



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GLENDALÁISSA OLIVEIRA DE MELO CANDEIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE
EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *EUGENIA
UNIFLORA* LINN EM MODELOS EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS (MUS
MUSCULUS) SWISS**

Recife

2022

GLENDALÁISSA OLIVEIRA DE MELO CANDEIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE
EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *EUGENIA
UNIFLORA* LINN EM MODELOS EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS (MUS
MUSCULUS) SWISS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Linha de pesquisa: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos. Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Co-orientadora: Dr^a. Magda Rhayanny de Assunção Ferreira

Recife

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

C216a	Candeia, Glenda Laíssa Oliveira de Melo Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de extrato e frações obtidos a partir das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> Linn em modelos experimentais em camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss / Glenda Laíssa Oliveira de Melo Candeia. – 2022. 71 p. : il. Orientadora: Luiz Alberto Lira Soares. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2022. Inclui referências e anexo. 1. Eugenia. 2. Anti-Inflamatórios. 3. Antinociceptivo. 4. Miricitrina. 5. Agonista opioide. I. Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador). II. Título. 615 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023-140)
-------	---

GLENDALAISSA OLIVEIRA DEMELO CANDEIA

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE
EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *EUGENIA
UNIFLORA* LINN EM MODELOS EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS (*MUS
MUSCULUS*) SWISS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Linha de pesquisa: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos. Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Aprovada em: 24/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (**Presidente**)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Maria Bernadete de Sousa Maia (**Examinadora Interna**)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Gerlane Coelho Bernardo Guerra (**Examinadora Externa**)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dedico essa dissertação a minha querida avó materna, Terezinha Santino, por todo o amor e incentivo a continuação dos estudos e a conclusão do mestrado que ela me ofertou, servindo de exemplo e inspiração para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por iluminar e guiar o meu caminho até este momento.

Aos meus pais, Eziel e Fátima Candeia, por terem fornecido os suprimentos necessários a minha educação e por serem a minha base nesta caminhada de vida, mesmo que tenham acreditado em muitos momentos que o melhor seria “arrumar um trabalho e largar a vida acadêmica”.

Aos meus familiares, e em especial a minha avó Terezinha, que sempre acreditou e a cada conversa e oportunidade que tínhamos ela me perguntava sobre como andavam os estudos e me estimulava a continuar. Sempre me colocando em suas orações e pedindo a proteção do Divino Espírito Santo sobre minha jornada.

Aos meus amigos(as) e companheiros(as), em especial a Ingrid e Ernesto, que diariamente, desde a seleção até a defesa, me encorajavam estando sempre prontos a serem um ombro amigo ou a me divertirem para espairer.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Soares, pela oportunidade que me deu em trabalhar em sua equipe, pelo exemplo de competência, dedicação e humildade, e por toda paciência ao longo dessa jornada. Obrigada pela confiança.

À minha co-orientadora, profa. Dra. Magda Ferreira, por me orientar ao longo dessa caminhada, estando sempre presente e disponível, me auxiliando até em experimentos de bancada, sendo um exemplo constante de dedicação e empenho na vida acadêmica e nas pesquisas. MUITÍSSIMO obrigada por tudo, até pelos passeios de bike que serviram para espairer e descontrair dos problemas.

Ao grupo de pesquisa do NUDATEF que em sua totalidade se mostrou bastante solícito e sempre dispostos a me auxiliar, e que aos poucos se tornaram amigos, compartilhando e dividindo experiências e momentos agradáveis a cada lanche da tarde regado a café e boas conversas. Em especial a Ewelyn, Camylla, Wliana, Janaína e Lucas que diretamente me auxiliaram nos experimentos de bancada e nas dúvidas que surgiam ao longo do caminho.

Ao grupo de pesquisa do LABPROT, em especial ao prof. Dr. Alisson Macário e ao Msc. Wendeo Costa, que me acompanharam lado a lado durante os testes com experimentação animal, abrindo as portas do laboratório e me enriquecendo com seus conhecimentos teóricos e práticos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

À FACEPE, pela concessão da Bolsa de Mestrado e as agências de fomento, CNPq e CAPES, por subsidiarem o desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae), conhecida como pitanga, é uma espécie usada na medicina tradicional que possui atividades biológicas já descritas na literatura, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, que estão associadas à presença de flavonoides, ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis e óleos essenciais. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato seco por aspersão (ESA) das folhas de *E. uniflora* e investigar o mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva de frações obtidas. O extrato foi obtido por turbólise utilizando a mistura água: etanol: propilenoglicol como solvente, e em seguida, foi submetido à secagem por spray dryer. O ESA foi submetido a sucessivas partições com hexano, água e acetato de etila, originando frações FH, FAqr e FAE respectivamente. A caracterização do ESA e frações foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nos ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss (Comitê de ética: nº 0068/2020) para avaliar as atividades anti-inflamatória (testes de edema de pata e de peritonite, ambos induzidos por carragenina) e antinociceptiva (testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e movimento de cauda). Na investigação do possível mecanismo de ação, foi realizado o teste da formalina com as frações frente a ação de um bloqueador opioide não seletivo (naloxona). Como resultados foi possível detectar a presença de polifenóis, incluindo os marcadores ácido gálico e ácido elágico e miricitrina por CCD, com bandas mais evidentes no ESA e FAE. O perfil observado por CCD, foi confirmado por CLAE e corroboram com dados da literatura para extratos da espécie. O ESA demonstrou atividade anti-inflamatória diminuindo o edema de pata durante todo o experimento, bem como diminuindo a migração leucocitária para a cavidade peritoneal, apresentando relevância estatística. Nos testes de nocicepção, ESA foi capaz de reduzir o número de contorções induzidas por ácido acético, diminuiu o tempo de lambertura de pata no teste da formalina e aumentou a latência para movimento de cauda em banho quente, com $p < 0,05$. Durante a avaliação de mecanismo de ação a FAE demonstrou atividade antinociceptiva superior a FAqr, e considerando a análise fitoquímica sugere-se que o composto relacionado a essa atividade seja o flavonoide miricitrina, visto que está presente apenas na FAE. Confrontando FAE e FAqr (25 mg/kg) com o bloqueador naloxona, houve um aumento

no tempo de lambadura ($p < 0,05$), indicando que a atividade antinociceptiva percebida anteriormente se dá através de receptores opioides. Considerando estes resultados, concluímos que *E. uniflora* confere potencial terapêutico com propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas e de acordo com a investigação de mecanismo de ação, sugerimos que estas atividades estejam relacionadas a presença de flavonoides e mais especificamente a miricitrina enriquecidos na FAE, através da atuação em receptores opioides.

Palavras-Chave: *Eugenia uniflora*; anti-inflamatório; antinociceptivo; miricitrina; agonista opioide.

ABSTRACT

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae), known as pitanga, is a species used in traditional medicine that has biological activities already described in the literature, such as antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive, which are associated with the presence of flavonoids, phenolic acids, hydrolysable tannins, and essential oils. In view of the above, the aim of this work was to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the spray-dried extract (SDE) of *E. uniflora* leaves and to investigate the mechanism of action involved in the antinociceptive activity of the fractions obtained. The extract was obtained by turboextraction using the mixture water: ethanol: propylene glycol as solvent, and then was subjected to spray drying. The SDE was submitted to successive partitions with hexane, water and ethyl acetate, originating fractions HF, AqrF and EAF respectively. The characterization of SDE and fractions was performed by thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). In the in vivo assays, Swiss mice were used (Ethics Committee: No. 0068/2020) to evaluate the anti-inflammatory (paw edema and peritonitis tests, both induced by carrageenan) and antinociceptive (abdominal contortions tests induced by acetic acid, formalin and tail movement) activities. To investigate the possible mechanism of action, the formalin test was performed with the fractions against the action of a non-selective opioid blocker (naloxone). As results it was possible to detect the presence of polyphenols, including the markers gallic acid and ellagic acid and myricitrin by TLC, with bands more evident in SDE and EAF. The profile observed by TLC, was confirmed by HPLC and corroborate with literature data for extracts of the species. SDE demonstrated anti-inflammatory activity by decreasing paw edema steadily throughout the experiment, as well as decreasing leukocyte migration into the peritoneal cavity. In nociception tests, SDE was able to reduce the number of acetic acid-induced writhing, decreased paw licking time in the formalin test and increased the latency for tail movement in hot bath. During the mechanism of action evaluation, EAF showed higher antinociceptive activity than AqrF, and considering the phytochemical analysis it is suggested that the compound related to this activity is the flavonoid miricitrin, since it is present only in EAF. Confronting EAF and AqrF (25 mg/kg) with the blocker naloxone, there was an increase in licking time ($p < 0,05$), indicating that the previously perceived antinociceptive activity takes place through opioid receptors. Considering these results, we conclude that *E. uniflora*

confers therapeutic potential with anti-inflammatory and antinociceptive properties and according to the investigation of mechanism of action, we suggest that these activities are related to the presence of flavonoids and more specifically myricitrin enriched in EAF, through acting on opioid receptors.

Keywords: *Eugenia uniflora*; anti-inflammatory; antinociceptive; myricitrin; opioid agonist.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo do processo inflamatório	18
Figura 2 - Componentes da resposta inflamatória, aguda e crônica e suas funções	19
Figura 3 - Sensibilização periférica e central via prostaglandina E2 (PGE2)	20
Figura 4 - Modelo conceitual da experiência dolorosa	22
Figura 5 - Receptores sensoriais simples com terminações nervosas livres	23
Figura 6 - Esquema representativo das fibras sensoriais de primeira ordem	24
Figura 7 - Diagrama esquemático dos tipos de dor	26
Figura 8 - Sensibilização periférica	27
Figura 9 - Regulação inibitória da transmissão da nocicepção	28
Figura 10 - <i>Eugenia uniflora</i> Linn	32
Figura 11 - Flavonoides majoritários encontrados em <i>Eugenia uniflora</i>	34
Figura 12 - Esquema do método extrativo e fracionamento	42
Figura 13 - Cromatograma obtido por CCD do ESA, frações e padrões observados após derivatização e luz ultravioleta	48
Figura 14 - Cromatograma do extrato e frações de <i>E. uniflora</i> (270 nm) e espectros de varredura dos picos correspondentes aos marcadores da espécie	50
Figura 15 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina e salina no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos	52
Figura 16 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina, morfina e salina no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	56
Figura 17 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina, morfina e salina no teste da formalina em camundongos	58
Figura 18 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), morfina e salina no teste do movimento de cauda em camundongos	59

Figura 19 -Efeito de FAE e FAqr (6,25, 12,5 e 25 mg/kg, v.o.), FAE e FAqr (25 mg/kg, v.o.) + naloxona (2 mg/kg, i.p.) e salina no teste da formalina em camundongos 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina e salina no teste de peritonite induzido por carragenina 1% em camundongos	53
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO	17
2.1.1	Abordagens terapêuticas para tratamento de processos inflamatórios	21
2.2	NOCICEPÇÃO	22
2.3	<i>EUGENIA UNIFLORA LINN</i>	30
2.3.1	Família Myrtaceae	30
2.3.2	Gênero Eugenia	31
2.3.3	Espécie <i>Eugenia uniflora</i>	31
2.3.3.1	Aspectos botânicos e distribuição geográfica	31
2.3.3.2	Aspectos fitoquímicos	33
2.3.3.3	Aspectos farmacológicos	34
2.4	OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DE EXTRATOS VEGETAIS	37
2.5	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAL VEGETAL	41
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO E FRAÇÕES	41
4.3	CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS NO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO E FRAÇÕES	42
4.3.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	42
4.3.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	43
4.4	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	44
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO	44
4.5.1	Edema de pata induzido por carragenina	44
4.5.2	Peritonite induzida por carragenina	45

4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ESA	45
4.6.1	Contorções abdominais induzidas por ácido acético	45
4.6.2	Teste da formalina	45
4.6.3	Teste do movimento de cauda	46
4.7	INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO PARA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DAS FRAÇÕES AQUOSA E ACETATO DE ETILA	46
4.7.1	Teste da formalina com uso de bloqueadores de receptor opioide	46
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	ANÁLISES CROMATOGRAFICAS DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO E FRAÇÕES	48
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO	51
5.2.1	Edema de pata induzido por carragenina	51
5.2.2	Peritonite induzida por carragenina	53
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO	54
5.3.1	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	55
5.3.2	Teste da formalina	57
5.3.3	Teste do movimento de cauda	58
5.4	INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO PARA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DAS FRAÇÕES AQUOSA E ACETATO DE ETILA	60
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	71

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta de um tecido vivo e vascularizado a um agente infeccioso, a um antígeno ou mesmo a um estímulo irritante de natureza física, química ou traumática. Essa resposta manifesta-se pela presença de 4 sinais cardinais: rubor, calor, edema e dor que pode levar a perda de função do tecido ou órgão afetado (ETIENE, VIEGAS, VIEGAS, 2021). A dor nociceptiva representa um sistema importante para alertar o organismo sobre um dano tecidual, a partir da sinalização mediada por receptores periféricos de alto limiar, denominados nociceptores (NICKEL *et al.*, 2012).

Na tentativa de inibir o processo inflamatório e nociceptivo, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) constituem em um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética eficazes. Mas em paralelo a estes efeitos, é frequentemente associado a tais fármacos os efeitos adversos gastrointestinais graves, como ulcerações e dispepsias pelo seu uso continuado (MITCHELL *et al.*, 1993).

Em outra direção, tem-se sugerido diversas estratégias na busca de novos fármacos anti-inflamatórios e analgésicos que apresentem mecanismos relevantes e desencadeiem reações adversas menos intensas. Dentre eles, existem numerosos agentes oriundos de fontes naturais que apresentam importantes atividades biológicas, tais como terpenos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, entre outros, que tem demonstrado atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*. O estudo de plantas medicinais preconizadas pela medicina popular recorre ao emprego de técnicas e modelos experimentais para validar a sua utilização de forma segura e eficaz, na procura de novos medicamentos ou protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (UPADHYAY, 2019).

Nesse contexto, insere-se *Eugenia uniflora* L., conhecida popularmente como pitanga ou pitangueira, pertencente à família Myrtaceae, representando importância econômica devido ao seu potencial agroindustrial e alimentício, além de apresentar efeitos benéficos à saúde, sendo utilizada para tratamento de distúrbios gástricos, diabetes, febre e hipertensão. Foi evidenciada a presença de flavonoides, ácidos fenólicos, monoterpenos e sesquiterpenos, antocianidinas e carotenoides na pitanga. A constituição química de espécies vegetais confere a elas a capacidade de

apresentar propriedades terapêuticas, justificando assim o seu uso pela população (BEZERRA *et al.*, 2018; BIAZOTTO *et al.*, 2019; SOBEH *et al.*, 2019). Acerca das atividades farmacológicas descritas para *E. uniflora*, a literatura relata propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antinoceptiva, antidiabética, redutora lipídica, antiproliferativa, leishmanicida, antibacteriana e antifúngica (FALCÃO *et al.*, 2018; RONCATO *et al.*, 2019; SOBEH *et al.*, 2019).

Considerando que os estudos sobre o uso de espécies vegetais são sustentados pela biodiversidade brasileira e pela busca de novos agentes terapêuticos, principalmente no que se refere à identificação dos principais compostos ativos, elucidação da estrutura e atividade farmacológica (segurança e eficácia), esse projeto justifica-se pela ampliação e esclarecimento sobre o conhecimento acerca da diversidade de produtos derivados das folhas de *Eugenia uniflora* com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva e os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta antinociceptiva.

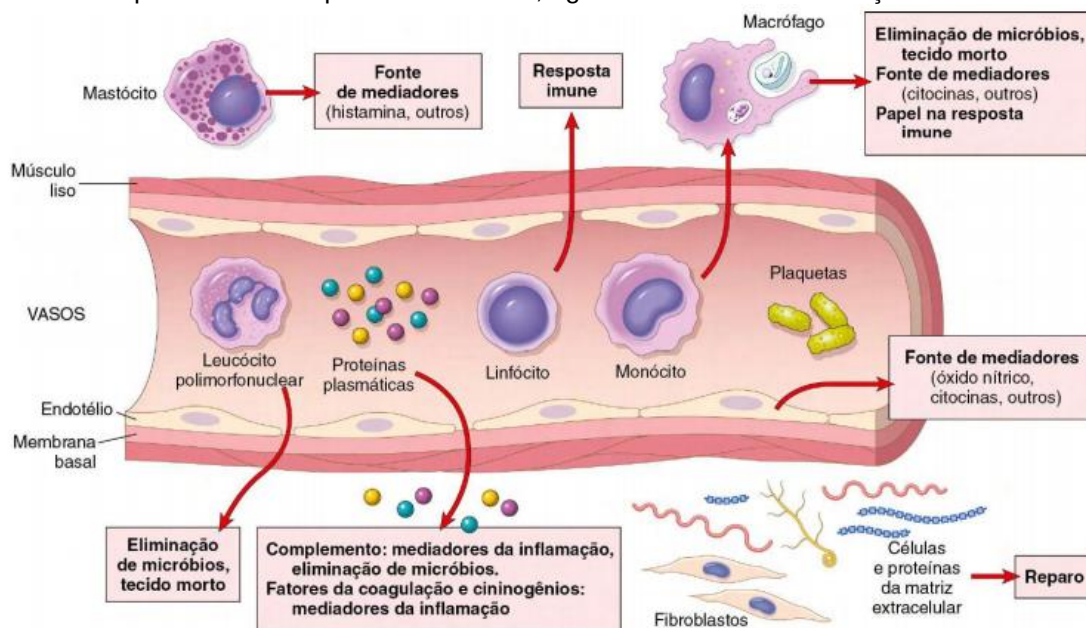
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

A inflamação é um processo regulatório iniciado como consequência de lesão tecidual ou infecção. Se trata de um dos eventos mais eficazes que protegem nosso corpo contra infecções, lesões, exposição a produtos tóxicos ou estresse. Em detrimento disso, é um processo complexo que envolve diferentes tipos de células do sistema imunológico e vias de sinalização (CHOVATIYA; MEDZHITOV, 2014).

