



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



WÊNDEO KENNEDY COSTA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Psidium glaziovianum*
Kiaersk**

Recife

2023

WÊNDEO KENNEDY COSTA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Psidium glaziovianum*
Kiaersk**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Sistemas biológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Alisson Macário de Oliveira

Prof. Dr Fábio André Brayner

Recife

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Costa, Wêndeo Kennedy.

Composição química, avaliação toxicológica e atividades biológicas do óleo essencial de folhas de *Psidium glaziovianum* kiaersk. / Wêndeo Kennedy Costa. – 2023.

146 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva.

Coorientador: Alisson Macário de Oliveira.

Coorientador: Fábio André Brayner.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, 2023.

Inclui referências.

1. Artrite. 2. Cicatrização. 3. Inflamação. 4. Myrtaceae - segurança de uso. I. Silva., Márcia Vanusa da. (orient.). II. Oliveira, Alisson Macário de. (Coorient.). III. Brayner, Fábio André. (Coorient.). IV. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-102

WÊNDEO KENNEDY COSTA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Psidium glaziovianum*
Kiaersk**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Sistemas biológicos.

Aprovado em: 14/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva - Orientadora
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Magda Rhayanny Assunção Ferreira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva
Universidade CEUMA

Em especial a minha mãe, Magna Batista da Costa por seu amor incondicional e por sempre acreditar em mim, transmitindo-me as palavras de incentivo, que me dão a força devida para lutar por meus ideais. Aos meus irmãos Roberto Belo e Wesley Costa, que sempre estiveram ao meu lado nesta jornada que é a vida. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Se alguém me contasse que esse dia chegaria eu não acreditaria. Quando comecei a graduação em Ciências Biológicas lá na Universidade de Pernambuco em 2012 eu achava que não sobreviveria ao primeiro período, ao longo do curso pensei em desistir umas 1000 vezes, mas com muita dedicação, políticas públicas e incentivo de amigos, da minha mãe, dos meus irmãos, de alguns professores entusiasmados e de muitos que estavam ao meu redor, enfim, chego a esse dia.

Agradeço a minha querida orientadora Márcia Vanusa, que de braços abertos recebeu um desconhecido em seu laboratório e se dispôs a passar parte dos seus conhecimentos. Minha eterna gratidão pela paciência, pela sua disponibilidade e por contribuir na minha formação profissional, com todas as idealizações desse projeto e de tantos outros. Certamente o propósito de sua vida é incentivar quem está ao seu redor.

Ao meu coorientador e companheiro de vida Alisson Macário, que muito esteve ao meu lado ajudando e compartilhando todos os momentos desse projeto e da vida. Sou muito grato por todo auxílio na execução desse sonho que agora se realiza, tem muito de você em cada parte dessa tese. Obrigado por estar disponível quando precisei estar no laboratório a madrugada toda, ou acordar muito cedo para executar algum experimento. Você é incrível, te amo!

Ao professor Fábio Brayner que inicialmente se dispôs a colaborar com o meu Doutorado e esteve sempre de portas abertas para auxiliar na execução do mesmo. Meu muito obrigado e espero contar em próximas colaborações.

À minha mãe Magna Costa, que nunca mediu esforços no investimento da minha formação pessoal e acadêmica, por sempre estar comigo independentemente da situação, pelos momentos de felicidade e por ser quem sou hoje. Obrigado por toda disponibilidade em acordar cedo quando o cansaço da vida me fazia perder a hora e você prontamente estava a me acordar para que pudesse voar cada vez mais alto e longe. Amo muito você e todas as conquistas tenha certeza que é para você.

Aos meus irmãos Roberto Júnior e Wesley Costa, e minha cunhada Stefanny Íris que enchem meu coração de alegria pelo simples fato de existirem, obrigado por estarem comigo nessa jornada que é a vida e por sempre estarem prontos a ouvir minhas histórias, mesmo muitas vezes sem entender.

À minha eterna avó Zuleide Costa (*in memoriam*), sei que hoje você não faz parte desse plano, mas tenho certeza que estaria extremamente feliz em me ver

conquistando mais esse objetivo. Serei eternamente grato por todos os ensinamentos e por todos os momentos compartilhados. Te amo muito e sinto sua falta!

Toda minha família que sempre acreditou e me incentivou nos estudos, meus sinceros agradecimentos. Agradeço por tudo! Seja na preocupação com o bem estar, nos pensamentos positivos e por permanecerem comigo nos momentos diversos.

Aos meus amigos Ynayaes, Thaís, Drielly e Yales por estarem comigo desde o início da idealização de um sonho que parecia impossível e que hoje estou alcançando níveis que jamais imaginei. Nossos caminhos se cruzaram muito antes disso tudo acontecer e vocês sabem bem longa a jornada que foi. Desculpa pelos momentos que não pude compartilhar com vocês por causa dessa jornada, mas dedico este trabalho a vocês, que sempre acreditaram em mim!

Aos meus eternos Marmotas (Édipo, Edyanne, Cleyanna e Juliana) por serem minha família durante cinco anos e sempre acreditarem no meu potencial. As horas de estudos no ICB/UPE ou Biblioteca da FCM me fizeram chegar até aqui. Agradecimento especial à Édipo, obrigado por ser o melhor amigo de todas as horas e sempre disponível a me receber e me ouvir falar sobre os mais aleatórios assuntos.

Aos Raizeiros Izabelly, Julyanne e José Roberto eu quero deixar bem claro aqui que vocês sempre serão minha melhor equipe e que sempre que tiverem uma ideia, por mais louca que seja, tenham certeza que eu estarei abraçando essa ideia com vocês. Vocês foram fundamentais na minha jornada durante o mestrado e nossa amizade deu tão certa que o encontro anual do raizeiros tá aí para provar. Essa conquista tem muito de vocês. Obrigado Bruno por acompanhar a gente nessa jornada.

Aos meus amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais: Andreza Larissa, Bartira, Beatriz, Bruno Vinicius, Iris, João Victor, Joyce Guedes, Larissa, Luciclaudio, Maisa, Paloma, Priscila, Roger e Valquíria. Muita gratidão por vocês, sei que nem todos os dias foram dias ensolarados, mas vocês estiveram comigo nessa jornada. Obrigado pela amizade, convivência e pelas conversas.

Valquíria e Beatriz, obrigado por estarem comigo durante essa jornada, sei que vocês poderiam ter escolhido alguém mais calmo para acompanhar vocês no PIBIC, mas vocês abraçaram sempre minhas ideias e tenho certeza que vocês chegarão longe.

Matheus Ferreira o resultado desse trabalho tem muito de você e tem também muito hambúrguer de Raul e muitas horas de conversa. Meu muito obrigado pela

companhia, por todas as vezes que precisamos passar por baixo do portão e por toda ajuda que você me deu nos experimentos.

Aos amigos que puderam compartilhar comigo esta fase tão importante, por me escutarem, por proporcionarem momentos únicos e por contribuírem na minha felicidade. Em especial a Aleffy Alves, Aline Larissa, Luis André, Victor Emanuel, Danuza, Carlos Júnior, Milleny, Manuela, Priscila, Herculano.

É impossível está concluindo esse sonho e não agradecer a Adenilda por todo suporte na secretária do PPGCB; Professora Tereza Correia pela disposição, paciência e boa vontade de sempre; Professora Magda e Professor Prof. Luiz Soares por abrir as portas do seu laboratório e estar dispostos a auxiliar no que fosse necessário; Aos professores Thiago Napoleão e Patrícia Paiva pelas colaborações nessa jornada tão importante que é a vida acadêmica.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho e que, porventura, não foram citados, o meu MUITO OBRIGADO!

“Na minha vida tudo acontece, mas quanto mais a gente rala, mais a gente cresce...
...História, nossas histórias. Dias de luta, dias de glória”.

(CHARLIE BROWN JR, 2005)

RESUMO

Psidium glaziovianum Kiaersk, espécie endêmica do Brasil, apresenta odistribuição nos biomas Caatinga e Mata atlântica, entretanto não há relatos sobre o potencial medicinal nem a segurança de uso. Diante disso, foi extraído um óleo essencial de folhas de *P. glaziovianum* (PgEO), realizada a caracterização química e avaliado o potencial hemolítico, toxicidade aguda, subaguda e genotoxicidade, bem como os efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório aguda e crônico, antimicrobiano e cicatrizante. A caracterização química de PgEO foi realizada por Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas e demonstrou que o óleo era dominado por 1,8-cineole (24,29%), α -pinene (19,73%) e β -pinene (17,31%). PgEO apresentou baixa ação hemolítica (0,33% a 1,78%) para eritrócitos de camundongos. Na toxicidade oral aguda, o tratamento na concentração de 2000 mg/kg não promoveu alteração nos parâmetros fisiológicos, enquanto a concentração de 5000 mg/kg promoveu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas. A avaliação de genotoxicidade demonstrou, que a concentração de 5000 mg/kg promoveu aumento nos índices e frequência de danos de células sanguíneas nucleadas, enquanto a o tratamento de 2000 mg/kg mostrou-se seguro. No ensaio de toxicidade subaguda os animais tratados por 28 dias com PgEO (250, 500 ou 1000 mg/kg pc vo) não apresentaram alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias, histopatológicas e temperatura retal em ambos sexos quando comparados aos controles. Já na mensuração da glicemia, os animais apresentaram uma redução significativa, além de aumento da concentração de SOD e CAT no baço e fígado de maneira dependente de dose, quando comparados aos controles. Adicionalmente, ao longo de 28 dias de tratamento as diferentes concentrações do PgEO não promoveu alterações nas atividades motora e exploratória dos camundongos. Na avaliação da atividade antinociceptiva o tratamento com PgEO (25, 50 e 100 mg/kg) reduziu as contorções abdominais induzida por ácido acético, o tempo de lambadura em ambas as fases do teste de formalina, além de promover aumento do tempo de latência em testes térmicos. Na investigação do mecanismo analgésico revelou uma ação combinada das vias opioidérgica e muscarínica. A ação anti-inflamatório (PgEO 25, 50 e 100 mg/kg), no ensaio de edema de pata o PgEO foi capaz de reduzir o edema em até 89,23%. Já no teste de peritonite o tratamento com PgEO reduziu o influxo leucócitos e neutrófilos, bem como a produção de TNF- α e IL-1 β . No ensaio de granuloma o tratamento com PgEO reduziu o peso do granuloma. Na atividade antiartrítica o

tratamento com PgEO (50 e 100 mg/kg) reduziu alterações osteoarticulares e edema, além dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo. Adicionalmente, um gel contendo PgEO (1%) apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. Além disso, o gel foi eficaz na redução de feridas experimentais em camundongos com participação do sistema redox e citocinas inflamatórias. Este estudo fornece evidências que o PgEO apresenta baixa toxicidade quando administrado em alta concentração em dose única e quando administrado diariamente por até 28 dias. O tratamento com PgEO apresentou efeito no tratamento da dor e da inflamação aguda e crônica, além de apresentar atividade antimicrobiana e cicatrizante, podendo ter aplicações futuras farmacêutica.

Palavras-chave: Artrite. Cicatrização. Inflamação. Myrtaceae. Segurança de uso.

ABSTRACT

There are no data on the therapeutic potential or safety of using *Psidium glaziovianum* Kiaersk, an indigenous species from Brazil that is extensively spread in the Caatinga and Atlantic Forest biomes. The hemolytic potential, acute and subacute toxicity, genotoxicity, and antinociceptive, acute and chronic anti-inflammatory, antibacterial, and healing properties of an essential oil of *P. glaziovianum* leaves (PgEO) were therefore assessed. Gas chromatography coupled with mass spectrometry was used to characterize the chemical composition of PgEO, and the results showed that 1,8-cineole (24.29%), α -pinene (19.73%), and β -pinene (17.31%) dominated the oil. PgEO has a negligibly hemolytic effect on mouse erythrocytes (0.33% to 1.78%). While therapy for acute oral toxicity at a dosage of 5000 mg/kg enhanced hematological, biochemical, and histopathological alterations, treatment at a dose of 2000 mg/kg had no effect on the physiological parameters. The genotoxicity assessment showed that the treatment of 2000 mg/kg was safe, however the concentration of 5000 mg/kg encouraged a rise in the rates and frequency of damage to nucleated blood cells. When compared to controls, the animals given PgEO for 28 days (250, 500, or 1000 mg/kg bw po) did not exhibit any changes in hematological, biochemical, urinary, histological, or rectal temperature. When compared to controls, the animals demonstrated a substantial decrease in blood glucose levels as well as a dose-dependent rise in the concentration of SOD and CAT in the liver and spleen. Additionally, during the course of the 28-day treatment period, none of the PgEO doses promoted modifications in the mice's motor or exploratory behaviors. Treatment with PgEO (25, 50, and 100 mg/kg) decreased abdominal writhing caused by acetic acid, licking time in both stages of the formalin test, and promoted an increase in latency time in heat tests when evaluating antinociceptive activity. A combination activity of the opioidergic and muscarinic pathways was discovered during the exploration of the analgesic mechanism. In the paw edema test, PgEO (25, 50, and 100 mg/kg) had an anti-inflammatory effect that may decrease edema by up to 89.23%. Treatment with PgEO in the peritonitis test decreased the generation of TNF- α and IL-1 β as well as the inflow of neutrophils and leukocytes. PgEO therapy decreased the weight of the granuloma in the granuloma test. Treatment with PgEO (50 and 100 mg/kg) had antiarthritic effects and decreased osteoarticular alterations, edema, pro-inflammatory cytokine levels, and oxidative stress. Additionally, gram-positive and gram-negative

bacteria as well as fungi were resistant to a gel containing PgEO (1%). Additionally, the gel reduced experimental wounds in mice when the redox system and inflammatory cytokines were involved. According to the results of this investigation, PgEO has minimal toxicity whether taken daily for up to 28 days and in a single dosage at a high concentration. Treatment with PgEO was successful in reducing acute and chronic inflammation, and it also has antibacterial and healing properties, which may have pharmaceutical uses in the future.

