



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

IZABELLY BIANCA DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-  
INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE EXTRATOS DA CASCA DO FRUTO  
DE *Myrciaria floribunda* (H.WEST EX WILLD.) O.BERG**

Recife  
2019

IZABELLY BIANCA DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE EXTRATOS DA CASCA DO FRUTO DE *Myrciaria floribunda* (H.WEST EX WILLD.) O.BERG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Ciências Biológicas

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Vanusa da Silva

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2019

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santos, Izabelly Bianca da Silva

Avaliação da composição química, atividades antioxidante, antiinflamatória e antinociceptiva de extratos da casca do fruto de *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O.Berg / Izabelly Bianca da Silva Santos- 2019.  
98 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva  
Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Plantas medicinais 2. Estresse oxidativo 3. Inflamação  
I. Silva, Márcia Vanusa da (Orientadora) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (Coorientadora) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-083

IZABELLY BIANCA DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE EXTRATOS DA CASCA DO FRUTO DE *Myrciaria floribunda* (H.WEST EX WILLD.) O.BERG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/07/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Márcia Vanusa da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>.Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>.Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva (Examinador Externo)  
Universidade Ceuma

À minha mãe Maria de Fátima, ao meu pai Adail (*in memorian*), à minha avó Izabel, ao meu avô João Batista (*in memorian*), ao meu namorado Bruno Xavier e aos meus irmãos, pelo apoio em todas as etapas da minha vida e que não mediram esforços para que eu concluísse mais uma etapa em minha vida acadêmica,

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Vanusa da Silva, por ter me acolhido desde o primeiro dia de aula durante a graduação, também por aceitar ser minha orientadora durante o Mestrado, por ter me mostrado como a pesquisa e a ciência são extremamente importantes, por ter me dado condições de realizar a pesquisa do Mestrado e por sempre me ajudar.

Agradeço a Bruno Souza, João Ricardhis, Wêndeo Kennedy e Luís Cláudio, por estarem sempre presentes me ajudando a construir esse trabalho, por terem me passado parte do conhecimento que aprendi na bancada e na escrita. E por me incentivarem a crescer na pesquisa e profissionalmente.

Agradeço a Associação dos Agricultores Familiares da Serra dos Paus Dóias (Agrodóia).

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado do Laboratório de Produtos Naturais, que me acompanharam durante o Mestrado.

Agradeço aos amigos Wêndeo, José Roberto e Julyanne pelo incentivo, parceria e amizade durante o mestrado nas disciplinas, estágio à docência, extensão, curso de inverno e fora do ambiente da universidade também.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Bioquímica que de alguma forma contribuíram com o meu aprendizado, com a minha pesquisa e com essa conquista.

Agradeço a CAPES por ter me concedido a bolsa de Mestrado.

Agradeço a UFPE, a sua equipe técnico-administrativa, aos docentes que são espelhos de profissionais que eu quero seguir.

## RESUMO

*Myrciaria floribunda*, conhecida popularmente como cambuí, é uma árvore que está distribuída em todos os biomas do Brasil. Seus frutos são usados como recurso alimentício. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição fitoquímica, toxicidade aguda, atividades antioxidantes, anti-inflamatória e antinociceptiva de extratos da casca do fruto de *M. floribunda*. Foram avaliadas as composições fitoquímicas dos extratos éter etílico (MfEeE), clorofórmico (MfCE), acetônico (MfAE), metanólico (MfME) e aquoso (MfAqE), por Cromatografia de Camada Delgada, conteúdo de fenóis totais, flavonoides e antocianinas monoméricas. Também foi avaliada a capacidade antioxidante por meio dos ensaios DPPH, ABTS, sequestro do radical superóxido e Capacidade Antioxidante Total, para selecionar o extrato mais promissor. Foi realizada a análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do melhor extrato, MfAE. Também foram avaliados os efeitos tóxicos (por teste de toxicidade aguda), anti-inflamatório (pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina) e analgésico (por contorção induzida por ácido acético e modelos de dor induzida por formalina), *in vivo*, desse extrato. O perfil cromatográfico de MfAE apresentou diversas classes de metabólitos secundários e foi identificada a presença de ácido gálico e seus derivados e ácido elágico. O maior conteúdo de fenóis e antocianinas monoméricas foi detectado no MfAE (296,27 mg EAG/g e 35,65 mg cy-3-glc E/ g). O extrato MfAE também se destacou por apresentar atividade antioxidante, nos testes de DPPH ( $IC_{50} = 63.84 \mu\text{g/mL}$ ), ABTS (1630.11  $\mu\text{M TEAC/g}$ ) e sequestro do radical superóxido ( $IC_{50} = 260,27 \mu\text{g/mL}$ ). MfAE apresentou dose letal de baixa toxicidade ( $LD_{50} = 2.154,06 \text{ mg/kg}$ ). MfAE também exibiu efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. MfAE reduziu as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. As duas doses testadas (50 e 100 mg/kg) inibiram a fase inflamatória da dor. A dose de 100 mg/kg também reduziu a fase neurogênica e este efeito foi revertido pela naloxona (sugerindo o envolvimento do sistema opioidérgico). Os resultados evidenciaram que a casca do fruto de *M. floribunda* apresenta potenciais promissores como antioxidante, anti-inflamatório e analgésico. Deve-se continuar os estudos a fim de isolar e identificar compostos ativos, assim como elucidar os mecanismos de ação das atividades analisadas.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Estresse oxidativo. Inflamação. Nocicepção.

## ABSTRACT

*Myrciaria floribunda*, popularly known as camboim, is a tree which is present in all biomes of Brazil. Its fruits are used as a food resource. The objective of this study was to evaluate the phytochemical composition, acute toxicity, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of extracts of the fruit peel of *M. floribunda*. The phytochemical content of the ethylic ether (MfEeE), chloroformic (MfCE), acetonic (MfAE), methanolic (MfME) and aqueous (MfAqE) extracts were evaluated by Thin Layer Chromatography; total phenols, flavonoids and monomeric anthocyanins was evaluated; antioxidants activities were evaluated through DPPH, ABTS, superoxide radical sequestration and Total Antioxidant Capacity, to select the most promising extract. The analysis of Liquid Chromatography of High Efficiency of the best extract, MfAE, was performed. The toxic (by acute toxicity test), anti-inflammatory (by carrageenan-induced paw edema model) and analgesic effects (by acetic acid-induced writhing and formalin induced pain models) were also evaluated. The chromatographic profile of MfAE presented several classes of secondary metabolites, with the presence of gallic acid and its derivative, ellagic acid. The highest content of monomeric phenols and anthocyanins was obtained by MfAE (296.27 mg EAG/g and 35.65 mg cy-3-glc E/g). The MfAE extract also stood out by presenting high antioxidant activity in most of the tests, DPPH (IC<sub>50</sub> = 63.84 µg/mL), ABTS (1630.11 µM TEAC / g) and superoxide radical sequestration (IC<sub>50</sub> = 260.27 µg/mL). MfAE presented a lethal dose of low toxicity (LD 50 = 2,154.06 mg/kg). MfAE also exhibited anti-inflammatory and analgesic effects. MfAE reduced the abdominal contortions induced by acetic acid. The two concentrations tested (50 and 100 mg/kg) inhibited the inflammatory phase of pain. The dose of 100 mg/kg also reduced the neurogenic phase and this effect was reversed by naloxone (suggesting the involvement of the opioidergic system). The results evidenced that the bark of the *M. floribunda* fruit presents promising potential as antioxidant, anti-inflammatory and analgesic. The studies should be continued in order to isolate and identify active compounds, as well as to elucidate the mechanisms of action of the activities analyzed.

Keywords: Medicinal plants. Oxidative stress. Inflammation. Nociception.



## LISTA DE FIGURAS

### Referencial teórico

|            |                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – | Limites da Caatinga .....                                                                                                                                                                                                             | 23 |
| Figura 2 – | Árvore de <i>Myrciaria floribunda</i> .....                                                                                                                                                                                           | 28 |
| Figura 3 – | Frutos e ramos de de <i>Myrciaria floribunda</i> . a. frutos maduros, b. ramos com frutos .....                                                                                                                                       | 28 |
| Figura 4 – | Esquema geral das vias de biossíntese do metabolismo vegetal secundário (retângulos rosas) e suas conexões com o metabolismo primário (retângulos vermelhos), os metabólitos primários (verde) e metabólitos secundários (azul) ..... | 31 |
| Figura 5 – | Estrutura química da molécula antocianina e a combinação dos radicais para cada molécula de antocianina diferente ..                                                                                                                  | 33 |
| Figura 6 – | Mecanismo da dor inflamatória .....                                                                                                                                                                                                   | 40 |

### Artigo

|            |                                                                                                                                                                         |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – | Chromatographic profile of the phenolic acids from acetone extract (MfAE) of the fruit peel at 270 nm .....                                                             | 76 |
| Figura 2 – | Effect of the acetone extract of the fruit bark of <i>Myrciaria floribunda</i> (MfAE, 50 and 100 mg / kg, p.o) on carrageenan-induced paw edema .....                   | 77 |
| Figura 3 – | Effect of the acetone extract of the fruit bark of <i>Myrciaria floribunda</i> (MfAE, 50 and 100 mg / kg, p.o) on the abdominal contortion induced by acetic acid ..... | 78 |
| Figura 4 – | Effect of the acetone extract of the fruit bark of <i>Myrciaria floribunda</i> (MfAE, 50 and 100 mg / kg, p.o) on the formalin test .....                               | 79 |

## LISTA DE TABELAS

### Referencial teórico

|            |                                                                                                   |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – | Atividades farmacológicas de espécies da família Myrtaceae testadas experimentalmente .....       | 26 |
| Tabela 2 – | Atividades farmacológicas de espécies do gênero <i>Myrciaria</i> testadas experimentalmente ..... | 26 |

### Artigo

|            |                                                                                                                                                           |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – | Phytochemical analysis of extracts from fruit barks of <i>Myrciaria floribunda</i> .....                                                                  | 73 |
| Tabela 2 – | Concentration of total phenols, total flavonoids and monomeric anthocyanins in different extracts obtained from fruit barks of <i>M. floribunda</i> ..... | 74 |
| Tabela 3 – | Antioxidant activity of the fruit barks extracts of <i>Myrciaria floribunda</i> .....                                                                     | 75 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                    |                                                               |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| A                                  | Absorbância                                                   |
| Aabs                               | Absorbância da amostra                                        |
| AAabbs                             | Absorbance of ascorbic acid                                   |
| ABTS                               | Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)       |
| Ad libitum                         | À vontade                                                     |
| AINES                              | Anti-inflamatórios não esteroides                             |
| AlCl <sub>3</sub>                  | Cloreto de alumínio                                           |
| ANOVA                              | Analysis of variance                                          |
| Babs                               | Absorbance of white                                           |
| CAPES                              | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior   |
| CAT                                | Catalase                                                      |
| CAT                                | Capacidade antioxidante total                                 |
| COX                                | Ciclooxygenase                                                |
| CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na | Acetato de sódio                                              |
| CLAE                               | Cromatografia líquida de alta eficiência                      |
| CNPq                               | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| Cy-3-glc E                         | Cyanidin-3-glucoside equivalent                               |
| C10                                | Monoterpenos                                                  |
| C15                                | Sesquiterpenos                                                |
| C20                                | Diterpenos                                                    |
| C30                                | Triterpenos                                                   |
| C40                                | Tetraterpenos                                                 |
| DAD                                | Photodiode array detector                                     |
| DAD                                | Detector de arranjo fotodiodo                                 |
| DF                                 | Dilution factor                                               |
| DMAPP                              | Dimetilalil difosfato                                         |
| DMSO                               | Dimetilsulfóxido                                              |
| DNA                                | Deoxyribonucleic acid                                         |
| DPPH                               | 2,2- Difenil-1-picril-hidrazil                                |
| Dr.                                | Doutor                                                        |
| Dr <sup>a</sup> .                  | Doutora                                                       |
| D <sub>0</sub>                     | Maior dose que não induziu a mortalidade                      |

|                               |                                                                   |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| D <sub>100</sub>              | Menor dose que produziu mortalidade de camundongos                |
| EAG                           | Equivalente de ácido gálico                                       |
| ERO                           | Espécies reativas de oxigênio                                     |
| ERN                           | Espécies reativas de nitrogênio                                   |
| EQ                            | Equivalente a quercitina                                          |
| ET                            | Equivalente de trolox                                             |
| et al.                        | e outro                                                           |
| EUA                           | Estados Unidos da América                                         |
| FACEPE                        | Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco |
| FD                            | Fator de diluição                                                 |
| GAE                           | Gallic Acid Equivalent                                            |
| GPx                           | Glutathione peroxidase                                            |
| H <sup>+</sup>                | Íon hidrogênio                                                    |
| HO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | Hidroperoxila                                                     |
| HPLC                          | High performance liquid chromatography                            |
| HT29                          | Linhagem celular de adenocarcinoma de câncer de cólon humano      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                                            |
| IASP                          | International Association for the Study of Pain                   |
| IC <sub>50</sub>              | Concentração que inibe 50%                                        |
| IL                            | Interleucina                                                      |
| i.p                           | Intra-peritoneal                                                  |
| IPA                           | Instituto Agrônomo de Pernambuco                                  |
| IPP                           | Isopentenil difosfato                                             |
| KCL                           | Cloreto de potássio                                               |
| LD <sub>50</sub>              | Lethal Dose 50%                                                   |
| LIKA                          | Laboratório de imunopatologia Keizo Asami                         |
| LT                            | Leucotrieno                                                       |
| MEP                           | Via do metileritritol fosfato                                     |
| MEV                           | Via do ácido mevalônico                                           |
| MfAE                          | <i>Myrciaria floribunda</i> acetone extract                       |
| MfAqE                         | <i>Myrciaria floribunda</i> aqueous extract                       |
| MfCE                          | <i>Myrciaria floribunda</i> chloroform extract                    |

|                              |                                                         |
|------------------------------|---------------------------------------------------------|
| MFC7                         | Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano       |
| MfEeE                        | <i>Myrciaria floribunda</i> ethyl ether extract         |
| MfME                         | <i>Myrciaria floribunda</i> methanol extract            |
| MW                           | Molecular Weight                                        |
| NBT                          | Nitroblue tetrazolium                                   |
| NCI-H460                     | Linhagem celular de câncer de pulmão                    |
| ND                           | Not detected                                            |
| NMDA                         | N-methyl-D-aspartato                                    |
| NGF                          | Nerve growth factor                                     |
| No.                          | Número                                                  |
| NO <sup>•</sup>              | Óxido nítrico                                           |
| NO <sub>2</sub>              | Dióxido de nitrogênio                                   |
| NO <sub>3</sub>              | Nitrato                                                 |
| NT                           | Not tested                                              |
| OCDE                         | Organization for Economic Cooperation and Development   |
| OH <sup>•</sup>              | Hidróxila                                               |
| OMS                          | Organização Mundial de Saúde                            |
| OVCAR-03                     | Linhagem celular de câncer de ovário                    |
| O <sub>2</sub> <sup>•</sup>  | Superóxido                                              |
| PC-3                         | Linhagem celular de câncer de próstata                  |
| PE                           | Pernambuco                                              |
| PG                           | Prostaglandina                                          |
| PGI <sub>2</sub>             | Prostaciclina                                           |
| pH                           | Potencial Hidrogeniônico                                |
| PM                           | Peso molecular                                          |
| PNPMF                        | Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos |
| Prof <sup>a</sup> .          | Professora                                              |
| Prof <sup>o</sup> .          | Professor                                               |
| p/v                          | Peso/volume                                             |
| PVDF                         | Polyvinylidene difluoride                               |
| QE                           | Quercetin equivalent                                    |
| RO <sup>•</sup>              | Alcoxila                                                |
| RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> | Peroxila                                                |

|         |                                        |
|---------|----------------------------------------|
| Sabs    | Absorbance of the sample (extracts)    |
| SOD     | Superóxido dismutase                   |
| SUS     | Sistema Único de Saúde                 |
| TAC     | Total antioxidant capacity             |
| TEAC    | Trolox equivalent antioxidant capacity |
| TGF     | Transforming growth factor             |
| TNF     | Fator de Necrose Tumoral               |
| Tr      | Traces                                 |
| UACC-62 | Linhagem celular de câncer de melanoma |
| UFPE    | Universidade Federal de Pernambuco     |
| UV      | Ultravioleta                           |
| U251    | Linhagem celular de glioma             |
| v.o     | Via oral                               |
| v/v     | Volume/volume                          |
| w/v     | Weight/volume                          |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|               |                               |
|---------------|-------------------------------|
| $\alpha$      | Alfa                          |
| $\beta$       | Beta                          |
| $\delta$      | Delta                         |
| $\varepsilon$ | Coeficiente de extinção molar |
| ®             | Marca registrada              |
| %             | Porcentagem                   |
| -             | Absent                        |
| +             | Weak                          |
| ++            | Strong                        |

## SUMÁRIO

|               |                                                                       |           |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>      | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                               | <b>17</b> |
| 1.1           | OBJETIVOS .....                                                       | 20        |
| 1.1.1         | <b>Objetivo Geral .....</b>                                           | <b>20</b> |
| 1.1.2         | <b>Objetivos Específicos .....</b>                                    | <b>20</b> |
| <b>2</b>      | <b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                      | <b>21</b> |
| 2.1           | PLANTAS MEDICINAIS .....                                              | 21        |
| 2.2           | O DOMÍNIO CAATINGA .....                                              | 23        |
| 2.3           | Myrtaceae Juss .....                                                  | 25        |
| 2.4           | Myrciaria O. Berg .....                                               | 26        |
| 2.5           | Myrciaria floribunda (H. West ex Willd) O. Berg .....                 | 27        |
| 2.6           | METABOLISMO VEGETAL: PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO .....                      | 30        |
| 2.7           | RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES .....                                 | 33        |
| 2.8           | INFLAMAÇÃO .....                                                      | 35        |
| 2.9           | DOR E NOCICEPÇÃO .....                                                | 38        |
| <b>3</b>      | <b>MÉTODO .....</b>                                                   | <b>43</b> |
| 3.1           | MATERIAL VEGETAL .....                                                | 43        |
| 3.2           | EXTRATOS VEGETAIS .....                                               | 43        |
| 3.3           | ANÁLISE FITOQUÍMICA .....                                             | 43        |
| 3.4           | CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E<br>ANTOCIANINAS ..... | 44        |
| 3.5           | ENSAIOS ANTIOXIDANTES .....                                           | 45        |
| <b>3.6.1</b>  | <b>Ensaio de DPPH (sequestro de radicais livres) .....</b>            | <b>45</b> |
| <b>3.6.2</b>  | <b>Ensaio ABTS .....</b>                                              | <b>45</b> |
| <b>3.6.3</b>  | <b>Capacidade Antioxidante Total .....</b>                            | <b>46</b> |
| <b>3.6.4</b>  | <b>Determinação do sequestro do radical superóxido .....</b>          | <b>46</b> |
| 3.6           | ANÁLISE POR CLAE .....                                                | 46        |
| 3.7           | ASPECTOS ÉTICOS .....                                                 | 47        |
| 3.8           | ANIMAIS .....                                                         | 47        |
| 3.9           | ESTUDO DE TOXIDADE AGUDA .....                                        | 48        |
| 3.10          | ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO .....                                        | 48        |
| 3.11          | ENSAIOS ANTINOCICEPTIVOS .....                                        | 48        |
| <b>3.11.1</b> | <b>Dor abdominal induzida por ácido acético .....</b>                 | <b>48</b> |



|        |                                                                                                                                                                                   |           |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.11.2 | Ensaio de formalina .....                                                                                                                                                         | 49        |
| 3.12   | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                                                                                                                         | 49        |
| 4      | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                                                                                                           | <b>50</b> |
| 4.1    | ARTIGO MYRCIARIA FLORIBUNDA FRUIT PEEL HAS ANTIOXIDANT<br>ACTION AND IN VIVO ANTI-INFLAMMATORY AND<br>ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES: POSSIBLE INVOLVEMENT OF<br>OPIOIDERGIC SYSTEM . | 50        |
| 5      | <b>CONCLUSÃO</b> .....                                                                                                                                                            | <b>80</b> |
|        | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                                                                                                          | <b>82</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade é considerada uma fonte inesgotável de produtos e moléculas com propriedades benéficas para a humanidade. Os produtos naturais estão presentes em alimentos, cosméticos e medicamentos. O Brasil é um país megadiverso, que possui entre 10 a 20% das espécies vivas do mundo. Porém, a maior parte dessa biodiversidade ainda não foi explorada. Dentre as diferentes fontes de compostos, como os microrganismos (8%), biotransformação (2%), semissíntese (15%), marinho (<1%), as plantas ainda são as principais fontes de produtos naturais estudadas (78%) (PILON et al., 2017).