A função da inflamação é reconhecer e eliminar o estímulo nocivo e remover o tecido danificado com o objetivo de restaurar a homeostase, desencadeando assim, o término da resposta aguda, ensejando o processo de reparação completo (JUNIOR *et al.*, 2011) como visto na figura 1. Mas quando este processo não ocorre de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente. Quando a resposta inflamatória é excessiva e prolongada pode levar a diversas desordens que resultam nas patologias mais prevalentes, como as doenças reumáticas, diabetes, doença de Alzheimer e aterosclerose (SERHAN; CHIANG, 2004).

Figura 2 - Componentes da resposta inflamatória, aguda e crônica e suas funções.



Fonte: Robbins (2013).

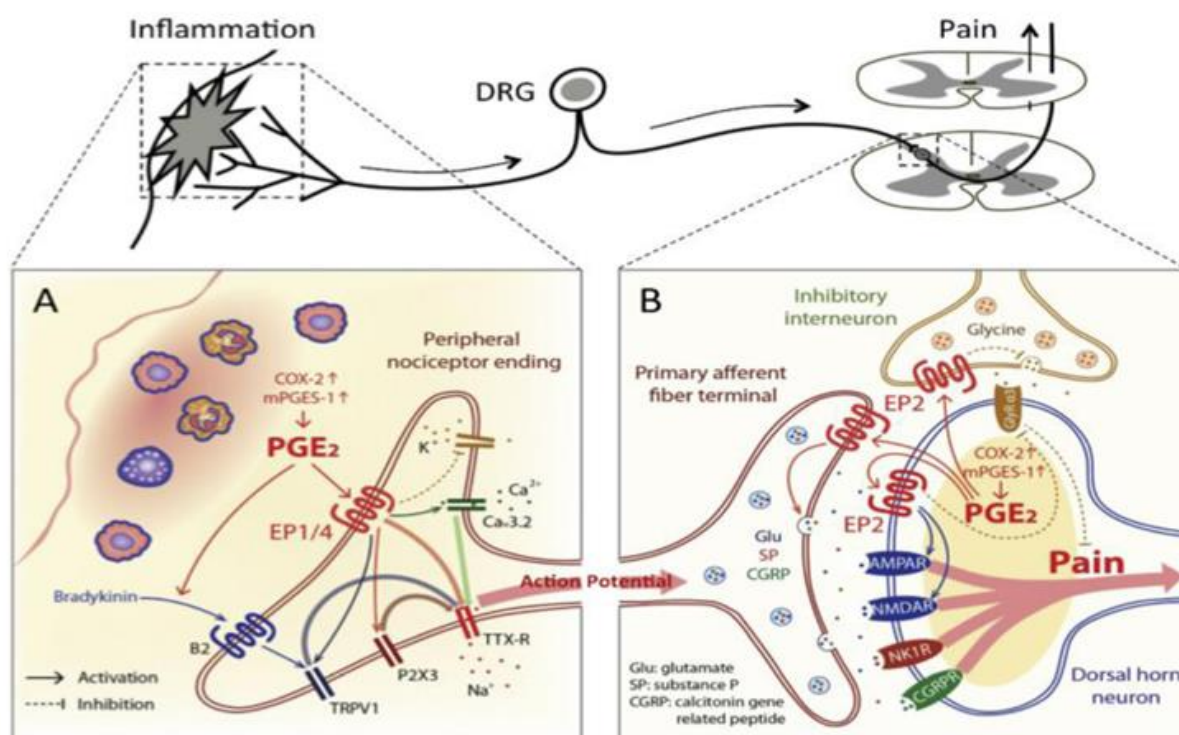
Esse fluído inflamatório acarreta algumas características marcantes do processo inflamatório, como o inchaço que é consequência do aumento da permeabilidade vascular que permite o extravasamento do fluído e, assim, a formação do edema. A dor está relacionada, tanto pela compressão de terminações nervosas pelo edema, quanto pelas substâncias químicas (citocinas, quimiocinas e prostaglandinas) liberadas no tecido. Por último vem a perda de função, podendo ser total ou parcial, em decorrência do edema e da dor, principalmente nas articulações e tecidos ou membros relacionados ao movimento (BARNES,1998).

Tanto na resposta de fase aguda quanto na crônica os mediadores inflamatórios como a bradiginina, leucotrienos, interleucinas, substância P e prostaglandinas agem ativando outras células envolvidas com o processo inflamatório, ampliando assim, a resposta inicial ao agente lesivo. Assim como os mediadores inflamatórios liberados pelos macrófagos, mastócitos e células endoteliais ou nervosas traumatizadas, acabam ativando nociceptores facilitando a transmissão dolorosa (KRAYCHETE, CALASANS, VALENTE, 2006).

O ácido araquidônico é um mediador inflamatório resultante da ação da fosfolipase A2 nos lipídeos de membrana que posteriormente é metabolizado pela ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), lipoxigenase e epoxigenase, formando prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas e ácido epoxieicosatetraenoico (HOHJOH *et al.*, 2014).

A COX-2, é frequentemente referida como a isoforma induzível responsável pela produção de prostaglandinas durante a inflamação. Além do envolvimento em processos inflamatórios, a COX-2 também está relacionada com o crescimento e a formação tumoral (SILVA, 2017). Uma das prostaglandinas formadas pela COX-2 é a prostaglandina E2 (PGE₂), que é o principal prostanoide pró-inflamatório envolvido na hipersensibilidade dolorosa periférica e central. A PGE₂ ativa na periferia os canais de sódio e cálcio, reduz o fluxo de potássio, ativa receptores purinérgicos, sensibiliza e potencializa os receptores TRPV1 e aumenta a sensibilidade de receptores de bradicinina via PKA e PKC produzindo assim a hiperalgesia. A sensibilização central da PGE₂ pré-sináptica ocorre pela liberação de cálcio e posteriormente de glutamato, substância P e do peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), enquanto a PGE₂ pós-sináptica potencializa os receptores NMDA e AMPA e bloqueia a liberação de neurotransmissores inibitórios como a glicina (Figura 3) (CHEN, YANG, GROSSER, 2013).

Figura 3 - Sensibilização periférica e central via prostaglandina E2 (PGE₂).



Fonte: Chen, Yang, Grosser (2013).

Os outros mediadores inflamatórios, como a bradicinina, fator de crescimento nervoso (NGF), íon hidrogênio (H⁺), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e quimiocinas promovem a sensibilização periférica a

partir da ativação de receptores TRPV1 e TRPA1, e canais de sódio tipo Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 resultando em aumento da sensibilidade e excitabilidade dos nociceptores via proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKS) (JI *et al.*, 2011).

2.1.1 Abordagens terapêuticas para tratamento de processos inflamatórios

Os glicocorticoides são os anti-inflamatórios mais elementares, são moléculas endógenas, mas também são encontrados seus derivados sintéticos conhecidos como anti-inflamatórios esteroides (AIEs). São sintetizados e liberados pelas glândulas adrenais e exercem ações sobre o metabolismo de diversas moléculas (carboidratos, proteínas e lipídeos), além de exibirem a atividade anti-inflamatória e imunossupressora. Alguns exemplos de AIEs utilizados na clínica são: dexametasona, prednisona, budesonida etc. Estes fármacos exercem ações anti-inflamatórias amplas, tais como interações com receptores intracelulares que controlam transcrição gênica, que reprimem a transcrição de diversos fatores como o AP-1 e o NFkB que regulam a síntese da COX-2, de citocinas, de moléculas de adesão, dentre outras (CHROUSOS; MARGIORIS, 2001). Também inibem a ação da fosfolipase A2 (PLA2), enzima responsável pela liberação do ácido araquidônico, que é um precursor das prostaglandinas e dos leucotrienos (CLARK, 2007; MENEZES *et al.*, 2009).

Sabe-se que as enzimas COX (COX-1 – constitutiva, e COX-2 – induzida) estão envolvidas na produção e instalação de um processo inflamatório, estas sendo mediadas por sinalização química dos mediadores acima mencionados. Dessa forma, muitas estratégias e regimes terapêuticos são baseados no uso de medicamentos que inibem tais enzimas. Nesse contexto, os fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), são considerados os de primeira escolha por serem menos tóxicos e mais seguros do que os anti-inflamatórios esteroides, sobretudo em tratamentos a longo prazo. Mas esta classe de fármacos é relacionada aos efeitos colaterais bastante indesejáveis, que incluem desde dispepsias a ulceração gástrica e duodenal, hipersensibilidade e possibilidade de recorrência (MITCHELL *et al.*, 1993).

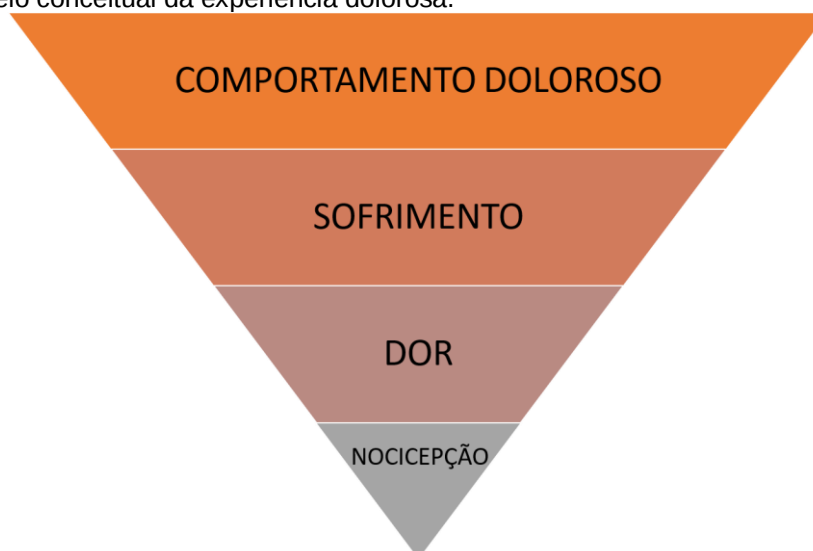
Essas duas classes de anti-inflamatórios (AIEs e AINEs) representam a maior parcela do arsenal terapêutico disponível para o tratamento e controle de processos inflamatórios. E embora sejam as mais usuais para esses quadros, os efeitos

adversos relacionados a elas são bem conhecidos. Todos os AIEs e AINEs convencionais têm a tendência de causar efeitos adversos gastrointestinais. Esses efeitos estão relacionados a inibição da produção de prostaglandinas em órgãos como estômago e rins, que origina lesões gástricas, nefrotoxicidade e aumento de hemorragias (MASFERRER *et al.*, 1994; FABIOLA *et al.*, 2001; RAJAKARIAR *et al.*, 2006). Isso pode ocorrer mesmo com a administração intramuscular ou intravenosa de tais medicamentos, por inibirem a COX-1, impedindo a síntese das prostaglandinas gástricas, especialmente PGI₂ e PGE₂, que servem como citoprotetores da mucosa gástrica.

2.2 NOCICEPÇÃO

Dor é a sensação desagradável que tem por função primária a proteção do organismo. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP – International Association for the Study of Pain) a define como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com o dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (LOESER, TREEDE, 2008). Assim como a inflamação, trata-se de uma experiência completa e multidimensional que envolve a transdução da informação gerada pelo estímulo nocivo, bem como o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro, ou seja, apresenta o envolvimento de componentes discriminativos-sensoriais, afetivos-motivacionais e cognitivos-emocionais (Figura 4) (SEWARDS, SEWARDS, 2002).

Figura 4 - Modelo conceitual da experiência dolorosa.



Fonte: Adaptado de LOESER *et al.*, 2001.

Já o termo nocicepção refere-se à percepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (os nociceptores), existentes no local da lesão, que fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos (FÜRST, 1999; FEIN, 2011).

Existe uma sequência de eventos que originam o fenômeno doloroso, e o primeiro deles é a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central (BESSON, PERL, 1969). Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações nervosas de fibras nervosas aferentes primeira ordem e, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação.

Esses receptores sensoriais como já falado são os nociceptores, que são neurônios com terminações nervosas livres (Figura 5) e eles são capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor (LEVINE, TAIWO, 1994; LOEWENSTEIN, 1971). São encontrados na pele, nas articulações, nos músculos, nos ossos e em vários órgãos internos, mas não no sistema nervoso central (SILVERTHORN, 2010). Ainda que todos os receptores para a dor sejam terminações nervosas livres, essas terminações adotam duas vias separadas para a transmissão de sinais dolorosos para o sistema nervoso central, correspondendo assim aos dois tipos de dor, uma via para dor pontual rápida, e a outra para dor lenta crônica (HALL, 2011).

Figura 5 - Receptores sensoriais simples com terminações nervosas livres.



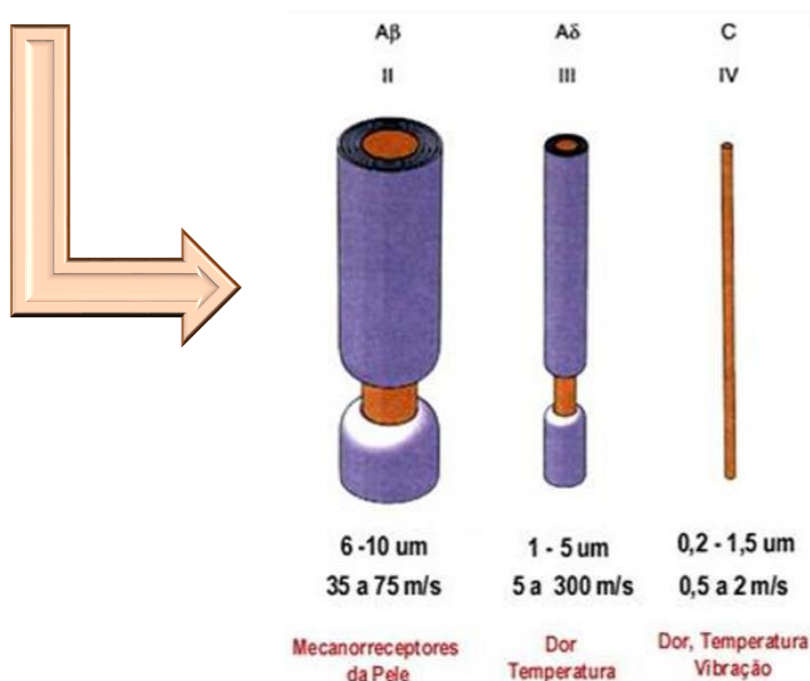
Fonte: Adaptado de Silverthorn (2010).

As fibras de primeira ordem, relacionadas com a condução do estímulo doloroso são classificadas de acordo com a sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução em três tipos: fibras C, fibras A- β , fibras A- δ (RANG *et al.*, 2001). As fibras do tipo C caracterizam-se por serem amielinizadas, possuem diâmetro de 0,4 a 1,2 μm e velocidade de condução que varia de 0,5 a 2,0 m/s (Figura 5). Estas fibras apresentam receptores termossensíveis, mecânicos e receptores específicos para substâncias algogênicas (tais como íons potássio, acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina, prostaglandinas, substância P e histamina) (MILLAN, 1999).

As fibras A- δ são mielinizadas, têm diâmetro que varia de 1,0 a 4,0 μm , conduzindo a uma velocidade de 12 a 30 m/s (Figura 5). Elas transmitem informações de alta intensidade e baixa latência, promovendo a sensação dolorosa rápida da primeira fase da dor aguda, e são elas que desencadeiam o reflexo de retirada. Enquanto as fibras A- β possuem diâmetro maior que 10 μm e velocidade de condução que varia entre 30 e 100 m/s (Figura 6). Estas fibras estão relacionadas a alodinia, que é uma dor provocada por estímulos que normalmente não gerariam dor, causada por alterações sensoriais (MILLAN, 1999).

Figura 6 - Esquema representativo das fibras sensoriais de primeira ordem.

Tipos de fibras	Características das fibras	Velocidade de condução	Associada com
A β (beta)	Grossas, mielinizadas	30-70 m/s	Estímulos mecânicos
A δ (delta)	Finas, mielinizadas	12-30 m/s	Frio, dor rápida, estímulos mecânicos
C	Finas, não mielinizadas	0,5-2 m/s	Dor lenta, calor, frio, estímulos mecânicos



Fonte: Adaptado de Silverthorn (2010).