Keywords: Arthritis. Healing. Inflammation. Myrtaceae. Safety use.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Distribuição geográfica da Caatinga.	24
Figura 2-	Distribuição geográfica do gênero <i>Psidium</i> L.	31
Figura 3-	Distribuição geográfica de <i>Psidium glaziovianum</i> Kiaersk.	32
Figura 4-	Alteração da microcirculação local, saída de células sanguíneas e componentes plasmáticos para o espaço intersticial.	36
Figura 5-	Etapas do processo de cicatrização tecidual.	41
Figura 6-	Avaliação de toxicidade aguda de acordo com o guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 423).	43

Artigo 1

Figure 1-	Histopathological analysis of the liver, kidney, and spleen of mice in the control and treated with <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) at concentrations of 2,000 or 5,000 mg/kg.	50
Figure 2-	Results of micronucleus tests and comet assay in the control group and the groups treated with <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) at concentrations of 2,000 and 5,000 mg/kg.	51
Figure 3-	Results of comet assay in the control group and the groups treated with <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) at concentrations of 2,000 and 5,000 mg/kg. Legend: 2000 mg/kg: <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) at concentration of 2,000; 5000 mg/kg: <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) at concentration of 5,000.	51

Artigo 2

Figure 1-	Effect of the <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on the body weight of males (A) and females (B).	71
Figure 2-	Consumption of water and food by male and female mice treated with <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO).	72
Figure 3-	Evaluation of glycemia and temperature in male and female mice treated with <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO).	73
Figure 4-	Histopathological analysis of the liver, spleen, and kidney of mice males in the control group and the groups treated with <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) at concentrations of 250, 500 and 1,000 mg/kg.	74

Figure 5-	Histopathological analysis of the liver, spleen, and kidney of mice females in the control group and the groups treated with <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) at concentrations of 250, 500 and 1,000 mg/kg.	75
-----------	--	----

Artigo 3

Figure 1-	Antinociceptive effect of <i>P. glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on abdominal contortion induced by acetic acid. <i>P. glaziovianum</i> essential oil.	87
Figure 2-	Antinociceptive effect of <i>P. glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on both phases of the formalin assay.	87
Figure 3-	Antinociceptive effect of <i>P. glaziovianum</i> essential oil (PgEO) in the tail-immersion assay.	88
Figure 4-	Antinociceptive effect of <i>P. glaziovianum</i> essential oil (PgEO) in the hot-plate test.	88
Figure 5-	Investigation of mechanisms of antinociceptive activity of the <i>P. glaziovianum</i> essential oil (PgEO) in the formalin test.	89
Figure 6-	Anti-inflammatory effect of different concentrations of <i>P. glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on paw edema induced by carrageenan.	89
Figure 7-	Anti-inflammatory effect of <i>P. glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on the levels of TNF- α and IL-1 β in the peritoneal fluid after treatment with carrageenan solution.	89

Artigo 4

Figura 1-	Efeito da administração durante 14 dias de PgEO no edema artrítico induzido por CFA.	108
Figura 2-	Imagens macroscópicas e Imagens radiológicas do efeito da administração durante 14 dias de PgEO no edema artrítico induzido por CFA.	109
Figura 3-	Efeito da administração durante 14 dias de PgEO nos níveis de TNF- α e IL-1 β na artrite induzido por CFA.	110

Artigo 5

Figura 1-	Efeitos do tratamento com PgEO gel na contração da ferida em camundongos.	129
-----------	---	-----

Figura 2- Efeito do tratamento com PgEO gel nos níveis de TNF- α e IL-
1 β .

130

LISTA DE TABELAS

Tabela1-	Principais mediadores inflamatórios envolvidos no processo inflamatório.	35
----------	--	----

Artigo 1

Table 1-	Evaluation of food and water consumption and weight gain of animals from control and treated with the <i>Psidium glaziovianum</i> Essential Oil (PgEO) per os.	48
Table 2-	Hematological parameters of mice treated with the <i>Psidium glaziovianum</i> Essential Oil (PgEO).	49
Table 3-	Biochemical parameters of blood of mice treated with the <i>Psidium glaziovianum</i> Essential Oil (PgEO).	49
Table 4-	Evaluation of the relative weight (g/10 g animal body weight) of mice treated with the <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) at concentrations of 2,000 or 5,000 mg/kg.	49
Table 5-	Effect on the liver and kidney of mice treated with the <i>Psidium glaziovianum</i> Essential Oil (PgEO).	51

Artigo 2

Table 1-	Effect of the <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on hematological parameters of mice male and female.	76
Table 2-	Effect of the <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on biochemical parameters of mice male and female.	77
Table 3-	Effect of the <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on urinalysis of mice male and female.	78
Table 4-	Effects of oral administration of <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on organ weight.	79
Table 5-	Effect of the <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) levels in organs of mice.	80
Table 6-	Effects of oral administration of <i>Psidium glaziovianum</i> essential oil (PgEO) on behavioral assessment.	81

Artigo 3

Table 1-	Chemical composition of the essential oil obtained from the leaves of <i>P. glaziovianum</i> (PgEO).	87
----------	--	----

Table 2-	Effect of vehicle (saline), PgEO (25, 50 and 100 mg/kg) and indomethacin (20 mg/kg) administered orally on leukocyte migration and neutrophil in peritoneal fluid of female mice in carrageenan-induced peritonitis.	89
----------	--	----

Table 3-	Effects of oral treatment with PgEO in mice subjected to granulomatous lesion induced by the implantation of cotton pellets.	90
----------	--	----

Artigo 4

Tabela 1-	Efeito do óleo essencial de <i>Psidium glaziovianum</i> (PgEO) nos níveis de malonaldeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em camundongos com artrite.	111
-----------	--	-----

Tabela 2-	Atividades antioxidantes usando os métodos ABTS, DPPH e TAC.	112
-----------	--	-----

Artigo 5

Tabela 1-	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) do PgEO e do gel contendo PgEO.	131
-----------	---	-----

Tabela 2-	Efeito do tratamento com PgEO gel nos níveis de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em camundongos.	132
-----------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CK	Creatine kinase
CMHC	Concentração média de hemoglobina corpuscular
COX	Ciclo-oxigenase
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
d.C.	Depois de Cristo
DL50	Dose letal mediana
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
EMA	European Medical Agency
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatography
GGT	Gama glutamil transferase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
MDA	Malondialdeído
MHRA	Medicines and Healthcare products Regulatory Agency
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Ministério da Saúde
NO	Nitric oxide
OECD	The Organization for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária

PAMPs	Pathogen Associated Molecular Pattern
PgEO	<i>P. glaziovianum</i> essential oil
RPM	Rotações por minutos
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TC	Total cholesterol
TG	Triglicerídeos
TGF- β	Fator de crescimento transformante β
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	GERAL	23
2.2	ESPECÍFICOS	23
3	REFERENCIAL TEÓRICO	24
3.1	CAATINGA, O ÚNICO BIOMA EXCLUSIVAMENTE BRASILEIRO	24
3.2	ETNOBOTÂNICA E IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS	26
3.3	FAMÍLIA MYRTACEAE: UMA IMPORTANTE FAMÍLIA BOTÂNICA	28
3.4	O GÊNERO <i>Psidium</i> L.	30
3.5	<i>Psidium glaziovianum</i> Kiaersk., UMA NOVA ESPÉCIE ENDÊMICA DO BRASIL	32
3.6	PROCESSO INFLAMATÓRIO	33
3.7	DOR: FISIOPATOLOGIA E CONDIÇÕES GERAIS	39
3.8	PROCESSO INFLAMATÓRIO E REPARO TECIDUAL	40
3.9	ESTUDOS DE TOXICIDADE	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	ARTIGO 1	45
	Cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity evaluation of essential oil from <i>Psidium glaziovianum</i> Kiaersk leaves	45
4.2	ARTIGO 2	53
	Evaluation of 28-day repeated doses oral toxicity of essential oil from <i>Psidium glaziovianum</i> Kiaersk leaves	53
4.3	ARTIGO 3	82
	Oral administration of essential oil from <i>Psidium glaziovianum</i> Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice	82
4.4	ARTIGO 4	92
	O óleo essencial de <i>Psidium glaziovianum</i> alivia os efeitos da artrite induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA), regulando a inflamação e o estresse oxidativo	92
4.5	ARTIGO 5	113
	Desenvolvimento de gel contendo óleo essencial de <i>Psidium glaziovianum</i> tem atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> e melhora a cicatrização de feridas excisionais em camundongos	113
5	CONCLUSÕES	133
	REFERÊNCIAS	134

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é detento da maior biodiversidade do planeta, com mais de 45 mil espécies vegetais catalogadas distribuídas nos 7 biomas que aqui contemplam. Dentre esses biomas temos a Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro e predominante na região nordeste. Essa região é marcada por clima seco e ausência de chuvas durante muitos meses do ano, a vegetação presente nessa região desenvolveu adaptações morfológicas e fisiológicas a essas variações constantes de temperatura e ao déficit hídrico, e acabam produzindo substâncias químicas através do metabolismo secundário para melhor se adequar a essas condições a qual estão expostas (CERAVOLO et al., 2018; SANTOS et al., 2018; TABARELLI, 2018; LESSA et al., 2019).

As substâncias químicas produzidas pelas plantas são de grande relevância por apresentar características medicinais capazes de alterar o funcionamento de órgãos e sistemas do corpo humano (SILVA et al., 2017). Sendo assim, estas plantas são consideradas como uma excelente fonte para a busca de novos compostos farmacologicamente ativos. De maneira geral, estes materiais vegetais aparentemente apresentam uma baixa toxicidade, quando comparados com as drogas sintéticas, o que os torna potentes candidatos no desenvolvimento de medicamentos (SAGAR et al., 2018; TUNG MUNNITHUM et al., 2018; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Devido a grande diversidade de espécies botânicas encontrada no Brasil, diversas famílias são descritas por apresentar potencial farmacológico, as quais pode-se citar: Asteraceae (CARVALHO JÚNIOR et al., 2018; AGUIAR et al., 2020), Euphorbiaceae (MARTÍNEZ; MOSQUERA; NIÑO, 2017; MOURA et al., 2019), Fabaceae (ATEBA et al., 2021), Lamiaceae (FREZZA et al., 2019) e Myrtaceae (COSTA et al., 2020; SANTOS et al., 2020b).

A família Myrtaceae é uma das famílias com maior distribuição no Brasil e no mundo. Com predomínio em regiões tropicais e subtropicais, esta família é amplamente distribuída nos diversos biomas brasileiros, possuindo 29 gêneros e 1.193 espécies descritas, sendo 4 gêneros e 784 espécies únicas dos Biomas brasileiros, sendo os gêneros *Eugenia*, *Myrcia*, *Syzygium* e *Psidium* os mais numerosos (WILSON et al., 2011; PROENÇA et al., 2020). Por apresentar importância econômica, a família Myrtaceae é cultivada em várias regiões do Brasil, tendo também

uso na medicina popular para o tratamento de diversas doenças (OKHALE et al., 2018; SANTOS et al., 2019; BEIDOKHTI et al., 2020; COSTA et al., 2020; ROMUALDO et al., 2021).

Dentre os gêneros com importância medicinal na família Myrtaceae destaca-se o gênero *Psidium* L. encontrado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, e no Brasil são encontradas 60 espécies (LANDRUM, 2016; TULER et al., 2020). Diversos estudos comprovaram o potencial farmacológico de espécies desse gênero (VINHOLES et al., 2017; HIRUDKAR et al., 2020; HOTTA; NEELIMA et al., 2020; JAIN et al., 2020; PATHAK et al., 2021). Dentre as espécies de *Psidium* L. encontramos *Psidium glaziovianum* Kiaersk, que é uma espécie endêmica do Brasil, é uma árvore de médio porte, com folhas elípticas e fruto globoso (LANDRUM, 2017; TULER et al., 2020), e apesar do uso popular, não há relatos na literatura sobre o potencial medicinal.

Diante disso, objetivou-se avaliar a segurança de uso de um óleo essencial obtido das folhas *P. glaziovianum* através dos testes de toxicidade aguda, subaguda e genotoxicidade, bem como avaliar o potencial farmacológico no tratamento da dor, inflamação aguda e crônica, antimicrobiano e no reparo tecidual em lesões.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar quimicamente e avaliar a toxicidade e o potencial farmacológico do óleo essencial de *Psidium glaziovianum* Kiaersk

2.2 ESPECÍFICOS

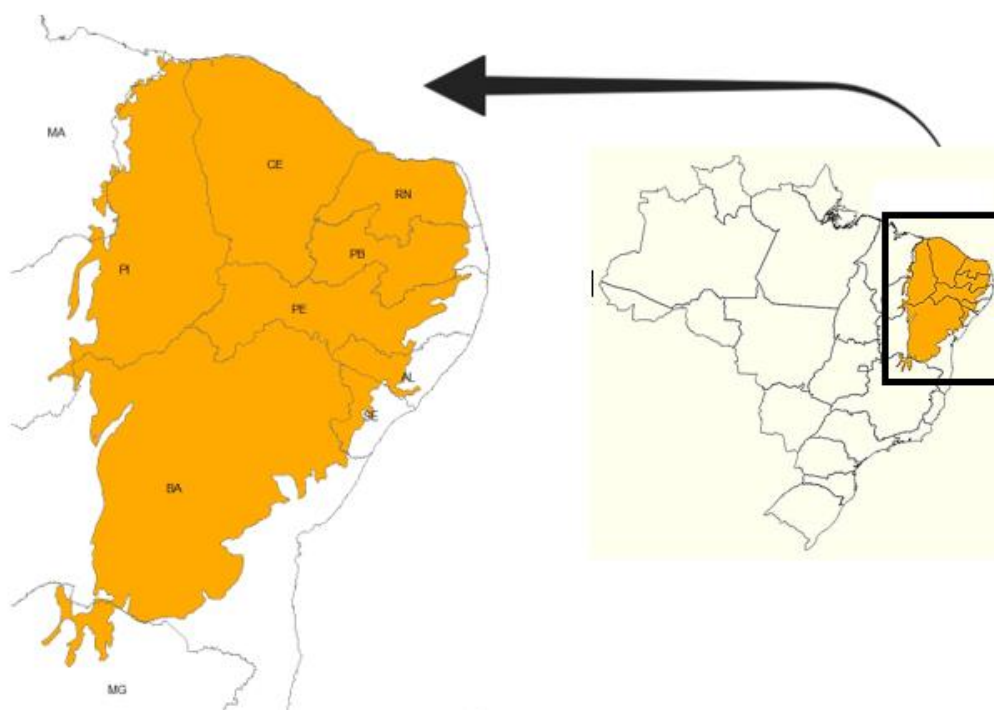
- Caracterizar quimicamente o óleo essencial obtido das folhas de *P. glaziovianum* por Cromatografia Gasosa associada ao Espectrometria de massa (GC-MS);
- Avaliar a toxicidade aguda, subaguda e genotoxicidade em camundongos Swiss albino utilizando parâmetros comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos;
- Avaliar a influência do óleo essencial nos parâmetros comportamentais de exploração, atividade motora e ansiedade durante 28 dias de administração;
- Avaliar o efeito antinociceptivo do óleo essencial e possível mecanismo de ação;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória através de modelos experimentais de inflamação aguda;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória crônica em modelo de artrite induzida por Freund's complete adjuvante (CFA);
- Preparar e caracterizar formulação em gel semissólida contendo óleo essencial de *P. glaziovianum* para aplicação tópica;
- Avaliar a irritação dérmica de formulação em gel semissólida;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do PgEO e da formulação.
- Avaliar o potencial cicatrizante da formulação em gel semissólida sobre lesões.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CAATINGA, O ÚNICO BIOMA EXCLUSIVAMENTE BRASILEIRO

A Caatinga é uma importante zona biogeográfica localizada no semiárido brasileiro, que ocupa uma área de aproximadamente 850 mil quilômetros quadrados (LESSA et al., 2019). Essa região representa cerca de 70% do território nordestino e 11% do território nacional e apresenta distribuição principalmente nos estados do Nordeste brasileiro, onde engloba parte de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe, apresentando também uma pequena distribuição no Sudeste do país na região norte do Estado de Minas Gerais, como demonstrado na Figura 1 (QUEIROZ et al., 2006; SILVA; LEAL; TABARELLI, 2018).