A população brasileira utiliza as plantas medicinais tradicionalmente para tratar diferentes doenças. No mundo há um aumento do interesse em produtos medicinais derivados de plantas. Os compostos derivados de plantas além de serem empregados na terapia, são importantes para a síntese de moléculas mais complexas. Dentre os medicamentos terapêuticos disponíveis cerca de 30% são derivados de fontes naturais, principalmente de plantas (DUTRA et al., 2016; PILON et al., 2017).

As plantas medicinais podem ser utilizadas no tratamento e na prevenção de várias doenças, como o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e no tratamento da dor (BAHARVAND-AHMADI et al., 2015; GREENWELL; RAHMAN, 2015; MAIONE et al., 2016; SHAYGANNI et al., 2016; VERMA et al., 2017). O uso dessas plantas também é importante para a manutenção e recuperação da saúde (ALCANTARA; JOAQUIM; SAMPAIO, 2015).

A inflamação é uma resposta biológica complexa a diferentes estímulos, como trauma, isquemia, infecções, doenças autoimunes ou injúrias tóxicas, que causam danos ao tecido. Ela apresenta alguns sinais: vermelhidão, calor, dor e edema. Os eventos celulares e químicos envolvidos na resposta inflamatória são desencadeados em resposta à injúria inflamatória e ocorre a liberação de mediadores, citocinas e quimiocinas e o recrutamento de células imunes para o local afetado, tendo como finalidade restaurar a integridade do tecido. No entanto, em determinadas condições, pode haver a presença do estímulo inflamatório de forma persistente ou uma desregulação da fase de resolução (MACK, 2018; MAIONE et al., 2016).

As células imunológicas além de liberarem citocinas, também liberam radicais livres. E quando há um desequilíbrio entre a formação e a eliminação das espécies reativas, há o estresse oxidativo. Durante esse processo também ocorre a expressão de genes envolvidos nas vias inflamatórias. E a inflamação e o estresse oxidativo desempenham um papel patogênico em diversas doenças, como no diabetes e doenças cardiovasculares (DANDEKAR; MENDEZ; ZHANG, 2015; HUSSAIN et al., 2016).

A dor aguda é um dos sinais da inflamação e é protetora, tem a função de evitar o potencial dano e proteger o tecido ferido. A dor crônica é debilitante e desagradável e não tem função biológica benéfica. A dor crônica é uma das principais preocupações de saúde global e afeta cerca de 30% dos adultos. A resposta inflamatória está relacionada com a dor, pois as células envolvidas nessa resposta liberam mediadores inflamatórios, como quimiocinas, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, que ativam diretamente os nociceptores induzindo a dor (BASBAUM et al., 2009; BLISS et al., 2016; DUTRA et al., 2016; JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016; MATSUDA; HUH; JI, 2018).

Os AINEs (Anti-inflamatórios não esteroidais) e corticosteroides são os medicamentos anti-inflamatórios mais utilizados atualmente nos distúrbios inflamatórios. Os AINEs também possuem efeito analgésico e junto com os opioides são os medicamentos antinociceptivos mais empregados. No entanto todos esses medicamentos apresentam efeitos colaterais indesejáveis (PHILLIPS; CURRIER, 2004; SHAYGANI et al., 2016) Sendo assim o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios e analgésicos seguros e com efeitos colaterais reduzidos é necessário.

As plantas medicinais apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva, sendo fontes promissoras de novas drogas analgésicas e anti-inflamatórias ou como terapia complementar apresentando menos efeitos colaterais e com mais eficácia. Essas plantas apresentam uma característica importante que é a diversidade estrutural ampla e única, que garante uma gama de efeitos farmacológicos diferentes, por diferentes mecanismos de ação (DUTRA et al., 2016; SHAYGANI et al., 2016).

*Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd) O. Berg pertence à família Myrtaceae, conhecida popularmente como cambuí (ANDRADE et al., 2016). No Brasil encontra-se distribuída em todas as regiões. Na região Nordeste está presente na Bahia, em Sergipe e em Pernambuco (SOBRAL et al., 2015). Os seus frutos são usados

popularmente como recurso alimentício, consumidos *in natura* e usados no preparo de licores e sucos (ANDRADE et al., 2016; MAGRO et al., 2013; MITRA, 2010).

Há alguns estudos com o fruto e folhas de *M. floribunda*. Em um estudo foi determinado que o fruto apresenta ácido ascórbico, carotenoides, flavonoides e fenóis e que possui atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2018). Óleos essenciais obtidos das folhas de *M. floribunda* apresentaram atividades antimicrobiana, antitumoral, inseticida e de inibição da enzima acetilcolinesterase (APEL et al., 2006; TIETBOHL et al., 2012, 2014). O extrato acetato de etila das folhas dessa espécie apresentou atividades antioxidante e antiproliferativa (TIETBOHL et al., 2017). E o extrato metanólico das folhas demonstrou atividades antioxidante e antibacteriana (AZEVEDO et al., 2016).

Diante da diversidade de atividades relatadas para essa espécie é importante a continuidade de pesquisas, para que esse recurso vegetal seja avaliado quanto à sua importância farmacológica. Deve-se ressaltar que não há estudos na literatura com a casca do fruto cambuí. Assim, no presente trabalho, foram obtidos extratos da casca do fruto, coletado em região de Caatinga, Exú (PE) e a composição fitoquímica, as atividades antioxidantes, anti-inflamatória e antinociceptiva e a toxicidade aguda foram avaliadas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a composição fitoquímica e a atividade antioxidante de extratos obtidos da casca do fruto de *Myrciaria floribunda* e avaliar a toxicidade aguda e atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato acetônico.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar os compostos bioativos dos extratos éter etílico (MfEeE), clorofórmico (MfCE), acetônico (MfAE), metanólico (MfME) e aquoso (MfAqE) da casca do fruto de *Myrciaria floribunda*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato acetônico (MfAE);
- Investigar a atividade anti-inflamatória do extrato acetônico (MfAE) através do modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- Verificar o efeito antinociceptivo do extrato acetônico (MfAE) por meio do teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e teste da formalina.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais do Brasil eram utilizadas para o tratamento de patologias pelos povos nativos, os índios e seus Pajés antes da colonização. Durante a colonização o seu uso continuava restrito a matriz indígena, já que a população em geral utilizava os medicamentos que eram importados, principalmente da Europa. O reconhecimento mundial do uso dessas plantas brasileiras com fins terapêutico demorou anos (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). Hoje a grande riqueza de conhecimento dessas plantas no Brasil é resultado do saber indígena, africano e europeu, matrizes étnicas formadoras da população brasileira (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população mundial faz uso de alguma planta medicinal para aliviar sintomas (ZENI et al., 2017). Tanto o uso da medicina tradicional como das plantas medicinais ainda faz parte da cultura, da história e das crenças de um país e essas práticas devem ser analisadas e fazer parte do sistema de saúde do país (WHO, 2002).

No ano de 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) foi criada no Brasil, como resultado de uma luta que se iniciou antes do surgimento do Sistema Único de Saúde (SUS) e a sua implementação faz parte do resgate de uma prática milenar, na qual se interligam o conhecimento popular e o científico (DE FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

No Brasil a terapêutica ainda é centrada no uso de medicamentos sintéticos, tanto no SUS quanto na medicina suplementar, que além de ter altos custos, apresentam efeitos adversos e nem sempre apresentam resultados satisfatórios (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). O preço final elevado desses medicamentos industrializados é um reflexo do alto custo de seus insumos (DE FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Algumas das vantagens de explorar a utilização das plantas medicinais no sistema de saúde são: os custos financeiros são menores, têm menores potenciais de gerar efeitos adversos, são de fácil acesso, contribuem para o resgate do saber

popular e podem ser fonte de emprego e de renda (DE FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Devido à importância do uso das plantas medicinais, há uma crença popular de que por serem naturais, as plantas não trazem malefícios. É necessário validar o saber do uso dessas plantas, ampliar a oferta nos serviços de saúde e minimizar seu uso indevido e abusivo (ALCANTARA; JOAQUIM; SAMPAIO, 2015). A utilização dessas plantas deve ser criteriosa e o seu papel pode ser complementar ao uso do medicamento sintético (DE FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Os avanços na pesquisa científica de plantas medicinais permitem o desenvolvimento de fitoterápicos seguros e eficazes. Contudo, ainda não há estudos suficientes que comprovem a eficácia e segurança da maior parte das plantas medicinais existentes (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

A diretriz nº 5 da PNPMF recomenda: “Fomentar pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população” (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016, p.25). Apesar dessa recomendação o pouco investimento em estudos de plantas medicinais brasileiras configura um dos obstáculos para a consolidação de ações e programas de fitoterapia nos serviços de saúde (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014).

As plantas medicinais podem ser utilizadas em diversas formas: fresca (in natura), seca (droga vegetal) ou como fitoterápico manipulado. A fresca (in natura) é coletada no momento do uso. A seca (droga vegetal) é a planta medicinal ou partes dela que contenham classes de compostos que são responsáveis pela ação terapêutica e que passou pelos processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser utilizada de forma íntegra, rasurada ou triturada. Os fitoterápicos podem ser manipulados em farmácias públicas ou particulares, na qual a matéria-prima vegetal é manipulada de acordo com as boas práticas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

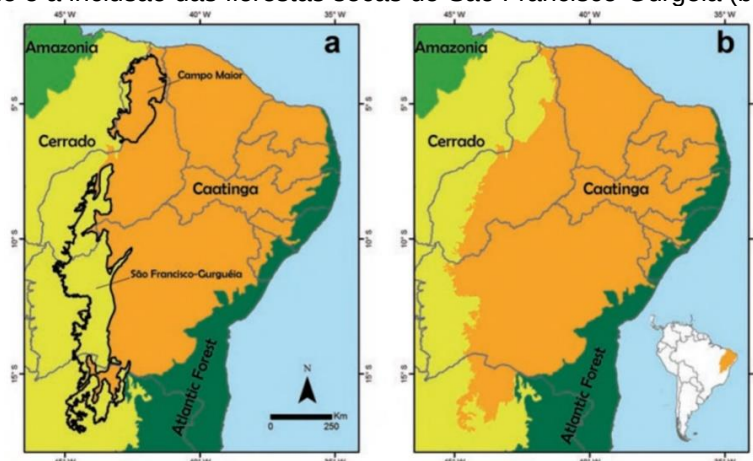
O uso das plantas medicinais é uma das alternativas para atender as necessidades de saúde coletiva e individual e é uma forma de enriquecer as práticas de saúde que visam a prevenção de doenças, a manutenção e a recuperação da saúde (ALCANTARA; JOAQUIM; SAMPAIO, 2015). Além disso a inserção dessas plantas na atenção primária à saúde, por exemplo, é importante para a promoção da saúde e o cuidado autônomo (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014).

## 2.2 DOMÍNIO CAATINGA

O Brasil apresenta a maior diversidade biológica do mundo, com um número de espécies catalogadas superior a 350 mil, que são encontradas nos seus diferentes biomas: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa (SOUSA et al., 2017). O território brasileiro possui uma flora estimada de 50.000 a 60.000 espécies (TRZECIAK et al., 2008).

O domínio fitogeográfico da Caatinga apresenta uma área de aproximadamente 912.000 km<sup>2</sup> e uma precipitação máxima de 1.000 mm de chuva anualmente. Esse bioma é muito heterogêneo em relação a vegetação, clima, solo e relevo. Caatinga é o nome da vegetação que predomina nesse bioma, o qual ocupa todos os estados do Nordeste e também o norte de Minas Gerais (Figura 1) (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

Figura 1 - Limites da Caatinga. Comparação dos limites proposto pelo IBGE (a) com o proposto por Silva; Leal; Tabarelli (2018) com a exclusão de Campo Maior por sua similaridade florística com o Cerrado e a inclusão das florestas secas do São Francisco-Gurguéia (b).



Fonte: SILVA; LEAL; TABARELLI (2018).

O significado desse nome é “floresta branca”, pois a maioria das árvores e arbustos são decíduas e perdem as folhas durante a estação seca e os troncos e galhos apresentam cor branco-acinzentada (FERNANDES; QUEIROZ, 2018; TABARELLI et al., 2018). As plantas desse bioma possuem adaptações para sobreviver durante as secas recorrentes e precipitações irregulares (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).



A Caatinga é a única região ecológica restrita do Brasil, não sendo encontrada em nenhuma parte do mundo além desse país. Apresenta extensas superfícies planas, composta por florestas secas e vegetação decídua, mas também existem planaltos que estão intercalados entre essas superfícies, nos quais a vegetação é bastante diferente, possuindo campos rupestres, cerrados e florestas úmidas. O clima que predomina é o semiárido, a temperatura média é elevada (25° e 30°C) e com baixa precipitação (400-1200mm anuais). Já nos planaltos as temperaturas médias podem ser mais baixas e a precipitação anual pode chegar a 1800 mm (TABARELLI et al., 2018).

Esse bioma é denso em biodiversidade, por isso possui o título das florestas secas mais ricas do mundo, apresentando atualmente 3150 espécies de plantas vasculares, 276 formigas, 386 peixes, 98 anfíbios, 191 répteis, 548 aves e 183 mamíferos (SILVA; LEAL; TABARELLI, 2018). E possui espécies endêmicas, as quais não são encontradas em nenhuma outra região do planeta (TABARELLI et al., 2018).

No domínio Caatinga a flora é amplamente utilizada pelas comunidades locais na medicina popular para o tratamento de diferentes enfermidades, as quais possuem uma vasta farmacopeia natural. Dentre as espécies medicinais encontradas em regiões desse bioma, observa-se que algumas são mais utilizadas que as demais, como *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira), *Genipa americana* L. (Jenipapo), *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba), *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (Angico), *Amburana cearenses* (Allemão) A.C. Smith (Imburana de cheiro), *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá) e *Ximenia americana* L. (Ameixa) (CORDEIRO; FÉLIX, 2014; JÚNIOR et al., 2014; SARAIVA et al., 2015).

Estudos etnobotânicos realizados em áreas do bioma Caatinga reportam que dentre as diversas partes das plantas medicinais utilizadas pela população local o uso da casca do caule é o que predomina, provavelmente devido a maior disponibilidade dos metabólitos nessa parte ou devido à ausência de folhas na maior parte do ano, por causa do clima seco com temperatura média elevada e baixa precipitações (JÚNIOR et al., 2014; ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010). Um trabalho realizado no município Exu, no estado de Pernambuco, demonstrou que dentre as espécies de plantas utilizadas como recurso terapêutico, a casca do caule também foi a parte mais comumente utilizada, seguida da raiz e folhas e as partes utilizadas

com menor incidência foram flores, sementes, frutos e resina (SARAIVA et al., 2015).

As plantas encontradas na maior parte do semiárido, no domínio Caatinga, são utilizadas para diversas finalidades além do uso medicinal, como lenha, forragem, alimento e madeira para construções. É preciso haver um manejo sustentável para garantir a perpetuação das espécies desse rico bioma, o ensino a comunidade local sobre como preservar a flora nativa e estimular o desenvolvimento econômico através do uso adequado dos recursos naturais dessa região (CORDEIRO; FÉLIX, 2014).

### 2.3 Myrtaceae Juss.

A família Myrtaceae é da classe das Angiospermas, suas espécies são encontradas em diferentes formas de vida como arbusto, árvore, erva, trepadeira e subarbusto (SOBRAL et al., 2015). Encontra-se localizada nos trópicos úmido, principalmente na América do Sul, Austrália e Ásia Tropical (GOVAERTS et al., 2008). Essa família tem ocorrência confirmada em todas as regiões do Brasil e está presente em todos os domínios fitogeográficos como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (SOBRAL et al., 2015).

No mundo essa família é constituída por 145 gêneros e 5970 espécies (THE PLANT LIST, 2013). Já no Brasil, dentro dessa família existem 23 gêneros, dos quais 4 são endêmicos, são encontradas 1031 espécies e dessas 793 são endêmicas e há 1 variedade. Na região Nordeste existem 357 espécies, no domínio Caatinga há 99 espécies e no estado de Pernambuco 62 espécies (SOBRAL et al., 2015).

A família Myrtaceae apresenta muitas espécies que são relatadas na medicina popular sendo utilizadas para diversas propriedades terapêuticas tais como: edema, dor de estômago, dislipidemia, diabetes, hipertensão, osteoporose, cicatrização de feridas, má digestão, úlceras, diarreia e má digestão (SOUZA et al., 2014). Além disso há muitos estudos científicos sobre as atividades biológicas das diferentes espécies dessa família (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividades farmacológicas de espécies da família Myrtaceae testadas experimentalmente

| Nome científico                 | Nome popular | Parte utilizada | Avaliações científicas                                               |
|---------------------------------|--------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------|
| <i>Syzygium cumini</i>          | Jambolão     | Casca           | Atividade antimicrobiana (CARTAXO-FURTADO et al., 2015).             |
| <i>Calypttranthes restingae</i> | Murta        | Folhas          | Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (PASSOS et al., 2016). |
| <i>Myrcianthes pungens</i>      | Guabijú      | Polpa do fruto  | Atividade anti-colinesterásica (SILVEIRA et al., 2011).              |
| <i>Eugenia dysenterica</i>      | Cagaita      | Folhas          | Atividade gastroprotetora (PRADO et al., 2014)                       |
| <i>Psidium guajava</i>          | Goiaba       | Fruto           | Atividade antioxidante (FLORES et al., 2015)                         |
| <i>Myrtus communis</i>          | Murta-comum  | Folhas          | Atividade antidiarreica (SISAY; ENGIDAWORK; SHIBESHI, 2017).         |

Fonte: Izabelly Bianca da Silva Santos (2019).

## 2.1 *Myrciaria* O. Berg

O gênero *Myrciaria* pertence à família Myrtaceae e é nativo do Brasil, no qual é possível encontrar 22 espécies, das quais 15 são endêmicas, distribuídas dentre as regiões brasileiras. Também está presente na maior parte dos domínios, com exceção do Pantanal. Na região Nordeste há 10 espécies com nomes aceitos, no domínio Caatinga há 5 espécies e em Pernambuco há 2 espécies. As suas formas de vida são como arbusto, árvore e subarbusto e o seu substrato é o terrícola (SOBRAL et al., 2015).

As espécies do gênero *Myrciaria* apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, diminuição de colesterol total e triglicerídeos, antiproliferativa, antimutagênica e antinociceptiva conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividades farmacológicas de espécies do gênero *Myrciaria* testadas experimentalmente

| Nome científico             | Nome popular    | Parte utilizada | Avaliações científicas                      |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------------|
| <i>Myrciaria cauliflora</i> | Jabuticaba assú | Folhas e caule  | Atividade antifúngica (DINIZ et al., 2010). |

|                                    |                                     |                        |                                                                                                                                              |
|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                    |                                     | Casca do fruto         | Atividade antioxidante (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010).                                                                                      |
| <b><i>Myrciaria jaboticaba</i></b> | Jaboticaba sabará                   | Fruto                  | Diminuição do colesterol total e triglicerídeos em ratos diabéticos e aumento da capacidade antioxidante do plasma (ALEZANDRO et al., 2013). |
|                                    |                                     | Casca do fruto         | Atividades antioxidante, antiproliferativa e antimutagênica (LEITE-LEGATTI et al., 2012).                                                    |
| <b><i>Myrciaria tenella</i></b>    | Cambuí, camboim ou jaboticaba-macia | Folhas                 | Atividade anti-inflamatória (APEL et al., 2010).                                                                                             |
| <b><i>Myrciaria cuspidata</i></b>  | Cambuí-amarelo ou camboim           | Talos, folhas e flores | Atividade antibacteriana (WIEST et al., 2009).                                                                                               |
| <b><i>Myrciaria glomerata</i></b>  | Cabeludinha                         | Folhas e galhos        | Atividades antifúngica e antibacteriana (SERAFIN et al., 2007).                                                                              |
|                                    |                                     | Folhas                 | Atividade antinociceptiva (FISCHER et al., 2008).                                                                                            |
| <b><i>Myrciaria dúbia</i></b>      | Camu-camu                           | Fruto                  | Atividades antioxidante e anti-inflamatória (INOUE et al., 2008).                                                                            |

Fonte: Izabelly Bianca da Silva Santos (2019).