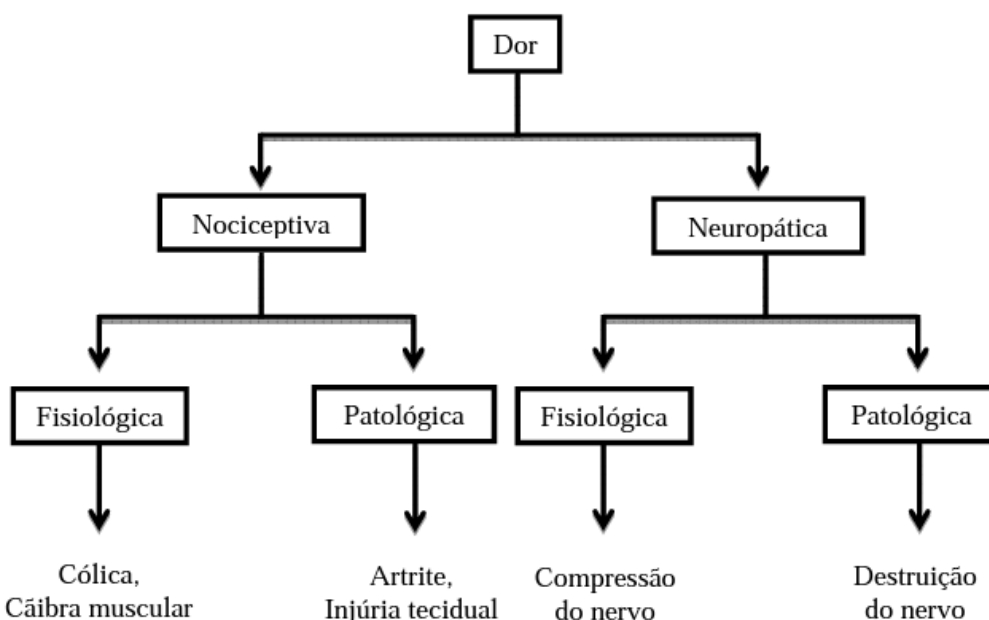
Assim a dor pontual comunica rapidamente o indivíduo, desempenhando função importante na reação imediata para se afastar do estímulo doloroso, por outro lado, a dor lenta tende a aumentar com o passar do tempo, produzindo sensação intolerável em que a pessoa tenta aliviar sua causa (HALL, 2011).

Há quatro classes de nociceptores já descritos: mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos ou silentes. Os nociceptores mecânicos respondem a pressão intensa, enquanto os nociceptores térmicos às temperaturas extremas (quente $> 45^{\circ}\text{C}$, ou frias $< 5^{\circ}\text{C}$) e estes possuem um tipo de fibra aferente de condução do estímulo conhecida por fibras do tipo A mielinizadas, que conduzem os impulsos na velocidade de 3 m/s a 40 m/s. Esse conjunto de receptores também pode ser conhecido como nociceptores mecanotérmicos (FEIN, 2011). Esses receptores térmicos são conhecidos também como receptores de potencial transitório (TRP), os quais são canais catiônicos (Na^+ , Ca^{2+} e K^+) não seletivos. As respostas ao calor nocivo envolvem a subfamília de receptores TRPV1, que são sensíveis a temperaturas acima de 42°C , pH extracelular baixo e estados inflamatórios. Os receptores TRPM8 e TRPA1 estão envolvidos na resposta ao frio e ao mentol, sendo o TRPM8 ativado em temperaturas abaixo de 15°C e o TRPA1 ativado em temperaturas abaixo de 17°C (ANDRADE, MEOTTI, CALIXTO, 2012).

Os nociceptores polimodais respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos; e possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem o impulso em velocidade menor que 3 m/s. Os nociceptores silenciosos ou silentes são ativados por estímulos químicos e mediadores inflamatórios, respondendo a estímulos mecânicos e térmicos somente depois de serem ativados. E de igual forma aos polimodais, apresentam fibras do tipo C amielinizadas (FEIN, 2011).

De acordo com a sua etiologia a dor pode ser classificada como dor nociceptiva, que é resultante da ativação ou sensibilização de nociceptores periféricos; dor inflamatória, que é desencadeada pela liberação de mediadores químicos a partir de células inflamatórias, bem como pelos tecidos periféricos ou células tumorais, os quais ativam ou modificam as propriedades de resposta dos aferentes nociceptivos ao estímulo; e dor neuropática, a qual surge em virtude de injúria ou anormalidades adquiridas por parte de estruturas neurais centrais ou periféricas (Figura 7) (ZHU; LU, 2010). Esta última é uma dor crônica que tem relação com a neurotoxicidade de algumas substâncias, e requer uma abordagem diferente visando a analgesia do que a destinada aos outros tipos de dores (SCHESTATSKY, 2008).

Figura 7 - Diagrama esquemático dos tipos de dor.

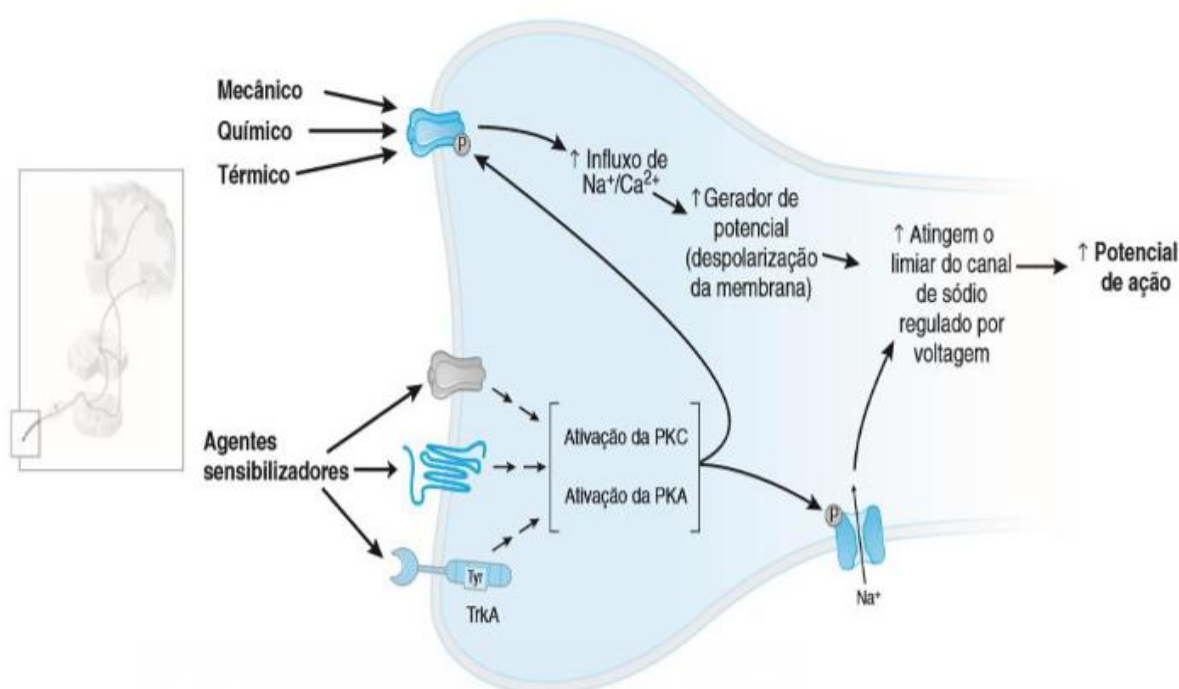


Fonte: MOTA (2013).

Como foi dito, a dor corresponde a um dos sinais clássicos do processo inflamatório, pois este tem a capacidade de sensibilizar ou ativar os nociceptores. Em modelos animais, essas estruturas não são capazes de discriminar o componente emocional da dor, apenas a sensação nociceptiva (MILLAN, 1999), a qual ocorre

mediante uma lesão tecidual, que, induz a formação de mediadores químicos envolvidos na dor inflamatória local, ocasionando danos celulares. Tais mediadores, são a histamina (HIS), bradicinina, a serotonina (5-HT), o ATP, produtos da ativação da via de ácido araquidônico (AA), prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), íons (K^+ e H^+), citocinas e fatores do crescimento. Parte desses mediadores atuam de maneira direta no local da inflamação, resultando em dor inflamatória espontânea, e outros agem indiretamente via estimulação de células inflamatórias, induzindo a liberação de agentes algogênicos, sensibilizando os nociceptores por reduzir o limiar de ativação, amplificando a percepção da dor (SILVERTHORN, 2010). Esses mediadores ativam segundos mensageiros que por sua vez fosforilam canais de sódio regulado por voltagem (Nav 1,8) e receptores TRPV1 resultando em redução do limiar de ativação e aumento de resposta a estímulos de calor (Figura 8) (GRIFFIN; WOLF, 2009).

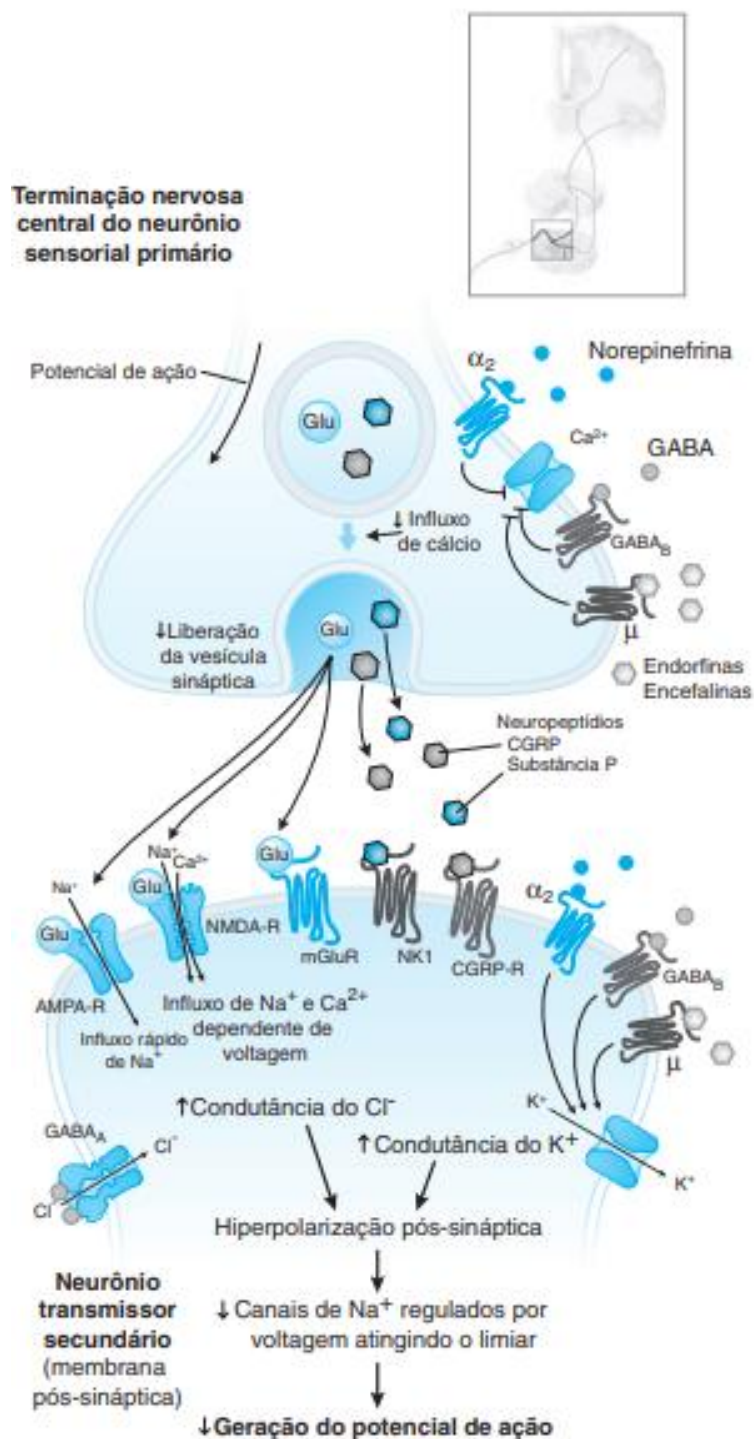
Figura 8 - Sensibilização periférica.



Legenda: Um agente sensibilizador ativa o seu receptor acoplado à proteína G, e este receptor desencadeia duas cascatas de sinalização paralelas. Um ramo ativa a via da fosfolipase C resultando em aumento da liberação de cálcio das reservas intracelulares e outro ativa a proteína cinase C (PKC). Ambos aumentam o influxo de íons em resposta ao estímulo nociceptivo. Fonte: GRIFFIN; WOOLF (2009).

A regulação inibitória da dor é realizada pelas vias descendentes que partem do cérebro para as lâminas I, II e IV do corno dorsal da medula espinal (Figura 9) (MERTENS *et al.*, 2015).

Figura 9 - Regulação inibitória da transmissão da nocicepção.



Fonte: GRIFFIN; WOOLF (2009).

Os opioides representam o principal sistema de controle periférico e central da dor. Os receptores opioides apresentam uma elevada distribuição de receptores no corno dorsal da medula espinhal, nas lâminas I e II (MERRER *et al.*, 2009) e por isso são um importante alvo para caracterização farmacológica de substâncias antinociceptivas. Os peptídeos opioides (β -enkefalina, enkefalinas e dinorfinas) agem

sobre os receptores μ , δ e κ , acoplados a proteína G, e quando ativados inibem a adenilato ciclase, subsequentemente reduzindo o influxo de cálcio, aumentando o fluxo de potássio, gerando uma redução na liberação de neurotransmissores excitatórios pré-sinápticos e hiperpolarização pós-sináptica (STEIN, 2013). Além disso, parte da resposta inibitória do sistema é atribuída pela desativação do sistema noradrenérgico no cérebro e ativação de receptores α_2 -adrenérgicos na medula espinal (VO *et al.*, 2016).

A noradrenalina exerce seus efeitos pela ativação dos receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos, pela redução pré-sináptica do fluxo de cálcio e pela ativação pós-sináptica dos canais de potássio (PERTOVAARA, 2013). Enquanto o papel da serotonina parece ser através da inibição de respostas nociceptivas transmitidas pelas fibras-C no corno dorsal da medula espinal (LIU *et al.*, 2010). Outros mediadores são o GABA e a glicina que são os principais neurotransmissores inibitórios que agem no corno dorsal da medula espinal. O GABA agindo através da sua ligação alostérica a receptores GABAa presentes nas fibras C e na medula espinal, reduzem a excitabilidade neural e favorecem a hiperpolarização. A glicina, em parceria com o GABA, permite que os íons de magnésio permaneçam bloqueando o canal do receptor NMDA, um potente neurotransmissor excitatório (RUSCHEWEYH *et al.*, 2011). Um outro caminho que está sendo desvendado aos poucos é a participação dos canabinoides no processo analgésico, como foi estudado por Ascensão *et al.* (2016) a partir do aumento na expressão de receptores CB1 e CB2 em processos nociceptivos.

A intervenção terapêutica nas dores inflamatórias e neuropáticas é uma situação difícil na área clínica, uma vez que as drogas existentes apresentam capacidade limitada e revelam efeitos colaterais indesejáveis. Portanto, existe um campo de pesquisa farmacológica para o estudo de drogas alternativas que demonstrem boa eficácia e segurança, diminuindo a dor neuropática e inflamatória com uma tática para cessar a transição da dor aguda para a crônica (HOLANDA PINTO *et al.*, 2008).

Os fármacos analgésicos trabalham em prol do alívio imediato da dor, e estes variam desde o paracetamol a potentes opioides, como a morfina. O paracetamol é um inibidor fraco da COX-1 e da COX-2 nos tecidos periféricos, não possuindo efeito anti-inflamatório significativo, apenas analgésico e antipirético. Os opioides atuam

diretamente nos receptores opioides do SNC, os quais são parte de um sistema analgésico que responde a moléculas opioides endógenas (SILVERTHORN, 2010).

Além destes existem outros fármacos analgésicos utilizados na clínica, muitos deles derivados de moléculas de plantas ou animais, incluindo o ácido acetilsalicílico, derivado da casca de árvore do salgueiro (gênero *Salix*), que age inibindo as prostaglandinas, diminuindo a inflamação, e consequentemente a transmissão dos sinais de dor gerados no local de lesão. Também os fármacos opioides, como a morfina e codeína, são provenientes do ópio da papoula, *Papaver somniferum*. Além disso, fitoterápicos como arnica (*Arnica montana*) demonstraram atividade analgésica e anti-inflamatória, carvalho (*Quercus sp*) com potente ação anti-inflamatória e a catinga de mulata (*Tanacetum vulgare* ou *Tanacetum partheinium*) com atividade anti-inflamatória e potente analgesia para enxaquecas (BOTSARIS; MACHADO, 1999; TESKE; TRENTINI, 2001). Estes fármacos têm sido usados na medicina ocidental e na chinesa por séculos, e hoje é possível encontrar diversas formulações farmacológicas sintéticas e fitoterápicas envolvendo seus componentes químicos ou derivados deles.

2.3 EUGENIA UNIFLORA LINN

2.3.1 Família Myrtaceae

Myrtaceae é uma família composta por mais de 130 gêneros e 3800-5800 espécies de arbustos e árvores verdes durante todo o ano, cujas folhas opostas, com nervuras marginais são frequentes nesta família. Tem distribuição geográfica ampla, sendo encontrada em todos os continentes, exceto na Antártica, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais (ABOUTABL *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2001; STEFANELLO, PASCOAL, SALVADOR, 2011).

Está dividida em duas subfamílias: Myrtoideae, que apresenta frequentemente frutos em bagas e inclui os gêneros *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Eugenia*, *Pseudocaryophyllus* e *Syzygium*, e Leptospermoideae, com frutos na sua maioria com semente única do tipo noz, à qual pertencem os gêneros *Eucalyptus*, *Leptospermum* e *Malaleuca* (TYLER, 1999). Aproximadamente um terço das espécies desta família pertencem ao gênero *Eugenia*, com cerca de 1000 espécies distribuídas do sul do

México ao norte da Argentina. Estima-se que 350 espécies sejam nativas do Brasil, com um pequeno número de espécies sendo encontradas na África.