Figura 1: Distribuição geográfica da Caatinga



Fonte: O autor (2021).

O nome Caatinga tem origem na língua indígena tupi-guarani e era aplicado para descrever uma região aparentemente esbranquiçada e com pouca vegetação, fazendo menção ao aspecto dessa região no período de secas prolongadas onde as folhas das árvores caem e ficam apenas os caules brancos e ressecos (LESSA et al.,

2019). Essa característica da vegetação se dá devido as condições da região, que apresenta déficit hídrico, baixa precipitação que variam entre 200 e 800 milímetros anuais, chuvas bastante irregulares entre os meses de janeiro a maio, insolação média de 2.800 horas por ano, elevadas temperaturas em torno de 25 – 30 °C submetendo a região periodicamente a longos períodos de seca com temperatura do solo podendo chegar até 60 °C (SILVA; LEAL; TABARELLI, 2018).

Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2012), a Caatinga abriga aproximadamente 27 milhões de pessoas, se tornando a região seca mais povoado do mundo. Ao longo da ocupação desse território ocorreram modificações que ocasionaram em extensas degradações do solo e que levaram ao desequilíbrio ecológico, influenciando nos recursos naturais e perda da biodiversidade (CHOUBIN et al., 2017; VIEIRA et al., 2021). Mais que 50% do território original da Caatinga já foi modificado, levando a diminuição da cobertura vegetal, tornando a Caatinga um dos ecossistemas brasileiros mais alterados pelas atividades humanas e o terceiro bioma mais ameaçado, ficando atrás da Mata atlântica e Cerrado (SANTOS et al., 2011; MMA, 2012).

Para evitar que a biodiversidade da Caatinga seja completamente perdida é necessário o desenvolvimento sustentável e controlado dessa região. Diversas espécies vegetais e animais são utilizados pelos nativos para a sua subsistência. Entretanto esses recursos acabam sendo explorados de forma inadequada, levando a escassez de diversas espécies. A Caatinga apresenta um potencial que se explorado de forma sustentável, poderá garantir o desenvolvimento dessa região, promovendo a sua conservação e das espécies que nele vivem, garantindo a bioprospecção dessa região (RAMALHO, 2013; LEAL; TABARELLI, 2018).

Quando se trata da flora, são encontradas espécies altamente adaptadas as condições adversas da região, como o clima, o solo e o déficit hídrico. Sendo adaptações anatômicas, funcionais e morfológicas que garantem a sobrevivência das espécies. Entre as diversas espécies da caatinga, várias plantas são notoriamente consideradas como medicamentosas de uso popular, sendo vendidas as folhas, cascas e raízes, em calçadas e ruas das principais cidades, bem como mercados e feiras livres. Há uma ampla literatura sobre estudos etnobotânicos que comprovam a ação benéfica de muitas espécies encontradas na Caatinga, possibilitando uma nova visão para esse bioma e promovendo o interesse de novos estudos sobre a região e as plantas da região (JUVIK et al., 2017; CERAVOLO et al., 2018; SANTOS et al.,

2018).

3.2 ETNOBOTÂNICA E IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais pela população mundial tem crescido significativamente nos últimos tempos, entretanto essa utilização é tão antiga quanto a civilização humana (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018). Historicamente a terapia com os recursos vegetais é relatado na medicina chinesa, tibetana e indiana-ayurveda, com registros datados de mais de 2000 anos antes de Cristo como o Pen Ts'ao e a coleção de formulações depositadas no Museu da Pensilvânia. Já aqui no Brasil esse conhecimento era detido principalmente pelos indígenas, quilombolas e ribeirinhos e foram compartilhados através da transmissão oral entre gerações (HELFAND; COWEN, 1990; BADKE et al., 2011; FIRMO et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve que para uma espécie vegetal ser considerada planta medicinal é necessário que ela apresente em um ou mais órgãos, substâncias que possam ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (WHO, 1998).

Essas substâncias são produzidas pelo metabolismo vegetal e que são classificadas em dois grupos, o primeiro, grupo dos metabólitos primários correspondem aos componentes essenciais para desenvolvimento, crescimento e reprodução das plantas, compondo esse grupo pode citar os aminoácidos, os lipídios, carboidratos e clorofila (SHIH; MORGAN, 2020). Já o segundo, o grupo dos metabólitos secundários, apresentam importante papel na defesa e proteção, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microrganismos simbiote como também na comunicação entre as espécies (BANERJEE; ROYCHOUDHURY, 2017; BORGES et al., 2017).

Algumas plantas representam uma excelente fonte para a busca de novos compostos biologicamente ativos devido a grande diversidade química e estrutural de substâncias que poderão ser aplicadas farmacologicamente (HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2019; SHIH; MORGAN, 2020). Em relação as partes da planta utilizadas, elas podem variar de acordo com o tipo de uso, geralmente as partes mais utilizadas são: folhas, cascas, raízes, leite (látex), frutos e sementes (SILVA PEREIRA; COELHO-FERREIRA, 2017).

Apesar de atualmente haver aumento na inserção de plantas com fins

terapêuticos, a quantidade de espécies vegetais exploradas é baixo comparada ao montante total de espécies vegetais (BUBALO et al., 2018). Estima-se que exista aproximadamente 500 mil espécies de plantas no mundo e o Brasil se apresenta como o maior detentor dessa biodiversidade, entretanto apenas pequena percentagem tem sido investigada fitoquimicamente e farmacologicamente, sendo a maior parte desse percentual investigado em estudos preliminares, não avaliando todo o seu potencial farmacológico e nem a segurança de seu uso (SILVA et al., 2017; VON WETTBERG; DAVIS; SMÝKAL, 2020; MOURA et al., 2021).

No Brasil aproximadamente 82% da população utiliza de produtos a base de plantas medicinais como fonte terapêutica (SILVA et al., 2020). Em outros países em desenvolvimento o uso de plantas medicinais na Atenção Primária à Saúde varia por cerca de 70% a 90% da população. Já nos países desenvolvidos como Alemanha, Canadá, Itália, França e Suíça o uso de recursos naturais é feito como terapia complementar, alternativa ou não convencional, e são usados por 70 a 90% da população (WHO, 2011).

A busca de plantas para avaliação de potencial farmacológico muitas vezes tem como base o conhecimento etnobotânico sobre a aplicação de uso, no conteúdo químico e toxicidade, na seleção ao acaso ou pela combinação de vários critérios (SALEHI et al., 2019; CHEN et al., 2020). Essas estratégias de busca de plantas com potencial medicinal têm sido aplicadas na busca de substâncias bioativas para várias doenças, entre elas o câncer (ABU-DARWISH; EFFERTH, 2018; TAÏBI, 2020), artrite (SADIA et al., 2018), infecções (MACHABA; MAHLO, 2017; TARIQ et al., 2018; SANTOS et al., 2019), diabetes (SHABAB; GHOLAMNEZHAD; MAHMOUDABADY, 2020; LANDAZURI; CHAMORRO; CORTES, 2021), hipertensão (SAMAHA et al., 2019), entre outras. Através desses estudos que pode desenvolver formulações que podem ser aplicadas na Fitoterapia (ZHOU et al., 2018). Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais (SOUSA; OLIVEIRA; CALOU, 2018).

A inserção de plantas medicinais na atenção básica à saúde, minimiza os custos gerados na fabricação e comercialização de fármacos, além do mais, as plantas medicinais apresentam alta eficiência e é de fácil alcance. No Brasil, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares pelo Ministério da Saúde (MS) que tem como objetivo ampliar as opções terapêuticas, e nele está inserido o acesso a plantas medicinais,

fitoterápicos e outros serviços relacionados (MS, 2006a). As ações decorrentes são imprescindíveis para a melhoria da atenção à saúde da população, ampliação das opções terapêuticas aos usuários do SUS, uso sustentável da biodiversidade brasileira, fortalecimento da agricultura familiar, geração de emprego e renda, desenvolvimento industrial e tecnológico, inclusão social e regional (MS, 2006b; RICARDO et al., 2017).

O uso de plantas medicinais é favorável à saúde humana, desde que se tenha conhecimento integral do potencial medicinal dessas plantas (LIN et al., 2018). Para o uso medicinal de plantas segundo a regulamentação é necessária comprovação das propriedades terapêuticas que lhe são atribuídas, bem como de seu grau de toxicidade em doses compatíveis com o seu emprego medicinal, através de avaliação da toxicidade. A utilização de forma inconsciente e exagerada pode gerar graves danos ao organismo, por isso se faz necessário estudos farmacológicos para determinar o potencial dessa planta (KUETE, 2014; BOSTAN; MEHRI; HOSSEINZADEH, 2017).

3.3 FAMÍLIA MYRTACEAE: UMA IMPORTANTE FAMÍLIA BOTÂNICA

O nome Myrtaceae é derivado do Latim “myrtus” e numa tradução direta significa perfume, fazendo alusão ao aroma exalado pelas flores e pelos óleos essenciais presentes (WATSON; DALLWITZ, 1999). As plantas dessa família geralmente são arbóreas ou arbustivas, apresentando de 2 metros de altura até várias dezenas de metros. Apresentam folhas opostas decussadas, flores com um número de peças florais múltiplo de 4 ou 5 e flores com coloração predominantemente branca ou creme, ocasionalmente com peças florais róseas, magenta ou vermelhas. Os frutos são bagas apresentando uma ou mais sementes por fruto (JIE; CRAVEN, 2006; WILSON et al., 2011).

A família Myrtaceae está inserida na ordem Myrtales e compreende aproximadamente 6.000 espécies distribuídas em 132 gêneros (GOVAERTS, 2008; CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). Essa família apresenta distribuição nas regiões tropicas e subtropicais do mundo, não sendo encontrada apenas na Antártida (GOVAERTS, 2008). No Brasil essa família é importante componente da flora brasileira, sendo dominante em diferentes tipos de vegetação, possuindo 29 gêneros e 1.193 espécies descritas, sendo 4 gêneros e 784 espécies únicas dos Biomas brasileiros (PROENÇA et al., 2020).

No Brasil são encontrados os seguintes gêneros: *Acca*, *Accara*, *Algrizea*, *Blepharocalyx*, *Calycolpus*, *Calycorectes*, *Calypttranthes*, *Calyptrogenia*, *Campomanesia*, *Chytraculia*, *Curitiba*, *Eugenia*, *Marlierea*, *Mitranthes*, *Mosiera*, *Myrceugenia*, *Myrcia*, *Myrcianthes*, *Myrciaria*, *Myrrhinium*, *Myrteola*, *Myrtus*, *Neomitranthes*, *Pimenta*, *Plinia*, *Psidium*, *Siphoneugena*, *Syzygium* e *Ugni*. Sendo os gêneros *Eugenia*, *Myrcia*, *Psidium* e *Syzygium* os mais numerosos (TULER et al., 2020).

Análises filogenéticas moleculares das Myrtaceae resultaram que espécies dessa família são agrupadas em duas subfamílias: Myrtoideae que compreende 15 tribos e que agrupa as espécies com folhas opostas e frutos carnosos e Leptospermoideae que compreende 2 tribos e cujos membros produzem cápsulas secas. Dentre as tribos de Myrtoidea destaca-se Myrteae, que é a tribo mais diversa dentro e apresenta o maior número de gêneros (51) e espécies (2500), representando metade da biodiversidade da família (WILSON et al., 2001; BIFIN et al., 2010).

A tribo Myrteae apresenta maior biodiversidade ao longo da costa litorânea do Brasil, nas Guianas e no Caribe (MCVAUGH, 1968). Essa tribo foi ainda classificada em três subtribos com base na morfologia do embrião: Eugeniinae (hipocótilo mais curto que os cotilédones, indistinguível em alguns gêneros; cotilédones carnudos que são grossos, separados e plano-convexo ou fundido em uma massa sólida), Myrciinae (hipocótilo com comprimento semelhante ou mais longo que os cotilédones; cotilédones membranosos a submembranosos, não fundidos juntos) e Myrtinae (cotilédones com largura semelhante ou mais estreita do que o hipocótilo; cotilédones lineares a lanceolados ou oblongos, comprimento semelhante ou mais curto que o hipocótilo) (OLIVEIRA BERNARDES et al., 2020).

Além dessas características as espécies dessa família são conhecidas na indústria madeireira, como espécies do gênero *Eucalyptus*, e são utilizadas na produção de papel, postes, carvão e biomassa energética (BONDANCIA et al., 2017; HAKAMADA et al., 2017; SILVA IGNÁCIO et al., 2019); outros gêneros apresentam uso na indústria alimentar, como *Syzygium aromaticum* conhecido popularmente como cravo-da-índia e *Pimenta dioica* conhecida como pimenta-da-jamaica são empregados como especiarias (BLANCO; THIAGARAJAN et al., 2017; BATIHA et al., 2020). Várias espécies produzem frutos comestíveis e também são empregados na indústria alimentar, como *Psidium guajava* (goiaba), *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba), *Eugenia uniflora* (pitanga) e *Syzygium* spp. (jambo) (DONADO-PESTANA et al., 2018;

SERAGLIO et al., 2018; PAULO FARIAS et al., 2020).

Essa família é conhecida por apresentar algumas características excepcionais, como o *Eucalyptus regnans* que é conhecido por apresentar as árvores mais altas do mundo; já o gênero *Syzygium* apresenta a maior diversidade de espécies, com estimados 1800 espécies descritas (SHENKIN et al., 2019; OLIVEIRA BERNARDES et al., 2020).