#### 2.4 *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd) O. Berg

*Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd) O. Berg é uma árvore nativa da América Central e do Sul. No Brasil, ela encontra-se distribuída em todas as regiões e nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Na região Nordeste ela está presente nos estados Alagoas, Bahia e Pernambuco. Essa árvore cresce bem nos climas secos e úmidos (MITRA, 2010; SOBRAL et al., 2015). Essa espécie é popularmente conhecida como cambuí (ANDRADE et al., 2016).

Em relação às suas características morfológicas, o cambuizeiro é uma árvore com altura entre 2 e 5 m (Figura 2). O tronco contém uma casca que se desprende em placas rígidas. As folhas com pecíolo de 1,0-6,4mm, com lâmina de 1,6-6,2cm x

0,7-2,1cm, elíptica, a base é cuneada ou arredondada, com ápice longo acuminado. As flores sésseis, reunidas em glomérulos, axilares. Os frutos são vermelho-escuro a roxo quando maduros, globosos, apresentam 8 mm de diâmetro e contêm 1 semente de 7 mm de diâmetro, conforme apresenta a Figura 3 (LOURENÇO; BARBOSA, 2012; MITRA, 2010; MORAIS; LOMBARDI, 2006; TRINDADE; ROSÁRIO; SANTOS, 2018).

Figura 2 – Árvore de *Myrciaria floribunda*



Fonte: Izabelly Bianca da Silva Santos (2019).

Figura 3 – Frutos e ramos de de *Myrciaria floribunda*. a. frutos maduros, b. ramos com frutos.



Fonte: Izabelly Bianca da Silva Santos (2019).

O fruto cambuí de *M. floribunda* apresenta baixo teor de lipídeos (2,43 g·100 g<sup>-1</sup>material seco) e de proteínas (4,78 g·100 g<sup>-1</sup>material seco). A análise de açúcares

livres revelou a presença de glicose, frutose e sacarose. O fruto *in natura* apresentou ácido ascórbico ( $46,88 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). Dentre os carotenoides presentes nesse fruto a  $\beta$ -criptoxantina foi a principal, 75% do total encontrado. O flavonoide rutina (quercetina-3-O-ramnosídeo) foi encontrado em altas concentrações ( $78,56 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). O ácido gálico e o ácido elágico estavam presentes após as hidrólises ácida e básica dos frutos. E o fruto liofilizado apresentou capacidade antioxidante por meio de dois testes, o ensaio DPPH ( $\text{IC}_{50}$  de  $85,68 \text{ g} \cdot \text{g DPPH}^{-1}$ ) e o método ABTS ( $550,14 \text{ } \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (OLIVEIRA et al., 2018).

Os frutos de *M. floribunda* são usados como recurso alimentar, frequentemente consumidos *in natura*. Eles apresentam um excelente sabor ácido e são utilizados no preparo de bebidas alcoólicas, para dar sabor, como nos licores. Também são usados para preparar sucos (ANDRADE et al., 2016; MAGRO et al., 2013; MITRA, 2010).

Estudos fitoquímicos foram realizados para caracterizar os constituintes dos óleos essenciais e dos extratos de *M. floribunda*. Tietbohl et al., (2012) identificaram compostos voláteis das folhas, flores e pecíolo dessa espécie: a maior fração nas folhas e flores foi de monoterpenos, o constituinte majoritário foi o 1,8-cineol (38,4% e 22,8% respectivamente). No óleo do pecíolo os sesquiterpenos estavam em maior quantidade e as principais substâncias identificadas foram o (2E,6E) -acetato de farnesil (19,9%) e o (2E,6Z) - farnesil (13,1%).

Em um estudo foi demonstrada a presença de compostos fenólicos, flavonoides e tanino no extrato em acetato de etila obtido das folhas de *M. floribunda* (TIETBOHL et al., 2017). Outro estudo investigou a composição química do extrato metanólico das folhas dessa espécie e foram identificados os triterpenóides nor-lupano, ácido platânico, ácido messagenico, aldeído betulínico, ácido acetil ursólico, ácido betulínico, um novo triterpenóide lupano ( $2\alpha,6\alpha,30$ -ácido tri-hidroxi-betulínico) e os flavonoides catequina, quercitrina e mirecitrina (AZEVEDO et al., 2017).

Os óleos essenciais das folhas de *M. floribunda* apresentam diversas atividades farmacológicas, como antimicrobiana, antitumoral, inseticida e inibição da enzima acetilcolinesterase (APEL et al., 2006; TIETBOHL et al., 2012, 2014).

Segundo Tietbohl et al., (2017), o extrato em acetato de etila obtido das folhas de *M. floribunda* apresenta atividade antiproliferativa frente a diferentes células de

linhagem tumoral, sendo a linhagem MCF-7 (câncer de mama) a mais susceptível. O extrato mostrou efeito citostático contra as linhagens U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário) e HT29 (cólon). Esse extrato também demonstrou capacidade antioxidante por meio do ensaio DPPH (IC<sub>50</sub> de 45,89 µg/mL).

O extrato metanólico da folha de *M. floribunda* e o composto isolado 2α,6α,30-ácido tri-hidroxi-betulínico apresentaram atividade antioxidante por meio do teste DPPH (IC<sub>50</sub> 6,8 e 12,9 µg/mL respectivamente) e atividade antibacteriana frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (AZEVEDO et al., 2016).

## 2.4 METABOLISMO VEGETAL: PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

O metabolismo nos vegetais se divide em primário e secundário. O primário é indispensável para a planta, pois ela depende dos seus produtos para o crescimento e desenvolvimento. Além disso é considerado universal, pois está presente em todas as plantas, é conservado e regular (HARTMANN, 2007). As rotas metabólicas do primário são responsáveis pela síntese de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (AMORIM et al., 2016). Esses produtos desempenham funções que são essenciais para o vegetal como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos (PERES, 2004).

O metabolismo secundário é fundamental para a sobrevivência das plantas no meio ambiente, mas é dispensável para o seu crescimento e desenvolvimento. É um metabolismo diverso e adaptável, dependendo das condições da planta e do ambiente no qual está inserida (HARTMANN, 2007). Os metabólitos secundários, diferente dos primários, não estão envolvidos na geração de energia. Os produtos secundários não são expressos da mesma forma em todos os vegetais, eles diferem nas famílias, gêneros e espécies. Isso é resultado da elevada plasticidade genética e diversidade de cada planta (AMORIM et al., 2016).

As funções desempenhadas pelos metabólitos secundários são diversas: atração de polinizadores, defesa frente a herbívoros, proteção contra a radiação ultravioleta (UV), proteção frente a poluição, estresse hídrico, sinalização intraespecífica, alelopatia e outras (AMORIM et al., 2016). Os produtos secundários





lipossolúveis, apresentam ação fotoprotetora, antioxidante e também atraem os polinizadores (AMORIM et al., 2016; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os compostos nitrogenados são orgânicos cíclicos, que possuem no mínimo um átomo de nitrogênio em seu anel. Os alcaloides na maioria das vezes são alcalinos, devido à presença de um átomo de nitrogênio em sua estrutura, que possui um par de elétrons não compartilhado. Essa classe é famosa por causa da acentuada ação no sistema nervoso humano, como a morfina, um analgésico opioide, que alivia a dor (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os compostos fenólicos apresentam pelo menos um anel aromático e tem no mínimo um grupamento hidroxila substituindo um hidrogênio. Esse grupo é importante tanto para o vegetal, quanto para o homem. Pois o sabor, odor e coloração de vários vegetais se deve à presença dos componentes desse grupo. Também atraem os polinizadores, protegem as plantas contra injúria, insetos e ataques de animais (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

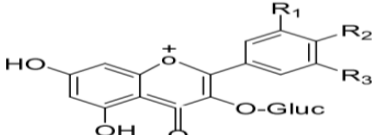
A ação antioxidante desses compostos tem um possível efeito na prevenção de doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas. O potencial anti-inflamatório e a capacidade de sequestrar os radicais livres podem estar envolvidos nessas ações benéficas para a saúde do homem (SILVA et al., 2010).

Os compostos fenólicos são classificados em fenólicos simples ou ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanas e taninos. Os flavonoides são classificados nos grupos: flavonas, flavanonas, flavonols, flavanonols, isoflavonas, flavanols ou catequinas e antocianinas (PEREIRA; CARDOSO, 2012; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

As antocianinas são uma classe de pigmentos naturais que apresentam diversas cores, como o azul, roxo e vermelho. Esses compostos estão presentes em grãos, frutos, caule, raiz, flores e galhos (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005; MENEZES et al., 2015). Esses pigmentos são importantes para os alimentos, pois eles contribuem com a cor, a aparência e a qualidade deles (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005). Diversos frutos possuem esse pigmento em sua constituição química, como a uva, a jaboticaba, o açaí, a uva-do-monte, o sabugueiro e a framboesa (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005; PEIXOTO et al., 2016; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010; XIA et al., 2013).

As antocianinas apresentam em sua estrutura um resíduo de açúcar no carbono 3 ou 5. Quando ocorre a hidrólise desse composto obtém-se a aglicona e o glicídio (DEWICK, 2009; LEE; DURST; WROLSTAD, 2005). Dentre as agliconas, a cianidina é a mais comum em seguida vem a delphinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina e malvidina, conforme apresenta a figura 5 (OOMAH; MAZZA, 1999).

Figura 5 – Estrutura química da molécula antocianina e a combinação dos radicais para cada molécula de antocianina diferente.



|                             | R1               | R2 | R3               |
|-----------------------------|------------------|----|------------------|
| Peonidina-3-O-glicosídeo    | OCH <sub>3</sub> | OH | -                |
| Petunidina-3-O-glicosídeo   | OH               | OH | OCH <sub>3</sub> |
| Malvidina-3-O-glicosídeo    | OCH <sub>3</sub> | OH | OCH <sub>3</sub> |
| Cianidina-3-O-glicosídeo    | OH               | OH | -                |
| Delphinidina-3-O-glicosídeo | OH               | OH | OH               |

Fonte: XIA et al., (2013).

Essas moléculas promovem benefícios para a saúde do homem, pois estão atreladas a diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antimutagênica, antioxidante, efeito protetor frente a danos gástricos, hepáticos e degradação do colágeno, antidiabetes, redução do risco de doença cardiovascular e aumento do desempenho cognitivo (REYNERTSON et al., 2008; SANTOS; MEIRELES, 2009).

## 2.5 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

Radicais livres são moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu último orbital, conferindo-lhes elevada reatividade e instabilidade (VASCONCELOS et al., 2014). Existem as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais se dividem em radicais livres e espécies não radicais, que não possuem elétrons desemparelhados na última camada (CAVALCANTE; BRUIN, 2009). Dentre as espécies reativas de oxigênio, que são radicais livres, existem superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH^\cdot$ ), hidroperoxila ( $HO_2^\cdot$ ), peroxila ( $RO_2^\cdot$ ), alcóxila ( $RO^\cdot$ ) e oxigênio singlete. Como exemplo de espécies não-radicaís tem-se o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O óxido

nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3$ ) são exemplos de radicais livres pertencentes às ERN (SÁNCHEZ-VALLE; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2013).

As ERO e ERN apresentam efeitos benéficos em concentrações baixas ou moderadas. Essas espécies estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos, como defesa contra agentes infecciosos, regulação do tônus vascular, resposta imune, adesão celular, crescimento celular, diferenciação celular e apoptose (VALKO et al., 2007).

Nos organismos aeróbios saudáveis, as espécies reativas produzidas (ERO e ERN) são balanceadas por meio do sistema antioxidante. O saldo não é perfeito, pois os antioxidantes controlam os níveis dessas espécies, mas não eliminam todas que foram formadas (HALLIWELL, 2007). O equilíbrio formado entre eles permite menor toxicidade e menos dano celular (CORONADO H et al., 2015).

O efeito danoso dos radicais livres nos sistemas biológicos pode ser resultado de condições de desequilíbrio, em que há o excesso de radicais livres sendo formados e deficiência de antioxidantes (SÁNCHEZ-VALLE; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2013). Segundo Sies, (1986) o estresse oxidativo ocorre quando há um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro, levando a potenciais danos. Esse processo pode mediar danos às estruturas celulares, como membrana celular, lipídeos, proteínas e DNA (VALKO et al., 2007).

As espécies reativas, ERO e ERN, estão ligadas à patogênese e à progressão de diversas doenças como o câncer, doença cardiovascular, aterosclerose, hipertensão, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e de Parkinson), artrite reumatoide e o processo de envelhecimento (SOARES et al., 2015; VALKO et al., 2007).

Segundo Halliwell (2007) os antioxidantes são definidos como “qualquer substância, que quando presente em baixas concentrações em comparação ao substrato oxidável, atrasa ou evita significativamente oxidação desse substrato”. O sistema antioxidante é dividido em dois tipos, o enzimático e o não enzimático (endógeno e exógeno) (CORONADO et al., 2015). Esse sistema inclui moléculas, enzimas e sequestradores químicos que são capazes de prevenir ou sequestrar ERO e ERN, neutralizando-as e prevenindo o dano oxidativo (SÁNCHEZ-VALLE; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2013; SOARES et al., 2015).

As enzimas antioxidantes são a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo. A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) atuam sobre as EROs. As moléculas não enzimáticas correspondem à segunda linha de defesa, que atua sobre os radicais livres. Dentre esse tipo de antioxidantes os endógenos dividem-se em preventivos, como a transferrina, lactoferrina, ferritina e ceruloplasmina, e em sequestradores de ERO como o ácido úrico e a bilirrubina. Os antioxidantes exógenos ou nutricionais são obtidos através da dieta, correspondendo a moléculas antioxidantes e microelementos necessários para a síntese de enzimas antioxidantes (SÁNCHEZ-VALLE; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2013).

Diferentes vegetais contêm nutrientes e compostos bioativos com ação antioxidante, como as vitaminas A (betacaroteno), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), os flavonoides, o licopeno, os polifenóis (KIRKHAM; RAHMAN, 2006; VASCONCELOS et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) também desempenham um papel central na progressão de diversas doenças inflamatórias. As células de defesa como os neutrófilos polimorfonucleares produzem EROs e essas moléculas também atuam na sinalização e como mediadoras da inflamação. A exposição da célula a EROs e o desequilíbrio do status redox pode levar ao desencadeamento da transcrição de genes inflamatórios. Os genes transcritos podem gerar citocinas pró-inflamatórias como produto final e essas citocinas podem desencadear a formação de mais EROs promovendo um ciclo entre o estresse oxidativo e a geração de citocinas pró-inflamatórias (MITTAL et al., 2014; SOARES et al., 2015).

## 2.6 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta de defesa do corpo contra diversos estímulos como a injúria, isquemia tecidual, agentes infecciosos ou resposta autoimune. O local do tecido no qual está acontecendo esse processo inflamatório apresenta características clássicas como tumor, vermelhidão, calor e dor (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006). Essas características são resultados de uma série de eventos que ocorrem localmente como mudanças vasculares, que leva a

vasodilatação, a formação de edema e a infiltração de células inflamatórias. Já a dor é uma resposta sensorial (VERGNOLLE, 2008).

A resposta inflamatória pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. A aguda é caracterizada pelo aumento da permeabilidade a nível capilar, vasodilatação e infiltração de leucócitos. A crônica é uma fase proliferativa, na qual ocorre a degeneração tecidual e fibrose (ROTELLI et al., 2003).

Normalmente, após exercer o seu papel contra os estímulos que lhe desencadearam, a reação inflamatória é controlada por meio da fase de resolução. Nessa fase os mediadores pró-inflamatórios estão reduzidos e se inicia a reparação do tecido e o retorno das funções fisiológicas do tecido que foi afetado (VERGNOLLE, 2008). Nessas condições a resposta inflamatória é benéfica, pois foi ativada de maneira regular e por um tempo definido (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

A inflamação excessiva ou inapropriada é uma das causas de diversas doenças como artrite reumatoide e psoríase. Esse tipo de inflamação também contribui fundamentalmente para outras doenças crônicas como o câncer, o diabetes e as doenças cardiovasculares (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

A resposta inflamatória é modulada por meio dos mediadores inflamatórios e células inflamatórias. Dentre os mediadores, existem as citocinas. Essas podem ser classificadas como pró-inflamatórias e como anti-inflamatórias, dependendo da via em que elas atuarem. As citocinas pró-inflamatórias, como as IL- 1, IL- 6 e  $\text{TNF}\alpha$ , estão envolvidas no início e na amplificação do processo inflamatório. Já as anti-inflamatórias modulam de forma negativa esse processo, como IL-10 e  $\text{TGF}\beta$  (CALIXTO et al., 2004). As células residentes do tecido ou as células migratórias tais como os mastócitos, os macrófagos e os neutrófilos produzem as citocinas. Após serem sintetizadas, as citocinas podem agir no local que foram geradas ou sistematicamente (CALIXTO et al., 2004).

O processo inflamatório também desencadeia a indução da expressão e atividade de enzimas envolvidas com a síntese de outros mediadores inflamatórios, como os eicosanoides e o óxido nítrico ( $\text{NO}^-$ ), a enzima ciclooxigenase (COX) e a NO sintetase, respectivamente (SCHMITZ; BACHER, 2005). O ácido araquidônico ocupa um lugar importante durante o processo inflamatório, pois é um composto

necessário para a síntese dos eicosanoides: prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT), os quais são mediadores pró-inflamatórios (FLOWER; PERRETTI, 2005; WAGNER, 1989).

O substrato comum das vias das ciclooxygenases e lipoxigenases é o ácido araquidônico. A via das ciclooxygenases tem como produto as prostaglandinas, tal como a PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>, a prostaciclina PGI<sub>2</sub> e os tromboxanos. E a via das lipoxigenases produz os leucotrienos, como exemplo os LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> e lipoxinas (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004; WAGNER, 1989).

Existem duas isoformas majoritárias da enzima ciclooxygenase, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é expressa de forma constitutiva em muitos tecidos e as PGs produzidas por essa via são importantes para o estabelecimento da homeostasia, das funções fisiológicas normais. Já a COX-2 é a forma induzida, pois a sua síntese ocorre em resposta à presença de mediadores pró-inflamatórios. E as PGs produzidas via COX-2 são responsáveis pelo aparecimento de efeitos inflamatórios (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

Há diversos medicamentos que são usados como anti-inflamatórios. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente utilizados no mundo. Eles agem sobre a via do ácido araquidônico, primeiro acetilando a ciclooxygenase, que fica bloqueada de forma irreversível, impossibilitando a conversão do ácido araquidônico em eicosanoides (SCHMITZ; BACHER, 2005). Os AINES são classificados como inibidores não específicos da COX, tais como os derivados do ácido salicílico, aspirina, indometacina e dipirona. Como inibidores específicos da COX-2 pode-se citar o nimesulide e o celecoxibe (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004).

Os dois tipos de AINEs levam ao aparecimento de efeitos colaterais. Os inibidores não específicos da COX predispõem ao aparecimento de distúrbios gastrointestinais, como dispepsia, dor abdominal, sangramento, úlcera e perfuração gastroduodenal. Esses efeitos resultam da não-especificidade de ação desses AINEs, que agem sobre a COX-1 e a COX-2. As prostaglandinas sintetizadas pela COX-1 diminuem a acidez, o volume e o conteúdo de pepsina da secreção gástrica, aumentam a secreção de muco no estômago e intestino delgado, são vasodilatadoras e estão envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo local. Os

distúrbios gastrointestinais mencionados aparecem devido á ação inibidora dos AINEs não seletivos sobre a COX-1, que resulta na diminuição da síntese de prostaglandinas (BJORKMAN, 1996; CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004; WALLACE, 1997).