2.3.2 Gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia*, subtribo Eugeniinae, ordem Myrtales, subclasse Rosidae, classe Magnoliopsida, se distribui entre as Américas Central e do Sul (CRONQUIST, 1981). Na América tropical e subtropical foram referidas mais de 500 espécies deste gênero que consiste em árvores ou arbustos, com flores tetrâmeras ou pentâmeras, solitárias ou em racemos, com sépalas bem diferenciadas no botão floral frequentemente reduzidos a glomérulos ou fascículos, cálice aberto ou fechado, rompendo-se irregularmente, bractéolas persistentes ou decíduas, ovário bilocular com uma ou duas sementes, geralmente membranáceas e embrião com cotilédones unidos. O fruto é uma baga de até três centímetros de diâmetro, esférico e achatado nas extremidades, em gomos mais ou menos salientes, coroados pelo cálice (BRAGA, 1985).

2.3.3 Espécie *Eugenia uniflora*

2.3.3.1 Aspectos botânicos e distribuição geográfica

A primeira citação da espécie no Index Kewensis (1958) foi em 1983, com o nome de *Stenocalys pitanga* Berg., e a denominação atual começou a ser usada por Angely em 1965.

Eugenia uniflora é bem distribuída no território brasileiro, e parece ser mais abundante nas regiões sudestes e sul, pelo fato de ter sido objeto de estudo de muitos trabalhos nos países do sul do nosso continente. Trata-se de uma árvore ou arbusto perene de porte médio, com 3 a 12 m de altura, é nativa do Brasil e é comum na região litorânea do nordeste ao sul do país (Figura 10). Também está presente em outras regiões da América do Sul, como Paraguai, Uruguai e Argentina. É menos presente em países da América Central, sudeste da Ásia e da África. No Brasil é conhecida popularmente como pitanga (que significa “vermelho profundo” em Tupi Guarani) e cereja brasileira ou ginja (ANGELY, 1965).

Figura 10 - *Eugenia uniflora* Linn.



Fonte: Autoria própria (2022).

- Caule: cilíndrico, medindo de 15 a 35 cm de diâmetro, podendo ser ereto ou ramificado, coloração marrom acinzentada, com casca que desprende em placas coriáceas. As espécies diferenciam-se em relação ao lenho quanto ao tipo de parênquima axial e presença de cristais. Quanto a casca, o tipo de arranjo das células esclerificadas no floema é periderme e apresentam ritidoma. (SOFFIATI, ANGYALOSSY-ALFONSO, 1999).

- Folhas: simples, ovais lanceoladas, medindo de 4,5 a 6,2 cm de comprimento e 2,0 a 2,7 cm de largura, glabras, membranáceas e levemente coriáceas, coloração verde escuro; ápice agudo, base aguda e obtusa, margem inteira, penínérvea, com nervura principal mais proeminente na região medial basal da face abaxial. Pecíolo mede de 0,3 a 0,6 cm de comprimento. O parênquima fundamental é bem desenvolvido; nessa região podem ser observadas drusas. O feixe vascular do tipo bicolateral é envolvido por bainha fibrosa, constituída de duas a cinco camadas celulares, podendo ser interrompidas nas regiões laterais relacionadas com o floema, voltado a epiderme superior (JORGE *et al.*, 1994).

- Flores: nascem nas axilas das folhas em pendúnculos unífloros, filiformes, agrupados em números de 2 a 6, medindo de 2,4 a 3,6 cm de comprimento. No ápice o botão floral é protegido por brácteas de 2 a 4 mm de comprimento. Ocorrem no período de janeiro, setembro e outubro.

- Fruto: baga esférica, costada com 8 saliências, achatadas nos polos, medindo de 1,2 a 2,8 cm de diâmetros por 0,7 a 1,7 cm de altura. Ocorre no período de março, abril, outubro e novembro.

2.3.3.2 Aspectos fitoquímicos

Os primeiros componentes desta espécie que despertaram interesse foram os óleos essenciais. Os sesquiterpenos germacreno, furanoelemento, γ -elemento e selina trienona foram relatados pela primeira vez por Rücker *et al.* em 1977. Wyerstahl *et al.* (1988) confirmaram estes dados, detalhando a composição do óleo essencial de folhas de *E. uniflora*. No Brasil, os primeiros a relatarem o isolamento e identificação de componentes do óleo essencial de folhas foram Moraes *et al.* em 1996, colhidas na região Nordeste do Brasil, com rendimento de 0,74%, do qual os componentes majoritários são selina-1,3,5(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona, com teores de 48% e 17% respectivamente.

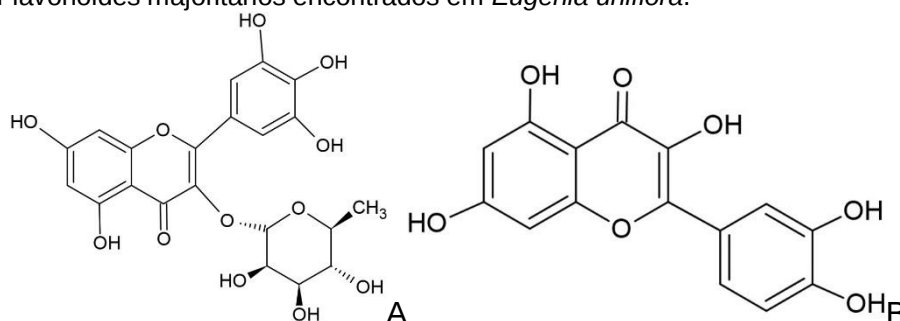
Schmeda-Hirschmann (1995) foi o primeiro a relatar a presença dos flavonoides quercetina e miricetrina nas folhas de *E. uniflora* coletadas no Paraguai. A quercetina e miricetrina apresentam estrutura química semelhante, mas diferem nas quantidades de hidroxilas, onde a miricetrina possui uma hidroxila a mais na posição 5' do anel B (Figura 11) (CHEN *et al.*, 1996). Também foram descritos em menor proporção os flavonoides afzelina, desmantina 1 e as moléculas glicosiladas de miricetrina e quercetina (RATTMANN *et al.*, 2012).

Um outro estudo investigando os constituintes fenólicos de *E. uniflora* relatou a presença de eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2, dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis, obtidos do extrato metanólico das folhas (LEE *et al.*, 1997). Alguns outros taninos relatados em *E. uniflora* são camptotina A, oenoteína B, gemina D e hipomanina A (RATTMANN *et al.*, 2012).

Bezerra *et al.* (2017) analisando os perfis cromatográficos por CLAE-DAD e CCDAE das folhas extraídas com metanol, do extrato bruto acetônico, das frações

aquosa, acetato de etila e hexânica de *E. uniflora* quantificaram os marcadores químicos miricitrina, ácido gálico e ácido elágico (taninos hidrolisáveis) por CLAE, e demonstraram que a fração acetato de etila correspondia a fração que continha a maior concentração destes marcadores, sendo 6,587 %m/m, 0,899% m/m e 0,323 %m/m, de miricitrina, ácido gálico e ácido elágico, respectivamente.

Figura 11 - Flavonoides majoritários encontrados em *Eugenia uniflora*.



A: Miricitrina; B: Quercetina.
Fonte: Autoria própria (2022).

Sobeh *et al.* (2019) avaliou um extrato metanólico obtido das folhas de *E. uniflora* submetendo-o a diversos procedimentos cromatográficos, incluindo cromatografia em coluna e cromatografia em papel e obteve a separação de 17 compostos que posteriormente tiveram suas estruturas químicas estabelecidas em UV, MS e NMR (H^1 , C^{13} , DEPT, COSY, HMQC e HMBC). Dentre eles encontraram-se miricitrina e derivados glicosilados, quercetina e compostos glicosilados, ácido elágico, ácido gálico, metilgalato, ácido gentísico e derivados glicosilados e dilactona de ácido vanoleico.

Além desses, também foi relatado a presença de terpenos e antraquinonas (β -sitosterol, ácido betulínico e centelosídeo C) em folhas de *E. uniflora* (BRASILEIRO *et al.*, 2006; RATTMANN *et al.*, 2012).

2.3.3.3 Aspectos farmacológicos

Inúmeros efeitos terapêuticos têm sido atribuídos a *E. uniflora* L., dentre eles estão: ação hipotensora (SCHAPOVAL *et al.*, 1994; CONSOLINI *et al.*, 1999; AMAT *et al.*, 2002; PINO *et al.*, 2003), antidiarreica (SANTOS *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2013), anti-inflamatória (DESRIVOT *et al.*, 2007; PRESTES *et al.*, 2011; RATTMANN

et al., 2012; DENARDIN *et al.*, 2014), antirreumática (COSTA *et al.*, 2013), anti-pirética (DESRIVOT *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2013), hipoglicemiante (ARAI *et al.*, 1999).

Schapoval *et al.* (1994), estudando infusos e decoctos de folhas de *E. uniflora*, seguindo o modo de preparo preconizado pela população, relatam efeito anti-inflamatório com a infusão elaborada a partir de folhas frescas; os infusos e decoctos testados não mostraram ação analgésica nas condições do ensaio. A infusão provocou aumento no tempo de sono, induzido por pentobarbital, segundo os autores, provavelmente, devido aos monoterpenos, por atuarem no citocromo P450, o qual está envolvido na biotransformação do pentobarbital. Os decoctos se revelaram mais ativos em relação à diminuição do trânsito intestinal, provavelmente, por extraírem os taninos mais eficazmente. Tanto infusos como os decoctos preparados nas concentrações de 5% (p/v) não exibiram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10321).

Para avaliar os efeitos de *E. uniflora* na inflamação encontram-se descritos alguns ensaios, todos desenvolvidos em camundongos e usando ou óleo essencial ou extrato aquoso ou alguma de suas frações. Em um modelo de edema de pata, o extrato aquoso de *E. uniflora* na concentração de 300 mg/kg por v.o. foi capaz de reduzir o edema em 57% (SCHAPOVAL *et al.*, 1994). Mas, em modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratado com o óleo essencial das folhas de *E. uniflora*. Isso pode indicar para a possibilidade de que existe mais compostos anti-inflamatórios nas frações mais polares das folhas. Rattmann *et al.* (2012) usando a fração butanólica proveniente da extração hidroalcóolica das folhas de *E. uniflora* nas doses de 300 mg/kg v.o. comprovaram que esta fração rica em flavonoides inibiu consideravelmente vários parâmetros pró-inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, atividade enzimática da mieloperoxidase, expressão de enzimas iNOS e COX-2, todos fortemente associados a manutenção dos processos inflamatórios.

Já na avaliação dos efeitos antinociceptivos, Amorin *et al.* (2009) relataram que o óleo essencial bruto na concentração de 200 mg/kg v.o. foi capaz de reduzir em 48% o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Isso sendo mais evidente na fração pentano (70%) e nos sesquiterpenos (74%). Mas todos os produtos provenientes do óleo essencial de *E. uniflora* foram capazes de

aumentar o tempo de latência na placa quente, confirmando o seu potencial analgésico.

2.4 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DE EXTRATOS VEGETAIS

Ao estudar uma matriz química vegetal faz-se necessário utilizar técnicas de separação e purificação para avaliação dos compostos químicos ali presentes. Porém, ao longo de um processo de purificação é possível que se obtenham compostos purificados com menor atividade biológica do que a do extrato bruto, isso pode decorrer de diversos motivos, incluindo do resultado de sinergias entre os diferentes constituintes ali presentes. O fracionamento de extratos vegetais tem como objetivos principais o isolamento e a identificação de metabólitos primários ou secundários por meio de processos cromatográficos e espectrofotométricos obtendo frações enriquecidas em compostos ativos (SIMÕES *et al.*, 2017).

O fracionamento bioguiado é uma das primeiras ferramentas da qual o pesquisador deve lançar mão em seus estudos acerca da identificação de substâncias com novos mecanismos de ação para tratar de patologias humanas. Este processo se vale de ensaios *in vitro* baseados em alvos moleculares, como a ligação a receptores ou a inibição de proteínas-chave, sendo estes alvos de relevância clínica já estabelecida ou com forte potencial terapêutico, ou ainda usando cultura de células humanas ou de mamíferos baseados na investigação de efeitos em processos patológicos celulares a fim de guiar a separação dos componentes de um extrato vegetal visando a fração ou grupo de frações que apresentem a maior resposta biológica pretendida.

O estudo bioguiado inicia a partir da escolha da planta, baseando-se no uso tradicional e popular e em levantamentos bibliográficos em literatura científica que relatam as características da espécie. Depois disto é obtido um extrato bruto obtido das partes de interesse da planta, e define-se o solvente de acordo com a natureza química dos compostos bioativos de interesse, ou seja, de forma a solubilizar a maior quantidade possível de substâncias com as atividades biológicas pretendidas. Então, realizam-se várias separações dos compostos químicos a partir da solubilização destes em solventes com diferentes polaridades, obtendo-se frações e subfrações com bioatividade concentrada (OLDONI *et al.*, 2016; KARLING, 2017).

A principal vantagem destes ensaios é a rapidez da execução juntamente com o menor custo associado com a possibilidade de triagem de várias frações e compostos resultando, em geral, na identificação de substâncias e/ou misturas ativas, com potencial para o desenvolvimento de mais pesquisas e futuramente novos

fármacos. A literatura científica registra diversos estudos que iniciam suas análises com triagens baseadas no fracionamento bioguiado em modelos *in vitro* baseados em alvos moleculares e em culturas de células. Apesar destes ensaios terem baixo poder preditivo e resultados limitados, eles serviram como pontapé inicial para o desenvolvimento da maioria fitofármacos atualmente usados.

2.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES

Caracterizar uma amostra faz-se necessário pois os extratos vegetais geralmente ocorrem como uma combinação de vários grupos de metabólitos secundários com diferentes polaridades, e sua separação e identificação ainda hoje é um desafio (SASIDHARAN *et al.*, 2011).

Existem diversas formas de caracterização, mas os métodos cromatográficos e os espectroscópicos são hoje em dia os principais métodos utilizados tanto na separação, quanto na caracterização e identificação de moléculas orgânicas. Dentre os métodos cromatográficos encontram-se a cromatografia em camada delgada, a líquida e a gasosa (RUCKER *et al.*, 1998). E entre os espectroscópicos estão o ultravioleta-visível (UV-VIS), o infravermelho (IR), a ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massas (MS).

Os procedimentos cromatográficos diferem entre si pelo seu tipo de interação com a fase estacionária (adsorção, partição, troca iônica, por exemplo), pelo tipo de condições operacionais (placa de sílica, coluna aberta ou alta pressão, por exemplo) e pelas mudanças de eluentes ou fases móveis. É possível utilizar a cromatografia líquida por partição para promover separações sequenciais e assim, isolar componentes específicos ou enriquecer alguma classe química. Mas para se obter maior purificação dos compostos obtidos são utilizadas cromatografia em camada delgada de alta eficiência, cromatografia flash e cromatografia líquida de alta eficiência (SASIDHARAN *et al.*, 2011).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um procedimento simples, rápido e pouco oneroso que fornece ao pesquisador uma resposta rápida sobre os componentes que estão na mistura, auxiliando também na confirmação da identidade de um composto através da comparação entre os fatores de retenção (R_f) do encontrado na amostra e de um composto conhecido. Além disso, na CCD é possível a realização da pulverização de reagentes químicos de triagem, que promovem a

alteração da coloração de bandas de acordo com os compostos existentes na amostra (SASIDHARAN *et al.*, 2011).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica versátil, robusta e amplamente utilizada na identificação de compostos de origem vegetal. Isso se deve ao fato de que certos compostos têm diferentes taxas de migração na fase móvel considerando-se também a fase estacionária utilizada. O processo de separação pode ser realizado por eluição isocrática ou gradiente, este segundo sistema é mais comum quando se trata de matrizes vegetais complexas (SASIDHARAN *et al.*, 2011).

Atualmente, a CLAE ainda é considerada a técnica mais utilizada para obtenção de perfis químicos e quantificação de compostos fenólicos, tais como flavonoides e taninos. A utilização de detector como arranjo de diodos (DAD) é aplicada para a identificação dos polifenóis presentes em matrizes vegetais complexas; fornecendo informações acerca do tempo de retenção e espectros de varredura dos picos observados nas amostras (FU *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato e frações obtidos das folhas de *Eugenia uniflora* buscando estabelecer um possível mecanismo de ação envolvido que justifique a atividade antinociceptiva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e caracterizar as folhas de *E. uniflora*;
- Obter extrato bruto e frações a partir das folhas de *E. uniflora*;
- Caracterizar os derivados obtidos das folhas de *E. uniflora* por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar as atividades anti-inflamatória - através dos testes de edema de pata induzido por carragenina e peritonite induzida por carragenina – e, analgésica – através dos testes de contorções induzidas por ácido acético, teste da formalina e teste da remoção de cauda - *in vivo* do extrato bruto e frações obtidos a partir das folhas de *E. uniflora*;
- Identificar e estabelecer um mecanismo de ação que possa estar envolvido na atividade analgésica das folhas de *E. uniflora*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Eugenia uniflora* foram coletadas no município de Paulista, Pernambuco, Brasil, e a sua identificação foi realizada por deposição da exsicata no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), correspondendo a exsicata de nº 93732. A espécie também foi registrada no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) sob o código A449575. Posteriormente foi realizada a secagem do material vegetal em estufa de ar circulante até estabilização (72h h, 40 °C; Lucadema®). Após secagem, o material foi triturado em moinho de facas (TE-680, Tecnal®).