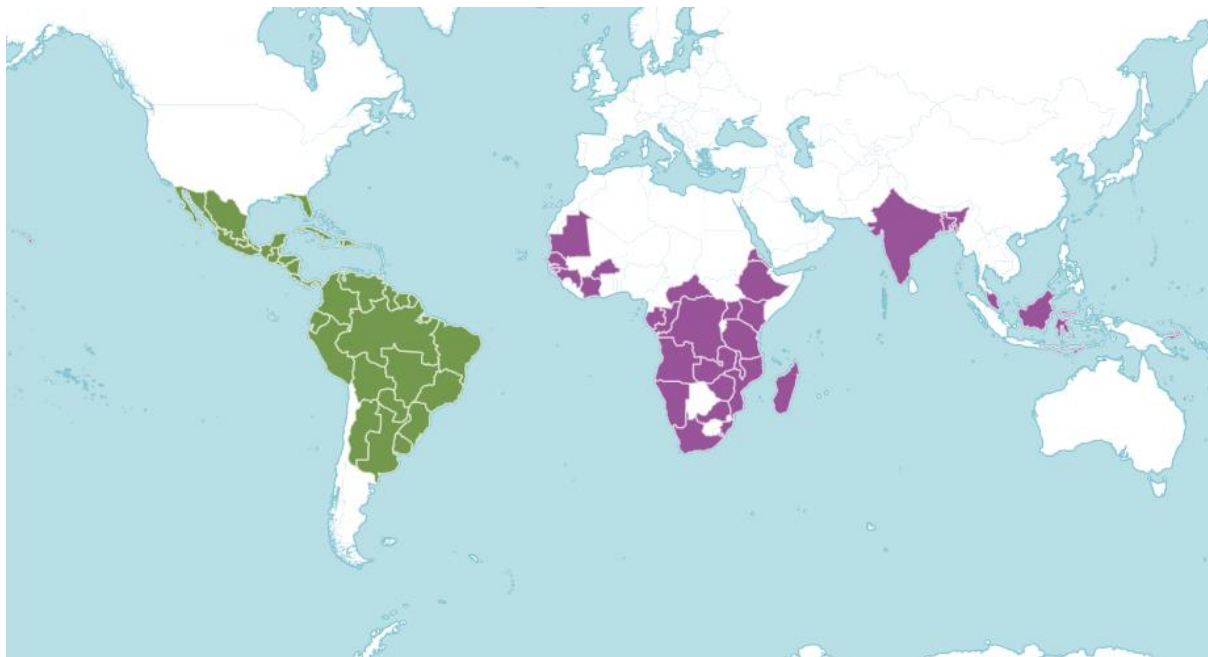
Espécies de Myrtaceae também são descritas na literatura quanto ao seu uso etnofarmacológico, sendo usadas na medicina popular para tratar várias doenças, principalmente infecções (OKHALE et al., 2018; SANTOS et al., 2019; OLOGUNDUDU; IDRIS; OLADELE, 2020), inflamações (GOLDONI et al., 2019; MAZUTTI DA SILVA et al., 2019; COSTA et al., 2020), doenças cardiovasculares (OSUNSANMI et al., 2018) e metabólicas (SOBEH et al., 2018; BEIDOKHTI et al., 2020; ROMUALDO et al., 2021).

3.4 O GÊNERO *Psidium* L.

Dentre os gêneros da Família Myrtaceae com importância econômica destaca-se o gênero *Psidium* L. que cresce em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, adapta-se a diferentes condições climáticas, mas com preferência por climas secos, como apresentado na Figura 2, esse gênero está distribuído em 185 espécies no mundo, com distribuição desde o México até o norte da Argentina, com grande número de espécies no Caribe, Uruguai e Brasil (LANDRUM, 2017). Em território brasileiro as espécies ocorrem desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul, apresentando 60 espécies, 39 delas endêmicas, sendo distribuídas em todos os domínios fitogeográficos brasileiro (LANDRUM, 2016; TULER et al., 2020).

O gênero *Psidium* L. apresenta espécies com hábito subarbustivo a arbóreo, podendo chegar até 32 metros de altura. As folhas são simples e opostas. Já as flores são axilares, podem se apresentar de forma solitária ou agrupadas com 1-3 flores por grupo, com pétalas de cor branca ou creme, às vezes rosadas no botão floral. Os frutos são bacóides, geralmente verdes, verde-amarelados ou amarelos, mais raramente avermelhados, carmim escuro ou negros na maturação; sementes podem apresentar diversa quantidade, variando entre 1 e 320, mas 4 a 80 é o número mais comum do gênero (PROENÇA et al., 2010; VILLARROEL; GOMES-BEZERRA, 2015; TULER et al., 2017; 2020).

Figura 2: Distribuição geográfica do gênero *Psidium* L.



Verde: Espécies nativas; Roxo: Espécies introduzidas.

Fonte: Plantas do mundo (2021).

Espécies desse gênero, têm se destacado em pesquisas em diversas áreas, os frutos de *Psidium* L. apresentam importância agrícola e são comumente utilizados na indústria na produção de sucos, néctares, geléias e sorvetes por apresentar sabor exótico, suculência, alta acidez e características sensoriais únicas (CHOUDHARY et al., 2008; GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008; TANWAR; ANDALLU; CHANDEL, 2014; LI et al., 2016; ALMEIDA LOPES; CHANDEL, 2018; OLIVEIRA SILVA et al., 2018).

O uso na medicina tradicional das espécies desse gênero apresenta uma longa história, principalmente nos países da América do Sul, América Central, África e Ásia (NASCIMENTO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018; SADIA et al., 2018; SERUNJOI et al., 2020; WIART, 2020). Estudos etnofarmacológicos mais recentes mostram que espécies do gênero *Psidium* L. é usado em muitas partes do mundo para o tratamento de uma série de doenças e vários estudos comprovam a eficácia desses tratamentos como distúrbios gastrointestinais (WEI; LI; CHEN, 2000; ARBID; SALEH, 2019; HIRUDKAR et al., 2020; JAIN et al., 2020; LU et al., 2020), problemas respiratórios (SUNDARAM; SURESH, 2019; PATHAK et al., 2021), diabetes (VALKO et al., 2007; ILOKA et al., 2017; VINHOLES et al., 2017), hipertensão (ELIAS et al.,

2017; YOUSOUFOU et al., 2020; BABATOLA et al., 2021), dor (KAKUO et al., 2018; ALABI et al., 2019; SOUZA SAMPAIO et al., 2020), inflamação (MCCOOK-RUSSELL et al., 2012; OLANIYAN et al., 2017; HOTTA; NEELIMA, 2020), feridas (JAYAKUMARI et al., 2018; SHETTY et al., 2019; DELORINO et al., 2020) e febre (SYARIF et al., 2020). Sendo comumente utilizado para esses tratamentos raízes, cascas, folhas e frutas imaturas (KAFLE et al., 2018; LUFULUABO et al., 2018; SANTOS PEREIRA et al., 2018; MACEDO et al., 2021).

3.5 *Psidium glaziovianum* Kiaersk., UMA NOVA ESPÉCIE ENDÊMICA DO BRASIL

Psidium glaziovianum Kiaersk. é uma árvore de pequeno a médio porte, podendo chegar até aproximadamente 5 metros de altura. Esta espécie apresenta folhas elípticas e lanceoladas com comprimento variando entre 3,8 e 7 cm, e largura entre 1,2–2,4 cm, já os botões florais são piriformes com 4–5 mm de comprimento, localizado na região axilar, as flores sempre apresentam 5 pétalas. O fruto é globoso, liso, com polpa succulenta, de cor vermelha, aromática e ácida doce, apresentando de 5 a 7 sementes, com coloração variando de verde quando imaturos, quando maduro o fruto pode apresentar variações de cor de amarelo até a cor vermelho escuro. (LANDRUM, 2017; TULER et al., 2020).

Figura 3: Distribuição geográfica de *Psidium glaziovianum* Kiaersk.



Fonte: Plantas do mundo (2021).

Essa espécie é considerada endêmica do Brasil, a floração ocorre no mês de novembro e a frutificação entre os meses de janeiro e fevereiro (LANDRUM, 2017). Sendo encontrada na Caatinga e Mata atlântica (Figura 3), até então a espécie tinha sido descrita apenas nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Bahia (Região Nordeste) (LANDRUM, 2017; TULER et al., 2020).

3.6 PROCESSO INFLAMATÓRIO

As características clínicas da Inflamação foram descritas primeiramente em papiros egípcios datados de mais de 3000 anos antes de Cristo (a.C.), entretanto, apenas no primeiro século depois de Cristo (d.C.) que Aulus Cornelius Celsus (25 a.C- 50 d.C.) descreveu os sintomas, sendo então chamados de sinais cardinais da inflamação. Esses sinais são considerados o marco clássico da inflamação aguda, e são eles: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), ardor (calor) e dolor (dor). Posteriormente, no século XIX Rudolf Virchow, observou que a associação dos sinais cardinais poderiam levar o organismo a perda de função, diante disso adicionou então um quinto sinal clínico, que seria a perda de função (*functio laesa*). Mas só em 1793 que o médico escocês John Hunter observou que a inflamação era uma resposta inespecífica que tinha a função de conservar ou recuperar o estado de saúde do hospedeiro e não uma doença como se pensava anteriormente (SILVA, 1978; PIKOULIS et al., 2004; KULINSKY, 2007).

A inflamação tem início quando o organismo sofre a ação de um agente que causa agressão, diante disso é gerado uma resposta do organismo ao dano tecidual que ocorre. Esse dano pode ser ocasionado por diversos agentes estimulantes, como infecções, seja ela bacteriana, viral ou fúngica, além das toxinas por elas produzidas; necrose tecidual, seja ela por isquemia, traumas e lesões físicas e químicas; por corpos estranhos, como fragmentos de madeiras ou metal e sujeiras; ou reações imunes, causando hipersensibilidade podendo ocasionar doenças autoimunes (MUÑOZ et al., 2017; STEWART; CHEN et al., 2018; NICHOL, 2018; SERRA et al., 2019).

A resposta inflamatória pode se apresentar de duas formas: aguda e crônica, essa classificação vai ser baseada no tempo que a resposta se mantém e conforme as características que são observadas. A resposta aguda é característica por ocorrer imediatamente após o dano, apresentar tempo de duração de curto a médio e presença dos sinais cardinais: rubor, edema e dor, além de ser encontrado grande

quantidade de neutrófilos e macrófagos. Já na inflamação crônica há uma persistência do agente agressor e/ou produção exacerbada de mediadores inflamatórios, levando a persistência da resposta por um tempo prolongado (HAMIDZADEH et al., 2017; SOEHNLEIN et al., 2017; PAHWA et al., 2018; CASTANHEIRA; KUBES, 2019).

Diante do dano causado o organismo iniciará um processo de reparo, de forma rápida e inespecífica. A primeira fase dessa resposta é o reconhecimento do agente agressor, para isso vários receptores celulares e proteínas circulatórias são capazes de reconhecer microrganismos e produtos de dano celular, e provocar a inflamação. Essas substâncias podem ser de dois tipos: PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns/Padrões Moleculares Associados a Patógenos, em tradução) que são produzidas por agentes patogênicos biológicos; e DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns/Padrões Moleculares Associados ao Dano, em tradução) são produzidos em uma resposta inflamatória não infecciosa (BIANCHI et al., 2007; RANG et al., 2016).

Nos receptores celulares para microrganismos, onde as células expressam receptores na membrana plasmática, nos endossomos e no citosol que permitem a percepção da invasão dos microrganismos em qualquer compartimento celular. O sistema complemento também participa no reconhecimento de microrganismos e produz mediadores de inflamação, uma proteína circulatória chamada lectina ligante de manose (mannosebinding lectin) reconhece os açúcares dos microrganismos e, então, promove a respectiva ingestão e a ativação do sistema complemento. Já os receptores citosólicos tem a função de percepção de danos celulares e reconhecem um conjunto diverso de moléculas que são liberadas ou alteradas como consequência do dano (COSTA et al., 2012; RANG et al., 2016; SUGIMOTO et al., 2019).

Após o reconhecimento do agente agressor, há o desenvolvimento e a execução da resposta, essa resposta tem início no local afetado e se estende por todo organismo visando auxiliar na diminuição dos efeitos danosos para o corpo, como também propiciar o organismo a uma adaptação morfofisiológica. Essa resposta tem início com alteração da microcirculação local, ocasionando na saída das células sanguíneas e componentes plasmáticos para o espaço intersticial. Essa alteração vascular tem estímulo de várias células e derivados de proteínas plasmática (WALFORD; LOSCALZO, 2003; CASTANHEIRA; KUBES, 2019; COOKE, 2019).

Mastócitos plaquetas, neutrófilos e monócitos/macrófagos participam desse processo de resposta e sob influência dessas células vários mediadores químicos são

liberados. Esses mediadores podem ser de origem tecidual como as aminas vasoativas, o fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanoides, citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos ou de origem plasmático como o sistema de coagulação, sistema complemento e cininas. Sendo ambos responsáveis pela homeostasia do organismo e participação direta na resposta inflamatória, como apresentados no Quadro 1 (HAMIDZADEH et al., 2017; CASTANHEIRA; KUBES, 2019).

Tabela 1: Principais mediadores inflamatórios envolvidos no processo inflamatório.

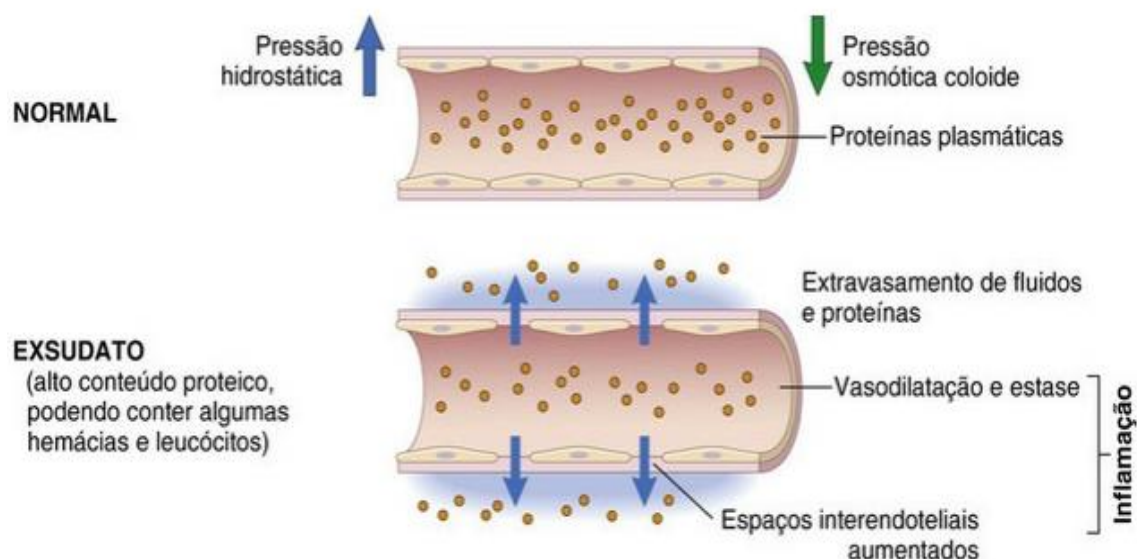
Mediador	Ação
Histamina	Vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular
Prostaglandinas	Vasodilatação, dor e febre
Quimiocinas	Quimiotaxia, ativação de leucócitos
Cininas	Aumento da permeabilidade vascular, contração muscular lisa, vasodilatação e dor
Leucotrienos	Aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, adesão e ativação de leucócitos
Complemento	Quimiotaxia e ativação de leucócitos, eliminação direta do alvo e vasodilatação
Citocinas (TNF, IL-1 e IL-6)	Local: ativação endotelial. Sistêmica: febre e anormalidades metabólicas
Fator ativador plaquetário	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, adesão de leucócitos, quimiotaxia e desgranulação
Complemento	Quimiotaxia e ativação de leucócitos, eliminação direta do alvo e vasodilatação

Fonte: O autor (2021).