Os inibidores específicos da COX-2 podem comprometer o funcionamento renal normal, contribuindo para o aparecimento de alguns efeitos colaterais, como edema periférico, hipertensão, inibição da excreção de água e sódio e hipercalemia (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004).

Os glicocorticoides são anti-inflamatórios que são considerados mais potentes que os AINEs (VANE; BOTTING, 1995). Eles são utilizados, frequentemente, durante o tratamento de inflamações crônicas. Eles possuem a habilidade de induzir ou reprimir a expressão de genes por meio da ligação a receptores de glicocorticoides (SCHMITZ; BACHER, 2005).

Além do tratamento com medicamentos convencionais, a inflamação pode ser tratada com fitoterápicos, que são a base de plantas medicinais. As preparações fitoterápicas apresentam uma natureza complexa e a mistura de metabólitos secundários propicia a inibição de várias vias da inflamação simultaneamente. Além disso combina o máximo de eficácia e menos efeitos colaterais (SCHMITZ; BACHER, 2005).

## 2.7 DOR E NOCICEPÇÃO

Dentre os sinais cardinais da inflamação encontra-se a dor (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017). Segundo IASP (1994, p.209) a dor é definida como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos.”

O processamento da dor pode se dividir em dois mecanismos: a dor fisiológica e a dor patológica. A fisiológica atua normalmente como um alarme, que é ativado para impedir danos. Esse tipo de dor é necessário para manter o bem-estar e para garantir a sobrevivência do organismo (DELEO; WINKELSTEIN, 2003; SCHOLZ; WOOLF, 2002). A dor patológica é prolongada ou ampliada inapropriadamente, pode ocorrer na ausência de estímulos externos necessários para o seu

desencadeamento e na maioria das vezes não responde aos fármacos empregados (DIB-HAJJ et al., 2010).

Há três categorias em que a sensação da dor pode ser dividida, como dor nociceptiva, dor inflamatória e dor neuropática (SCHOLZ; WOOLF, 2002). A nocicepção é um mecanismo sensorial e fisiológico no qual os nociceptores, que são receptores sensoriais especializados, detectam os estímulos nocivos, que podem desencadear um dano tecidual (TRACEY JR, 2017; VARDEH; NARANJO, 2017; WOLLER et al., 2017).

Os nociceptores detectam diversos estímulos nocivos, tais como o mecânico, o térmico e o químico (BASBAUM et al., 2009). Esses receptores têm três tipos de fibras que são definidas com base na mielinização (ou ausência de mielina), diâmetro e velocidade de condução. São as fibras C, A $\delta$  e A $\beta$  (SNEDDON, 2017).

As fibras C são desmielinizadas, têm diâmetro pequeno e a velocidade de condução é lenta (0,5-2 m/s), a maioria dessas fibras são receptores polimodais, ou seja, são ativados por estímulos mecânicos, químicos e térmicos. As fibras A $\delta$  são levemente mielinizadas, possuem diâmetro médio e possuem a velocidade de condução entre 5 e 35 m/s, a maior parte dessas fibras também são polimodais. Já as fibras A $\beta$  são mielinizadas, têm diâmetro largo e a velocidade de condução é alta (35-75 m/s). A maioria das fibras A $\beta$  detectam estímulos inócuos sobre a pele, articulações e músculos e não contribuem com a dor (JULIUS; BASBAUM, 2001; VARDEH; NARANJO, 2017).

O processamento do estímulo nocivo pode ser dividido em três estágios: transdução, transmissão e percepção. No estágio de transdução os estímulos nocivos que afetam os tecidos são detectados por meio das fibras aferentes dos neurônios de primeira ordem. Neste estágio o estímulo é convertido em uma atividade eletrofisiológica. Os canais iônicos são ativados, causando despolarização dos terminais periféricos. Os potenciais de ação são propagados por meio das fibras C e A $\delta$ , que tem como resultado a liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinhal (BASBAUM et al., 2009; BRIDGESTOCK; RAE, 2013; TRACEY JR, 2017; WOLLER et al., 2017).

No segundo estágio, ocorre sinapses entre os neurônios de primeira ordem e os de segunda ordem do corno dorsal, que transmitem a informação codificada para o

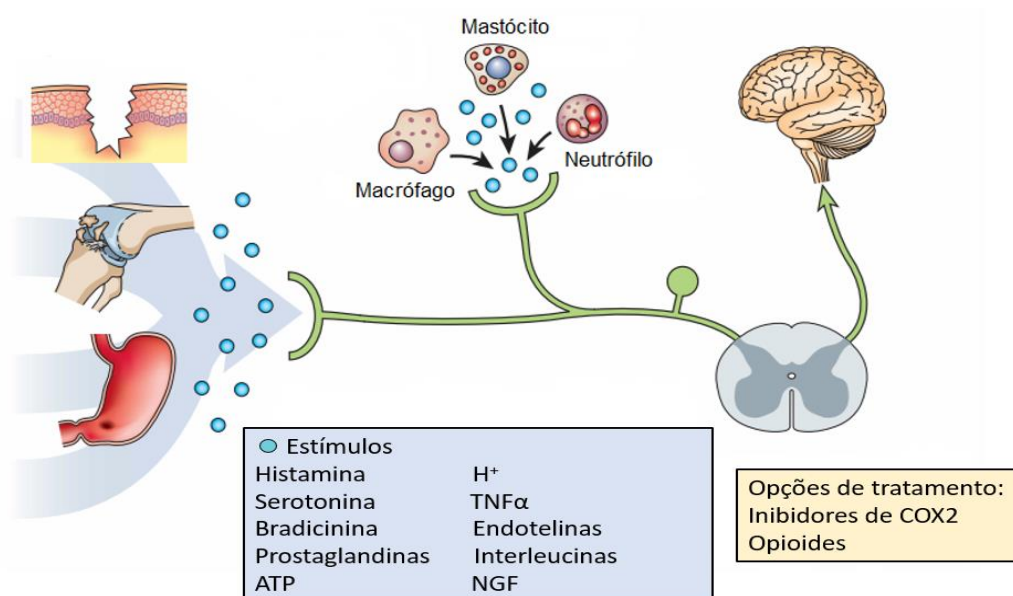


tronco cerebral, por meio do trato espino-retículo-talâmico e para o tálamo, através do trato espino-talâmico. O terceiro estágio ocorre através de conexões entre o tálamo e o córtex cerebral, que resulta na percepção da dor (BASBAUM et al., 2009; BRIDGESTOCK; RAE, 2013).

A dor inflamatória é localizada, pode ocorrer no sistema nervoso periférico ou central. O tecido pode ser danificado por diversos estímulos como trauma, infecções por vírus, bactérias e fungos, isquemia, crescimento tumoral e processos autoimunes. As células inflamatórias e as que foram danificadas liberam citocinas, fatores de crescimento, cininas, purinas, aminas, prostanoídes e prótons ( $H^+$ ), que juntos compõem a “sopa inflamatória” (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; SCHOLZ; WOOLF, 2002).

O sistema imune desempenha um papel fundamental na via da dor, por meio da liberação dos mediadores moleculares que sensibilizam os nociceptores, que têm receptores para detectar as citocinas, os lipídios, as proteases e os fatores de crescimento que foram liberados durante a inflamação. A informação é transmitida como potencial de ação, através da medula espinhal até o cérebro, onde é processada como dor, conforme apresenta a Figura 6 (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

Figura 6 – Mecanismo da dor inflamatória



Fonte: SCHOLZ & WOOLF (2002).

Dentre os mediadores lipídicos, a  $PGE_2$  é considerada uma potente intensificadora da dor inflamatória. As citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  atuam de forma direta sobre os neurônios nociceptores. As células imunes também liberam o NGF (Fator de Crescimento do Nervo) durante o processo inflamatório, e esse fator ativa o seu receptor no nociceptor, o que contribui com o aumento da sensibilidade à dor. Há também a liberação de neurotransmissores por células imunes, como os mastócitos que contêm histamina e serotonina, que também são responsáveis pela modulação da sinalização da dor (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

A inflamação e a dor interagem de forma bidirecional, pois a atividade dos neurônios nociceptivos são influenciados pelos mediadores das células imunes, mas também esses neurônios modulam a resposta inflamatória (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016). Os nociceptores participam de forma ativa sobre as células inflamatórias, por meio da liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos que agem modulando a função das células do sistema imune, durante condições inflamatórias (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

A dor neuropática surge após ocorrer um dano ou disfunção do sistema nervoso periférico ou central, que pode ser causado por trauma, infecção, isquemia, neoplasia e indução por droga. Por exemplo após uma lesão da medula espinhal ou um acidente vascular cerebral. Ela é uma combinação de dor e déficits neurológicos (BRIDGESTOCK; RAE, 2013; SCHOLZ; WOOLF, 2002).

De acordo com o tempo de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica (SCHOLZ; WOOLF, 2002). A aguda cumpre seu papel benéfico de alertar. Já a crônica tem como característica ser debilitante (BASBAUM et al., 2009). Essa dor é definida como persistente ou recorrente por mais de três meses. Além de ser desagradável, a dor crônica não possui uma função benéfica clara (BLISS et al., 2016; MATSUDA; HUH; JI, 2018).

Há diversas classes de medicamentos empregadas no manejo da dor. Como a transmissão da dor envolve diferentes mecanismos periféricos e centrais, para otimizar o seu controle e limitar os efeitos colaterais do tratamento, o melhor é empregar uma analgesia multimodal. Dentre os medicamentos utilizados estão os

AINES, opioides, antidepressivos, anticonvulsivantes, antagonistas NMDA (N-methyl-D-aspartato), antiarrítmicos e canabinoides (BRIDGESTOCK; RAE, 2013).

Dentre os analgésicos os AINEs são os mais empregados, por causa da combinação de seus efeitos analgésico, anti-inflamatório e antipirético. A sua eficácia analgésica é devido à inibição das enzimas ciclo-oxigenases, inibindo a produção das prostaglandinas a nível periférico e central. A administração dos AINEs pode ser de forma isolada ou combinada com os opioides, para obter um efeito sinérgico (PHILLIPS; CURRIER, 2004).

Os opioides também são uma das classes de analgésicos mais utilizadas na modulação da dor (SNEDDON, 2017). Os opioides atuam periféricamente ou centralmente. Eles estimulam os receptores opioides e são extremamente efetivos para tratar a dor aguda. Podem ser de origem natural ou sintética (PHILLIPS; CURRIER, 2004).

A morfina é um opioide, considerada como padrão-ouro da analgesia, por causa da sua potente ação sobre a dor. Ela mimetiza a ação dos opioides endógenos e inibe a liberação de neurotransmissores (DELEO, 2006). Contudo, com a administração pode surgir alguns efeitos colaterais como a depressão respiratória e a tolerância (SNEDDON, 2017).

Os opioides e os AINEs são as drogas mais empregadas atualmente como analgésicos, porém causam graves efeitos colaterais. A maioria desses fármacos antinociceptivos derivaram de plantas ou foram sintetizados com base nos produtos naturais. No Brasil muitas plantas medicinais são utilizadas para tratar diversas condições de dor e existem bastantes estudos que descrevem o potencial uso analgésico dessas plantas. A pesquisa de novos agentes antinociceptivos que sejam eficazes, com menos efeitos colaterais, seguros e potentes é necessária (CALIXTO et al., 2002; DUTRA et al., 2016; ZEB et al., 2016).

### 3 MÉTODO

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Frutos de *M. floribunda* foram coletados na Serra dos Paus Doías (Exu, Pernambuco, Brasil) em 2015. O material vegetal foi identificado e o voucher (número: 92722) foi depositado no Herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).

#### 3.2 EXTRATOS VEGETAIS

Os frutos foram lavados com água corrente e separados manualmente em polpa, semente e casca. Amostras da casca do fruto foram secas a 40 °C e reduzidas a pó. O material vegetal (50 g) foi extraído com 100 mL éter etílico por 1h a temperatura ambiente (30 °C). A solução foi filtrada, e o resíduo passou por mais duas extrações seguindo o mesmo procedimento com 50 mL. Após este processo, o resíduo foi extraído com outros solventes (clorofórmio, acetona e metanol), e todas as etapas de extração foram repetidas. Em cada etapa as soluções foram secas em rotaevaporador a 40 °C, gerando os extratos MfEeE, MfCE, MfAE e MfME. A extração aquosa também foi realizada com 10 g do pó com 100 mL de água destilada (1:10, p/v), então a solução foi filtrada e liofilizada, gerando o extrato MfAqE.

#### 3.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A presença de flavonoides, fenilpropanóides, triterpenos, esteroides, saponinas, monoterpenos, sesquiterpenos, cumarinas, quinonas, alcaloides, proantocianidinas e taninos solúveis em água nos extratos foi investigada por cromatografia em camada delgada com placa de gel de sílica F254. (ALUGRAM<sup>R</sup> 818131, Macherey-Nagel, Alemanha) e para cada sistema de eluição, foram utilizados agentes e padrões de visualização específicos para identificar os metabolitos (BRASSUER; ANGENOT, 1986; JÚNIOR et al., 2014; RICHARDSON; HARBORNE, 2006; ROBERTS; CARTWRIGHT; OLDSCHOOL, 1957; WAGNER; BLADT, 1996).

### 3.4 CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ANTOCIANINAS MONÓMERICAS

O teor de fenóis totais foi estimado pelo método de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações (SINGLETON; ROSSI, 1965). Amostras de 20 µL dos extratos (1 mg/mL) foram misturadas com 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos à temperatura ambiente, 80 µL de solução de bicarbonato de sódio (0,7 M) foram adicionados. A reação foi mantida no escuro durante 2 horas à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 735 nm usando um leitor de microplacas (BioTek UQuant MQX200). Metanol ou água destilada foram usados como controles negativos. O ácido gálico foi utilizado como padrão, e os resultados foram calculados com base na curva de calibração do ácido gálico (10-100 mg/L) e expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato (EAG / g extrato).

O teor de flavonoides foi determinado de acordo com o método colorimétrico do cloreto de alumínio (WOISKY; SALATINO, 1998). Os extratos foram testados na concentração de 1 mg/mL e a quercetina foi utilizada para obter a curva de calibração padrão (10-100 mg/L). A amostra (100 µL) foi misturada com 100 µL do reagente [2% cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) em metanol] após 1 h em ambiente escuro, a absorbância foi lida contra um branco de metanol ou água destilada mais o reagente a 420 nm. Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ/ g extrato). O experimento foi realizado em triplicata.

O conteúdo de antocianinas monoméricas foi determinado pelo método do pH diferencial (HOSSEINIAN; LI; BETA, 2008). Foram utilizados dois tampões, cloreto de potássio (KCl, 0,025 M) a pH 1 e pH 4,5 a acetato de sódio a 0,4 M (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na). A amostra (200 µL a 10 mg / mL) e 1,8 mL de cada tampão, foram misturadas e após 10 min foi lida a absorbância a 520 nm e a 700 nm contra o branco, água destilada. A concentração de antocianina foi calculada de acordo com a equação (1) e os resultados expressos como equivalentes de cianidina-3-glicosídeo (Cy-3-glc E).

$$\text{Conteúdo de antocianina (equivalente cy-3-glc, mg/g)} = \frac{(A \cdot PM \cdot FD \cdot 10^3)}{\epsilon \cdot l} \quad (1)$$

$A = (\text{Absorbância } 520 \text{ nm} - \text{Absorbância } 700 \text{ nm}) \text{ pH } 1 - (\text{Absorbância } 520 \text{ nm} - \text{Absorbância } 700 \text{ nm}) \text{ pH } 4,5$ ; PM (peso molecular) = 449,2 g/mol de cy-3-glc; FD = fator de diluição (0,2 mL da amostra foi diluído para 2mL, FD = 10); 1 = comprimento em cm;  $\epsilon = 26900$ , coeficiente de extinção molar, em  $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , para cy-3-glc; e  $10^3$  = fator para conversão de g para mg.

### 3.5 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

#### 3.5.1 Ensaio de DPPH (sequestro de radicais livres)

Para avaliação da capacidade de sequestrar o radical DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil), uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de cada extrato em diferentes concentrações (8,0625 a 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) foi misturada com 250  $\mu\text{L}$  da solução DPPH de 1 mM (em metanol) durante 25 min a temperatura ambiente e protegida da luz (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O ácido gálico foi o padrão usado como controle positivo e o metanol foi o controle negativo. O branco da reação (40  $\mu\text{L}$  do extrato e 250  $\mu\text{L}$  do solvente usado para diluir as amostras) foi usado para descartar a possível interferência da cor do extrato. A absorbância de cada solução foi medida a 517 nm usando um leitor de microplacas (BioTek UQuant MQX200).

#### 3.5.2 Ensaio ABTS

O radical ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] foi obtido misturando 5 mL da solução mãe (7 mM) com 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio 140 mM. Esta mistura permaneceu no escuro e a temperatura ambiente durante 16 h antes da utilização. A solução do radical ABTS foi diluída com etanol até se obter uma absorbância de 0,7 nm ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm. Amostras dos extratos (10  $\mu\text{L}$ , 1 mg/mL) foram misturadas com 1 mL do radical ABTS por 6 min e lidas em espectrofotômetro a 734 nm (RE et al., 1999). Trolox foi usado como antioxidante padrão (100  $\mu\text{M}$  a 2000  $\mu\text{M}$ ) O resultado foi expresso como capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) em  $\mu\text{M ET} / \text{g extrato}$ .

### 3.5.3 Capacidade antioxidante total (CAT)

Amostras dos extratos (100 µL, 1 mg/mL) foram combinadas com 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram incubados a 95 °C por 90 min, então resfriados a temperatura ambiente e a absorbância de cada um foi lida a 695 nm contra um branco (100 µL de metanol ou água destilada mais 1 mL da solução reagente) (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). O padrão utilizado foi construído com ácido ascórbico (1 mg/mL). O resultado foi calculado de acordo com a fórmula abaixo e foi expresso como capacidade antioxidante total (CAT) em relação ao ácido ascórbico.

$$\text{CAT \%} = \frac{A_{\text{abs}} - B_{\text{abs}}}{AA_{\text{abs}} - B_{\text{abs}}} * 100$$

Na qual, Aabs é a absorbância da amostra (extratos), Babs é a absorbância do branco, AAabs é a absorbância do ácido ascórbico.

### 3.5.4 Determinação do sequestro do radical superóxido

Neste ensaio, a mistura da reação consistiu de 300 µL de extrato em diferentes concentrações (50 µg/mL a 1000 µg/mL), 100 µL de NBT (cloreto de Nitroblue tetrazolium a 1 mg/mL em DMSO) e 1 mL de DMSO alcalino (1 mL de DMSO contendo 5 mM de hidróxido de sódio em 0,1 mL de água) e a absorbância foi medida a 560 nm (KUNCHANDY; RAO, 1990).

## 3.6 ANÁLISE POR CLAE

Para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; em inglês: High performance liquid chromatography, HPLC), 20 mg do MfAE foram pesados, diluídos com metanol a 50% (v/v) para um balão volumétrico de 2 mL e filtrados através de uma membrana PVDF de 0,45 µm (Macherey-Nagel®) para injeção de amostra. O sistema utilizado foi o Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific®, EUA) acoplado a um detector de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific®) e equipado com uma bomba

binária (HPG-3x00RS; Thermo Fisher Scientific®), desgaseificador e amostrador automático com volume de 20 µL (ACC-3000; ThermoFisher Scientific). O comprimento de onda para as análises foi estabelecido em 270 nm. A separação cromatográfica foi realizada a 26 °C usando uma coluna Dionex® C18 (250 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm) equipada com pré-coluna Phenomenex® (C18; 4 mm × 3,9 µm). A fase móvel foi constituída pelo solvente A (água purificada, Purelab Classic UV, Elga®) e solvente B (metanol, grau HPLC, Tedia®), ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético (Vetec®), e a taxa de fluxo foi ajustada para 0,9 ml/min. O seguinte programa de gradiente foi usado: 0-10 min, 10-2% B; 10-13,5 min, 20-25% de B; 13,5-18 min, 25-40% de B; 18-25 min, 40-80% B; 25-30 min, 80% de B; 30-35 min, 80-10% de B.

