiley/** or through your Author Services Dashboard. If you have any questions, please direct them to **videoabstracts@wiley.com**.

ANEXO B- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 20 de dezembro de 2018

Ofício nº 118/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Maria Tereza dos Santos Correia**

Centro de Biociências

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº0051/2018

Certificamos que a proposta intitulada “Caracterização química do óleo essencial de *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg e avaliação das potenciais atividades biológicas.” registrada com o nº0051/2018, sob a responsabilidade de **Prof.ª Maria Tereza dos Santos Correia** que envolvem a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 18/12/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	3 meses após parecer favorável
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogenico
Nº de animais	138
Peso/Idade	30-35g/10 a12 semanas
Sexo	Macho (138)
Origem	Bioterio do Laboratorio de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