Os mediadores inflamatórios estimulam alterações vasculares e exsudativas na região da infecção ou lesão, resultando em vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo destinado à maximização do movimento das proteínas e leucócitos do plasma para fora da circulação (Figura 4), esse processo torna a região mais avermelhada (rubor) devido a presença de hemácias e a alta oxigenação sanguínea, esse processo é denominado hiperemia. Além disso, o fluido extravascular

concentrado de proteínas e resíduos celulares propicia o desenvolvimento do edema (COSTA et al., 2012; RANG et al., 2016).

Figura 4: Alteração da microcirculação local, saída de células sanguíneas e componentes plasmáticos para o espaço intersticial.



Fonte: Kumar; Abbas; Aster (2016).

No processo de migração de leucócitos, os mesmos migram pelos vasos sob a influência das citocinas e quimiocinas. A principal função desses leucócitos é eliminar o agente agressor e substâncias estranhas, bem como os tecidos necrosados, para execução desse processo se faz necessário a presença de leucócitos do tipo neutrófilos e macrófagos, pois os mesmos apresentam a capacidade de fagocitose de corpos estranhos e danificados. Os neutrófilos predominam no processo inflamatório nas primeiras 24 horas, após esse período eles são substituídos pelos monócitos, que podem sobreviver por mais tempo e podem ser produzidos nos tecidos envolvidos na inflamação (JOHNSON III et al., 2017; DAVID; KUBES, 2019; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019).

Essas células de defesa para desempenhar a função passam pelo processo de ativação leucocitária que faz o reconhecimento dos corpos invasores e células mortas e induzem a resposta de combate. Como citado anteriormente uma dessas respostas é a fagocitose, onde os leucócitos fazem o reconhecimento/identificação do corpo estranho, se liga a ele, realiza a ingestão para posteriormente ocasionar a morte ou degradação. A destruição é desempenhada pelas espécies reativas de oxigênio

(ERO) e nitrogênio (RNS, reactive nitrogen species) (RANG et al., 2016; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019).

Adicionalmente os leucócitos estimulam a produção de citocinas, fatores de crescimento que são auxiliares no mecanismo de reparo tecidual. Entretanto, quando produzidos e ativados de forma exacerbada essas células podem causar danos teciduais e prolongar o processo inflamatório, pois durante a fagocitose há liberação para o espaço extracelular de hidrólases ácidas que lesam fibras colágenas e glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular, além de gerar radicais livres durante a cadeia respiratória (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019; MAXFIELD; BARBOSA-LORENZI; SINGH, 2020).

A resposta inflamatória começa a ter declínio após eliminação dos agentes agressores e tecidos danificados. Para que esse declínio aconteça há influência do metabolismo do ácido araquidônico, leucotrienos pós-inflamatórios, lipoxinas anti-inflamatórias e citocinas também anti-inflamatórias, como o fator de crescimento transformante β (TGF- β) e a Interleucina-10 (IL-10). Além desses, a inibição da produção de fator de necrose tumoral (TNF) em macrófagos estimulada pelos impulsos neurais também são capazes de findar uma resposta inflamatória (PARKER, 2017; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019).

Apesar de desejável, nem todas as reações inflamatórias com neutralização e eliminação do agente agressor finaliza com resolução completa, as reações inflamatórias podem apresentar três resultados. A resolução completa envolve a remoção dos restos celulares e microrganismos, além de regeneração tecidual completa. Já no reparo pela substituição ocorre importante dano tecidual com impossibilidade de regeneração. Uma outra evolução da resposta inflamatória é a transição de inflamação aguda para crônica, quando esta não consegue ser resolvida e há persistência do agente agressor (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019; NA et al., 2019).

O processo de inflamação crônica é de tempo prolongado e ele pode ter origem em diferentes tipos de situações, como citado no parágrafo anterior uma inflamação aguda não resolvida pode progredir para uma inflamação crônica, entretanto infecções persistentes por microrganismos de difícil eliminação, ativação excessiva e persistente do sistema imunológico e exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos também são fatores agravantes para o desenvolvimento de inflamação crônica. No processo de inflamação crônica há predomínio de macrófagos, linfócitos e

plasmócitos. Por apresentar persistência do agente agressor, o dano tecidual é contínuo, entretanto nas tentativas de eliminação do agente e reparo tecidual há substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo (HAMIDZADEH et al., 2017; SOEHNLEIN et al., 2017; CASTANHEIRA; KUBES, 2019).

Tanto na inflamação aguda, quanto na inflamação crônica há manifestação sistêmica do organismo. Entre as características de uma manifestação sistêmica, principalmente quando o agente agressor é um agente infeccioso, é possível observar a presença de febre, que é caracterizado pela elevação da temperatura corporal em até 4 °C. Substâncias pirógenos estimulam a produção de citocinas como IL-1 e TNF pelos leucócitos, essas substâncias aumentam as ciclooxigenases (COX) no hipotálamo que influenciam nas prostaglandinas, essa influência estimula a produção de neurotransmissores que reprogramam o ponto de ajuste da temperatura para um nível mais alto (HAMIDZADEH et al., 2017; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019).

Outras manifestações da resposta inflamatória incluem produção de proteínas da fase aguda, como a proteína C-reativa (CRP), o fibrinogênio e a proteína amiloide sérica A(SAA). Também pode ser observado leucocitose, principalmente nas reações inflamatórias infecciosas. Além de aumento da pulsação e da pressão sanguínea; diminuição do suor, calafrios, anorexia, sonolência e mal-estar, provavelmente por causa da ação das citocinas no sistema nervoso (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019).

Os medicamentos utilizando para o tratamento da inflamação possuem diversos mecanismos de ação. A função desses fármacos é inibir um ou mais de um evento que cause a cascata de reações inflamatórias, tais como as vias de síntese dos mediadores inflamatórios: inibição da enzima fosfolipase A2 que atua na via do ácido araquidônico, inibição das enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases que são precursores de prostaglandinas e leucotrienos, inibição de citocinas pró-inflamatórias, diminuição da migração leucocitária, entre outros. Contudo, boa parte dessas medicações apresentam efeitos colaterais e nesse caso não podem ser administrados por longos períodos, havendo a necessidade de muita atenção em seu uso (BJARNASON et al., 2018; BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020).

Portanto, a necessidade da busca por novos fármacos com potencial anti-inflamatório e que apresentem o mínimo de efeitos colaterais se faz necessário. Nesse contexto, a pesquisa com plantas que apresentam potencial medicinal, principalmente aquelas já conhecidas popularmente, representam uma estratégia relevante no âmbito da busca por novos fármacos a serem utilizados no tratamento de inflamações, além

de apresentar maior eficácia e menos efeitos colaterais ao organismo, quando comparados aos medicamentos comercializados (AL-SNAFI et al., 2018; YATOO et al., 2018).

3.7 DOR: FISIOPATOLOGIA E CONDIÇÕES GERAIS

Durante o processo inflamatório, um dos sinais cardinais é a presença de dor, que se caracteriza como um importante mecanismo de proteção que possibilita a detecção de estímulos nocivos para o organismo, seja eles físicos, químicos ou biológicos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019). Diante desse mecanismo são estimulados sistemas que protegem os indivíduos de futuras lesões. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) o conceito de dor é tido como “experiência sensitiva e emocional desagradável decorrente ou descrita em termos de lesões teciduais reais ou potenciais” (TROUVIN; PERROT, 2020).

A dor pode ser classificada em dois tipos: aguda e crônica. A dor aguda constitui um alerta de lesão tecidual ou de algum problema que está se instalando ou possa instalar, além de induzir reações de defesa, fuga ou remoção do agente causador. A dor crônica frequentemente se estende mais do que a ativação do nociceptor, refletindo lesões ou mudanças de longa duração no sistema nervoso e é constituída em resposta musculoesqueléticas e psicocomportamental (LAVAND'HOMME et al., 2020).

A percepção da dor tem início com a transformação do estímulo causador em potencial de ação que são transferidos, das fibras nervosas do sistema nervoso periférico (SNP) para o sistema nervoso central (SNC). A dor tem um sistema neuronal próprio, denominado sistema nociceptivo que possui fibras nervosas conhecidas como A δ (A-Delta) e C e são distribuídas nos tecidos, nas articulações, nos músculos, nos ossos e em vários órgãos internos. As fibras A-Delta apresentam bainha de mielina, que faz com que a transmissão através dela seja mais rápida (VANDERAH, 2007; SOMMER; LEINDERS; ÜÇEYLER, 2018).

Os neurônios nociceptivos primários fazem sinapses com interneurônios nas respostas reflexas espinais ou em neurônios secundários que se projetam ao encéfalo. As respostas nociceptivas integradas na medula espinal iniciam reflexos protetores inconscientes rápidos que, automaticamente, retiram a área estimulada, afastando-a da fonte do estímulo. Essas vias também chegam ao hipotálamo, e como resultado há estímulo para manifestações emocionais e neurovegetativas, como

náuseas, vômitos e sudorese (VANDERAH, 2007; SOMMER; LEINDERS; ÜÇEYLER, 2018).

O tratamento da dor é realizado com fármacos analgésicos, eles podem agir inibindo prostaglandinas, diminuindo a inflamação, e, presumivelmente, diminuindo a transmissão dos sinais de dor gerados no local da lesão. Embora seja a forma de tratamento mais comum, os medicamentos apresentam capacidade de causar várias reações adversas, além de existir a possibilidade de desenvolver tolerância e passar a necessitar de doses cada vez maiores para obter o mesmo efeito (TAUBEN et al., 2017; WERTLI; STEURER, 2018). Como consequência, os cientistas estão explorando fármacos e estratégias alternativas para o alívio da dor. Nesse contexto as plantas medicinais representam uma excelente fonte para busca desse potencial, tendo em vista que desde a antiguidade as plantas são utilizadas no tratamento da dor (URITU et al., 2018; FOROUZANFAR; HOSSEINZADEH, 2018; DUTTA et al., 2020).

3.8 PROCESSO INFLAMATÓRIO E REPARO TECIDUAL

A evolução do processo inflamatório envolve a regeneração do tecido, esse processo precisa reestabelecer a arquitetura e funcionalidade do tecido após a lesão. O reparo do tecido pode ocorrer por dois tipos de reação: regeneração quando há estímulo da proliferação das células residuais visando substituir os componentes danificados e retornar essencialmente ao seu estado normal, para isso participam o tecido lesado remanescente, as células endoteliais vasculares e os fibroblastos; Quando os tecidos remanescentes não conseguem restituir-se vai haver maturação de células-tronco teciduais e consequente deposição de tecido conjuntivo em um processo que resulta na formação de cicatriz (Figura 5) (SINGH; YOUNG; MCNAUGH, 2017; SHEDOEVA et al., 2019; .

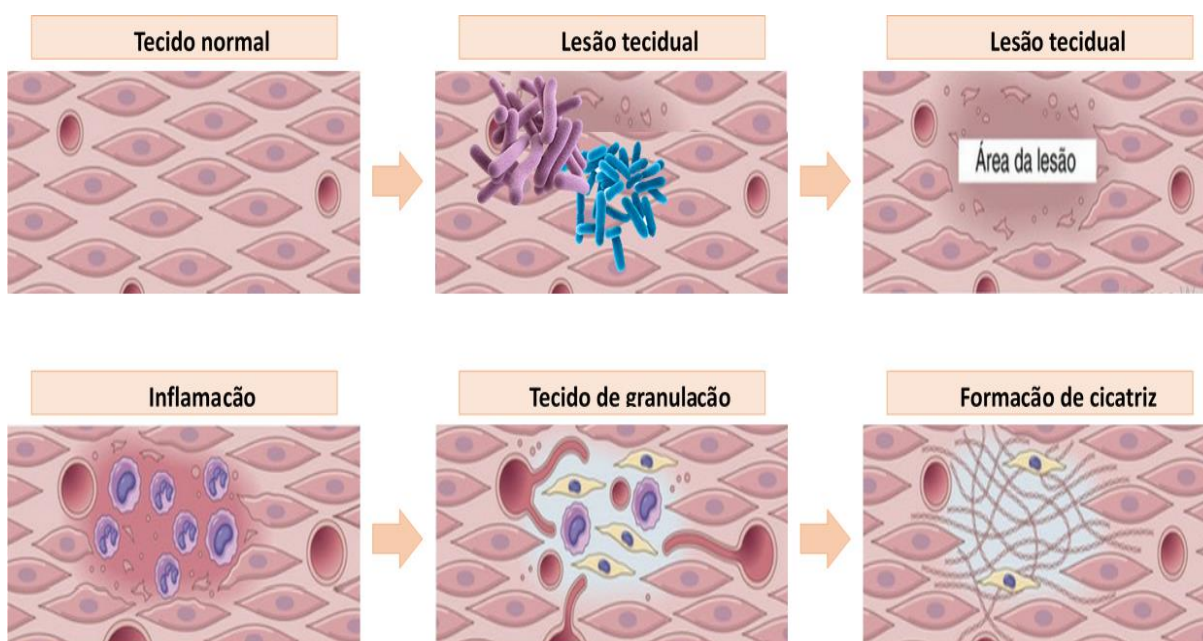
O primeiro passo envolvido no processo de reparo tecidual é a proliferação celular, que é estimulada pelos fatores de crescimento e controlada por ele e pela matriz extracelular. Os fatores de crescimento são produzidos por células próximas ao local do dano, as fontes mais importantes desses fatores de crescimento são os macrófagos ativados pela lesão tecidual, mas as células epiteliais e estromais também produzem alguns desses fatores (SINGH; YOUNG; MCNAUGH, 2017; ELLIS; LIN; TARTAR, 2018).

Para execução do processo de reparo é necessário fornecimento de nutrientes

e oxigênio, para esse fornecimento são formados novos vasos sanguíneos através da angiogênese. Já a deposição do tecido conjuntivo ocorre através da migração e proliferação de fibroblastos para o local da lesão e deposição das proteínas da matriz extracelular produzidas por essas células. A síntese de colágeno pelos fibroblastos tem início logo no começo do reparo das feridas (dias 3 a 5) e prossegue por várias semanas, resultando, por fim, na formação de uma cicatriz, dependendo do tamanho da lesão. À medida que o reparo prossegue, o número de fibroblastos e novos vasos proliferativos diminui (ELLIS; LIN; TARTAR, 2018; CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019).