O conteúdo de substâncias encontradas no MfAE foi determinado a partir das curvas de calibração do ácido gálico (96% de pureza) e ácido elágico (95% de pureza, da casca das árvores), todos os padrões químicos foram adquiridos da Sigma® (EUA). A determinação dos conteúdos foi realizada em triplicata.

### 3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (CEUA-UFPE; Número do Processo: 0003/2018). A proposta foi aprovada na reunião do CEUA-UFPE realizada em 23 de abril de 2018.

### 3.8 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos utilizando camundongos Swiss machos (30-35 g, 10 semanas) fornecidos pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Os animais receberam alimentação e água ad libitum com período claro/escuro de 12 h. Os animais foram limitados a uma dieta apenas com água para evitar interferência alimentar com absorção de substâncias, antes de cada experimento (6-8 h).



### 3.9 ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade aguda foi testada em duas etapas. Fase 1: os animais foram divididos em três grupos ( $n = 3$ ) que receberam o extrato nas doses de 10 mg/kg, 100 mg/kg e 1000 mg/kg. Os animais são colocados em observação por 24 horas para monitorar seu comportamento e sobrevivência. Fase 2: o extrato foi administrado em doses maiores (1600, 2900 e 5000 mg/kg; um camundongo por dose) e o comportamento e a sobrevivência foram observados por 24 horas (LORKE, 1983). A  $LD_{50}$  foi calculada pela fórmula:

$$LD_{50} = \sqrt{(D_0 \times D_{100})}$$

$D_0$  = Maior dose que não induziu a mortalidade,

$D_{100}$  = Menor dose que produziu mortalidade de camundongos.

### 3.10 ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO

A ação anti-inflamatória *in vivo* de MfAE foi avaliada pelo ensaio de edema de pata induzido por Carragenina. Para isso, os camundongos foram distribuídos em quatro grupos ( $n = 6$ ) que receberam uma dose oral única de: (i) MfAE a 50 mg/kg; (ii) MfAE a 100 mg/kg; (iii) veículo (solução salina a 0,9%); ou (iv) indometacina (20 mg/kg). Após 1 h, o edema da pata foi induzido por uma injeção de solução de carragenina a 2% (15  $\mu$ L/animal) na região subplantar da pata direita (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). Como controle, solução salina (0,9%; 15  $\mu$ L) foi injetada na pata esquerda. O volume da pata foi medido usando um paquímetro (1h, 2h, 3h, 4h e 5h) (HUANG et al., 2012). A inibição do edema foi calculada pela diferença entre o volume das patas direita e esquerda.

### 3.11 ENSAIOS ANTINOCICEPTIVOS

#### 3.11.1 Dor abdominal induzida por ácido acético

Os ratos foram divididos em quatro grupos ( $n = 6$ ) e foram tratados como descrito anteriormente. A nocicepção foi induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético (0,8%; 100 mL /10 g). Após a injeção, o número de contorções abdominais foi registrado entre 5 min e 15 min (COLLIER et al., 1968).

### **3.11.2 Ensaio de formalina**

Neste ensaio, os animais foram distribuídos em cinco grupos ( $n = 6$ /grupo) que receberam doses orais de: (i) veículo; (ii) MfAE a 50 mg/kg; (iii) MfAE a 100 mg/kg; (iv) indometacina (20 mg/kg); (v) e morfina (10 mg/kg). Após 1 h, a solução de formalina (2,5% em solução salina a 0,9%; 20  $\mu$ L/pata) foi administrada na região subplantar da pata traseira direita (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Os ratos foram observados em uma câmara com um espelho montado em três lados para permitir a visualização das patas; e o tempo (em segundos) gasto lambendo e mordendo a pata injetada foi medido como um indicador de dor. Esta resposta foi medida por 5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina (segunda fase, dor inflamatória). Para avaliar o possível envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo de MfAE, os ratos foram tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p) 30 minutos antes da administração de MfAE (100 mg / kg, v.o) ou morfina (10 mg / kg, v.o).

## **3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média ( $\pm$  erro padrão). A diferença entre as médias foi testada por significância estatística usando análise de variância unidirecional ou bidirecional (ANOVA) seguida por teste de Tukey para comparações múltiplas. A  $IC_{50}$  (concentração que inibe 50%) foi calculada por regressão linear. Os ensaios in vitro foram realizados em triplicatas. Na análise estatística dos resultados, o valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ARTIGO MYRCIARIA FLORIBUNDA FRUIT PEEL HAS ANTIOXIDANT ACTION AND IN VIVO ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES: POSSIBLE INVOLVEMENT OF OPIOIDERGIC SYSTEM



Artigo submetido ao periódico Journal of Pharmacy And Pharmacology (Fator de Impacto: 2.39; QUALIS Ciências Biológicas I: B1).

***Myrciaria floribunda* fruit peel has antioxidant action and in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities: possible involvement of opioidergic system.**

**Running head: *M. floribunda* peel to treat pain and inflammation.**

Izabelly Bianca da Silva Santos

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

izabelly.ufpe@outlook.com

Bruno Souza dos Santos

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
Recife/PE, 50670-901, Brazil.

souza.farmacia@hotmail.com

João Ricardhis Saturnino de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

ricardhis@gmail.com

Wêndeo Kennedy Costa

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

wendeocosta@gmail.com

Adrielle Zagmignan

Universidade Ceuma, Programa de Pós-graduação, São Luís/MA, 65075-120, Brazil.  
adriellyzagmignan@hotmail.com

Luís Cláudio Nascimento da Silva

Universidade Ceuma, Programa de Pós-graduação, São Luís/MA, 65075-120, Brazil.  
luiscn.silva@ceuma.br

Magda Rhayanny Assunção Ferreira

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Recife/PE, 50670-901, Brazil.

magda.ferreira00@gmail.com

Alexandre Gomes da Silva

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

agsilva@live.com

Rafael Matos Ximenes

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

ximenesem@gmail.com

Luiz Alberto Lira Soares

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas,  
Recife/PE, 50670-901, Brazil.

lals.ufpe@gmail.com

Patrícia Maria Guedes Paiva

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

ppaiva63@yahoo.com.br

Vera Lúcia de Menezes Lima

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

lima.vera.ufpe@gmail.com

Maria Tereza dos Santos Correia

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

mtscorreia@gmail.com

Márcia Vanusa da Silva

Correspondent author

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife/PE,  
50670-901, Brazil.

[marciavanusa@yahoo.com.br](mailto:marciavanusa@yahoo.com.br)

***Myrciaria floribunda* fruit peel has antioxidant action and *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activities: possible involvement of opioidergic system.**

**Abstract**

**Objectives:** This work evaluated the antioxidant properties and *in vivo* antinociceptive and anti-inflammatory effects of extracts obtained from fruit peels of *Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd.) O.Berg (*Cambuí* or *camboim*). **Methods:** Different extracts were submitted to a comparative analysis of selected phytochemical contents (levels of total phenols, flavonoids and monomeric anthocyanins) and *in vitro* antioxidant activity. The extract with higher potential was selected to *in vivo* evaluation of its antinociceptive and anti-inflammatory action. Finally, the chemical characterization of this extract was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Key findings:** MfAE (extract obtained using acetone as solvent) showed the higher levels of phenols (296 mg GAE/g) and anthocyanins contents (35.65 mg Cy-3-glcE/g) that were associated with higher antioxidant activity. MfAE also exhibited *in vivo* anti-inflammatory and analgesic effects. This fraction inhibited the inflammatory and neurogenic phases of pain and this effect was reversed by naloxone (suggesting the involvement of opioidergic system). MfAE reduced the abdominal contortions induced by acetic acid. The HPLC analysis revealed the presences of gallic acid (and its derivatives) and ellagic acid. **Conclusions:** Taken together these data support the use of *M. floribunda* peel fruit for development of functional foods and nutraceuticals.

**Keywords:** functional foods; oxidative stress; inflammation; pain.

## **1. Introduction**

Free radicals (and associated reactive species) are in general derived from normal metabolism and are crucial for redox signaling pathways and immune defense. However, these molecules can interact with cellular structures leading to impairment of physiological systems [1-3]. In this sense, the oxidative stress has

been associated with the etiology of several pathologies such as inflammatory disorders, chronic pain and degenerative diseases [4,5]. Despite the number of anti-inflammatory and analgesic drugs available in the market, the treatment schedules of these clinical conditions are complexes and constitute huge challenges for the health systems worldwide [6]. This scenario points out the urgent need for the development of effective analgesic and anti-inflammatory drugs [7-9].

Several scientific evidences report that fruits are valuable sources of compounds with antioxidant properties and their consumption may be beneficial for reduce the deleterious effects of inflammatory disorders and chronic pain [10-13]. In this sense, there is a growing interest in knowing the anti-inflammatory and analgesic properties of edible fruits (and their different parts) in order to provide more insights to support their use as functional foods and nutraceuticals [11,14,15].

*Myrciaria floribunda* (H.West ex Willd) O.Berg (Myrtaceae) is native plant of South and Central America which is distributed in different Brazilian biomes such as Amazon, Caatinga, Cerrado and Atlantic Forest. Its fruits (known in Brazil as *Cambuí* or *camboim*) are edible and often consumed freshly, in juices or alcoholic beverages [16]. Some works have shown the pharmacological properties of different parts of this plant such as antioxidant, antimicrobial and anticancer effects [17,18]. However, the pharmacological actions of the fruits were not properly addressed [16]. In special, the beneficial aspects of the products derived from fruit peels of the *M. floribunda* have not been demonstrated. In this context, this work analyzed the phytochemical composition along with the antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory potentials of extracts obtained from fruit peel of *M. floribunda*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

Fruits of *M. floribunda* were collected in the *Serra dos Paus Dóias* (Exu, Pernambuco, Brazil) in 2015. The plant material was identified by Alexandre Gomes da Silva (Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Brazil). The specimen voucher (number: 92722) was deposited in the Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco.



## 2.2. Plant Extracts

The fruits were washed with running water and manually separated into pulp, seed and peel. Samples of the fruit peels were dried at 40 °C and reduced to powder. The plant material (50 g) was extracted with 100 mL of ethyl ether for 1 h at room temperature (30 °C). The solution was then filtered, and the residue was re-extracted twice more following the same procedure with 50 mL. After this process, the residue was extracted with other solvents (in this sequence: chloroform, acetone and methanol), and all extraction steps were repeated as described above. At each step the solutions were dried in a rotaevaporator at 40 °C, generating extracts MfEeE (ethyl ether), MfCE (chloroform), MfAE (acetone) and MfME (methanol). Aqueous extraction was also performed with 10 g of the powder with 100 mL of distilled water (1:10, w/v), then the solution was filtered and lyophilized, generating the extract MfAqE.

## 2.3. Phytochemical analysis

The presence of several kinds of phytochemicals (flavonoids, phenylpropanoids, triterpenes, steroids, saponins, monoterpenes, sesquiterpenes, coumarins, quinones, alkaloids, proanthocyanidins and water-soluble tannins) in the extracts was investigated using thin layer chromatography with silica gel plate F<sub>254</sub> (ALUGRAM<sup>R</sup> 818131, Macherey-Nagel, Germany) and for each elution system, specific visualization agents and standards were used to identify the metabolites [19-22].

## 2.4. Total phenol content, total flavonoid and monomeric anthocyanins

The levels of total phenols were estimated using the Folin-Ciocalteu method [23], with some modifications. Samples of 20 µL of each extract (1 mg/mL) were mixed with 100 µL of the Folin-Ciocalteu reagent. After 3 minutes at room temperature, 80 µL of a sodium bicarbonate solution (0.7 M) was added. The reaction was kept in the dark for 2 h at room temperature. The absorbance was measured at 735 nm using a microplate reader (BioTek UQuant MQX200). Methanol or distilled water were used as negative controls. Gallic acid was used as standard,

and the results were calculated based on the calibration curve of gallic acid (10-100 µg/mL) and expressed as mg equivalent of gallic acid per gram of extract (GAE/g extract).

The flavonoid content was determined according to the colorimetric method of aluminum chloride [24]. The extracts were tested at the concentration of 1 mg/mL, and quercetin was used to obtain the standard calibration curve (10 -100 µg/mL). The sample (100 µL) was mixed with 100 µL of the reagent [2% aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) in methanol] after 1 h in dark room temperature environment, absorbance was read against a blank of methanol or more distilled water the reagent at 420 nm. The results obtained were expressed as mg equivalent of quercetin per gram of extract (mg QE/g extract). The experiment was done in triplicate.

The content of monomeric anthocyanins was determined by the differential pH method [25]. Potassium chloride buffer (KCl; 0.025 M; pH 1) and sodium acetate buffer (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na; 0.4 M; pH 4.5) were used. The sample (200 µL at 10 mg/mL) was mixed to 1.8 mL of each buffer. After 10 min the absorbance was read at 520 nm and at 700 nm. The distilled water was used as control. The concentration of anthocyanin was calculated according to equation (1) and the results expressed as cyanidin-3-glucoside equivalent (Cy-3-glc E).

$$\text{Anthocyanin content} = \frac{(A_{520} - A_{700}) \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

A = (Absorbance 520 nm - Absorbance 700 nm) pH 1 - (Absorbance 520 nm - Absorbance 700 nm) pH 4.5; MW (molecular weight) = 449.2 g/mol of ci-3-glc; DF = dilution factor (0.2 mL of the sample was diluted to 2 mL, DF = 10); l = length in cm;  $\epsilon$  = 26900, molar extinction coefficient, in L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>, for ci-3-glc; and 10<sup>3</sup> = factor for conversion from g to mg.

## 2.5. Antioxidant assays

### 2.5.1. DPPH assay (free radical sequestration)

For evaluation of the ability to sequester the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical, an aliquot of 40 µL of each extract at different concentrations (8.0625 to 1000 µg/mL) was mixed with 250 µL of 1 mM DPPH solution (in methanol) for 25 min at room temperature and protected from light [26]. Gallic acid was the standard used as a positive control, and methanol was the negative control. A control

solution (40  $\mu$ L of the extract and 250  $\mu$ L of the solvent used to dilute the samples) was used to rule out the possible interference of extract color. The absorbance of each solution was measured at 517 nm using a microplate reader (BioTek UQuant MQX200).

### 2.5.2. ABTS assay

The ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)) radical was obtained by mixing 5 mL of the ABTS stock solution (7 mM) with 88  $\mu$ L of 140 mM potassium persulfate solution. This mixture remained in the dark and at room temperature for 16 h before use. The ABTS radical solution was diluted with ethanol until an absorbance of 0.7 nm ( $\pm$  0.02) was obtained at 734 nm. Samples (10  $\mu$ L) of the extracts (1 mg/mL) were mixed with 1 mL of the ABTS radical for 6 min and then read in a spectrophotometer at 734 nm [27]. Trolox was used as standard antioxidant (100  $\mu$ M to 2000  $\mu$ M) The result was expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in  $\mu$ M TE/g extract.

### 2.5.3. Total antioxidant capacity (TAC)

Samples (100  $\mu$ L) of the extracts (1 mg/mL) was combined with 1 mL of the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were incubated at 95  $^{\circ}$ C for 90 min, then cooled to room temperature and the absorbance of each reaction was read at 695 nm. The control reaction consisted in 100  $\mu$ L of methanol mixed with 1 mL of the reagent solution [28]. The standard used was ascorbic acid (1 mg/mL). The result was calculated according to the formula below and was expressed as total antioxidant capacity (TAC) relative to ascorbic acid.

$$\text{TAC \%} = \frac{S_{abs} - B_{abs}}{AA_{abs} - B_{abs}} * 100$$

Where,  $S_{abs}$  is the absorbance of the sample (extracts),  $B_{abs}$  is the absorbance of control,  $AA_{abs}$  is the absorbance of ascorbic acid.

#### **2.5.4. Determination of the sequestration of the superoxide radical**

In this assay, the reaction mixture consisted of 300  $\mu$ L of extracts at different concentrations (50 - 1000  $\mu$ g/mL), 100  $\mu$ L of NBT (Nitrotetrazolium Blue chloride) (1 mg/mL in DMSO solution) and 1 mL of alkaline DMSO (1 mL DMSO containing 5 mM sodium hydroxide in 0.1 mL water) and the absorbance was measured at 560 nm [29].

#### **2.6. HPLC analysis**

For High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis, 20 mg of the MfAE were weight, diluted with methanol 50% (v/v) to a volumetric flask of 2 mL and filtered through a 0.45  $\mu$ m PVDF membrane (Macherey-Nagel®) to sample injection. The system was the Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific®, EUA) coupled to a photodiode array detector (DAD; Thermo Fisher Scientific®) and equipped with a binary pump (HPG-3x00RS; Thermo Fisher Scientific®), degasser, and automatic sampler loop volume of 20  $\mu$ L (ACC-3000; ThermoFisher Scientific). The wavelength for the analyzes was set at 270 nm.

The chromatographic separation was performed at 26 °C using a column Dionex® C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm d.i., 5  $\mu$ m) equipped with pre-column Phenomenex® (C<sub>18</sub>; 4 mm  $\times$  3.9  $\mu$ m). The mobile phase was consisted of solvent A (purified water, Purelab Classic UV, Elga®) and solvent B (methanol, HPLC grade, Tedia®), both acidified with 0.05% trifluoroacetic acid (Vetec®), and the flow rate was adjusted to 0.9 mL/min. The following gradient program was used: 0-10 min, 10-2% B; 10-13,5 min, 20-25% de B; 13,5-18 min, 25-40% de B; 18-25 min, 40-80% B; 25-30 min, 80% de B; 30-35 min, 80-10% de B. The content of the substances found in MfAE was determined from the calibration curves using gallic acid (96% of purity) or ellagic acid (95% of purity), both purchased from Sigma® (USA).

#### **2.7. Ethical statement**

All procedures using animals were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Pernambuco, Brazil (CEUA-UFPE;

Process Number: 0003/2018). The proposal was approved in the meeting of CEUA-UFPE performed in April 23, 2018.

## 2.8. Animals

The experiments were conducted using male Swiss mice (30-35 g, 10 weeks) supplied by the Immunopathology Laboratory Keizo Asami (LIKA). The animals received food and water standard ad libitum with light/dark period of 12 h. Before each experiment (6-8 h), animals were limited to a water-only diet to avoid food-borne interference with substance absorption.

## 2.9. Evaluation of acute toxicity

The acute toxicity of MfAE was analyzed in two steps. Phase 1: animals were divided into three groups ( $n=3$ ) that received MfAE at doses of 10 mg/kg, 100 mg/kg and 1000 mg/kg. The animals are placed under observation for 24 hours to monitor their behavior and survival. Phase 2: MfAE was administered higher doses (1600, 2900 and 5000 mg/kg; one mice per dose) and then the behavior and survival were observed for 24 hours [30]. The LD<sub>50</sub> was calculated by the formula:

$$LD_{50} = \sqrt{(D_0 \times D_{100})}$$

$D_0$  = Highest dose that did not induce mortality,

$D_{100}$  = Lowest dose that produced mice mortality.

## 2.10. Anti-inflammatory assay

The *in vivo* anti-inflammatory action of MfAE was evaluated by carrageenan-induced paw edema. For this, mice were allocated into four groups ( $n=6$ ) that received the following treatments: (i) MfAE at 50 mg/kg; (ii) MfAE at 100 mg/kg; (iii) vehicle (0.9% saline solution); or (iv) indomethacin (20 mg/kg). After 1 h, paw edema was induced by an injection of 2% carrageenan solution (15  $\mu$ L/animal) in the subplantar region of the right hind paw [31]. As control, saline solution (0.9%; 15  $\mu$ L)

was injected in the left hind paw. Paw volume was measured using a pachymeter (1h, 2h, 3h, 4h and 5h) [32]. Inhibition of edema was calculated by the difference between the volume of right and left paws.