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO E FRAÇÕES

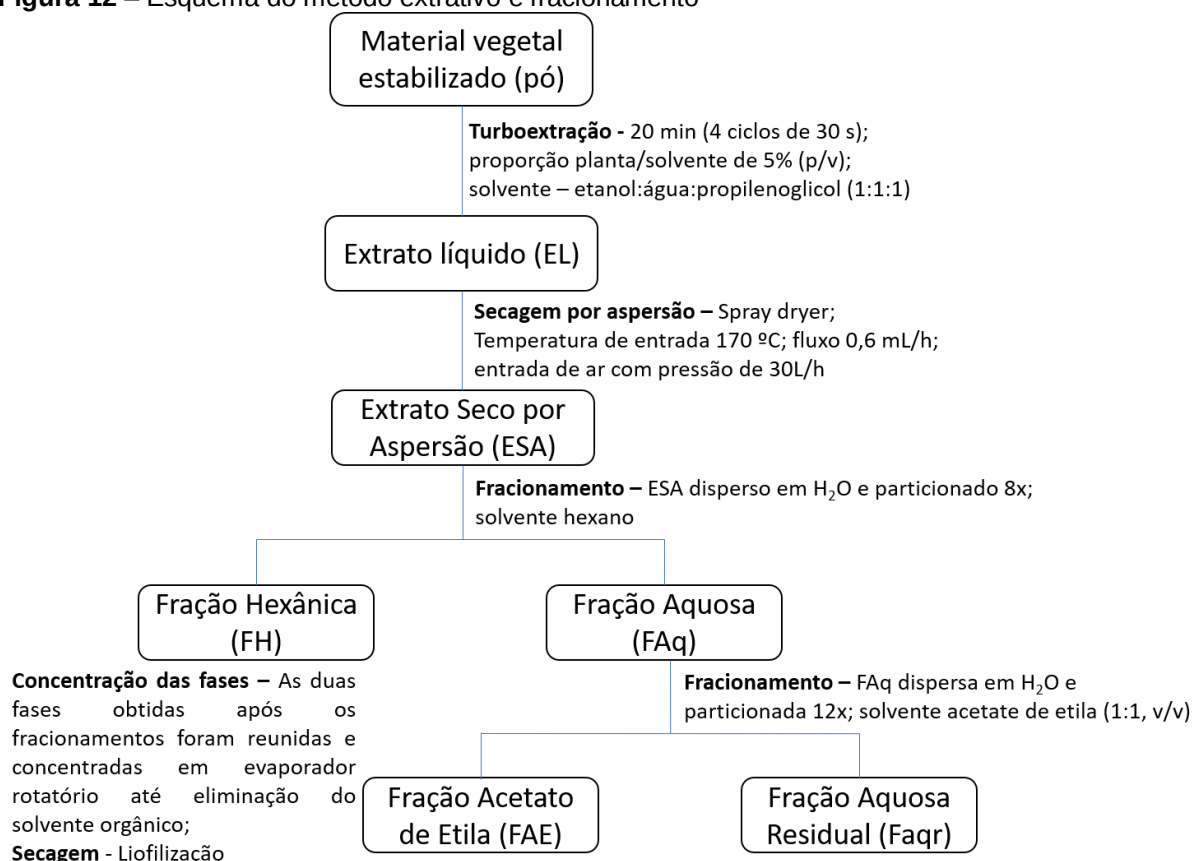
O extrato foi produzido de acordo com a metodologia proposta pelo nosso grupo de pesquisa (BEZERRA *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2022), onde o material vegetal foi submetido a uma turboextração (LAR.2, Metvisa®) por 20 minutos (4 ciclos de 30 s com intervalos de 5 min entre os ciclos) na proporção planta/solvente de 5% (p/v), utilizando como solvente a mistura de água, etanol e propilenoglicol (1:1:1, v/v/v). Ao final, o extrato foi filtrado sob vácuo com auxílio de algodão.

O extrato obtido foi submetido a secagem por aspersão em mini spray dryer (MSD 1.0, LabMaq®) utilizando como parâmetros de secagem: temperatura a 170 °C, fluxo de 0,6 mL/h e entrada de ar com pressão de 30 L/h para obtenção do extrato seco por aspersão (ESA).

O ESA foi disperso em água destilada (10 g/100 mL), mantido em banho de ultrassom (Cristofóli®) até completa solubilização e em seguida foi particionado com hexano (8 vezes), obtendo-se as fases aquosa e hexânica. As fases obtidas foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório (RV10 Basic, IKA®) até eliminação total do solvente orgânico e posteriormente submetidas a secagem por liofilização, obtendo-se as frações hexânica (FH) e fração aquosa (FAq). A FAq foi pesada e dispersa em água destilada (10 g/100 mL) foi então particionada por 12 vezes com

acetato de etila (na proporção 1:1, v/v) (RAMOS *et al.*, 2017). As fases acetato de etila e aquosa foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório (RV10 Basic, IKA®) até eliminação total do solvente orgânico e então congeladas e posteriormente submetidas a secagem por liofilização, originando a fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa residual (Faqr). A metodologia que utilizamos para obtenção do ESA e o fracionamento deste nas três frações segue esquematizada na figura 12.

Figura 12 – Esquema do método extrativo e fracionamento



Fonte: Autoria própria (2022).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS NO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO E FRAÇÕES

4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada

As amostras e padrões foram aplicados com auxílio de aplicador semi-automático (Linomat V, Camag®) controlado pelo software Wincats® (Camag®). Extrato e frações foram diluídos em metanol na concentração 3 mg/mL e, os padrões na

concentração de 1 mg/mL. Foram aplicados 30 µL de cada amostra (ESA, FH, Faqr, FAE) e 15 µL de cada padrão (ácido gálico, ácido elágico e miricitrina, todos adquiridos da Sigma-Aldrich®) em bandas de 10 mm de largura, com 5 mm entre elas. Em seguida, a placa foi submetida a eluição utilizando como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v/v) em cuba cromatográfica (20 x 10 cm, Camag®). Após eluição, a placa foi seca a temperatura ambiente e por fim foi realizada a derivatização na placa com reagente Natural A (éster de 2-etilamina de ácido difenilboril) e seguido de polietilenoglicol 400 (PEG400). Por fim, foram fotografadas sob luz UV 365 com auxílio de Fotodocumentador (System®) com software UVP® e câmera fotográfica Canon® (Rebel T3, EOS 1100 D).

4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Primeiramente foi feita a preparação das soluções de ESA, FH, FAqr e FAE, onde 15 mg dos pós foram pesados e transferidos para balões volumétricos, e adicionados 20 mL de água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga®). Os balões foram levados a um banho de ultrassom (Cristofóli®) até promover solubilização. Em seguida, foi realizada a diluição para obter soluções de concentração igual a 1 mg/mL. Os padrões ácido gálico (96% de pureza, Sigma®), ácido elágico (95% de pureza, Sigma®) e miricitrina (99% de pureza, Sigma®) foram usados como substâncias de referência. As soluções das amostras e dos padrões foram filtradas em membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm (Macherey-Nagel®) e então foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. As análises foram realizadas em triplicata.

As condições de análise foram: sistema Thermo Scientific (Ultimate 3000 Thermo Fisher Scientific®) equipado com Detector de Diodo (DAD) (Thermo Fisher Scientific®), bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific®), desgaseificador e um amostrador automático (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific®). O software Chromeleon (Dionex®) foi usado para aquisição e processamento dos dados.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm; Supelco®) protegida por uma pré-coluna feita de mesmo material (Phenomenex®). A fase móvel composta por água ultrapura (A) e metanol grau HPLC (B) acidificados com 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético, foi utilizada no

fluxo de 0,8 mL/min, seguindo o gradiente: 10-25% do solvente B (10 min), 25-40% do solvente B (5 min), 40-70% do solvente B (10 min), 75% do solvente B (5 min) e 75-100% do solvente B (1 min). As separações cromatográficas foram realizadas a temperatura de 24 ± 2 °C. Os comprimentos de onda de 254, 270 e 350 nm foram usados para detectar ácido elágico, ácido gálico e miricitrina, respectivamente, de acordo com a absorção máxima medida pelo DAD.

4.4 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo teve parecer favorável pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (nº 0068/2020). Estando todos os procedimentos de acordo com as legislações brasileiras para experimentação animal. Foram utilizados Camundongos (*Mus musculus*) Swiss obtidos do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Para ambientação os animais foram conduzidos após o desmame ao Biotério Setorial do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da UFPE, sendo mantidos sob condições padrão (ciclo claro/escuro de 12 horas, 22 ± 2 °C e umidade de 50–55%) com água e ração fornecidas *ad libitum* até atingirem o peso e idade ideais para experimentação. Os animais pesavam entre 30 e 40 g, com idade entre 8 e 10 semanas.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO

4.5.1 Edema de pata induzido por carragenina

Os camundongos machos foram agrupados em cinco grupos de seis animais e tratados com ESA de *E. uniflora* (50, 100 ou 200 mg/kg v.o.), ou com solução salina (0,9% v.o.) uma hora antes do início dos testes e a indometacina (20 mg/kg i.p.) foi administrada 30 minutos antes do início dos testes. Os animais tiveram o volume de suas patas traseiras medido utilizando o paquímetro, e este momento foi considerado o tempo 0. Uma hora após os tratamentos o edema de pata foi induzido. O agente flogístico carragenina em uma solução a 2% (15 µL) em soro fisiológico foi injetado na região subplantar da pata direita traseira. A diferença entre o volume inicial das patas e o volume nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos foi determinada e a alteração foi

calculada: Alteração percentual = $((\text{Volume final da pata} - \text{Volume inicial da pata}) / (\text{Volume inicial da pata}) \times 100$ (LAPA, 2007).

4.5.2 Peritonite induzida por carragenina

Trinta camundongos machos foram agrupados em cinco grupos de seis animais e foram tratados com ESA de *E. uniflora* (50, 100 ou 200 mg/kg v.o.), ou solução salina (0,9% v.o.) uma hora antes do início dos testes. Indometacina (20 mg/kg i.p.) foi administrada 30 minutos antes do início dos mesmos testes. Passado esse tempo, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 1% de carragenina em solução de soro fisiológico. Após quatro horas os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e 2 mL de PBS heparinizado foi injetado na cavidade peritoneal, logo em seguida o exsudato foi removido e armazenado. Então se seguiu com a contagem de leucócitos da lavagem peritoneal, que foi realizada e expressa em porcentagem (LAPA, 2007).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ESA

4.6.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Trinta e seis camundongos machos foram separados em seis grupos (n = 6) e receberam um dos seguintes tratamentos: ESA de *E. uniflora* (50, 100 ou 200 mg/kg v.o.), ou solução salina (0,9% v.o.), ou morfina (10 mg/kg i.p.) ou indometacina (20 mg/kg i.p.). A solução salina e o ESA foram administrados uma hora antes do início dos testes, já as drogas padrão morfina e indometacina foram administradas 30 minutos antes. A contorção abdominal foi induzida por ácido acético. Após o tempo estabelecido os animais receberam injeção intraperitoneal de ácido acético (0,85% v/v) e foram colocados em caixa de polietileno para registrar o número de contorções no intervalo correspondente de 5 a 15 minutos após a injeção (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

4.6.2 Teste da formalina

Trinta e seis camundongos machos foram separados em seis grupos (n = 6) e receberam os seguintes tratamentos: ESA de *E. uniflora* (50, 100 ou 200 mg/kg v.o.),

ou solução salina (0,9% v.o.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou indometacina (20 mg/kg i.p.). A solução salina e o EB foram administrados uma hora antes do início dos testes, já as drogas padrão morfina e indometacina foram administradas 30 minutos antes. Para avaliação no teste da formalina os animais receberam 20 µL de formalina (2,5%, v/v) na região subplantar da pata traseira direita. O tempo gasto pelo animal lambendo a pata foi registrado durante os primeiros cinco minutos (primeira fase da resposta nociceptiva: dor neurogênica), e no intervalo correspondente de 15 a 30 minutos seguintes (segunda fase da resposta nociceptiva: dor inflamatória) após a injeção de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

4.6.3 Teste do movimento de cauda

Trinta e seis camundongos machos foram separados em seis grupos (n = 6) e receberam os seguintes tratamentos: ESA de *E. uniflora* (50, 100 ou 200 mg/kg v.o.), ou solução salina (0,9% v.o.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou indometacina (20 mg/kg i.p.). A solução salina e o ESA foram administrados uma hora antes do início dos testes, já as drogas padrão morfina e indometacina foram administradas 30 minutos antes. Os animais utilizados no estudo foram pré-selecionados 24 horas antes das experiências imergindo suas caudas em água morna (55 ± 1 °C). Aqueles que mantiveram suas caudas imersa por mais que cinco segundos foram excluídos e os animais selecionados foram separados em grupos. Em seguida, eles receberam tratamento e tiveram suas caudas imersas na água morna nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após o tratamento e o tempo de latência para uma reação de desconforto foi registrado, não ultrapassando 20 segundos (KHATUN *et al.*, 2015).

4.7 INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO PARA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DAS FRAÇÕES AQUOSA E ACETATO DE ETILA

4.7.1 Teste da formalina com uso de bloqueador de receptor opioide

Da mesma forma como já mencionado anteriormente para a avaliação da atividade antinociceptiva do ESA, este procedimento experimental ocorreu, mas dessa vez o tratamento se deu seguindo os passos a seguir: inicialmente foi administrado

naloxona (2 mg/kg i.p) 30 minutos antes da administração das frações FAE e FAqr (6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg v.o.) que foram administrados uma hora antes do início do teste. Então os animais receberam 20 µL de formalina (2,5%, v/v) na região subplatar da pata traseira direita. O tempo gasto pelo animal lambendo a pata foi registrado durante os primeiros cinco minutos (primeira fase da resposta nociceptiva: dor neurogênica), e no intervalo correspondente de 15 a 30 minutos seguintes (segunda fase da resposta nociceptiva: dor inflamatória) após a injeção de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism® versão 8.0 e expressos em valores médios com desvio padrão ($\pm$ DP). As diferenças estatisticamente significantes foram calculadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Os valores foram considerados significativamente diferentes em $p < 0,05$.

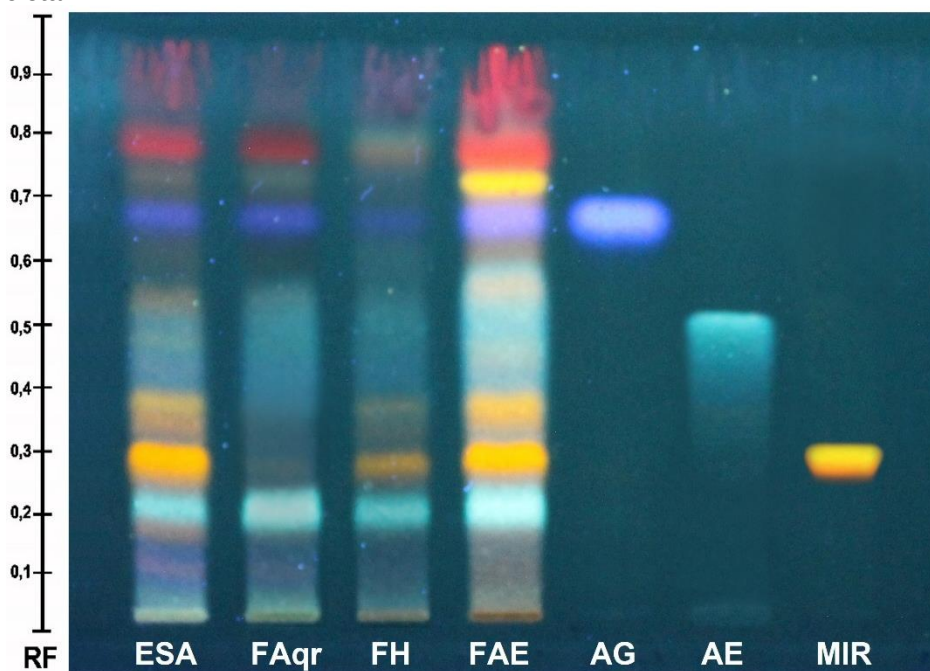
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO E FRAÇÕES

A cromatografia em camada delgada (CCD) por se tratar de procedimento simples, rápido e de baixo custo permitiu confirmar a presença dos três marcadores químicos de *E. uniflora* (ácido gálico, ácido elágico e miricitrina) através da comparação entre os fatores de retenção (R_f) das bandas observadas na amostra e dos padrões de referência.

Considerando a análise por CCD de ESA, FH, FAqr e FAE, é possível observar na figura 13 que os padrões de ácido gálico (AG; banda azul fluorescente; $R_f = 0,67$) e miricitrina (MIR; banda amarela; $R_f = 0,73$) apresentam bandas com melhor resolução do que o ácido elágico (AE; banda azul esverdeada; $R_f = 0,52$), que apresenta este efeito de cauda devido a solubilidade do mesmo, e que dificulta a identificação do padrão nas amostras analisadas, o que também foi observado por Bezerra *et al.* (2018).

Figura 13 - Cromatograma obtido por CCD do ESA, frações e padrões observados após derivatização e luz ultravioleta.



Legenda: ESA – Extrato bruto. FAqr – Fração Aquosa. FH – Fração Hexânica. FAE – Fração Acetato de Etila. AG – Ácido Gálico. AE – Ácido Elágico. MIR – Miricitrina.