No processo de reparo cutâneo envolve tanto a regeneração epitelial quanto a formação de cicatriz de tecido conjuntivo. Quando a lesão envolve apenas a camada epitelial, o principal mecanismo de reparo é a regeneração epitelial, também chamada de união primária ou cura por primeira intenção. Quando a perda de células ou tecidos é mais extensa, como ocorre em grandes feridas, abscessos, ulcerações e na necrose isquêmica de órgãos, o processo de reparo envolve uma combinação de regeneração e cicatrização (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2019).

Figura 5: Etapas do processo de cicatrização tecidual.



A lesão de um tecido, primeiro induz a inflamação, que, por sua vez, remove as células mortas ou os microrganismos. Seguem-se a formação de tecido de granulação vascularizado e a deposição da matriz extracelular para formar a cicatriz.

Fonte: Kumar; Abbas; Aster (2016) com modificações.

O processo de cicatrização pode sofrer a influência de vários fatores extrínsecos e intrínsecos como diabetes, estado nutricional, aumento de pressão local, corpos estranhos e a característica do tecido no qual a lesão ocorre também são importantes. Entretanto, um processo infeccioso é uma das causas que provocam maior demora no processo de reparo, pois a infecção aumenta a destruição tecidual e a necrose, exacerbando a doença e a cicatriz final. Nestes casos, podem ocorrer úlceras dolorosas com descargas purulentas e com inflamação ao redor além disso, a duração da doença seria prolongada (LINDSAY; OATES; BOURDILLON, 2017; WANG et al., 2018).

Algumas medicações são aplicadas no tratamento inflamatório e auxiliam no reparo tecidual, entretanto muitas vezes os medicamentos de uso sistêmico não atingem a eficácia desejada e não são capazes de combater as infecções secundárias que dificultam o processo de cicatrização. Diante disso, a administração tópica de fármacos é frequentemente utilizada quando se objetiva um efeito local, visto que formulações cujo sítio de ação é restrito à superfície da pele ou às primeiras camadas são capazes de manter concentrações efetivas do fármaco no tecido alvo e o risco de indução de efeitos secundários em decorrência de exposição sistêmica não ocorre. Nesse aspecto as plantas medicinais tornam-se uma importante fonte de busca para novos componentes ativos no controle de exacerbações inflamatórias cutâneas (FIRDOUS; SAUTYA, 2018; SHEDOEVA et al., 2019).

3.9 ESTUDOS DE TOXICIDADE

A toxicidade objetiva avaliar os efeitos nocivos causados por uma determinada substância dentro do organismo, sendo relacionada com sua concentração e tempo de permanência e/ou exposição. Por meio de ensaios toxicológicos, ela avalia as modificações que ocorre no organismo quando expostos, em condições propícias, a uma dada substância, devendo os testes de toxicidade ser realizados de forma padronizada e em condições replicáveis (TONKENS et al., 2005; HARTUNG et al., 2020).

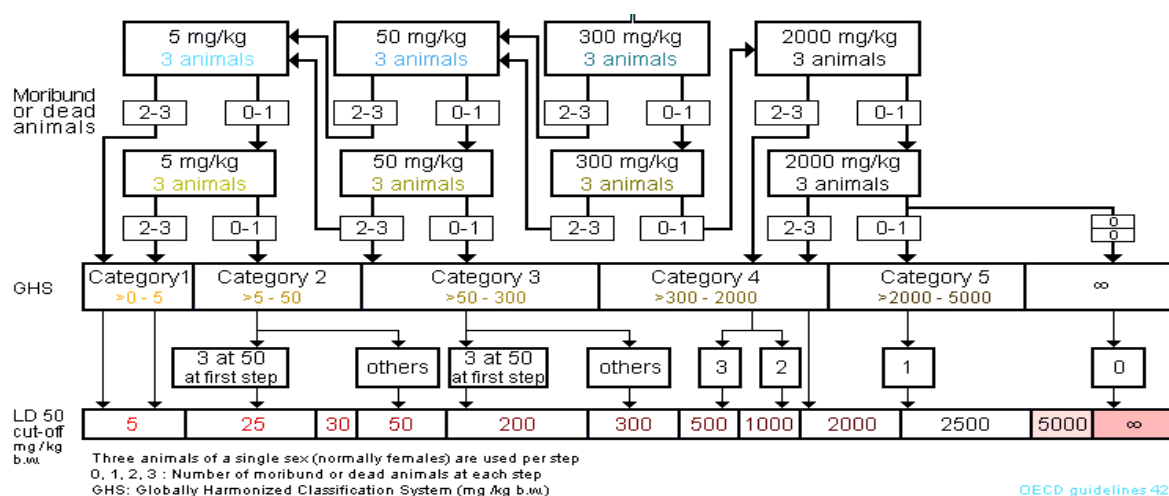
As alterações causadas por substâncias tóxicas podem ser reversíveis ou não, dependendo da extensão dos danos que são causados, que podem ser moleculares, celular, tecidual e em último caso podem levar a morte do organismo. Esses danos podem variar de acordo com características do paciente como gênero, idade e estado

de nutricional, entre outros (UGWAH-OGUEJIOFOR et al., 2019; DEYNO et al., 2020).

Diversas agências reguladoras apresentam protocolos para execução dos testes toxicológicos, sendo o da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) um dos mais aceitos no mundo, sendo seguido pelas principais agências reguladoras de drogas do mundo, como Food and Drug Administration (FDA), European Medical Agency (EMA), Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) e do ministério da Saúde do Japão. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também segue protocolos estabelecidos pelo OECD (MOURA et al., 2012).

Os estudos de toxicidade podem ser divididos em dois grupos: ensaios de dose única, denominado de teste de toxicidade aguda que permite classificar o composto de acordo com o grau de toxicidade ou letalidade, sendo capaz de determinar a dose letal mediana (DL50). No teste de toxicidade aguda são observadas alterações no consumo de água, ração e massa corpórea, e ao final do experimento os principais órgãos são retirados para avaliação macroscópica e histopatológica, para identificar os órgãos que podem ser alvos de efeitos indesejados, além de obter informações suficientes para classificar a substância e selecionar doses para estudos de longa duração. A Figura 6 apresenta o protocolo estabelecido pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) com orientações para avaliação da toxicidade aguda (OECD, 2001; UGWAH-OGUEJIOFOR et al., 2019).

Figura 6: Avaliação de toxicidade aguda de acordo com o guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 423).



Fonte: OECD (2001).

Já os ensaios de exposição a doses repetidas fornecem informações sobre a toxicidade de um produto quando administrado diariamente. Para a realização do teste é recomendado a utilização de três doses experimentais, além de utilizar animais machos e fêmeas por grupo, sendo observados alterações no consumo de água, ração e massa corpórea. Ao final do experimento os principais órgãos são retirados para avaliação macroscópica e histopatológica e o sangue também é coletado para análises hematológicas e bioquímicas (OECD, 2008; XIU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019).

Os testes toxicológicos visam garantir a segurança de uso de determinada substância estabelecendo limites seguros para a aplicabilidade e contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos (OLIVEIRA et al., 2019). A crença de que produtos naturais não fazem mal à saúde faz com que a toxicidade deles seja por muitas vezes subestimadas. Experimentos tem demonstrado que a utilização de algumas espécies de plantas causa inúmeros efeitos adversos ao organismo. Diante disso estudos toxicológicos envolvendo plantas medicinais devem ser realizados visando avaliar a sua segurança de uso (NDHLALA et al., 2013; TARIQ et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; COSTA et al., 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigos.

4.1 ARTIGO 1

Cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity evaluation of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves

Wêndeo Kennedy Costa; Matheus Ferreira do Nascimento; Édipo Lucas Soares Barbosa; Talita Giselly dos Santos Souza; Cristiano Aparecido Chagas; Thiago Henrique Napoleão; Maria Tereza dos Santos Correia; Fábio André Brayner; Alisson Macário de Oliveira and Márcia Vanusa da Silva.

Artigo publicado no Journal of Ethnopharmacology, Volume 303





Cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity evaluation of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves

Wêndeo Kennedy Costa^{a,*}, Matheus Ferreira do Nascimento^a, Édipo Lucas Soares Barbosa^a, Talita Giselly dos Santos Souza^a, Cristiano Aparecido Chagas^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Fábio André Brayner^c, Alisson Macário de Oliveira^a, Márcia Vanusa da Silva^a

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brazil

^b Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, 55608-680, Brazil

^c Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, 50670-420, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Brazilian plants
Caatinga
Essential oil
Preclinical
Safety
Toxicological safety

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Members of the *Psidium* genus have been suggested in ethnobotanical research for the treatment of various human diseases, and some studies have already proven their popular uses through research, such as *Psidium glaziovianum*, which is found in Brazil's northeast and southeast regions and has antinociceptive and anti-inflammatory properties; however, the safety of use has not yet been evaluated.

Aim of the study: This study investigated the safety of using essential oil obtained from *P. glaziovianum* leaves (PgEO) *in vitro* and *in vivo* models.

Materials and methods: Cytotoxicity was evaluated in murine erythrocytes, while acute toxicity, genotoxicity (comet assay) and mutagenicity (micronucleus test) studies were performed using Swiss albino mice.

Results: In the cytotoxicity assay, the hemolysis rate indicated a low capacity of PgEO to cause cell lysis (0.33–1.78%). In the acute oral toxicity study, animals treated with up to up to 5000 mg/kg body weight did not observe mortality or physiological changes. Neither dosage caused behavioral problems or death in mice over 14 days. The control and 2,000 mg/kg groups had higher feed intake and body weight than the 5,000 mg/kg PgEO group. Erythrocyte count, hemoglobin level, mean corpuscular volume, and MCV decreased, but serum alanine and aspartate aminotransferases increased. In the genotoxic evaluation, 5000 mg/kg PgEO enhanced nucleated blood cell DI and DF.

Conclusions: The present study describes that PgEO can be considered well tolerated in acute exposure at doses up to 2000 mg/kg, however the dose of 5000 mg/kg of PgEO should be used with caution.

1. Introduction

In underdeveloped and/or developing countries, the World Health Organization reported that between 70 and 90% of the population used medicinal plants in primary health care, while in Brazil approximately 82% of people depend on pharmaceutical products made from medicinal plants (World Health Organization, 2011; Silva, 2020). Given that the efficacy of using plants as a medicinal source is strongly linked to their safety, this fact reinforces the need for research to assess the toxicity of candidate drugs (Kute, 2014; Bostan et al., 2017). There are already several reports of the toxic potential of plants, in addition to the

excessive and careless use of these medicinal herbs, which can seriously harm the body (Lin et al., 2018; Tabarraei et al., 2019; Deyno et al., 2021).

Throughout the globe, *Psidium* species are utilized to treat a wide range of illnesses. Sprouts of the species *P. acutangulum* are made as decoctions, according to ethnopharmacological research, and are used to cure digestive diseases including diarrhea and dysentery (Pedrollo et al., 2016; Palheta et al., 2017). In folk medicine, *P. cattleianum* leaves are used to treat illnesses of the respiratory (Jacqueline et al., 2011; Bolson et al., 2015), genitourinary (Abreu et al., 2015), and digestive systems (Tomazi et al., 2014; Brito et al., 2017). Similarly, *P. guineense*

* Corresponding author.

E-mail address: wendeocosta@gmail.com (W.K. Costa).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115955>

Received 19 September 2022; Received in revised form 7 November 2022; Accepted 17 November 2022

Available online 25 November 2022

0378-8741/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

leaves and stem are used to treat headaches, sore throat, flu, diarrhea, dysentery, and headaches (Santana et al., 2016; Silva et al., 2018).

According to ethnopharmacological research, several investigations have shown pharmacological activities of this genus, such antioxidant (Dacoreggio et al., 2019; Nascimento et al., 2021), antimicrobial (Huang et al., 2021; Dias et al., 2019), anti-inflammatory (Houël et al., 2015; Nascimento et al., 2021; Yu et al., 2022), antinociceptive (Souza Sampaio et al., 2020), cytotoxic (Barradas et al., 2022; Bezerra et al., 2022) and insecticides (Abrão et al., 2022). However, few studies have evaluated the toxicity of the genus and its possible effects on long-term use (Castro et al., 2015; Manekeng et al., 2019; Delorino, 2020; Nascimento et al., 2021).

Among the genus, the species *Psidium glaziovianum* Kiaersk., a small to medium-sized tree, considered endemic to Brazil and found in the Caatinga and Atlantic Forest, has been demonstrating its pharmacological potential, as in reports it showed antinociceptive and anti-inflammatory activity (Costa et al., 2022); however, safety of use has not been evaluated. Thus, in this study, the essential oil extracted from the leaves of *P. glaziovianum* was submitted to biological safety tests involving acute toxicity, genotoxicity and mutagenicity in mice.

2. Materials and methods

2.1. Plant collection and identification

The leaves of *Psidium glaziovianum* Kiaersk (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-166734>) were collected in December 2019 (dry time) in the Caatinga region of Pernambuco, Brazil, in the municipality of Exu (07° 30'43" S 39° 43'27" W) and identified by Dr. Marcos Eduardo Guerra Sobral. Exsicata was placed as sample 93,728 at the Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) Herbarium Dárdano de Andrade Lima. The plant sample was entered under the registration number A08E18B in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen).

2.2. Essential oil extraction

P. glaziovianum leaves were hydrodistilled to produce the EO (PgEO), and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) was used to characterize the oil. An aliquot of PgEO (1 L) was injected into an Agilent 5975C GC/MSD mass spectrometer fitted with a fused silica capillary column DB-5 unpolished Agilent J; W (30 m 0.25 mm film; thickness: 0.25 m) with helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min to analyze its chemical makeup. The temperature rose by 4 °C/min from a starting point of 50 °C–230 °C.

Retention indices were used to identify chemical ingredients, and data from the GC-MS system's mass spectrum library (MassFinder 4, scientific consulting Dr. Hochmuth, Hamburg, Germany) and Mass Spectral Library NIST08 were compared (ChemSW Inc. Fairfield, CA, USA). Three separate experiments were conducted, and the procedure was done in triplicate.

PgEO contains a complex chemical profile, with the presence of 48 compounds, representing 98.22% of composition and the majority of the compounds were identified with 1,8-cineol (24,29%), α -pineno (19,73%) e β -pineno (17,31%) (Costa et al., 2022).

2.3. In vivo experiments

Swiss mice males and female, weighing between 30 and 35g, and maturing between 8 and 10 weeks, were utilized for the testing. The research has received approval from the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Pernambuco (no 122/2019) and all execution processes have been carried out in line with Brazilian law on animal testing and internationally accepted principles for laboratory animal use.

2.4. Hemolytic activity assessment

Toxicological screening of PgEO was assessed in the hemolytic activity assay as described by Costa et al. (2020). Briefly, a cardiac puncture was performed in anesthetized mice and then transferred to a tube containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Subsequently, the cell pellet was homogenized with saline solution to a concentration of 2% (v/v). Different concentrations of PgEO (0.250–10.0 mg/mL) were added in 96-well plates and incubated for 60 min at 28 °C. with the erythrocyte solution in triplicate. After the incubation period, a new centrifugation was performed under the same conditions as mentioned and the supernatant was collected to determine the hemoglobin released in a spectrophotometer UV/VIS (Erkin Elmer-Lambda 650) at 540 nm. For the positive control, Triton X was used.