## **2.11. Antinociceptive assays**

### **2.11.1. Abdominal pain induced by acetic acid**

The mice were divided into four groups ( $n=6$ ) and were treated as described above. The nociception was induced by an intraperitoneal injection of acetic acid (0.8%; 100 mL/10 g). After the injection, the number of abdominal contortions was recorded between 5 min to 15 min [33].

### **2.11.2. Formalin assay**

In this assay, the animals were distributed in five groups ( $n=6$ /group) that received the following treatments: (i) vehicle; (ii) MfAE at 50 mg/kg; (iii) MfAE at 100 mg/kg; (iv) indomethacin (20 mg/kg); (v) and morphine (10 mg/kg). After 1 h, the formalin solution (2.5% in 0.9% saline; 20  $\mu$ L/paw) was administered in subplantar area of right hind paw [34]. Mice were observed in a chamber with a mirror mounted on three sides to allow the observation of the paws. The time (in seconds) spent for licking and biting the injected paw was measured as an indicator of pain. This response was measured for 5 minutes (first phase, neurogenic pain) and between 15 and 30 minutes after formalin injection (second phase, inflammatory pain). To evaluate the possible involvement of the opioid system in the antinociceptive effect of MfAE, the mice were treated with naloxone (1 mg/kg, *i.p.*) 30 minutes prior to administration of MfAE (100 mg/kg, *v.o.*), morphine (10 mg/kg, *v.o.*).

## **2.12. Statistical analysis**

The *in vitro* assays were performed in triplicates in at least two independent assays. The results were expressed as mean ( $\pm$  standard error). The difference between means was tested for statistical significance using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. The IC<sub>50</sub> (concentration that inhibits 50%) was calculated by linear regression. In the

statistical analysis of the results, the value of  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Phytochemical analysis

The yield of each extract were 6.60%, 2.05%, 5.17%, 49.27%, for MfEeE, MfCE, MfAE and MfME, respectively. The chromatographic profile of the extracts from *M. floribunda* fruit barks revealed the presence of several classes of secondary metabolites (Table 1). In the MfEeE and MfCE were found monoterpenes, triterpenes, sesquiterpenes and steroids. MfAE is composed by flavonoids, phenylpropanoids, traces of triterpenes and steroids, saponins and hydrolysable tannins. On the other hand, MfME and MfAqE have flavonoids, polymeric proanthocyanidins and traces of hydrolysable tannins.

Some classes of secondary metabolites detected in the extracts from fruit barks of *M. floribunda* have been already described for the genus *Myrciaria*; such as steroids, proanthocyanidins, flavonoids and hydrolysable tannins [17,18,35]. In addition, the edible parts of the *M. floribunda* fruits are composed by carotenoids (lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, 13-cis- $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, 9-cis- $\beta$ -carotene), flavonoids (rutin), and phenolic acids (gallic acid and ellagic acid) [16].

#### 3.2. Comparative analysis of the concentration of total phenols, flavonoids and monomeric anthocyanins.

In order to select the extract with the highest potential, we performed a comparative evaluation of the amount of phenols, flavonoids and monomeric anthocyanins. The content of total phenols varied among the extracts from 7.54 mg GAE/g to 296.27 mg GAE/g (Table 2). The highest phenol content was obtained for MfAE (296.27 mg GAE/g) (Table 2).

The levels of total flavonoid content ranged from 0.74 mg QE/g to 16.62 mg QE/g (Table 2). The MfEeE showed the highest concentration (16.62 mg QE/g). Finally, the content of monomeric anthocyanins ranged from 4.34 to 35.65 mg Cy-3-glcE/g (Table 2) and MfAE showed the highest content (35.65 Cy-3-glcE/g). In

summary, MfAE showed the highest content of phenolic compounds and anthocyanins. These classes of compounds have been associated with several beneficial properties of foods and medicinal plants [36-38].

### 3.3. Comparative evaluation of antioxidant activity

Following, four antioxidant assays were employed to select the extract with the best potential (Table 3). In the DPPH assay, the lower IC<sub>50</sub> value was found for MfAE (63.84 µg/mL), followed by MfME (343.12 µg/mL), MfAqE (350.41 v) and MfEeE (854.94 µg/mL). Similarly, MfAE showed the highest ability to inhibit the ABTS radical (1630.11 µM TEAC/g) and total antioxidant capacity (123.91%). Finally, only MfAE and MfME were able to sequester the superoxide radical, with IC<sub>50</sub> values of 260.27 µg/mL and 446.31 µg/mL, respectively (Table 3).

The highest antioxidant action exhibited by MfAE may be explained by its higher content of anthocyanins and phenolic compounds, since the levels of these phytocompounds showed positive correlations with the results obtained in the *in vitro* antioxidants assays (Table 3). In addition, MfAE presented a phytochemical profile with different classes of secondary metabolites, such as flavonoids, phenylpropanoids, triterpenes, saponins and hydrolysable tannins. Taken together, the results suggest that MfAE is the most promise extract, leading us to select it for the *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive evaluation.

### 3.4. HPLC analysis of the acetonic extract of *M. floribunda*

The chromatographic profile of the acetone extract from bark of the fruit (MfAE) are shown in figure 1. The analysis revealed the presence of gallic acid (peak 1, with retention time of 7.56 min), and an indicative presence of ellagic acid (peak 7, with retention time 25.52 min). The other peaks (2 to 6) are gallic acid derivatives. The contents of the compounds were calculated as:  $0.29 \pm 0,0012$  g % gallic acid;  $0.33 \pm 0,0204$  g% of gallic acid (derivatives, peaks of 2 to 6);  $0.54 \pm 0,0012$  g% ellagic acid. The evidenced peaks, gallic acid and ellagic acid, were identified by comparing the retention times and UV spectra of standards. Also were confirmed by spiking the sample with a small amount of the standards solutions. Both gallic acid and ellagic acid were previously detected in the fruit of *M. floribunda* [16].



Gallic acid and ellagic acid (and their derivatives) are usually found in fruits and other plant-derived products [36,39]. with antioxidant activity, including those from *Myrciaria* genus [40,41]. Furthermore, some works have reported that these compounds are potent anti-inflammatory, analgesic and neuroprotective agents [41-43].

### **3.5. Acute toxicity**

The oral lethal dose (LD<sub>50</sub>) of acetonic extract was greater than 2000 mg/kg (LD<sub>50</sub>= 2.154,06 mg/kg), then it can be classified as a low toxic agent according to the Organization for Economic Cooperation and Development [44]. Thus, the doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg were selected to be applied in the *in vivo* assays.

### **3.6. Anti-inflammatory activity**

The *in vivo* anti-inflammatory of MfAE was evaluated in a model where the formation of edema was induced by carrageenan. The animals treated with both doses of MfAE demonstrated significant reductions of paw edema, in all periods evaluated, when compared to vehicle-treated groups ( $p < 0.001$ ) (Figure 2). Maximum inhibition (98.87%) was observed for 2 h treatment with MfAE at 100 mg/kg. For the dose of 50 mg/kg the higher effect (93.75%) was observed after 5h. The reference drug indomethacin (20 mg/kg) exhibited maximum inhibition (96.22%) after 3h of treatment.

Carrageenan-induced paw edema is an experimental model useful for evaluation of new agents acting on acute inflammation [45-47]. This test is considered a biphasic event, in the initial phase (1 h to 3 h) the release of inflammatory mediators such as histamine, serotonin and bradykinin occurs; while in the late phase (3h to 4h) occurs the synthesis cyclooxygenase 2 (COX-2) isoform is produced, leading to prostaglandins and nitric oxide release [48,49]. MfAE reduced the edema during the five hours observed, suggesting that it acts in both phases of the acute inflammatory process. Further, extracts from other *Myrciaria* plants also exhibited anti-inflammatory action in this model [45,46].

### **3.7. Antinociceptive activity**

The treatment with both doses of MfAE ( 50 and 100 mg/kg) also significantly inhibited the number of contortions (95.16% and 95.59%, respectively), compared to vehicle (saline) ( $p < 0.001$ ). There were no differences between the different concentrations, nor in relation to the indomethacin control (Figure 3). In this test, acetic acid induces nociception through a mechanism that depends on the resident cells (macrophages and mast cells) presented at the peritoneal cavity. These cells release cytokines (TNF- $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  and interleukin 8) that are involved in the contortion response [50]. However, this model cannot infer whether the antinociceptive action of MfAE is central or peripheral.

Regarding the formalin test, the results shown in Figure 4 reveal that in the first phase (neurogenic phase) of the test, only the concentration of 100 mg/kg showed a significant reduction of licking (86.52%;  $p < 0.001$ ). Morphine (10 mg/kg) induced a reduction of 83.98% at this stage. However, in the second phase (inflammatory phase), both concentrations of MfAE had a significant reduction in licking time ( $p < 0.001$ ). The inhibition was 69.47% and 82.58% for MfAE at 50 mg/kg and 100 mg/kg, respectively. Positive controls, indomethacin (20 mg/kg) and morphine (10 mg/kg) inhibited 76.45% and 94.91% of licking, respectively. Naloxone reverted the effects of MfAE only in the neurogenic phase.

The formalin test is a nociception model based on a biphasic pain response; it is a useful tool to investigate whether the action of new agents has an analgesic and anti-inflammatory effect [51]. In the first phase (neurogenic pain) which occurs up to 5 min after the injection of formalin in the paw, the direct chemical stimulation on nociceptors activates the afferent fibers and leads for the release of substance P. In the inflammatory phase (15 min to 30 min after the injection) occurs the release of inflammatory mediators, triggering a peripheral inflammatory response [34,52].

Centrally acting analgesic drugs (such as morphine) are able to inhibit both phases of the formalin test; in contrast, peripherally acting drugs (such as indomethacin) inhibit only the second phase [53]. Our results demonstrate that MfAE at the dose of 100 mg/kg can reduce both phases of the nociceptive response ( $p < 0.001$ ). In the first phase the analgesic effect of MfAE (100 mg/kg) was mediated by the action on the opioid receptors, as naloxone reversed the effect of MfAE. This observation is attributed to the opioidergic mechanism that has been antagonized in the administration of naloxone (selective opioid receptor antagonist).

#### 4. Conclusion

The results of this work show that the extracts from the peels of *M. floribunda* fruits are sources of compounds with antioxidant activity. The use of peels, a possible residue of fruit consumption represents a sustainable application of these natural products. In addition, the comparative analysis of antioxidant and phytochemical profiles allowed the selection of MfAE (a fraction rich in phenolic compounds and anthocyanins) as an agent high pharmacological potential. MfAE also showed significant anti-inflammatory and antinociceptive activities (effect involving the opioidergic system). Considering the present results, the fruit peels of *M. floribunda* are sources of high-value bioactive compounds that may contribute for several beneficial effects associated with the consumption of this fruit. In this sense, the fruit bark can be used for development of functional foods and nutraceuticals.

#### Acknowledgment

The authors thank the support given by the Laboratory of Natural Products and Laboratory of Molecular Biology, Department of Biochemistry of the Federal University of Pernambuco (UFPE).

#### Funding information

This work was supported by the following Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant number 405297/2018-1 and 307110/2018-4), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0493-4.03/14) and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (BEPP-02241/18).

#### Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest to declare.

#### Authors Contribution

IBSS, AGS, MTSC and MVS conceived the study and performed the study design. IBSS, JRSO, AGS, WKC and MVS collected the plant material, performed the botanical identification and extracts preparation. IBSS, BSS, JRSO, WKC, performed

the *in vivo* and *in vitro* assays. MRAF, RMX, LALS performed the chemical characterization of the extracts. IBSS, BSS, AZ, LCNS, PMGP, VLML, MTSC, MVS, MRAF, RMX, LALS interpreted and discussed the results. IBSS, BSS, AZ, LCNS and MVS drafted and revised the manuscript. All authors approved the final version of this manuscript.

## References

1. Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit Rev Toxicol* 2015; 45(9): 765-798.
2. Nascimento da Silva LC, Bezerra Filho CM, Paula RA, Silva ESCS, Oliveira de Souza LI, Silva MV, Correia MT, Figueiredo RC. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. *Free Radic Res* 2016; 50(8): 801-812.
3. Pena-Bautista C, Baquero M, Vento M, Chafer-Pericas C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clin Chim Acta* 2019; 491: 85-90.
4. Ihsan AU, Khan FU, Khongorzul P, Ahmad KA, Naveed M, Yasmeen S, Cao Y, Taleb A, Maiti R, Akhter F, Liao X, Li X, Cheng Y, Khan HU, Alam K, Zhou X. Role of oxidative stress in pathology of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and male infertility and antioxidants function in ameliorating oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 714-723.
5. Hossen I, Hua W, Ting L, Mehmood A, Jingyi S, Duoxia X, Yanping C, Hongqing W, Zhipeng G, Kaiqi Z, Fang Y, Junsong X. Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019: 1-25.
6. Sousa LP, Alessandri AL, Pinho V, Teixeira MM. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13(4): 625-631.
7. Chahdoura H, El Bok S, Refifa T, Adouni K, Khemiss F, Mosbah H, Ben-Attia M, Flamini G, Achour L. Activity of anti-inflammatory, analgesic and antigenotoxic of the aqueous flower extracts of *Opuntia microdasys* Lem.Pfeiff. *J Pharm Pharmacol* 2017; 69(8): 1056-1063.
8. Quinones OG, Hossy BH, Padua TA, Miguel NCO, Rosas EC, Ramos MFS, Pierre MBR. Copaiba oil enhances in vitro/in vivo cutaneous permeability and in vivo anti-inflammatory effect of celecoxib. *J Pharm Pharmacol* 2018; 70(7): 964-975.

9. Kumar A, Singh S, Kumar A, Bawankule DU, Tandon S, Singh AK, Verma RS, Saikia D. Chemical composition, bactericidal kinetics, mechanism of action, and anti-inflammatory activity of *Isodon melissoides* (Benth.) H. Hara essential oil. *Nat Prod Res* 2019; 1-6.
10. Lim DW, Kim JG, Kim YT. Analgesic Effect of Indian Gooseberry (*Emblica officinalis* Fruit) Extracts on Postoperative and Neuropathic Pain in Rats. *Nutrients* 2016; 8(12).
11. Serafini M, Peluso I. Functional Foods for Health: The Interrelated Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Fruits, Vegetables, Herbs, Spices and Cocoa in Humans. *Curr Pharm Des* 2016; 22(44): 6701-6715.
12. Basu A, Schell J, Scofield RH. Dietary fruits and arthritis. *Food Funct* 2018; 9(1): 70-77.
13. Gasparrini M, Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Afrin S, Cianciosi D, Reboredo-Rodriguez P, Varela-Lopez A, Zhang J, Quiles JL, Mezzetti B, Bompadre S, Battino M. Strawberry extracts efficiently counteract inflammatory stress induced by the endotoxin lipopolysaccharide in Human Dermal Fibroblast. *Food Chem Toxicol* 2018; 114: 128-140.
14. Peluso I, Villano Valencia D, Chen CO, Palmery M. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Microbial-Modulating Activities of Nutraceuticals and Functional Foods 2018. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 3824509.
15. Leal NRF, Vigliano MV, Pinto FA, de Sousa TV, Velozo LSM, Sabino KCC, Justo MDG, Coelho MGP. Anti-inflammatory effect of diterpenes-enriched fractions from *Pterodon polygalaeflorus* through inhibition of macrophage migration and cytokine production. *J Pharm Pharmacol* 2018; 70(6): 808-820.
16. de Oliveira LM, Porte A, de Oliveira Godoy RL, da Costa Souza M, Pacheco S, de Araujo Santiago MCP, Gouvea A, da Silva de Mattos do Nascimento L, Borguini RG. Chemical characterization of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd) fruit. *Food Chem* 2018; 248: 247-252.
17. de Azevedo MML, Cascaes MM, Guilhon G, Andrade EHA, Zoghbi M, da Silva JKR, Santos LS, da Silva SHM. Lupane triterpenoids, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg. *Nat Prod Res* 2017: 1-10.
18. Tietbohl LAC, Oliveira AP, Esteves RS, Albuquerque R, Folly D, Machado FP, Correa AL, Santos MG, Ruiz ALG, Rocha L. Antiproliferative activity in tumor cell

lines, antioxidant capacity and total phenolic, flavonoid and tannin contents of *Myrciaria floribunda*. *An Acad Bras Cienc* 2017; 89(2): 1111-1120.

19. Brassuer T, Angenot L. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol—PEG 400: Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. *Journal of Chromatography A* 1986; 351: 351-355.

20. Richardson PM. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. *Brittonia* 1990; 42(2): 115-115.

21. Roberts E, Cartwright R, Oldschool M. The phenolic substances of manufactured tea. I.—Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1957; 8(2): 72-80.

22. Wagner H, Bladt S. Flavonoid drugs including Ginkgo Biloba and Echinaceae Species. *Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas* 1996: 195-245.

23. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 1965; 16(3): 144-158.

24. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research* 1998; 37(2): 99-105.

25. Hosseinian FS, Li W, Beta T. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry* 2008; 109(4): 916-924.

26. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology* 1995; 28(1): 25-30.

27. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical G. ed.: Paganga.

28. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry* 1999; 269(2): 337-341.

29. Kunchandy E, Rao M. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics* 1990; 58(3): 237-240.

30. Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology* 1983; 54(4): 275-287.

31. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 1962; 111(3): 544-547.
32. Huang G-J, Pan C-H, Liu F-C, Wu T-S, Wu C-H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW246.7 macrophages and the  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema model. *Food and chemical toxicology* 2012; 50(5): 1485-1493.
33. Collier H, Dinneen L, JOHNSON CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 1968; 32(2): 295-310.
34. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30(1): 103-114.
35. Plaza M, Batista AG, Cazarin CB, Sandahl M, Turner C, Ostman E, Marostica Junior MR. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. *Food Chem* 2016; 211: 185-197.
36. Burri SCM, Ekholm A, Hakansson A, Tornberg E, Rumpunen K. Antioxidant capacity and major phenol compounds of horticultural plant materials not usually used. *J Funct Foods* 2017; 38(Pt A): 119-127.
37. Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *Br J Pharmacol* 2017; 174(11): 1226-1243.
38. Zhang Y, Pechan T, Chang SKC. Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activities of phenolic extracts and fractions derived from three phenolic-rich legume varieties. *J Funct Foods* 2018; 42: 289-297.
39. Altieri F, Cairone F, Giamogante F, Carradori S, Locatelli M, Chichiarelli S, Cesa S. Influence of Ellagitannins Extracted by Pomegranate Fruit on Disulfide Isomerase PDIA3 Activity. *Nutrients* 2019; 11(1).
40. Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Tomas-Barberan FA. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chem* 2013; 139(1-4): 578-588.
41. Zhao DK, Shi YN, Petrova V, Yue GGL, Negrin A, Wu SB, D'Armiento JM, Lau CBS, Kennelly EJ. Jaboticabin and Related Polyphenols from Jaboticaba ( *Myrciaria*

cauliflora) with Anti-inflammatory Activity for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Agric Food Chem* 2019; 67(5): 1513-1520.

42. Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Talas ZS, Nabavi SM. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! *Curr Pharm Biotechnol* 2014; 15(4): 362-372.

43. BenSaad LA, Kim KH, Quah CC, Kim WR, Shahimi M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17(1): 47.

44. OCDE. Acute oral Toxicity: Up and Down Procedure. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals* 2008; 425: 1-2.

45. Apel MA, Lima ME, Sobral M, Young MCM, Cordeiro I, Schapoval EE, Henriques AT, Moreno PRH. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. *Pharmaceutical biology* 2010; 48(4): 433-438.

46. Yazawa K, Suga K, Honma A, Shirosaki M, Koyama T. Anti-inflammatory effects of seeds of the tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Journal of nutritional science and vitaminology* 2011; 57(1): 104-107.

47. Dev SK, Choudhury PK, Srivastava R, Sharma M. Antimicrobial, anti-inflammatory and wound healing activity of polyherbal formulation. *Biomed Pharmacother* 2018; 111: 555-567.

48. Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2009; 19(1B): 212-217.

49. Ferreira LC, Grabe-Guimarães A, de Paula CA, Michel MC, Guimarães RG, Rezende SA, de Souza Filho JD, Saúde-Guimarães DA. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 145(1): 100-108.

50. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 387(1): 111-118.



51. Basting RT, Nishijima CM, Lopes JA, Santos RC, Périco LL, Laufer S, Bauer S, Costa MF, Santos LC, Rocha LR. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. *Journal of ethnopharmacology* 2014; 157: 257-267.
52. Tjølsen A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51(1): 5-17.
53. Viscardi DZ, da Silva Arrigo J, Correia CdAC, Kassuya CAL, Cardoso CAL, Maldonade IR, Argandoña EJS. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. *PloS one* 2017; 12(2): e0157107.

**Table 1.** Phytochemical analysis of extracts from fruit peels of *Myrciaria floribunda*.

| <b>Class of secondary metabolites</b>          | <b>Extracts</b> |             |                |                |                |
|------------------------------------------------|-----------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
|                                                | <b>MfEeE</b>    | <b>MfCE</b> | <b>MfAE</b>    | <b>MfME</b>    | <b>MfAqE</b>   |
| <b>Flavonoid</b>                               | -               | -           | + <sup>1</sup> | + <sup>1</sup> | + <sup>1</sup> |
| <b>Phenylpropanoid</b>                         | -               | -           | +              | -              | -              |
| <b>Triterpene</b>                              | +++             | ++          | tr             | -              | -              |
| <b>Steroid</b>                                 | +++             | ++          | tr             | -              | -              |
| <b>Saponin</b>                                 | -               | -           | +              | -              | -              |
| <b>Monoterpene and Sesquiterpene</b>           | +++             | ++          | -              | -              | -              |
| <b>Alkaloid</b>                                | -               | -           | -              | -              | -              |
| <b>Coumarin</b>                                | -               | -           | -              | -              | -              |
| <b>Quinone</b>                                 |                 | -           | -              | -              | -              |
| <b>Proanthocyanidin and leucoanthocyanidin</b> | -               | -           | -              | + <sup>2</sup> | + <sup>2</sup> |
| <b>Hydrolysable tannin</b>                     | -               | -           | +++            | tr             | tr             |

Legend: (-) absent; (+) weak; (++) medium; (+++) strong; (tr) traces; extracts MfEeE (ethyl ether), MfCE (chloroform), MfAE (acetone), MfME (methanol), MfAqE (aqueous).

Note: (1) 3',4'-OH flavonoids (aglycones, mono, di, and triheterosides); (2) Polymeric proanthocyanidins.

**Table 2.** Concentration of total phenols, total flavonoids and monomeric anthocyanins in different extracts obtained from fruit barks of *M. floribunda*.

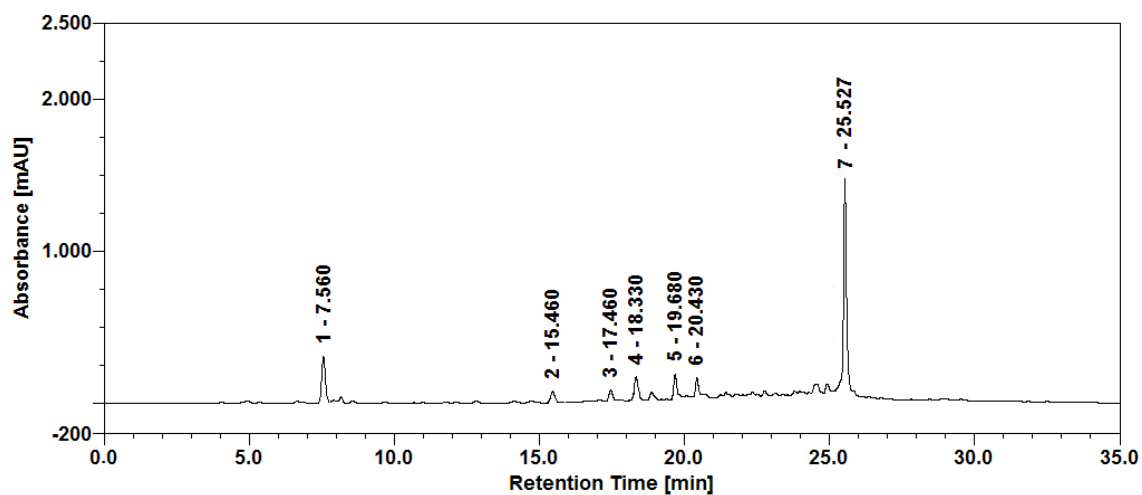
| <b>Samples</b> | <b>Total phenol<br/>content (mg GAE/g)</b> | <b>Total flavonoid<br/>content (mg QE/g)</b> | <b>Anthocyanin<br/>content (mg Cy-<br/>3-glucE/g)<sup>3</sup></b> |
|----------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| MfEeE          | 7.54                                       | 16.62                                        | ND                                                                |
| MfCE           | ND                                         | 3.46                                         | ND                                                                |
| MfAE           | 296.27                                     | 0.74                                         | 35.65                                                             |
| MfME           | 158.29                                     | ND                                           | 4.34                                                              |
| MfAqE          | 62.28                                      | ND                                           | 14.42                                                             |

Legend: ND = Not detected; extracts MfEeE (ethyl ether), MfCE (chloroform), MfAE (acetone), MfME (methanol), MfAqE (aqueous).

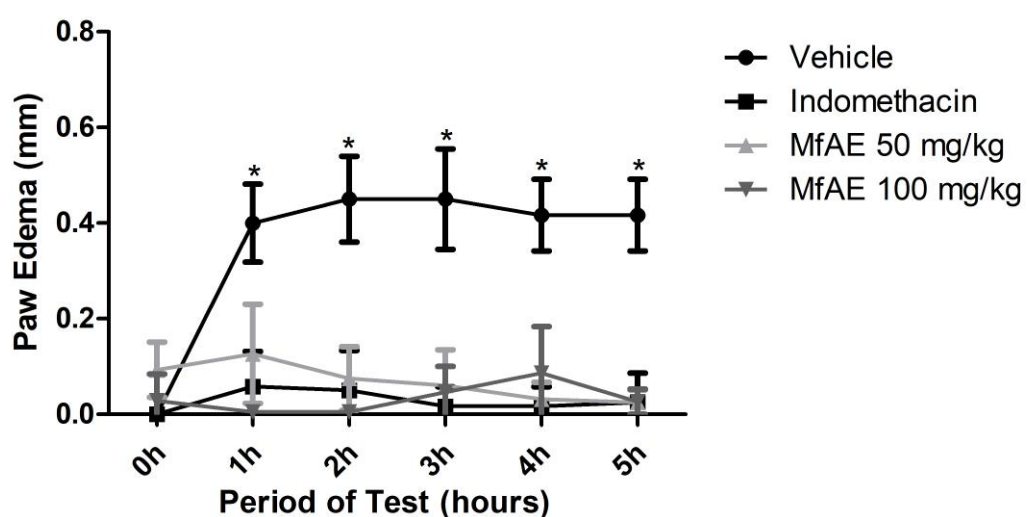
**Table 3.** Antioxidant activity of the fruit barks extracts of *Myrciaria floribunda*.

| Samples     | DPPH                        | ABTS <sup>+</sup> | TAC (%) | Superoxide                  |
|-------------|-----------------------------|-------------------|---------|-----------------------------|
|             | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL) | µM TEAC/g         |         | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL) |
| MfEeE       | 854.94                      | 597.89            | 109.45  | > 1000                      |
| MfCE        | > 1000                      | 347.89            | 68.87   | > 1000                      |
| MfAE        | 63.84                       | 1630.11           | 107.43  | 260.27                      |
| MfME        | 343.12                      | 660.11            | 102.82  | 446.31                      |
| MfAqE       | 350.41                      | 793.44            | 123.91  | NT                          |
| Gallic acid | 3.46                        | -                 | -       | -                           |

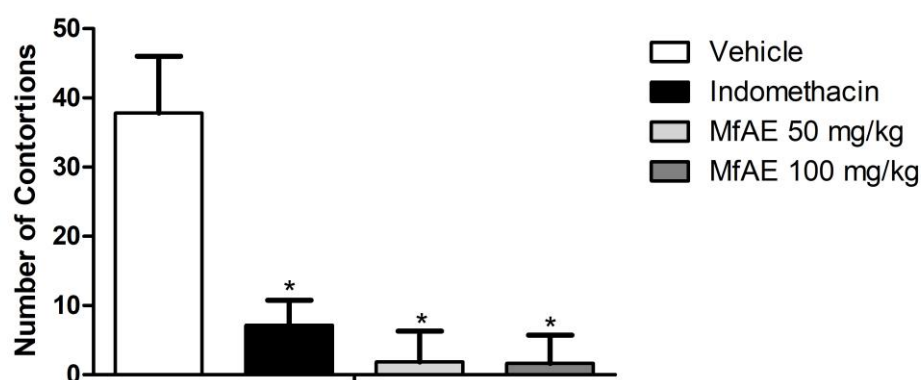
Legend: IC<sub>50</sub> = Concentration required to reduce 50% of the DPPH or superoxide radical; TEAC = Trolox equivalent antioxidant capacity; NT = not tested; extracts MfEeE (ethyl ether), MfCE (chloroform), MfAE (acetone), MfME (methanol), MfAqE (aqueous).



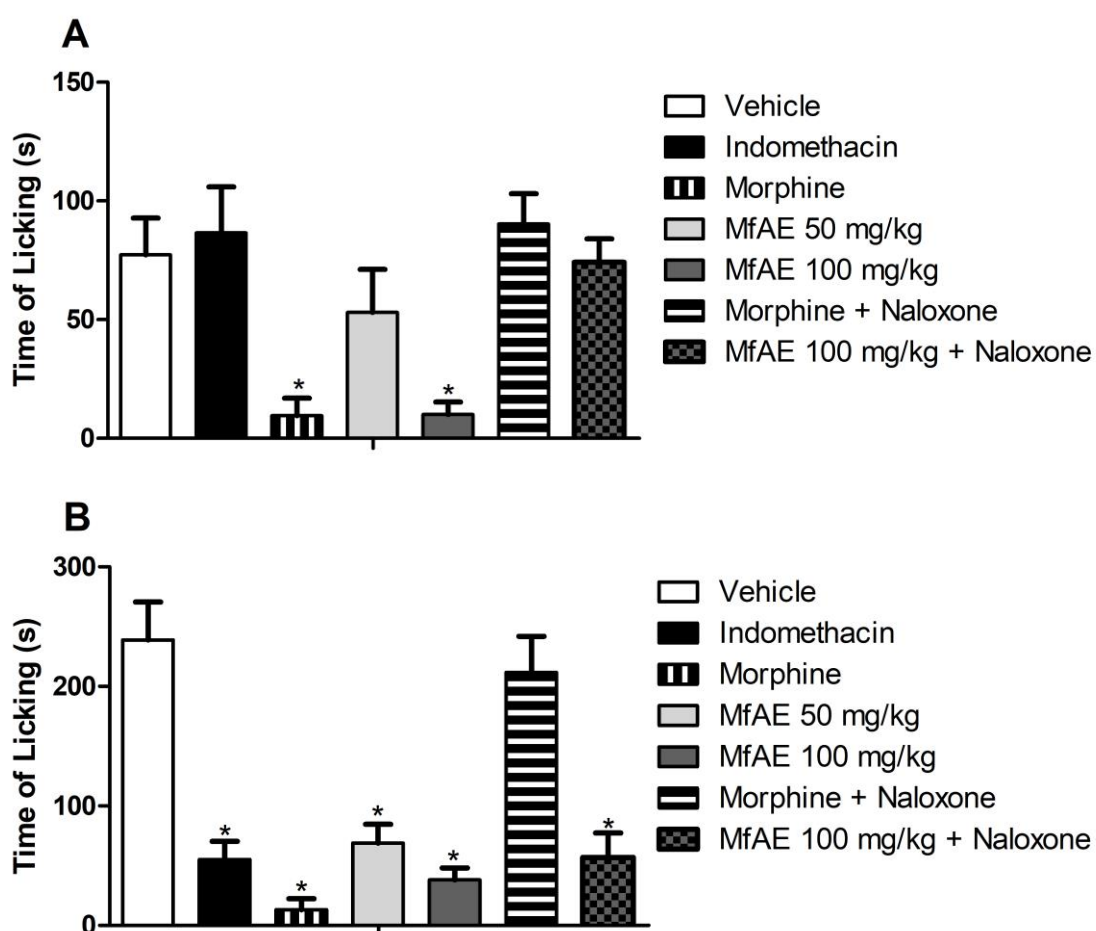
**Figure 1** – Chromatographic profile of the phenolic acids from acetone extract (MfAE). The extract was analyzed by HPLC at 270 nm. Detected compounds: (1) gallic acid, (2 to 6) gallic acid derivatives, (7) ellagic acid.



**Figure 2.** Effect of the acetone extract of the fruit peels of *Myrciaria floribunda* (MfAE, 50 and 100 mg / kg, p.o) on carrageenan-induced paw edema. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of the six animals. Asterisks indicate significance compared with vehicle group \*  $p < 0.001$ , two-way ANOVA.



**Figure 3.** Effect of the acetone extract of the fruit peels of *Myrciaria floribunda* (MfAE, 50 and 100 mg/kg, p.o) on the abdominal contortion induced by acetic acid. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of the number of contortions of the six animals. Asterisks indicate significance compared with vehicle group \*  $p < 0.001$ , one-way ANOVA.



**Figure 4.** Effect of the acetone extract of the fruit peels of *Myrciaria floribunda* (MfAE, 50 and 100 mg / kg, p.o) on the formalin test. Stage 1: 0 to 5 minutes of test, neurogenic phase; Stage 2: 15 to 30 minutes of test, inflammatory phase. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of the six animals. Asterisks indicate significance compared to the vehicle group, \*  $p < 0.001$ , one-way ANOVA.



## 5 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que os extratos da casca do fruto de *M. floribunda* MfME, MfAE e MfAqE são fontes de diversos metabólitos secundários e que apresentaram atividade antioxidante. A análise comparativa do perfil antioxidante e fitoquímico permitiu a seleção do MfAE como um agente de alto potencial farmacológico. MfAE apresentou baixa toxicidade aguda por via oral. Observou-se que MfAE possui atividade anti-inflamatória significativa, durante todo o período do teste de inflamação aguda. O MfAE também apresentou atividade antinociceptiva periférica e central significativa (efeito envolvendo o sistema opioide).

Os resultados indicam que a casca do fruto de *M. floribunda* é uma fonte promissora de compostos ativos com diferentes atividades biológicas. O uso de cascas, um possível resíduo do consumo de frutas, representa uma aplicação sustentável desses produtos naturais.

A continuação da pesquisa de *M. floribunda* deve ser realizada para isolar e identificar os compostos ativos responsáveis por tais atividades analisadas, elucidar os mecanismos de ação, auxiliar no desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos eficazes ou permitir o uso desse produto natural como alternativa terapêutica segura e eficaz.

## REFERÊNCIAS

ALCANTARA, R. G. L.; JOAQUIM, R. H. V. T.; SAMPAIO, S. F. Plantas Medicinais: O conhecimento e uso popular. **Revista de APS**, v. 18, n. 4, p. 470–482, 2015. Disponível em: <https://aps.ufjf.emnuvens.com.br/aps/article/view/2588/911>. Acesso em: 6 nov. 2018.

ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913003840>. Acesso em: 14 jun. 2019.

AMORIM, A. M. et al. Espécies reativas de oxigênio em plantas. **VI Botânica no Inverno**, 2016.

ANDRADE, R. S. et al. A restinga como recurso para as comunidades costeiras: o caso da comunidade quilombola Santa Cruz - Brejo Grande, SE. **Grupo Costeiros**, v. 3, p. 1-16, 2016.

ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in primary health care. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 3, p. 541–553, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/rsp/2014.v48n3/541-553/pt/>. Acesso em: 6 nov. 2018.

APEL, M. A. et al. Screening of the Biological Activity From Essential Oils of Native Species From the Atlantic Rain Forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacologyonline**, v. 3, n. January, p. 376–383, 2006. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Paulo\\_Moreno/publication/228504336\\_Screening\\_of\\_the\\_biological\\_activity\\_from\\_essential\\_oils\\_of\\_native\\_species\\_from\\_the\\_Atlantic\\_Rain\\_Forest\\_Sao\\_Paulo-Brazil/links/0fcfd50acd4913be000000000/Screening-of-the-biological-activity-from-essential-oils-of-native-species-from-the-Atlantic-Rain-Forest-Sao-Paulo-Brazil.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Paulo_Moreno/publication/228504336_Screening_of_the_biological_activity_from_essential_oils_of_native_species_from_the_Atlantic_Rain_Forest_Sao_Paulo-Brazil/links/0fcfd50acd4913be000000000/Screening-of-the-biological-activity-from-essential-oils-of-native-species-from-the-Atlantic-Rain-Forest-Sao-Paulo-Brazil.pdf). Acesso em: 14 jun. 2019.

APEL, M. A. et al. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus* Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 4, p. 433-438, 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200903164386>. Acesso em: 14 jun. 2019.

AZEVEDO, M. M. L. DE et al. Lupane triterpenoids, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg. **Natural Product Research**, v. 6419, n. November, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2017.1402311>. Acesso em: 14 out. 2018.

AZEVEDO, L. F. et al. Evidence of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Plinia edulis* leaf infusion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 178–182, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411630424X>. Acesso em: 14 jun. 2019.

BAHARVAND-AHMADI, B. et al. An ethno-medicinal study of medicinal plants used for the treatment of diabetes. **Journal of Nephropathology**, v. 5, n. 1, p. 44–50, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4790187/>. Acesso em: 14 de jun. 2019.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867409012434>. Acesso em: 25 mar. 2019.

BJORKMAN, D. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. **The American Journal of Medicine**, v. 101, n. 1, p. 25–32, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934396001350>. Acesso em: 14 jun. 2019.

BLISS, T. V. P. et al. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 485–496, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrn.2016.68>. Acesso em: 25 mar. 2019.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>. Acesso em: 17 jun. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 31, p. 1-156, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política e programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **livro BRASIL**. n.1, p. 1-190, 2016.

BRASSUER, T.; ANGENOT, L. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG 400. Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. **Journal of Chromatography A**, v. 351, n. C, p. 351–355, 1986. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730183507X>. Acesso em: 14 jun. 2018.

BRIDGESTOCK, C.; RAE, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 480–483, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472029913002312>. Acesso em: 25 mar. 2019.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. DE M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675–2685, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/csc/2012.v17n10/2675-2685/pt/>. Acesso em: 12 nov. 2018.

CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 6, p. 401–418, 2002. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1099-1573\(200009\)14:6%3C401::AID-PTR762%3E3.0.CO;2-H](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1099-1573(200009)14:6%3C401::AID-PTR762%3E3.0.CO;2-H). Acesso em: 14 jun. 2019.

CALIXTO, J. B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v. 70, n. 2, p. 93–103, 2004. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2004-815483>. Acesso em: 14 jun. 2019.

CARTAXO-FURTADO, N. A. D. E. O. et al. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, supl. 3, p. 1091-1096, 2015.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448–464, 2004. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/%0D/rba/v54n3/en\\_v54n3a17.pdf](http://www.scielo.br/pdf/%0D/rba/v54n3/en_v54n3a17.pdf). Acesso em: 14 jun. 2019.

CAVALCANTE, A. G. DE M.; BRUIN, P. F. C. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1227–1237, 2009. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132009001200011&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132009001200011&script=sci_arttext&tlng=pt). Acesso em: 14 jun. 2019.

COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295–310, 1968. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x>. Acesso em: 14 jun. 2019.