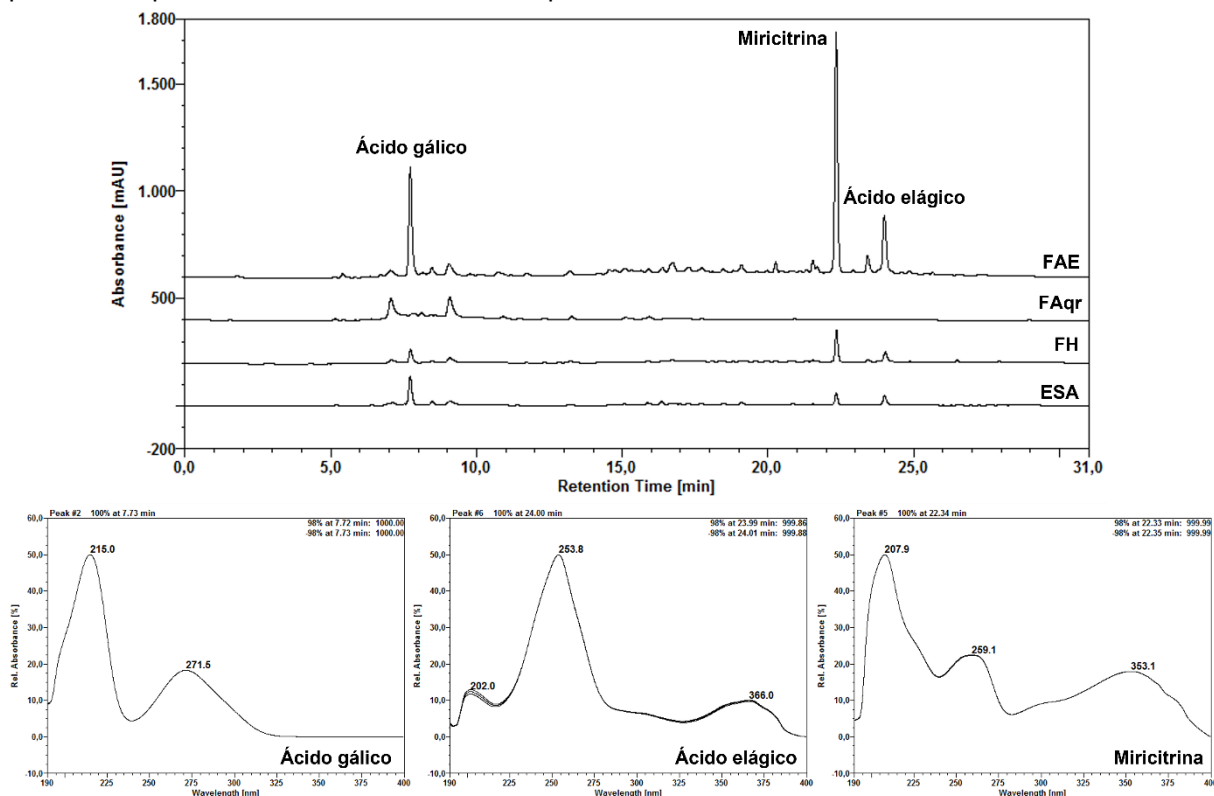
Fonte: Autoria própria (2022).

No que se refere ao ESA e as frações observamos uma série de bandas, sendo 12 bandas no ESA; 7 bandas na FH; 6 bandas na FAqr; 7 bandas na FAE. Foi possível observar que tanto no ESA quanto nas três frações há presença de ácido gálico e ácido elágico, embora a banda do ácido gálico na FAqr não tenha ficado tão evidente quanto nas outras. Na FAqr a banda referente a miricitrina apresentou-se menos evidente, enquanto na FAE foi intensificada.

A partir dessas análises pode-se inferir que a utilização da mistura de solventes etanol: água: propilenoglicol favorece a extração de compostos fenólicos, devido ao caráter polar do solvente garantido pela presença da água e do etanol. Somado a isto temos a presença do propilenoglicol que, como sugerido por Bezerra *et al.* (2020) explicaria a melhor solubilidade na extração de taninos devido ao efeito das porções hidrofóbicas das cadeias poliméricas e oligoméricas destes. Portanto, a mistura de solventes utilizada promove um bom rendimento de extração de ambas as classes de compostos estudados, os flavonoides e os taninos hidrolisáveis, garantindo assim a otimização do desempenho no processo de extração.

Analisando os cromatogramas obtidos por CLAE do ESA e das suas frações (Figura 14) observamos regiões específicas detectadas nos intervalos entre 7 e 10 min, e depois no intervalo de 21 a 25 min. Nesses intervalos foram detectados cinco picos, dois deles foram identificados como os taninos hidrolisáveis, ácido gálico e ácido elágico. Os outros picos são sugestivos de flavonoides, dentre eles é possível observar o pico característico de miricitrina, detectado com maior intensidade na FAE e ausente na FAqr. De forma semelhante ao que foi relatado na literatura, este composto também foi observado apenas na FAE, enriquecida em flavonoides. Os outros picos não puderam ser confirmados, mas há indicativos na literatura de que possam ser relativos a quercitrina (BEZERRA *et al.*, 2018).

Figura 14 - Cromatograma do extrato e frações de *E. uniflora* (270 nm) e espectros de varredura dos picos correspondentes aos marcadores da espécie.



Legenda: ESA – Extrato bruto. FAqr – Fração Aquosa. FH – Fração Hexânica. FAE – Fração Acetato de Etila. Fonte: Autoria própria (2022).

Através do fracionamento do ESA foi possível observar o enriquecimento na concentração dos marcadores, o que pode ser observado tanto nas análises de CCD quanto de CLAE. Como utilizamos inicialmente o solvente hexano que apresenta caráter bastante apolar, foi possível a extração melhorada de compostos apolares tais quais os polifenóis, e isto foi evidenciado na presença de diversas bandas referentes a estes grupamentos na CCD da FH. O segundo fracionamento, agora usando como solvente o acetato de etila, que apresenta um caráter mediano de polaridade, permitiu a extração e enriquecimento de compostos com caráter mais apolares que estavam presentes na fração aquosa separando-os de compostos mais polares. Assim, obtivemos uma fração enriquecida em compostos fenólicos semi-purificados, como observamos através da boa definição de picos na CLAE de FAE.

A seleção de um solvente adequado para obter frações ricas em determinado grupo de compostos constitui uma etapa bem importante. A utilização de solventes de crescente polaridade é necessária para realizar uma separação baseada nas propriedades dos compostos de interesse. Nesse sentido, o solvente acetato de etila tem sido utilizado em alguns trabalhos para obter frações ricas em flavonoides partindo de extratos brutos, demonstrando consequente

incremento das atividades biológicas (BEZERRA *et al.*, 2018; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2019; VAFAEI; BIN MOHAMAD; KARIMI, 2019).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO

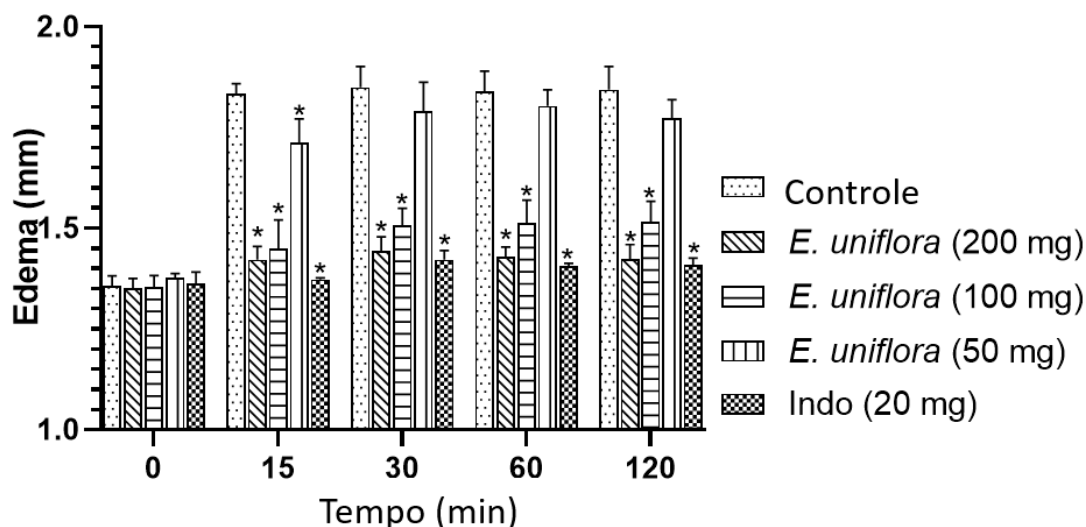
A infusão de folhas de *E. uniflora* já é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório contra dores reumáticas e febre. Schapoval *et al.* (1994) descreveram uma atividade anti-inflamatória para infusões de decoctos de folhas frescas e secas no edema de pata na concentração de 300 mg/kg. Buscando avaliar essa atividade anti-inflamatória do ESA, foram realizados os testes de edema de pata induzido por carragenina e a peritonite induzida por carragenina.

5.2.1 Edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata induzido por carragenina envolve três etapas distintas, de acordo com os mediadores envolvidos. Na etapa inicial, compreendendo os primeiros 60 minutos ocorre a liberação de histamina e serotonina, responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no início do processo inflamatório. A segunda etapa, que ocorre entre 60 e 120 minutos, a resposta é desencadeada por cininas, que têm a capacidade de induzir um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos e a biossíntese de prostaciclina e outros autacóides participantes do processo inflamatório. A terceira etapa começa da síntese de prostaglandinas no tecido inflamado, com um pico máximo na segunda hora. Nesta fase ocorre uma infiltração maciça de leucócitos polimorfonucleares (UENO *et al.*, 2000; CARVALHO, 2011).

Os nossos resultados podem ser observados na Figura 10, e eles demonstram que quando comparados ao grupo controle, os grupos tratados com o ESA de *E. uniflora*, nas concentrações de 100 mg/kg e 200 mg/kg, apresentaram significativa inibição no aumento do volume do edema de pata, e isto se manteve constante durante a execução do experimento, desde o tempo 15 minutos até 120 minutos, sendo o $p < 0,05$ (Figura 15). Estes resultados são similares ao do grupo tratado com indometacina (20 mg/kg).

Figura 15 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina e salina no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos



As medidas foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção s.pl. de carragenina. Análise estatística realizada no Graphpad Prism 6, usando teste ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparando os grupos tratados *versus* o grupo controle ($n = 6$ animais/grupo).

Fonte: Autoria própria (2022).

Como foi mencionado acima, a carragenina, que é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marinhas, é usada como estímulo inflamatório (diluída entre 1-2%) em modelos animais para testar substâncias, por provocar inchaço e dor (COSTA *et al.*, 2004). Ela induz o edema de pata resultando na liberação de mediadores tais como a histamina, serotonina, bradicinina, substância P e fator de agregação plaquetária, bem como algumas prostaglandinas (via da ciclooxigenase), dessa maneira, os achados neste estudo sugerem que as ações anti-edematogênicas do ESA de *E. uniflora* estão relacionadas à inibição de uma ou mais vias de sinalização intracelulares envolvidas nos efeitos desses mediadores. Mas, pela ação da carragenina em recrutar e promover a liberação de tantos mediadores químicos, é necessária a realização de testes que elucidem quais mediadores estão participando da atividade anti-inflamatória observada para o ESA.

Sobeh e colaboradores (2019), investigando a atividade anti-inflamatória do extrato butanólico das folhas de *E. uniflora* (100 mg/kg, v.o.) em um teste similar ao que realizamos, de edema de pata induzido por carragenina, diferindo no tempo em que os animais ficaram em observação, que foi de 24 horas, demonstraram que o extrato diminuiu o tamanho do edema induzido por carragenina em comparação com o controle positivo, que neste caso foi usado o anti-inflamatório diclofenaco. Eles

sugerem que esta atividade pode ser atribuída a inibição de COX-2, visto que é por meio desta via que age o diclofenaco. Eles atribuem esta atividade a presença de diversos flavonoides, entre eles miricetina e quercetina (SOBEH *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2015).

5.2.2 Peritonite induzida por carragenina

É conhecido que a carragenina tem ação na liberação de mediadores pró-inflamatórios, então uma injeção intraperitoneal de carragenina promove a liberação de citocinas leva ao recrutamento de leucócitos, principalmente polimorfonucleares, para o local da lesão, isto é uma resposta essencial e precoce da inflamação. Durante a inflamação há duas isoenzimas COX distintas capazes de converter ácido araquidônico em endoperóxidos de prostaglandinas. A COX-1, também conhecida como PGH sintase-1, é expressa constitutivamente na maioria das células. Por outro lado, a COX-2 (PGH sintase-2) é mais rapidamente induzível; e sua expressão varia dependendo do estímulo. A COX-2 é um produto gênico de resposta imediata acentuadamente sobreexpressada por força de cisalhamento, fatores de crescimento, promotores tumorais e citocinas (KATZUNG *et al.*, 2017), estas últimas foram induzidas e liberadas em presença da carragenina na cavidade peritoneal dos camundongos, o que promoveu a indução destas enzimas.

Neste estudo observamos que os animais tratados com o ESA de *E. uniflora* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg tiveram uma diminuição significativa na migração do número total de leucócitos (35,38%, 49,39% e 55,56%, respectivamente), e também promoveram uma diminuição na migração do número total de neutrófilos (20,76%, 35,85 e 60,37%, respectivamente), enquanto o grupo indometacina teve uma redução na migração de leucócitos de 79,01% e neutrófilos de 71,69% (Tabela 1). O valor de p calculado nesses achados foi menor que 0,05.

Tabela 1 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina e salina no teste de peritonite induzido por carragenina 1% em camundongos.

	Dose (mg/kg)	Leucócitos (10 ⁵ /mL)	Inibição (%)	Neutrófilos (10 ⁵ /mL)	Inibição (%)
Salina	-	8.1±0.9	-	5.3±0.5	-
Indometacina	20	1.7±0.6*	79.01	1.5±0.3*	71.69
<i>E. uniflora</i>	200	3.6±0.9*	55,56	2.1±0.4*	60,37

100 mg/kg	4.1±0.6*	49,39	3.4±0.4*	35.85
50	5.2±0.7*	35,81	4.2±0.3*	20.76

4 h após receberem a injeção s.pl. de carragenina, e após eutanásia, os animais tiveram o líquido de sua cavidade peritoneal removido e analisado. Análise estatística realizada no Graphpad Prism 6, usando teste ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparando os grupos tratados *versus* o grupo controle (n = 6 animais/grupo).

Fonte: Autoria própria (2022).

No mesmo estudo realizado por Sobeh e colaboradores (2019) foi demonstrado que o extrato butanólico de *E. uniflora* (100 mg/kg, v.o.) inibiu a migração leucocitária de forma semelhante ao diclofenaco, mas este efeito não foi significativo para ambas as drogas. Em nosso modelo, usamos o fármaco indometacina, que apresenta inibição não seletiva tanto para COX-1 quanto para a COX-2, o que pode sugerir que a ação do ESA de *E. uniflora* seja semelhante a este mecanismo.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO SECO POR ASPERSÃO

Devemos enfatizar que a definição dor é reconhecida como a percepção de uma sensação nociceptiva, logo ela abrange dois aspectos, a nocicepção e a percepção. A percepção envolve a função integrativa modulada por circunstâncias emocionais, motivacionais e psicológicas, enquanto a nocicepção é o resultado da ativação de neurônios sensoriais somáticos específicos. A partir destes conceitos, dor se enquadraria como termos mais adequados para o ser humano, enquanto nocicepção seria mais apropriado para modelos animais (NOBACK *et al.*, 1999).

E embora os animais não externem a habilidade de comunicar verbalmente um episódio doloroso quando são submetidos a um estímulo reconhecidamente nociceptivo, ou pelo fato de ainda não conseguirmos distinguir o tipo de comunicação existente se houver, quando os animais são submetidos a um estímulo reconhecidamente nociceptivo, eles apresentam respostas comportamentais, motoras e fisiológicas equivalentes às observadas em humanos. E a partir da observação destes parâmetros é possível inferir que um animal está vivenciando uma resposta algica, avaliar a sua intensidade e compreender como substâncias potencialmente analgésicas interferem no processo. Então, deste modo, os modelos experimentais de dor são chamados de modelos de nocicepção, e constituem o ponto de partida

para a caracterização farmacológica de novos compostos antinociceptivos (LAPA *et al.*, 2007).

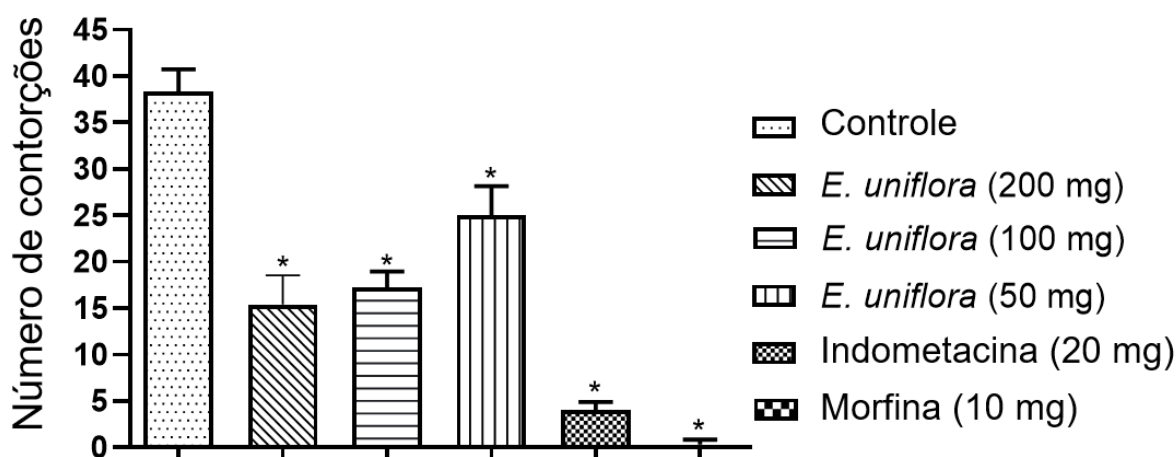
Após uma triagem inicial da atividade anti-inflamatória realizada com o ESA de *E. uniflora*, desenvolvemos as avaliações da atividade antinociceptiva e fim de investigar esses efeitos de *E. uniflora*, realizou-se os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e teste do movimento de cauda.