2.5. Acute oral toxicity

2.5.1. Experimental procedure

The acute toxicity tested recommendations in Protocol 423 of the Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. For this, healthy female mice (n = 5 per group) were fastened 6 h and randomly grouped into three distinct groups receiving treatment oral at single dose with saline or PgEO (2,000 or 5,000 mg/kg). Immediately after the administration of substances, animals were observed individually as the general behavioral changes during the period of 4 h. Throughout 14 days of testing, the weight, water consumption and occurrence of deaths was recorded. At the end of the experiment, the animals were anesthetized (80 mg/kg ketamine and 20 mg/kg xylazine, i.p.) and submitted to the opening of the abdominal cavity for cardiac puncture of blood and macroscopic analysis of internal organs to see any potential alterations in size, color, tumor presence, and hemorrhages. The organs (liver, kidney and spleen) were removed, weighed and their masses expressed in absolute (g) and relative terms (g/10g mass of animal), subsequently, histological analysis was performed (Oliveira et al., 2019). Finally, the median lethal dose (LD50) was stipulated.

2.5.2. Hematological and biochemical analysis

Blood was collected using a 1 mL disposable syringe and a portion was immediately transferred to a tube containing EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) for hematological examination by automated hematology analyzer and optical microscopy. The parameters evaluated were: red blood cell (RBC), hemoglobin (HB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean hemoglobin concentration (MCHC). As well as white blood cell (WBC), segmented leukocyte (SEG), lymphocyte (LYM), and monocyte (MON).

For biochemical analysis, another portion of the blood was transferred to a tube containing separator gel without anticoagulants and subjected to centrifugation at 3000 rpm for 10 min to obtain serum and stored at –20 °C until the analysis was performed. The biochemical parameters evaluated were: blood urea nitrogen (BUN), albumin (ALB), creatinine (CRE), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (CT), triglycerides (TG), total protein (TP), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT), and bilirubin (BIL) were measured.

2.5.3. Histopathology analysis

Using light microscopy, histological examinations of the kidneys, liver, and spleen of mice from the control group and the PgEO treatment groups were carried out. Organ sections were dried by a graded ethanol series (70–100 percent), fixed in buffered formalin (10% v/v), cleaned in xylene, and then embedded in paraffin. In the spinning microtome, 5 mm sections were cut, which were then transferred to a slide in a histology bath. A microscope and digital camera were used to study the samples (Oliveira et al., 2019).

2.5.4. Morphometric evaluation

For morphometric evaluation of the liver, a grid with 100 test points was used and placed in the histological sections stained with hematoxylin-eosin. Three slides were counted, so that 10 fields per slide were counted, using the 40x objective, totaling 5,000 points per group. The non-lobular proportion (portal space, centrilobular veins, branches of the hepatic vein) and the lobular proportion (hepatocytes, sinusoids, Disse space and bile ducts) were observed (Ribeiro et al., 2020).

In the evaluation of the kidney, ten random glomeruli were analyzed with evidence of the equatorial region per slide and three slides per group were analyzed. To obtain the glomerular area, the cursor was positioned in the central area of the glomerulus, establishing an external circular line, coinciding with the glomerular tuft, the same methodology was used to determine the Bowman capsule. The glomerular and Bowman's capsule volumes were calculated using the equation $4/3\pi r^3$ to calculate the volume of the sphere, where "r" represents the radius (Ribeiro et al., 2020).

2.6. Genotoxicity tests

2.6.1. Experimental procedure

Using peripheral blood from Swiss albino mice, the comet assay and micronucleus (MN) test were conducted to determine if the PgEO causes genetic harm and mutagenesis. Three experimental groups of five mice each were created using male mice. The treatment groups were given PgEO at 2000 and 5000 mg/kg body weight via gavage, whereas the negative control (NC) group received 0.5 mL deionized water. The animals were given ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally to make them unconscious 48 h after the treatment, and blood was drawn by a retro-orbital puncture. The animals were then put to euthanized using heavy dosages of anesthetics (ketamine 300 mg/kg and xylazine 30 mg/kg) (Santos Souza et al., 2021).

2.6.2. Comet assay

The comet test was used in accordance with the Tice et al. (2000) recommended procedure to assess the genetic damage to nucleated blood cells. Initial homogenization of 15 μ L of blood with 100 μ L of low-melting point (0.5 percent LM) agarose was followed by the deposit of this combination on slides covered in conventional 0.5 percent agarose. The slides were placed at 4 °C for 10 min with a coverslip on them. Slides were immersed in a lysis solution (2.5 M sodium chloride [NaCl], 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 13) for 48 h after cooling with the coverslips removed.

The slides were first lysed, then placed in an alkaline electrophoresis buffer (1 M NaOH and 200 mM EDTA disodium salt, pH 13), where they were left for 20 min. Following this, the slides were electrophoresed in a horizontal chamber for 20 min at 300 mA and 32 V. The slides were fixed for 5 min in 100% ethanol after being neutralized for 15 min in 0.4 M Tris-HCl buffer at pH 7.5. The slides were stained with a 30 μ L ethidium bromide solution (0.0002% w/v) to make the nucleoids visible. Using an AlexaFluor 546 filter and a Zeiss-imager M2 fluorescent microscope with a 40x magnification objective, the studies were carried out. Beginning with the blood collection, all operations were carried out in a red-lit environment.

A total of 100 nucleoids from each animal were analyzed in order to quantify DNA damage. According on the percentage of DNA in the comet tail and head, each nucleus was divided into one of five categories: 0 (no damage), 1 (minimal apparent damage), 2 (medium damage), 3 (medium high damage), and 4 (high damage) (Collins et al., 2008). Each animal was assessed for two factors during the study of the 100 nucleoids: the damage index (DI) and frequency of damage (DF). For each animal studied, the DF values ranged from 0 to 100 whereas the DI values ranged from 0 (no harm) to 400 (highest damage) (Collins et al., 2008; Sousa Coelho et al., 2018).

2.6.3. Micronucleus test

Each animal's blood (5 μ L) was placed on slides that had been treated with acridine orange and then covered with a coverslip (Hayashi et al., 1990). A total of 2000 polychromatic erythrocytes (PCEs) were examined on three prepared slides for each animal to confirm the presence of micronuclei. A fluorescent microscope (Zeiss-imager, M2) with a 40x magnification objective and an AlexaFluor 488 filter was used for the study (OECD, 2016).

2.7. Statistical analysis

The GraphPad Prism® version 8.0 was used to analyze the data and expressed as mean values with standard deviation ($\pm$ SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine statistically significant differences before Bonferroni's or Dunnett's test (when necessary). The findings of the genetic damage tests (MN, DI, and DF) were examined by performing a Wilcoxon test comparison of the PgEO and NC group. This comparison was carried out to determine whether or not there was a significant difference between the three groups (R software). The level of significance established in all tests was set at $P < 0.05$.

3. Results and discussions

Costa et al. (2022) reported that ingestion of *P. glaziovianum* leaves essential oil resulted in a decrease in nociception and inflammation of mice. In the present work, we investigated the effect of this essential oil (previously characterized as mentioned in section 2.2) oral toxicity and genotoxicity in mice.

The application of natural products can be limited if its composition is toxic to an organism; thus, the toxicity of PgEO was preliminarily assessed in erythrocytes using the hemolysis test. The hemolysis rate ranged from 0.33% to 1.78%, indicating the low hemolysis capacity of PgEO. As there was no damage to erythrocytes in the *in vitro* test, acute oral toxicity of PgEO was tested in mice at concentrations of 2,000 and 5,000 mg/kg. At both concentrations, the mice did not exhibit behavioral changes, temperature changes, signs of cyanosis, lacrimation, hypnosis, and anesthesia. Furthermore, no mortality was observed during the 14 days of the experiment. However, there was a reduction in the response to touch, as evidenced in the first hour. Regarding feed intake and absolute body weight, a significant reduction ($p < 0.05$) was observed in the 5,000 mg/kg PgEO treatment group compared with that in the control group (Table 1).

Teo et al. (2002) reported that the potential toxic effects of natural products can be verified when indicators such as body weight of the treated animals exceed a 10% loss. In this study, the animals in the group treated with 5,000 mg/kg PgEO showed a body weight reduction of 6.5%; thus, PgEO was not classified as toxic. The control group and the group treated with 2,000 mg/kg PgEO did not exhibit any behavioral or physiological changes. Thus, the lethal dose (LD50) was determined to be above 5,000 mg/kg. Overall, PgEO was classified as less toxic or non-toxic, according to the classification of the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals, and thus, its use is safe (OECD, 2001).

Other *Psidium* species demonstrated low toxicity in the oral toxicity

Table 1

Evaluation of food and water consumption and weight gain of animals from control and treated with the *Psidium glaziovianum* Essential Oil (PgEO) *per os*.

Treatments	Water consumed	Food consumed	Absolute weight
Control	100.36 $\pm$ 3.60	50.95 $\pm$ 2.06	36.80 $\pm$ 0.81
PgEO			
2,000 mg/kg	96.18 $\pm$ 2.75	48.95 $\pm$ 0.36	36.40 $\pm$ 1.20
5,000 mg/kg	95.41 $\pm$ 1.84	42.80 $\pm$ 1.60*	34.40 $\pm$ 1.40*

Legend: PgEO: *Psidium glaziovianum* Essential Oil. Values represent the mean $\pm$ SEM (n = 5/group). *Indicates significant difference ($p < 0.05$) were found in comparison with control.

assay. In the reports by [Castro et al. \(2015\)](#) the oral administration of the essential oil of *P. cattleianum* did not promote death to animals treated at doses of 100, 200 and 500 mg/kg. [Nascimento et al. \(2021\)](#) described that in the 14-day evaluation, the hydromethanolic extract of *P. guineense* at doses of 500 and 2000 mg/kg did not cause death or changes in the hippocratic parameters or clinical signs that indicated toxicity. Similarly, [Manekeng et al. \(2019\)](#) describes that treatment in a single dose with 5,000 mg/kg of methanolic extract of *P. guajava* bark did not promote mortality or signs of toxicity in animals, determining the LD₅₀ above 5000 mg/kg.

The results of the hematological analyses ([Table 2](#)) demonstrated a significant reduction ($p < 0.05$) in erythrocyte count, hemoglobin level, mean corpuscular volume, and mean corpuscular hemoglobin concentration in the group treated with PgEO at a concentration of 5,000 mg/kg compared with those in the control group. These results indicate that PgEO at this concentration negatively affects red blood cells, thereby destabilizing the integrity of the membrane or even causing cell lysis ([Oliveira et al., 2015](#); [Costa et al., 2020](#)). The group treated with 2,000 mg/kg PgEO exhibited parameters similar to those of the control group ($p > 0.05$).

The results of biochemical analyzes showed that the group treated with 2,000 mg/kg of PgEO did not show significant changes ($p > 0.05$) compared to the control group. However, treatment with 5,000 mg/kg of PgEO promoted a significant increase ($p < 0.05$) in serum levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase ([Table 3](#)) in mice, indicating possible liver damage ([Campelo et al., 2013](#)). The other parameters evaluated were similar to the control group ($p > 0.05$).

No changes in color and texture were observed in the visceral organs of mice treated with 2,000 or 5,000 mg/kg PgEO compared with control group. Additionally, no significant differences in the relative weights of kidneys, liver, and spleen in PgEO treated mice was noted when compared with the controls ([Table 4](#)). In the histological analysis of the hepatic tissue ([Fig. 1](#)), the 2,000 mg/kg PgEO and control groups presented architecture with normal characteristics, showing regular hepatocyte cords and caliber centrilobular veins supported by loose connective tissue. However, treatment with 5,000 mg/kg PgEO promoted an increase in the space of Disse, an area of communication between different liver cells, including natural killer cells that attack infected or injured cells ([Wisse et al., 1997](#)). This fact may be related to the metabolism of PgEO in the liver, causing disturbances in the hepatocytes, and this corroborates the results of biochemical analyses that showed an increase in liver transaminase levels in the 5,000 mg/kg PgEO treatment group.

Microscopic analysis of the kidney ([Fig. 1](#)) of the animals treated with PgEO and saline solution showed well-defined cortical and medullary zones and preserved architecture. The renal glomeruli had a

Table 2

Hematological parameters of mice treated with the *Psidium glaziovianum* Essential Oil (PgEO).

Parameter	Control	PgEO	
		2,000 mg/kg	5,000 mg/kg
Red blood cells (10 ⁶ /mm ³)	9.23 ± 0.72	9.06 ± 1.12	8.75 ± 0.62*
Hematocrit (%)	43.61 ± 2.33	46.44 ± 1.54	44.69 ± 1.07
Hemoglobin (g/dL)	15.61 ± 0.81	15.12 ± 0.72	13.86 ± 0.56*
MCV (%)	47.72 ± 2.86	47.41 ± 1.38	44.06 ± 0.62*
MCH (%)	16.78 ± 0.82	16.54 ± 0.21	15.73 ± 0.55
MCHC (%)	35.43 ± 1.78	35.69 ± 1.21	32.30 ± 0.97*
White blood cells (10 ³ /mm ³)	8.23 ± 1.21	8.46 ± 1.24	9.96 ± 1.12
Segmented (%)	51.43 ± 1.38	50.46 ± 1.13	50.31 ± 1.67
Lymphocytes (%)	37.44 ± 0.78	38.20 ± 1.12	38.38 ± 1.01
Monocytes (%)	10.33 ± 0.95	10.85 ± 1.09	10.07 ± 1.18

Legend: PgEO: *Psidium glaziovianum* Essential Oil. MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; Values represent the mean ± SEM (n = 5/group). (*) Indicates significant difference ($p < 0.05$) in comparison with control.

Table 3

Biochemical parameters of blood of mice treated with the *Psidium glaziovianum* Essential Oil (PgEO).

Parameter	Control	PgEO	
		2,000 mg/kg	5,000 mg/kg
Albumin (g/dL)	4.77 ± 0.27	4.66 ± 0.26	4.42 ± 0.23
Alanine aminotransferase (U/L)	67.9 ± 2.33	73.2 ± 3.44	92.9 ± 0.61*
Aspartate aminotransferase (U/L)	102.3 ± 2.93	108.2 ± 3.92	143.5 ± 0.73*
Alkaline phosphatase (U/L)	13.2 ± 0.86	13.3 ± 0.71	12.6 ± 0.34
Gamma-glutamyl transferase	10.39 ± 0.32	11.1 ± 0.41	11.3 ± 0.72
Total protein (g/dL)	5.21 ± 0.72	5.33 ± 0.69	5.43 ± 0.53
Blood urea nitrogen (mg/dL)	36.6 ± 0.52	36.7 ± 0.76	35.7 ± 0.71
Creatinine (mg/dL)	0.29 ± 0.11	0.31 ± 0.17	0.29 ± 0.13
Bilirubin (mg/dL)	0.17 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.02
Cholesterol total (mg/dL)	113.4 ± 1.97	115.3 ± 1.98	116.7 ± 1.79
Triglycerides (mg/dL)	132.5 ± 1.95	133.4 ± 1.89	129.8 ± 1.26

Legend: PgEO: *Psidium glaziovianum* Essential Oil. Values represent the mean ± SEM (n = 5/group). (*) indicates significant difference ($p < 0.05$) in comparison with control.