CORDEIRO, J. M. .; FÉLIX, L. . Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 685–692, 2014. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Joel\\_Cordeiro/publication/281750564\\_Botanical\\_medical\\_knowledge\\_of\\_native\\_species\\_of\\_the\\_Caatinga\\_and\\_spontaneous\\_plants\\_in\\_the\\_Agreste\\_region\\_of\\_the\\_state\\_of\\_Paraiba\\_Brazil/links/5852e26208ae95fd8e1d752d/Botanical-medical-knowledge-of-native-species-of-the-Caatinga-and-spontaneous-plants-in-the-Agreste-region-of-the-state-of-Paraiba-Brazil.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Joel_Cordeiro/publication/281750564_Botanical_medical_knowledge_of_native_species_of_the_Caatinga_and_spontaneous_plants_in_the_Agreste_region_of_the_state_of_Paraiba_Brazil/links/5852e26208ae95fd8e1d752d/Botanical-medical-knowledge-of-native-species-of-the-Caatinga-and-spontaneous-plants-in-the-Agreste-region-of-the-state-of-Paraiba-Brazil.pdf). Acesso em: 21 nov. 2018.

CORONADO H, M. et al. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. **Revista chilena de nutricion**, v. 42, n. 7, p. 206–212, 2015. Disponível em: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071775182015000200014&script=sci\\_arttext](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071775182015000200014&script=sci_arttext). Acesso em: 9 jan. 2019.

DE FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: Construção, perspectivas e desafios. **Physis**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/physis/2014.v24n2/381-400/>. Acesso em: 6 nov. 2018.

DELEO, J. A. Basic science of pain. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, v. 88, n. SUPPL. 2, p. 58–62, 2006. Disponível em: [https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/2006/04002/BASIC\\_SCIENCE\\_OF\\_PAIN.12.aspx](https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/2006/04002/BASIC_SCIENCE_OF_PAIN.12.aspx). Acesso em: 18 ago. 2018.

DELEO, J. A.; WINKELSTEIN, B. A. Physiology of Chronic Spinal Pain Syndromes. **Spine**, v. 27, n. 22, p. 2526–2537, 2003. Disponível em: [https://journals.lww.com/spinejournal/Abstract/2002/11150/Physiology\\_of\\_Chronic\\_S](https://journals.lww.com/spinejournal/Abstract/2002/11150/Physiology_of_Chronic_S)

pinal\_Pain\_Syndromes\_\_From.26.aspx. Acesso em: 18 ago. 2018.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=A4zptjOJfKQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Medicinal+Natural+Products:+A+Biosynthetic+Approach:+Third+Edition&ots=whinK0OIVd&sig=zgnDNvPD92SDs-BJzoH2w3MaNhc#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 15 jun. 2019.

DIB-HAJJ, S. D. et al. Sodium Channels in Normal and Pathological Pain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 33, n. 1, p. 325–347, 2010. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-neuro-060909-153234>. Acesso em: 27 maio 2019.

DINIZ, D. N. et al. Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Revista de odontologia da UNESP (Online)**, v. 39, n. 3, p. 151–156, 2010.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661816000232>. Acesso em: 15 jun. 2019.

FERNANDES, M. F.; QUEIROZ, L. P. DE. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 4, p. 51–56, 2018. Disponível em: [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S000967252018000400014&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S000967252018000400014&script=sci_arttext&lng=pt). Acesso em: 19 nov. 2018.

FISCHER, L. G. et al. Further Antinociceptive Properties of Extracts and Phenolic Compounds from *Plinia glomerata* ( Myrtaceae ) Leaves. FISCHER, Luiz Gustavo et al. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 235-239, 2008. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/31/2/31\\_2\\_235/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/31/2/31_2_235/_article/-char/ja/). Acesso em: 15 jun. 2019.

FLORES, G. et al. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food Chemistry**, v. 170, p. 327–335, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614013004>. Acesso em: 15 jun. 2019.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance ? **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 5, p. 671–674, 2005. Disponível em: <http://jem.rupress.org/content/201/5/671.abstract>. Acesso em: 3 ago. 2018.

GOVAERTS, R. et al. World checklist of myrtaceae. **Royal Botanic Gardens**, p. 1-455, 2008. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103174822>. Acesso em: 15 jun. 2019.

GREENWELL, M.; RAHMAN, P. K. S. M. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. **International Journal of Pharmacological Science Research**, v. 6, n. 10, p. 4103–4112, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4650206/>. Acesso em: 15 jun. 2019.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 2007. Disponível em: <http://www.biochemsoctrans.org/content/35/5/1147.abstract>. Acesso em: 15 jun. 2019.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942207005730>. Acesso em: 15 jun. 2019.

HOSSEINIAN, F. S.; LI, W.; BETA, T. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 916–924, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608000964>. Acesso em: 15 jun. 2019.

HUANG, G. J. et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW246.7 macrophages and the  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1485–1493, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512000683>. Acesso em: 15 jun. 2019.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103–114, 1987. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304395987900881>. Acesso em: 12 fev 2018.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/7432797/abs/>. Acesso em: 16 mar. 2019.

IASP, T. F. ON T. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. **Classification of Chronic Pain**, p. 209–214, 1994. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/Content.aspx?ItemNumber=1673>. Acesso em: 15 jun. 2019.

INOUE, T. et al. Tropical fruit camu-camu ( *Myrciaria dubia* ) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of cardiology**, v. 52, n. 2, p. 127-132, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0914508708001500>. Acesso em: 14 mar. 2018.

JI, R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Pain Research**, v. 354, n. 6312, p. 572–577, 2016. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/354/6312/572.abstract>. Acesso em: 25 mar. 2019.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 13, p. 203–210, 2001. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35093019>. 25 mar. 2019.

JÚNIOR, L. R. P. et al. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 509–520, 2014.

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 111, n. 2, p. 476–494, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725805002767>. Acesso em: 30 jan. 2019.

KUNCHANDY, E.; RAO, M. N. A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, n. 3, p. 237–240, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037851739090201E>. Acesso em: 15 jun. 2019.



LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac/2005/00000088/00000005/art00002>. Acesso em: 4 jun. 2017.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. activities Jaboticaba peel : Antioxidant compounds , antiproliferative and antimutagenic. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912002888>. Acesso em: 14 jun. 2017.

LORKE, D. A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 275–287, 1983. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01234480>. Acesso em: 15 jun. 2019.

LOURENÇO, A. R. DE L.; BARBOSA, M. R. DE V. Myrtaceae em restingas no limite norte de distribuição da Mata Atlântica, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 2, p. 373–393, 2012. Disponível em: <http://rodriguesia-seer.jbrj.gov.br/index.php/rodriguesia/article/view/140>. Acesso em: 12 jun. 2017.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. SUPPL. 1, p. 232–240, 2006. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/sj.bjp.0706400>. Acesso em: 3 ago. 2018.

MACK, M. Inflammation and fibrosis. **Matrix Biology**, v. 68–69, p. 106–121, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X1730375X>. Acesso em: 15 jun. 2019.

MAGRO, T. C. et al. Protected areas and Place Making Conference: how do we provide conservation, landscape management, tourism, human health and regional development?. **Forestry Sciences Departament – ESALQ/USP**. p.1-204, 2013.

MAIONE, F. et al. Medicinal plants with anti-inflammatory activities. **Natural Product Research**, v. 30, n. 12, p. 1343–1352, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2015.1062761>. Acesso em: 15 jun. 2019.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**, v. 33, n. 1, p. 131–139, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00540-018-2579-4> Acesso em: 15 jun. 2019.

MENEZES, M. A. G. DE et al. Quantificação de antocianinas dos extratos de embiratanha (*Pseudobombax marginatum*). **HOLOS**, v. 1, p. 30–35, 2015. Disponível em: <http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/2459> Acesso em: 15 jun. 2019.

MITRA, S. K. Important Myrtaceae fruit crops. **Acta Horticulturae**, v. 849, p. 33–38, 2010. Disponível em: [https://www.actahort.org/books/849/849\\_2.htm](https://www.actahort.org/books/849/849_2.htm). Acesso em: 15 jun. 2019.

MITTAL, M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 2014. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.5149> Acesso em: 15 jun. 2019.

MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. A família Myrtaceae na reserva particular do patrimônio natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 7, n. 1, p. 3–32, 2006. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/68749>. Acesso em: 15 jun. 2019.

MOREIRA, F. A. Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae). **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, p. 93, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-09032016-084046/en.php>. Acesso em: 15 jun. 2019.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. December, p. 1–7, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature01320>. Acesso em: 3 ago. 2018.

OLIVEIRA, L. M. DE et al. Chemical characterization of *Myrciaria fl oribunda* ( H . West ex Willd ) fruit. **Food Chemistry**, v. 248, n. December 2017, p. 247–252, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617320186>. Acesso em: 5 fev. 2018.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Health benefits of phytochemicals from selected

Canadian crops. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 193-198, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224499000552>. Acesso em: 15 jun. 2019.

DANDEKAR; MENDEZ; ZHANG. Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. In: *Stress Responses*. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 205-214. Disponível em: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2522-3\\_15](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2522-3_15). Acesso em: 15 de jun. 2019.

PASSOS, L. . et al. A New B-Triketone and Antinociceptive Effect from the Essential Oil of the Leaves of *Calyptanthus restingae* Sobral (Myrtaceae). **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 05, n. 03, 2016. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Lucindo\\_QuintansJunior/publication/304929553\\_A\\_New\\_BTriketone\\_and\\_Antinociceptive\\_Effect\\_from\\_the\\_Essential\\_Oil\\_of\\_the\\_Leaves\\_of\\_Calyptanthus\\_restingae\\_Sobral\\_Myrtaceae/links/577d302e08aed39f598f6c1f.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Lucindo_QuintansJunior/publication/304929553_A_New_BTriketone_and_Antinociceptive_Effect_from_the_Essential_Oil_of_the_Leaves_of_Calyptanthus_restingae_Sobral_Myrtaceae/links/577d302e08aed39f598f6c1f.pdf). Acesso em: 16 ago. 2018.

PEIXOTO, H. et al. An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 6, p. 1283–1290, 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b05812>. Acesso em: 16 ago. 2018.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. November, p. 146–152, 2012. Disponível em: <https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Metab%C3%B3litos-secund%C3%A1rios-ARTIGO.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2018.

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. **Piracicaba: ESALQ/USP**, p. 1-10, 2004.

PHILLIPS, W. J.; CURRIER, B. L. Analgesic pharmacology: II. Specific analgesics. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 12, n. 4, p. 221–233, 2004. Disponível em: [https://journals.lww.com/jaaos/Abstract/2004/07000/Analgesic\\_Pharmacology\\_\\_II\\_\\_Specific\\_Analgesics.3.aspx](https://journals.lww.com/jaaos/Abstract/2004/07000/Analgesic_Pharmacology__II__Specific_Analgesics.3.aspx). Acesso em: 16 ago. 2018.

PILON, A. C. et al. NuBBE DB : An updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-07451-x>

.Acesso em: 15 jun. 2019.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471490616301430>. Acesso em: 25 mar. 2018.

PRADO, L. C. DA S. et al. The Gastroprotective Effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) Leaf Extract: The Possible Role of Condensed Tannins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 722–730, 2014. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/5/37\\_b13-00514/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/5/37_b13-00514/_article/-char/ja/). Acesso em: 15 jun. 2019.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269799940198> **Analytical Biochemistry**, v. 341, p. 337–341, 1999. Acesso em: 16 jun. 2017.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an improved ABTS radical. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, n. 109, p. 883–890, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608000836>. Acesso em: 16 jun. 2017.

RICHARDSON, P. M.; HARBORNE, J. B. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Second Edition. **Brittonia**, v. 42, n. 2, p. 115–115, 2006. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/K6X6TM437G354XX6.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2019.

ROBERTS, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, n. 2, p. 72–80, 1957. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2740080203>. Acesso em: 15 jun. 2019.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31–42, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v12n1/v12n1a06>. Acesso em: 12 mar. 2019.

ROTELLI, A. E. et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 6, p. 601–606, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661803002251>. Acesso em: 3 ago. 2018.

SÁNCHEZ-VALLE, V.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad ARTÍCULO DE REVISIÓN. **Rev Invest Med Sur Mex, Julio-Septiembre**, v. 20, n. 3, p. 161–168, 2013. Disponível em: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=79284>. Acesso em: 9 jan. 2019.

SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Jabuticaba As a Source of Functional Pigments. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, n. 5, p. 127–132, 2009. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093206992>. Acesso em: 15 fev. 2019.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 23–31, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877410002852> .Acesso em: 15 fev. 2019.

SARAIVA, M. E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141–153, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874115003669>. Acesso em: 20 fev. 2019.

SCHMITZ, M. L.; BACHER, S. Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, n. 1, p. 19–25, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-005-3260-8>. Acesso em: 3 ago. 2018.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11s, p. 1062–1067, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nn942>.

Acesso em: 18 ago. 2018.

SERAFIN, C. et al. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 578–582, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n4/a17v17n4>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SHAYGANNI, E. et al. Inflammaging and cardiovascular disease: Management by medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1119–1126, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711315003566>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.198610581>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SILVA, J. M. C. DA; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. **Caatinga: The largest tropical dry forest region in South America**. Springer, 2018. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=029GDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=Caatinga:+The+largest+tropical+dry+forest+region+in+South+America.&ots=QQSTKtgVO4&sig=Hfd9Fw87PjPSRqEadj6jIL32\\_Q#v=onepage&q=Caatinga%3A%20The%20largest%20tropical%20dry%20forest%20region%20in%20South%20America.&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=029GDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=Caatinga:+The+largest+tropical+dry+forest+region+in+South+America.&ots=QQSTKtgVO4&sig=Hfd9Fw87PjPSRqEadj6jIL32_Q#v=onepage&q=Caatinga%3A%20The%20largest%20tropical%20dry%20forest%20region%20in%20South%20America.&f=false). Acesso em: 15 jun. 2019.

SILVA, M. L. et al. Compostos fenólicos , carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds , carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010. Disponível em: <https://www.redalyc.org/html/4457/445744097017/>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SILVEIRA, S. et al. Atividade anticolinesterásica dos frutos de *Myrcianthes pungens* (o. Berg) D.LEGRAND (MYRTACEAE). **Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar**, v. 15, n. 2, p. 127–133, 2011. Disponível em: <http://www.revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/3707>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965. Disponível em: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144.short>. Acesso em: 14 jun. 2017.

SISAY, M.; ENGIDAWORK, E.; SHIBESHI, W. Evaluation of the antidiarrheal activity of the leaf extracts of *Myrtus communis* Linn (Myrtaceae) in mice model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://bmccomplementaltemed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-017-1625-3>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SNEDDON, L. U. Comparative Physiology of Nociception and Pain. **Physiology**, v. 33, n. 1, p. 63–73, 2017. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00022.2017>. Acesso em: 25 mar. 2019.

SOARES, E. D. R. et al. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, n. 3, p. 64–72, 2015. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/19942>. Acesso em: 25 mar. 2019.

SOBRAL, M. et al. Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=DDB08D6CFAB5526FFE4F9DF82FE323A4>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SOUSA, I. J. O. et al. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista Uningá**, v. 31, n. 1, p. 35–39, 2017. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/2048>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SOUZA, R. K. D. et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco , northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 99–104, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874114006382>. Acesso em: 14 jun. 2017.

TABARELLI, M. et al. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 4, p. 25–29, 2018. Disponível em: [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S000967252018000400009&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S000967252018000400009&script=sci_arttext&tlng=pt). Acesso em: 10 mar. 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. **Artmed**, v. 5<sup>a</sup> edição, p. 918, 2013.

THE PLANT LIST. **The Plant List.Internet**, 2013. Disponível em:

<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae/>. Acesso em: 15 jun. 2019.

TIETBOHL, L. A. C. et al. Comparative study and anticholinesterasic evaluation of essential oils from leaves, stems and flowers of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 4, p. 637–641, 2012. Disponível em:

[http://www.latamjpharm.org/resumenes/31/4/LAJOP\\_31\\_4\\_2\\_6.pdf](http://www.latamjpharm.org/resumenes/31/4/LAJOP_31_4_2_6.pdf). Acesso em: 17 ago. 2018.

TIETBOHL, L. A. C. et al. Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *myrciaria floribunda* leaves on the development of *dysdercus peruvianus* and *oncopeltus fasciatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 3, p. 316–321, 2014. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2014000300316&script=sci\\_arttext&lng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2014000300316&script=sci_arttext&lng=es). Acesso em: 17 ago. 2018.

TIETBOHL, L. A. C. et al. Antiproliferative activity in tumor cell lines, antioxidant capacity and total phenolic, flavonoid and tannin contents of *Myrciaria floribunda*.

**Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 2, p. 1111–1120, 2017.

Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0001-](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0001-37652017005008103&script=sci_arttext)

[37652017005008103&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0001-37652017005008103&script=sci_arttext). Acesso em: 17 ago. 2018.

TRACEY JR, W. D. Nociception. **Current Biology**, v. 27, n. 4, p. R123–R138, 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982217300696>. Acesso em: 14. fev. 2019.

TRINDADE, J. R.; ROSÁRIO, A. S.; SANTOS, J. U. M. DOS. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Myrtaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1259–1277, 2018. Disponível em:

<https://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=03706583&AN=120684804&h=AHV2MSFx0A8Lsw3b%2bx2YCXReb0UUHA86G2Hpl44qhblQqQDVtrifkUFd2Vxr%2b7wgCKrFdUx47JWYG7fu3AlKRA%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrlNotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d03706583%26AN%3d120684804>. Acesso em: 15. jun. 2019.

TRZECIAK, M. B. et al. Utilização de sementes de espécies oleaginosas para produção de biodiesel. **Informativo Abrates**, v. 18, n. 1/3, p. 30-38, 2008.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n.



1, p. 44-84, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272506002196>. Acesso em: 15 jun. 2019.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflammation Research**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 1995. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01630479>. Acesso em: 3 ago. 2018.

VARDEH, D.; NARANJO, J. Anatomy and Physiology: Mechanisms of Nociceptive Transmission. **Pain Medicine. Springer**, n. Cham, p. 3–5, 2017. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-43133-8\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-43133-8_1). Acesso em: 23 mar. 2019.

VASCONCELOS, T. B. DE et al. Radicais livres e estresse oxidativo. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213–9, 2014.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 20, n. SUPPL. 1, p. 73–80, 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2982.2008.01110.x>. Acesso em: 23 mar. 2019.

VERMA, S. et al. A review on treatment and management of neuropathic pain with herbal folk drugs. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 5, p. 104–110, 2017.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Embrapa Clima Temperado**, p. 1–16, 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2019.

WAGNER, H. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. **Planta Medica**, v. 55, n. 3, p. 235–241, 1989. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-961992>. Acesso em: 25 mar. 2019.

WAGNER, H.; BLADT, S. Flavonoid Drugs Including Ginkgo Biloba and Echinaceae Species. In: **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**, p. 195–245, 1996. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-00574-9\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-00574-9_8). Acesso em: 25 mar. 2019.

WALLACE, J. L. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Gastroenteropathy: The Second Hundred Years. **Gastroenterology**, v. 126, n. 1, p. A27, 1997. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(97\)00141-8/abstract](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(97)00141-8/abstract). Acesso em: 23 mar. 2019.

WHO. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. **Traditional Medicine Strategy 2002-2005**, p. 1–74, 2002. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67163/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2002.1\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67163/WHO_EDM_TRM_2002.1_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 23 mar. 2019.

WIEST, J. M. et al. Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 2, p. 209–215, 2009. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/107588>. Acesso em: 15 jun. 2019.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 3, p. 544–547, 1962. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-111-27849>. Acesso em: 15 jun. 2019.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00218839.1998.11100961> Acesso em: 15 jun. 2019.

WOLLER, S. A. et al. An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. S40–S46, 2017. Disponível em: <https://www.clinexprheumatol.org/article.asp?a=12194>. Acesso em: 25 mar. 2019.

XIA, E. et al. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **Polyphenols in Human Health and Disease**, v. 11, n. 2, p. 47–58, 2013. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/11/2/622>. Acesso em: 25 mar. 2019.

ZEB, A. et al. Anti-nociceptive activity of ethnomedicinally important analgesic plant *Isodon rugosus* wall. ex Benth: Mechanistic study and identifications of bioactive compounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. JUL, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00200>. Acesso em: 15 jun. 2019.

ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2703–2712, 2017. Disponível em: [https://www.scielo.org/scielo.php?pid=S141381232017000802703&script=sci\\_arttext&tlng=pt](https://www.scielo.org/scielo.php?pid=S141381232017000802703&script=sci_arttext&tlng=pt). Acesso em: 15 jun. 2019.