5.3.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Este teste é um modelo não seletivo de dor inflamatória visceral, mas com alto poder de sensibilidade na identificação de drogas antinociceptivas promissoras, sendo uma ferramenta de triagem de compostos com atividade analgésica periférica que envolvem a ativação de receptores somáticos e viscerais. Este modelo também induz inflamação local mediada por prostaglandinas, bradicinina, TNF- α , IL-1 β e IL-8 (OLONODE *et al.*, 2015). Tais mediadores locais estimulam neurônios nociceptivos sensíveis aos anti-inflamatórios esteroides e aos opioides. Mas o ácido acético também pode agir induzindo a nocicepção através da dissociação dos prótons existentes no ácido, que ativam receptores de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1) e canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) encontrados nos neurônios aferentes primários (IKEDA *et al.*, 2001; COUTAUX *et al.*, 2005).

Os nossos achados demonstraram que o tratamento com as diferentes concentrações do ESA de *E. uniflora* foi eficaz na redução do número de contorções abdominais induzidos por ácido acético. Os grupos tratados com as concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg demonstraram redução de 35%, 55% e 59,83% respectivamente, com $p < 0,05$. O grupo tratado com morfina teve redução de 99,14%, já o grupo tratado com indometacina demonstrou redução de 89,57%, quando comparados ao grupo controle (Figura 16).

Figura 16 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina, morfina e salina no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,85%, v/v) em camundongos



Os animais foram observados para registrar o número de contorções no intervalo correspondente de 5 a 15 minutos após a injeção do ácido acético. Análise estatística realizada no Graphpad Prism 6, usando teste ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparando os grupos tratados *versus* o grupo controle ($n = 6$ animais/grupo).

Fonte: Autoria própria (2022).

Este resultado demonstra que o ESA de *E. uniflora* foi capaz de produzir, de forma significativa, um efeito antinociceptivo no modelo experimental das contorções induzidas por ácido acético. Este modelo é sensível aos AINEs e a narcóticos, bem como a outras drogas de ação central (REICHERT *et al.*, 2001). Mas também é sensível a relaxantes musculares e outras drogas analgésicas. As contrações evidenciam-se por contrações e rotação do abdômen, seguidas por extensão de uma ou ambas as patas traseiras; a contagem do número de contorções verificadas em um intervalo de tempo pré-determinado é um indicativo da intensidade para a resposta nociceptiva (COUTO *et al.*, 2011).

Ainda no mesmo estudo, Sobeh e colaboradores (2019) investigaram a ação antinociceptiva do extrato butanólico de *E. uniflora* e demonstraram que o extrato tinha atividades significativas e dose-dependentes reduzindo o número das contorções induzidas por ácido acético, isso de forma semelhante ao diclofenaco. Eles acreditam que a resposta observada se deva a ação em receptores peritoneais locais, através da inibição da liberação dos mediadores inflamatórios envolvidos neste modelo.

Um estudo com óleos essenciais obtido das folhas de *E. uniflora* sendo eles óleo bruto, e as frações pentano, diclorometano e metanólica, foi observado que a fração pentano foi a única a apresentar efeito antinociceptivo significativo, inibindo as contrações em 70% na dose de 200 mg/mL (AMORIM *et al.*, 2009). Eles inferiram que

o efeito antinociceptivo observado tinha relação com os furanosesquiterpenos encontrados na fração pentano.

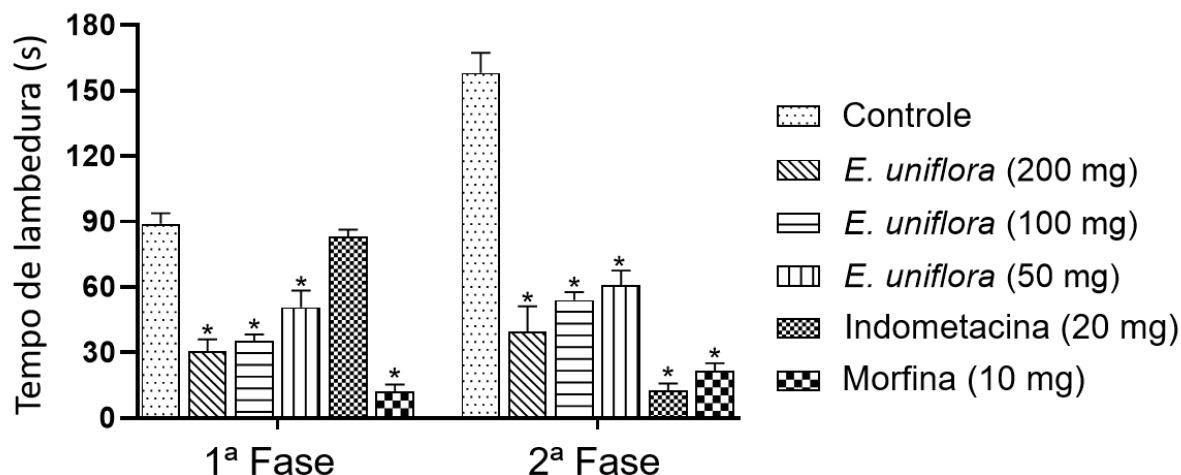
5.3.2 Teste da formalina

Este é outro modelo experimental para avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias investigadas, sendo sensível para várias classes de drogas analgésicas. Consiste em duas fases diferentes que são separadas por um tempo: a primeira fase, dita neurogênica (0-5 minutos) é resultante da estimulação química direta dos nociceptores, e a segunda fase, dita nocicepção inflamatória (15-30 minutos), é dependente da inflamação periférica e das alterações no processamento central da dor (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJOLSEN *et al.*, 1992; BERRINO *et al.*, 2003).

Portanto, o tempo do teste pode ser usado para esclarecer o mecanismo de um possível efeito antinociceptivo. Os estudos anteriores demonstram que AINEs, tais como aspirina, indometacina e diclofenaco, conhecidos por inibir a atividade da enzima COX, são ineficientes ou causam pequena inibição na primeira fase do teste, mas podem atenuar, de maneira dose-dependente, a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina (SANTOS; VEDENA; FREITAS, 1998).

Os nossos resultados na primeira fase demonstram que o tratamento por via oral com ESA (200, 100 e 50 mg/kg) reduziram significativamente o tempo de lambertura da pata injetada com formalina, quando comparado ao controle, em 65,62, 60,45 e 42,93%, respectivamente. A morfina (10 mg/kg) reduziu significativamente em 93,43%, já a indometacina não apresentou diferença estatística do grupo controle. Já na segunda fase do teste, as diferentes concentrações do extrato de *E. uniflora* (200, 100 e 50 mg/kg) produziu uma considerável redução no tempo de lambertura da pata de 74,97, 65,86 e 61,44%, respectivamente, com $p < 0,05$. Os controles positivos indometacina (20 mg/kg) e morfina (10 mg/kg) foram capazes de diminuir de maneira expressiva em 92 e 86,31%, quando comparado ao controle (Figura 17).

Figura 17 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina, morfina e salina no teste da formalina em camundongos



Os animais foram observados para registrar o número de lambeduras da pata em dois intervalos de tempo, no primeiro de 0 a 5 minutos e depois no intervalo de 15 a 30 minutos. Análise estatística realizada no Graphpad Prism 6, usando teste ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparando os grupos tratados versus o grupo controle ($n = 6$ animais/grupo).
Fonte: Autoria própria (2022).

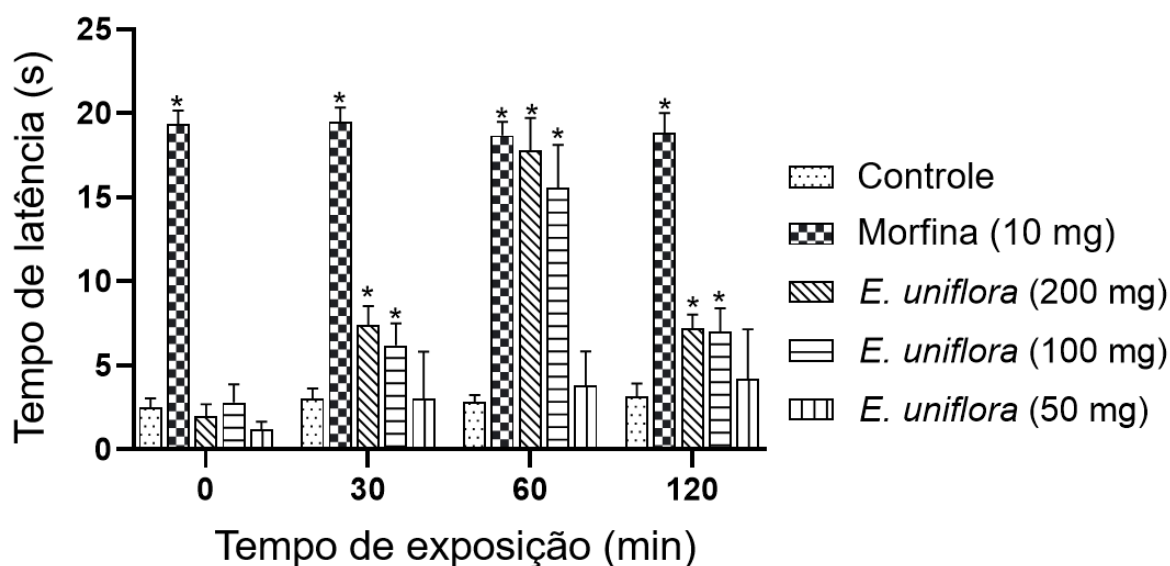
Diversos trabalhos revelam que a aplicação de formalina provoca a liberação de distintos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, óxido nítrico, glutamato, cinina, entre outros (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SANTOS *et al.*, 1998), estabelecendo potenciais de ação e despolarizando a membrana neural. A formalina atua também através da ativação de receptores TRPA1, que são canais iônicos não seletivos, e estão presentes preferencialmente em neurônios nociceptivos primários. Os receptores TRPA1 são acionados por compostos irritantes, baixas temperaturas, substâncias eletrofílicas ou por meio de mediadores, como a fosfolipase C ou proteína quinase A, que iniciam vias de sinalização celular e conduzem a ativação do receptor.

Nossos achados indicam que o ESA de *E. uniflora* é capaz de inibir tanto a primeira fase quanto à segunda fase da nocicepção induzida pela formalina em camundongos, de forma semelhante a morfina. A morfina e outras drogas opioides exercem suas atividades antinociceptivas atuando em receptores (μ , κ e δ) e assim modulam a transmissão do estímulo nociceptivo.

5.3.3 Teste do movimento de cauda

Nossos achados indicaram que o tempo de latência dos animais tratados com o ESA nas concentrações de 200 e 100 mg/kg aumentou significativamente em comparação ao grupo controle após 30 minutos de tratamento, com $p < 0,05$ (Figura 18). No tempo de 60 minutos os grupos tratados com o ESA nessas concentrações apresentaram eficiência máxima, com resultados similares ao grupo tratado com morfina. O grupo tratado com o ESA na concentração de 50 mg/kg não apresentou diferença significativa do grupo controle.

Figura 18 - Efeito do ESA (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), morfina e salina no teste do movimento de cauda em camundongos.



Os animais foram observados por 120 minutos para registrar o tempo de latência para retirada da cauda do banho aquecido. Análise estatística realizada no Graphpad Prism 6, usando teste ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparando os grupos tratados *versus* o grupo controle ($n = 6$ animais/grupo).

Fonte: Autoria própria (2022).

Esse teste é sensível para identificar a atividade de compostos cujos mecanismos sejam semelhantes aos promovidos pelos analgésicos opioides. Este ensaio experimental consiste na aplicação de uma fonte radiante de calor na cauda do animal como estímulo nociceptivo térmico, provocando seu movimento de retirada. Um aumento no tempo de reação é geralmente considerado como um parâmetro importante para avaliar a atividade antinociceptiva central, caracterizando-se por uma nocicepção aguda não-inflamatória. Sendo assim, substâncias que atuam em nível central, como a morfina, são capazes de suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo na cauda, aumentando o tempo de latência.

Sobeh e colaboradores (2019) realizaram um teste semelhante, o teste da placa quente, que também detecta substâncias analgésicas de efeito central, visto que avalia o tempo de latência para que o animal levante ou lamba as patas estando numa placa aquecida a ($55 \pm 0,5$ °C) ao reagirem a um estímulo térmico. Nesse estudo, eles observaram que o extrato butanólico (100 e 200 mg/kg) de *E. uniflora* administrado por via oral foi capaz de aumentar a latência para responder (retirar e lamba a pata) no teste da placa quente, nos tempos 1, 2, 3, e 4 horas. Como fármaco comparador eles utilizaram a nalbufina, um analgésico opioide, e sugeriram que o extrato butanólico de *E. uniflora* tenha atividades analgésicas centrais de forma semelhante.

5.4 INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO PARA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DAS FRAÇÕES AQUOSA E ACETATO DE ETILA

Nas plantas medicinais, embora possam existir diversos metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são normalmente isolados e estudados para fins terapêuticos. Para que isso ocorra é necessário uma complexa e longa análise de substâncias ativas, visto que, muitas vezes, os compostos presentes em menor proporção na planta, são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por esse motivo, existe a necessidade de vários trabalhos prévios para análise de extratos e testes biológicos, envolvendo extratos semi-purificados e frações (YUNES; CALIXTO, 2010).

Neste contexto, as metodologias para preparações de extratos vegetais, são parte do processo que visam isolar os seus constituintes (SIMÕES *et al.*, 2004). Inicialmente, utilizamos como solventes a mistura etanol, água e propilenoglicol na proporção 1:1:1. Posteriormente o extrato foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, o hexano e o acetato de etila, visando uma semi-purificação das substâncias através das suas polaridades. Assim, para localizar os princípios ativos, os extratos e as frações semi-purificadas foram testados e analisados em procedimentos cromatográficos para a identificação dos compostos.

A fim de investigar o mecanismo de ação envolvido no efeito antinociceptivo observado no teste da Formalina, repetimos o teste agora utilizando as duas frações oriundas do ESA, a fração acetato de etila e a fração aquosa residual (FAE e FAqr) nas doses de 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg. Por impedimento farmacotécnico

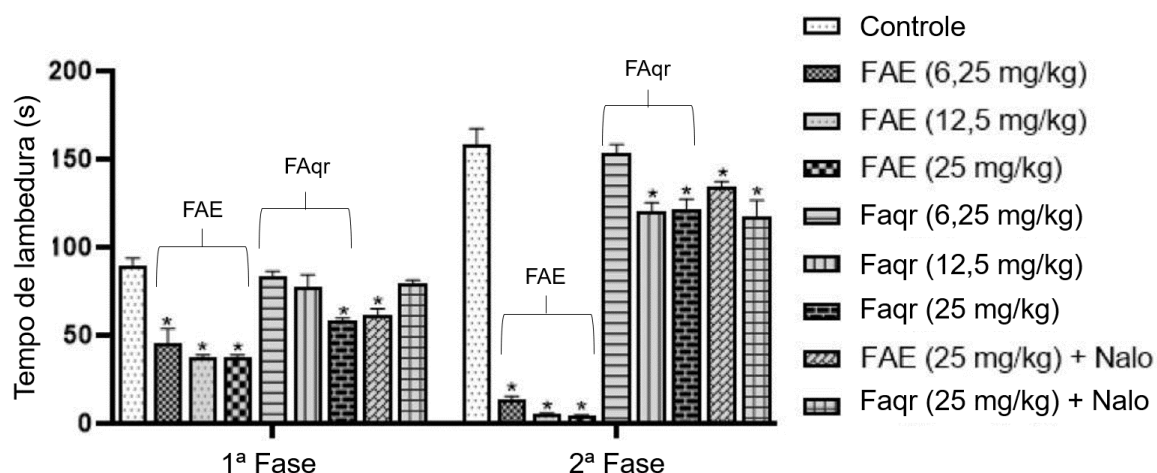
não foi possível analisar o efeito da fração hexânica, visto que esta tinha consistência de uma graxa insolúvel, e ainda após o uso de Tween 80 (5%) como tensoativo não foi possível dissolvê-la em meio aquoso para assim promover sua administração por via oral como foi realizado com as demais frações. Depois disso, confrontamos a maior dose utilizada anteriormente (25 mg/kg) realizando um tratamento prévio com uma droga bloqueadora dos receptores opioides, a naloxona (2 mg/kg).

Priorizamos por estudar o mecanismo relacionado aos receptores opioides pois ele é bastante significativo, já que é bem efetivo em diminuir a nocicepção induzida por estímulos químicos (LE BARS *et al.*, 2001). Somado a isto, tais receptores estão envolvidos em diversos níveis de transmissão dolorosa, sendo encarregados pelas ações antinociceptivas diretas e indiretas dos agonistas opioides (LEE *et al.*, 2003). Os receptores opióides μ (1 e 2), δ (1 e 2) e κ (1, 2 e 3) e sistemas de peptídeos endógenos (encefalinas, dinorfinas e β -endorfinas) estão consideravelmente envolvidos nos processos antinociceptivos, sendo encontrados em regiões críticas para a modulação da dor, como a área cinzenta periaquedutal, núcleos hipotalâmicos, sistema límbico e núcleo magno da rafe (HERNÁNDEZ-DELGADILLO; CRUZ, 2006).

Em nosso estudo observamos inicialmente que a FAE em todas as doses analisadas (6,25; 12,5 e 25 mg/kg) apresentou diferença significativa em relação ao controle na primeira fase do teste da formalina (resposta neurogênica), reduzindo aparentemente pela metade o tempo gasto em lambeduras, com $p < 0,05$ (Figura 19). Um achado interessante é o de que a FAqr, na primeira fase do teste, só apresentou diferença significativa com relação ao controle na maior dose, o que nos sugere que havia algum composto em maior concentração na FAE que permitia a melhor resposta no efeito de redução no tempo gasto em lambedura.

Na segunda fase do teste (dor inflamatória) a atividade da FAE nas três doses se mostrou ainda melhor, em relação ao observado com o grupo controle, apresentando redução de até 3 vezes no tempo gasto em lambedura. Enquanto para a atividade da FAqr foi observada diferença significativa apenas nas doses de 12,5 e 25 mg/kg em relação ao controle, com $p < 0,05$ (Figura 19). Esses achados nas duas fases do teste de formalina corroboram para a comprovação da atividade antinociceptiva de *E. uniflora* frente a esse teste.

Figura 19 - Efeito de FAE e FAqr (6,25, 12,5 e 25 mg/kg, v.o.), FAE e FAqr (25 mg/kg, v.o.) + naloxona (2 mg/kg i.p.) e salina no teste da formalina em camundongos.



Os animais foram observados para registrar o número de lambeduras da pata em dois intervalos de tempo, no primeiro de 0 a 5 minutos e depois no intervalo de 15 a 30 minutos. Foi realizada uma administração prévia (30 min) de naloxona 2 mg/kg. Análise estatística realizada no Graphpad Prism 6, usando teste ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparando os grupos tratados *versus* o grupo controle ($n = 6$ animais/grupo).

Fonte: Autoria própria (2022).

Analisando a composição fitoquímica das frações (FAE e FAqr) através dos cromatogramas (Figuras 13 e 14), percebemos que a miricitrina é um composto que está presente em maior evidência na FAE, sendo assim, esse composto pode estar envolvido na atividade exacerbada que foi observada nesta fração, em detrimento do que foi observado na FAqr. Sabe-se que os flavonoides interagem com enzimas e proteínas celulares e, assim, regulam processos como crescimento celular, apoptose, resposta imunológica e inflamação (CALIXTO *et al.*, 2004; KO *et al.*, 2005). Estudos anteriores demonstraram que a administração sistêmica de miricitrina foi capaz de reduzir a dor aguda e crônica em camundongos e essa atividade foi atribuída à inibição da atividade da proteína quinase, da redução na produção de NO e da atividade anti-inflamatória (AGULLO *et al.*, 1997; GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000; MEOTTI *et al.*, 2006a; MEOTTI *et al.*, 2006b).

Em nosso estudo, utilizamos uma administração oral de uma fração enriquecida, contendo miricitrina, que apresentou atividade antinociceptiva semelhante a morfina e seguimos para a investigação do possível mecanismo de ação. Iniciamos com o tratamento prévio dos animais com naloxona (2 mg/kg i.p.), um antagonista não seletivo para os receptores opioides, seguimos com a administração de FAE e FAqr (25 mg/kg) e 1 hora após administramos a formalina subplantar e submetemos os animais ao teste (Figura 19).

Como foi dito anteriormente, os opioides agem sobre os receptores μ , δ e κ , acoplados a proteína G, e quando ativados inibem a adenilato ciclase, subsequentemente reduzindo o influxo de cálcio, aumentando o fluxo de potássio, gerando uma redução na liberação de neurotransmissores excitatórios pré-sinápticos e hiperpolarização pós-sináptica e assim reduzem a transmissão dolorosa e a nocicepção (STEIN, 2013). Em estudo realizado por Meotti e colaboradores (2007) utilizando fatias corticais de encéfalos de ratos, foi evidenciado que a miricitrina inibiu o influxo de cálcio através do bloqueio dos canais de cálcio levando a uma atividade antinociceptiva comprovadamente com ação central. Eles demonstraram também que a atividade antinociceptiva de miricitrina envolve mecanismos de ativação da proteína G inibitória, abertura de canais específicos de K^+ e inibição do influxo de cálcio.

Em nosso estudo foi possível observar que a naloxona reverteu boa parte do efeito antinociceptivo da FAE e FAqr no modelo de nocicepção induzido pela injeção subplantar de formalina. Esse resultado sugere que os receptores opioides estão envolvidos na mediação da resposta inflamatória de FAE e FAqr de *E. uniflora* no teste da formalina e que esta atividade se deve principalmente a miricitrina, visto que esta molécula está em maior proporção na FAE evidenciado na caracterização fitoquímica das frações por CCD e CLAE.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção do extrato seco por aspersão (ESA) das folhas de *Eugenia uniflora* ocorreu por uma turboextração com posterior secagem por spray dryer. A partir deste extrato bruto foi realizado uma série de fracionamentos que permitiu a obtenção de das frações hexânica, aquosa residual e acetato de etila (FH, FAqr e FAE, respectivamente).

Através da caracterização fitoquímica do ESA das folhas de *E. uniflora* e das frações foi possível a identificação dos três marcadores químicos: ácido elágico, ácido gálico e miricitrina, este último estando evidente apenas no ESA e nas FH e FAE.

O ESA de *E. uniflora* demonstrou atividade anti-inflamatória em modelos experimentais agudos, através da diminuição do edema de pata induzido por carragenina durante o tempo total do experimento (120 minutos), bem como promoveu a diminuição da migração de leucócitos e neutrófilos de forma semelhante a indometacina.

O ESA de *E. uniflora* também demonstrou atividade antinociceptiva nos modelos de dor periférica e central, sendo evidenciado pela redução do número de contorções abdominais, redução no tempo de lambertura em ambas as fases da resposta nociceptiva a formalina e maior latência para o movimento de cauda.

A investigação do possível mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva realizada com as frações FAE e FAqr demonstrou que a via opioide pode estar envolvida na ação central, visto que essa ação foi bloqueada pelo uso do antagonista não seletivo de receptores opioides, naloxona. Uma possível explicação para esta atividade antinociceptiva mediada pela via opioide é a presença do flavonoide miricitrina, isto sendo sugerido pela maior presença da ação antinociceptiva na FAE contra a ação na FAqr.

REFERÊNCIAS

- ABOUTABL E. A., MESELHY K. M., ELKHREISY E. M., NASSAR M. I., FAWZI R. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. **J Essent Oil Bear Plants**, v. 14, p. 192-200, 2011.
- ANDRADE, E. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonist as potential analgesic drugs. **Pharmacology Therapy**, v. 13, n. 2, p. 189-204, 2012.
- AGULLO G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; RÉMÉSY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, N. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 1649-1657, 1997.
- AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n 10, p. 923-928, 2009.
- ANGELY, J. **Flora analítica do Paraná**. São Paulo: USP, p.487-491. 1965.
- ASCENÇÃO, M. D.; LUSTOSA, V. R.; SILVA, L. J. Canabinoides no tratamento da dor crônica. **Rev. Med. Saúde Brasília**, v.5, n. 3, p. 255-263, 2016.
- BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v. 94, p. 557-572. 1998.
- BESSON P.; PERL E. R. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J Neurophysiol**, v. 32, p. 1025-1043, 1969.
- BEZERRA, I. C. F.; RAMOS, R. T. M.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Chromatographic Profiles of Extractives from leaves of *Eugenia uniflora* L., **Rev. Bras. De Farmacog.**, v.28, p. 92-101, 2018.
- BEZERRA, I. C. F.; RAMOS, R. T. M.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Optimization Strategy for Extraction of Active Polyphenols from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 735-750, 2020.
- BIAZOTTO, K. R.; MESQUITA, L. M. S.; NEVES, B. B. *et al.* Brazilian Biodiversity Fruits: Discovering Bioactive Compounds from Underexplored Sources, **J. Agric. Food Chem.**, p. 1860-1876, 2019.
- BOTSARIS, A. S.; MACHADO, P. V. **Memento terapêutico de fitoterapia**. Rio de Janeiro: Flora Medicinal, v.1, 1999.
- BRASILEIRO B. G.; PIZZIOLO V. R.; RASLAN D. S.; JAMAL C. M.; SILVEIRA D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Rev Bras Ciênc Farm.** v., 42, p. 195–202, 2006.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CHEN, Y. C.; YANG, L.L.; LEE, T. J. F. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor- κ B activation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 1445-1457, 2000.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 58, p. 104-105, 2013.

CHOVATIYA R.; MEDZHITOV R. Estresse, inflamação e defesa da homeostase. **Mol Cell**, v. 54 (2): p. 281-288, 2014.

CHROUSOS, G. P.; MARGIORIS, A. N. Adrenocorticosteroides e antagonistas córticosuprarrenais. In: Katzung, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.574-589, 2001.

CLARK, A. R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 275, n. 1-2, p. 79-97, 2007.

COSTA, B. *et al.* Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. **Naunyn Schmiedebergs Archives Pharmacology**, v. 369, p. 294-299, 2004.

ETIENNE, R.; VIEGAS, F.P.D.; VIEGAS Jr., C. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Rev. Virtual Quim.**, v. 13, n.1, 2021.

FABIOLA, G. F.; DAMODHARAN, L.; PATTABHI, V.; NAGARAJAN, K. Cyclooxygenase-2- An attractive target for fruitful drug design. **Current Science**, v. 80, n. 1. 2001.

FALCÃO, T. R. *et al.* Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Comp.Altern. Med.**, v. 18, p. 84, 2018.

FEIN, A. NOCICEPTORES: As células que sentem dor. PETROV, P.; FRANCISCHI, J. N.; FERREIRA, S. H. tradutores. Ribeirão Preto–SP: **Dor On Line**; 2011.

FU, Y. *et al.* Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 168, p. 189–200, 2019.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**. v. 15, n. 2, p. 129-141, 1999.

GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; GRATACAP, M. P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **Gen. Pharmacol.**, v. 32, p. 279-286, 1999.

- GU J.Q., PARK E.J., LUYENGI L., HAWTHORNE M.E., MEHTA R.G., FARNSWORTH N.R., PEZZUTO J.M., KINGHORN A.D. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. **Phytochemistry**, v. 58, p.121-127, 2001.
- HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HOLANDA PINTOS, S.A; PINTO, L.M.S; GUEDES, M.A; CUNHA, G.M.A; CHAVES, M.H; SANTOS, F.A; RAO, V.S. Antinociceptive effect of triterpenoid a, b-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phitomedicine**, v.15, p.630-634, 2008.
- 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.
- Index Kewensis Plantarum Phanerogamarum**: Supplementarum quartum 1906-1910. London: Oxford University Press, 1958.
- JUNIOR, D.M.; ARAUJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; DE SOUZA, A.W.S.; DA SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C.; CRUVINEL, W.M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Rev. Brasileira de Medicina**, p. 66-81, 2011.
- KARLING, M. **Isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante do coproduto bagaço de uva**. Dissertação (mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco – PR, 2017.
- KAZTUNG, B.G. TREVOR, A.J. **Farmacologia básica e clínica**. 13 Ed. AMGH. Porto Alegre, 2017.
- KHATUN, A., IMAM, M. Z.; RANA, M. S. Antinociceptive effect of methanol extract of leaves of *Persicaria hydropiper* in mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 63, 2015.
- KO, C. H.; SHEN, S. C.; HSU, C. S.; CHEN, Y. C. Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 913-927, 2005.
- KRAYCHETE, D.C.; CALASANS, M.T.A; VALENTE, C.M.L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.
- LAPA, A. J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, T. R., CASTRO, M. A. S., & LIMA, T. C. M. Plantas Medicinais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica. **Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 144, 2008.
- LEVINE J.D.; TAIWO Y. Inflammatory Pain, em: WALL P.D.; MELZACK R.; BONICA J.J. **Textbook of Pain**. 3° ed., Edinburgh, Scotland, Churchill Livingstone, p. 45-56, 1994.
- LIU, E.H. *et al.* Elevated prepronociceptin, nociceptin/orphanin FQ and nocistatin concentrations in rat chronic constriction nerve injury and diabetic neuropathic pain models. **Neurosci Lett.**, v. 506, n. 1, p. 104-106, 2012.

LOESER J.D.; BUTLER S.H.; CHAPMAN R.; TURK D.C. **Bonica's Management of Pain**, Ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2001.

LOESER J.D.; TREEDE, R. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOEWENSTEIN W.R. Mechano-Electric Transduction in the Pacinian Corpuscle: Initiation of Sensory Impulses in Mechanoreceptors, em: AUTRUM H - **Handbook of Sensory Physiology**. Berlim. Springer-Verlag, p. 267-290, 1971.

MASFERRER, J. L.; ZWEIFEL, B. S.; MANNING, P. T.; HAUSER, S. D.; LEAHY, K. M.; SMITH, W. G.; ISAKSON, P. C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. **National Academy Sciences National Academy Sciences**, v. 91, p. 3228-3232, 1994.

MENEZES, G. B.; REZENDE, R. M.; AMARAL, S. S.; CASTRO, C. H. B. C.; CARA, D. C. Estudo da eficácia da associação entre dexametasona, piroxicam, cianocobalamina e orfenadrina (Rheumafim®) em modelos experimentais de inflamação em ratos. **Odontologia. Clínica Científica**. v. 8, n. 4, p. 319-324. 2009.

MEOTTI, F. C.; MISSAU, F. C.; FERREIRA, J.; PIZZOLATTI, M. G.; MIZUZAKY, C.; NOGUEIRA, C. W.; SANTOS, A. R. S. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 1707-1713, 2006a.

MEOTTI, F. C.; LUIZ, A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; KASSUYA, C. A. L.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A. R. S. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin. Evidence for a role of the l-arginine–nitric oxide and protein kinase C pathways. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p. 789-796, 2006.

MERRER, J. *et al.* Reward processing by the opioid system in the brain. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 1379-1412, 2009.

MERTENS, P. *et al.* Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: a focus on low back pain (part A). **Neurocirurgie**, v. 61, n. 3, p. 22-34, 2015.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164. 1999.

MITCHELL, J. A.; AKARASERENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, 1993.

OLDONI, T. L. C.; MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 306–312, 2016.

OLIVEIRA, A. M., DE LUNA FREIRE, M. O., DA SILVA, W. A. V., FERREIRA, M. R. A., PAIVA, P. M. G., SOARES, L. A. L., NAPOLEÃO, T. H. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 95, 289-297, 2018.

PERTOVAARA A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. **Eur. J. Pharmacol.** v. 15, n. 716, p. 2-7, 2013.

RAMOS, R. T. M.; BEZERRA, I. C. F.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Spectrophotometric Quantification of Flavonoids in Herbal Material, Crude Extract, and Fractions from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Pharmacog. Research**, v. 9, n. 3, p. 253-260, 2017.

RATTMANN Y.D.; DE SOUZA L.M.; MALQUEVICZ-PAIVA S.M.; DARTORA N.; SASSAKI G.L.; GORIN P.A.; IACOMINI M. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2012, 623940, 2012.

RAJAKARIAR, R.; YAQOOB, M. M.; GILROY, D. W. COX-2 in Inflammation and Resolution. **Molecular Interventions**, v. 6, n. 4, p. 199-207, 2006.

ROCK K.L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, p. 99-126, 2008.

RONCATO, J. F. F.; CAMARA, D., BRUSSULO PEREIRA, T. C. *et al.* Lipid reducing potential of liposomes loaded with ethanolic extract of purple pitanga (*Eugenia uniflora*) administered to *Caenorhabditis elegans*. **J Liposome Res.**, v. 29 p. 274-282, 2019.

RUCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G.G. **Intrumentelle Pharmazeutische Analytik**. Stutgar: Wissenschaftliche, 1998.

RUSCHEWEYH, R., *et al.* Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. **Mol Pain.**, v. 7, n. 20, 2011.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K.M.; LATHA, L.Y. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plant's Extracts. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resolomics. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 69-95, 2004.

SEWARDS, T.V.; SEWARDS, M.A. The medial pain system: neural representations of the motivational aspect of pain. **Brain Research Bulletin**, v. 59, p. 80-163, 2002.

SILVA, J.C. *et al.* Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2017.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 2ª Ed. São Paulo, p. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOBEH M.; EL-RAEY, M.; REZQ, S. *et al.* Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **J of Ethnopharmacol.**, v. 240, 2019.

STEFANELLO M.É.; PASCOAL A.C.; SALVADOR M.J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chem Biodivers**, v. 8, p. 73-94, 2011.

STEIN C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 716, n. 15, p. 179-187, 2013.

TESKE, M. TRENTINI, A.M.M. **Compendio de Fitoterapia**. Curitiba: Herbarium, p. 268, 1997.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 812, p. 85-99, 2004.

TYLER, V.E. Phytomedicines: back to the future. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 1589-1592, 1999.

YUNES, R. S.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. 1ª Ed. Chapecó: Editora universitária, 2001.

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

Recife, 18 de janeiro de 2021

Ofício nº 76/20

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

Para: **Prof. Luiz Alberto Lira Soares**

Departamento de Farmácia/CCS

processo nº0068/2020

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação da atividade gastroprotetora, anti-inflamatória e analgésica de extrato, frações e fitofármacos obtidos a partir das folhas de eugenia uniflora linn ”**, registrado com o nº0068/2020 sob a responsabilidade da **Prof Luiz Alberto Lira Soares** Que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 15/12/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/12/2020 a 15/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico
Nº de animais	336
Peso/Idade	30-40g/ 60 dias
Sexo	macho
Origem: Biotério de Criação	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da UFPE.