Table 4

Evaluation of the relative weight (g/10 g animal body weight) of mice treated with the *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentrations of 2,000 or 5,000 mg/kg.

	Control	PgEO	
		2,000 mg/kg	5,000 mg/kg
Liver	2.19 ± 0.09	2.17 ± 0.11	2.19 ± 0.11
Kidney	0.32 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.30 ± 0.04
Spleen	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.04

Values represent the mean ± SEM (n = 5/group). No significant differences ($p > 0.05$) were found in comparison with control.

homogeneous Bowman capsule without changes; however, a slight increase in the caliber of the proximal contorted tubules was observed in the group of animals treated with a higher concentration of PgEO but with reversible characteristics. Thus, treatment with a high concentration of PgEO did not promote nephrotoxicity, corroborating the lack of changes in the serum levels of creatinine and urea. Histological analysis of the spleen of animals treated with PgEO and saline solution showed well-defined nodules ([Fig. 1](#)).

Thus, due to the presence of small histopathological changes in the liver and kidney, a morphometric analysis was performed on the target structures of the organs ([Table 5](#)). In animals treated with PgEO 5,000 mg/kg, an increase in the space of Disse associated with an increase in lobular parenchyma was evidenced in the liver. Such alterations possibly occurred due to the presence of xenobiotics that promotes the increase of phagocytic cells (Kupffer cells) and alters the processes of metabolism of substances. In the kidneys, treatment with the highest dose of PgEO promoted an increase in the volume of contorted tubules, thus leading to disturbances in the process of reabsorption of substances and changes in urinary osmolarity. Treatment with 2,000 mg/kg PgEO maintained the liver and kidney structures, similar to those in the control.

In the genotoxic evaluation the damage index (DI) and frequency of damage (DF) of nucleated blood cells between the NC group and the group that received PgEO at a dose of 2000 mg/kg were not significantly different, according to the comet test. Comparing the PgEO 5000 mg/kg group to the CN group, the PgEO group demonstrated an increase ([Fig. 2](#)).

In the micronucleus test only the 2000 mg/kg group did not cause a statistically significant increase in micronucleated PCEs at the test

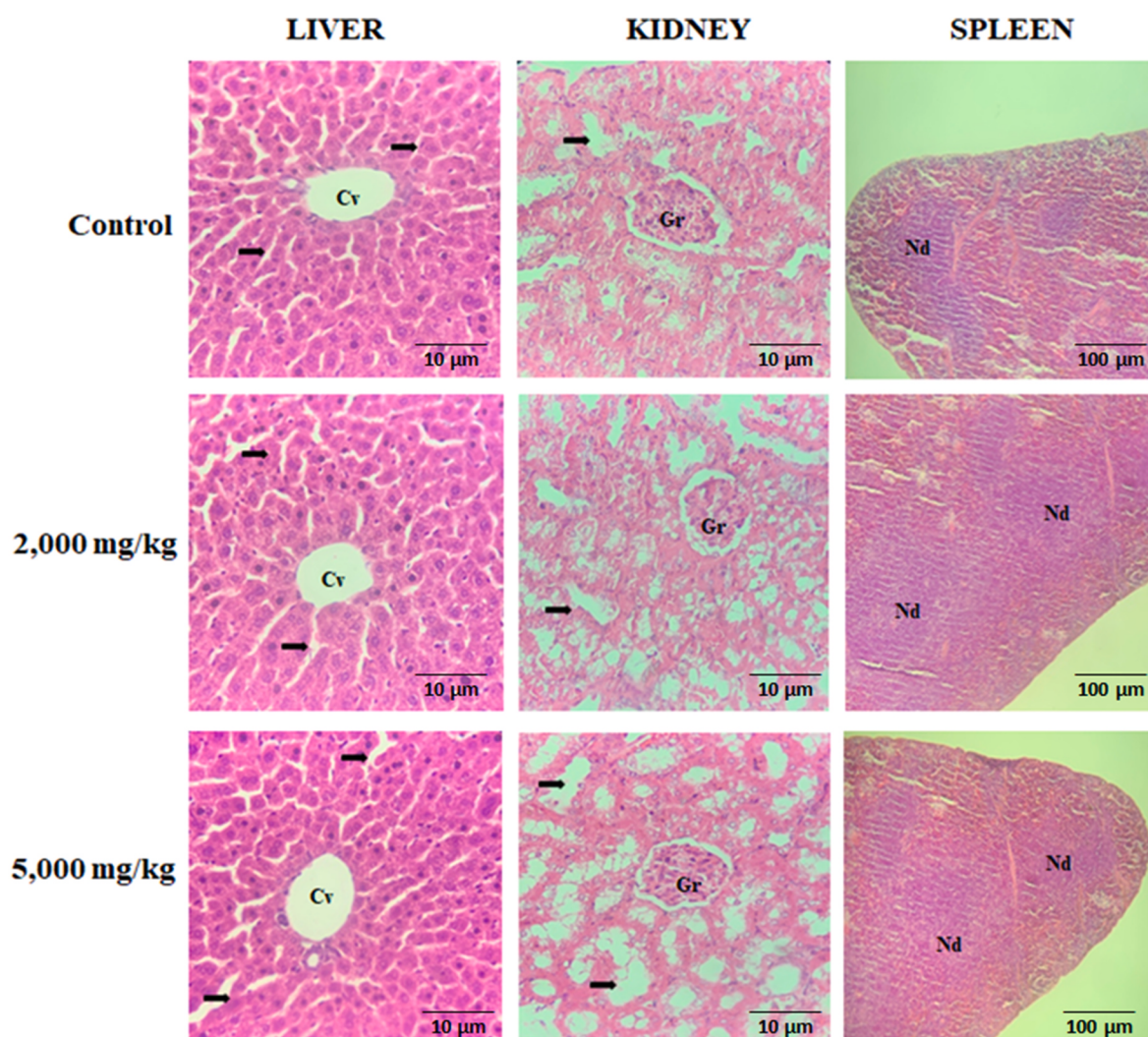


Fig. 1. Histopathological analysis of the liver, kidney and spleen of mice in the control and treated with *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentrations of 2,000 or 5,000 mg/kg.

Legend: Livers: centrilobular vein (cv) is seen in all images. The hepatocyte bundles were preserved and ordered. The space of Disse is present in all images (arrowhead) with a slight increase in the treatment with 5000 mg/kg of pgEO. Kidneys: Renal glomeruli (Gr) and contorted tubules (short arrows) with no changes are visible in the control groups and groups treated with PgEO. Treatment with 5000 mg/kg PgEO promoted an increase in light from twisted tubes. Spleen: The lymph nodes (Nd) are well defined in the control and treated groups. Hematoxylin and eosin staining was performed. Magnification: 100× for the spleen and 400 × for the other organs.

concentration when the CN group was contrasted with the PgEO treated groups. The 5000 mg/kg concentration demonstrated a significant difference (Fig. 3).

Genotoxic tests are significant toxicological evaluations because they may be used to identify chromosomal damage caused by chemicals as well as genotoxic damage that has accumulated in response to the danger of a complex combination of pollutants (Purpura et al., 2021). The increased frequency of micronucleus formation and comet formation is related to the risk of developing cancer (Shin et al., 2020). These tests are routinely carried out on medications and different herbal remedies to evaluate the potential of these substances to interact with nucleic acids and induce irreversible damage or mutations (Moura et al., 2020; Tao et al., 2022). These results presented validate the idea that PgEO at a concentration of 2000 mg/kg is safe to use, which means such a compound can be explored for the development of the pharmaceutical industry.

4. Conclusion

The oral treatment demonstrated low acute toxicity and did not

cause genetic damage even at high concentrations, according to our research. However, changes in hematological, biochemical, DI and DF parameters of the comet assay and an increase in the number of micronuclei were seen in the 5000 mg/kg treatment group, suggesting that PgEO is not recommended at this dose. In light of these findings, it is possible that PgEO, at least within the dosage range utilized in the current investigation, may be used safely for the development of traditional pharmaceuticals and herbal medicines. However, future studies of toxicity in repeated doses are essential to investigate possible cumulative effect of treatment with *P. glaziovianum*.

Funding

Funding was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance Code 001) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Table 5

Effect on the liver and kidney of mice treated with the *Psidium glaziovianum* Essential Oil (PgEO).

Parameter	Control	PgEO	
		2,000 mg/kg	5,000 mg/kg
<i>Liver</i>			
Lobular parenchyma	81.54 ± 2.17	82.95 ± 2.38	90.29 ± 3.23*
Non-lobular parenchyma	12.33 ± 2.36	14.23 ± 2.23	13.78 ± 3.37
<i>Kidney</i>			
Glomerular diameter (μm)	134.61 ± 10.31	136.11 ± 12.33	137.43 ± 12.21
Glomerular volume (μm ³)	137.09 ± 7.76	138.99 ± 9.45	141.12 ± 10.54
Bowman's capsule diameter (μm)	160.91 ± 5.37	159.56 ± 7.31	163.38 ± 8.61
Bowman's capsule volume (μm ³)	171.53 ± 8.95	168.71 ± 7.78	175.55 ± 8.92
Contorted tubule (μm ³)	158.58 ± 8.83	159.63 ± 6.78	187.69 ± 7.65*

Legend: Values represent the mean ± SEM. (*) Indicates significant difference ($p < 0.05$) in comparison with control.

CRediT authorship contribution statement

Wêndeo Kennedy Costa: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Matheus Ferreira do Nascimento:** Investigation. **Édipo Lucas Soares Barbosa:** Formal analysis, Investigation. **Talita Giselly dos Santos Souza:** Methodology, Investigation. **Cristiano Aparecido Chagas:** Methodology, Resources. **Thiago Henrique Napoleão:** Resources. **Maria Tereza dos Santos Correia:** Validation, Resources. **Fábio André Brayner:** Validation, Resources, Writing – review & editing. **Alisson Macário de Oliveira:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing, Supervision. **Márcia Vanusa da Silva:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

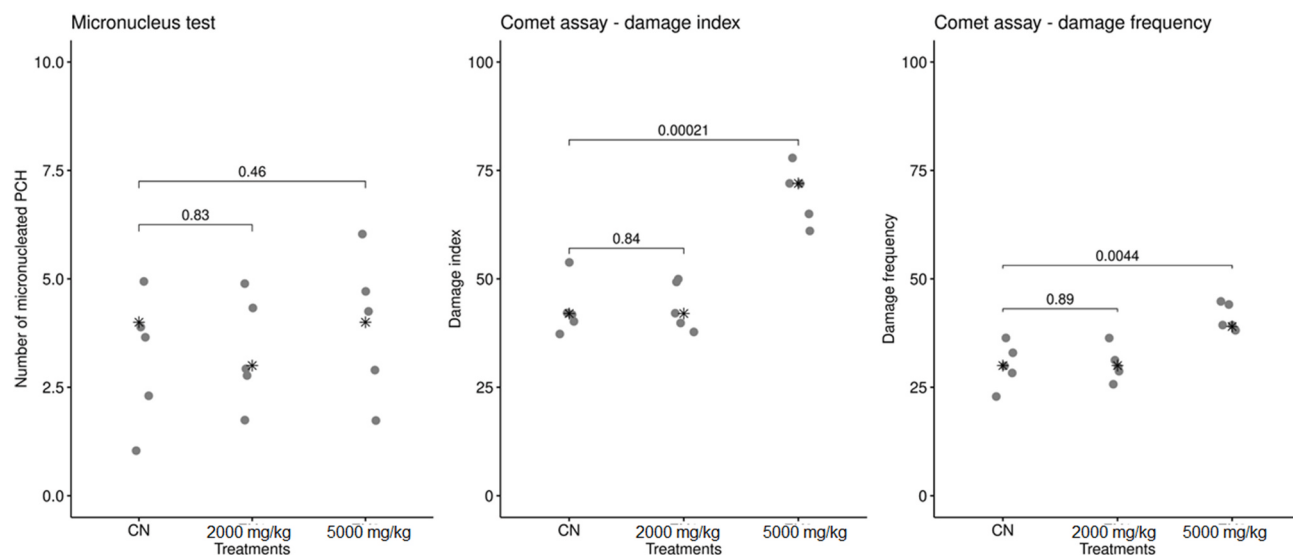


Fig. 2. Results of micronucleus tests and comet assay in the control group and the groups treated with *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentrations of 2,000 and 5,000 mg/kg.

Legend: PCE: polychromatic erythrocytes; NC: negative control; 2000 mg/kg: *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentration of 2,000; 5000 mg/kg: *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentration of 5,000. The stars represent the means; p values are shown in bars only when comparison was statistically significant ($p < 0.05$).

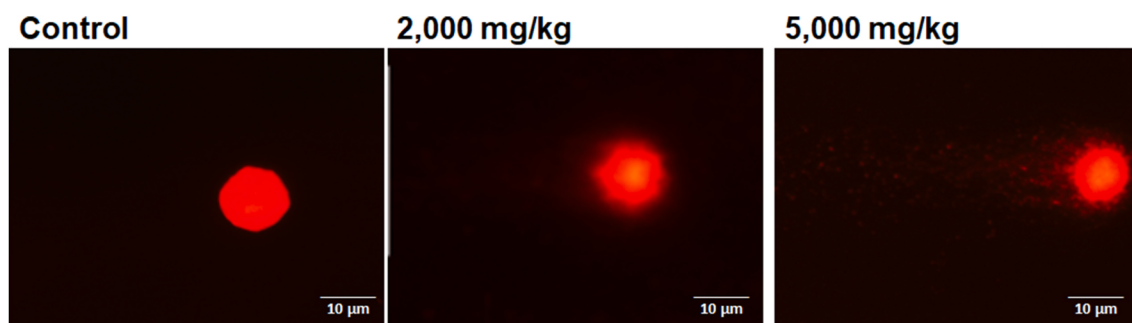


Fig. 3. Results of comet assay in the control group and the groups treated with *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentrations of 2,000 and 5,000 mg/kg. Legend: 2000 mg/kg: *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentration of 2,000; 5000 mg/kg: *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentration of 5,000.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115955>.

References

- Abrão, F.Y., da Costa, H.M., de Sousa Fiuza, T., Ramada, M.H.S., dos Santos, A.H., Romano, C.A., et al., 2022. Volatile oils from *Psidium guineense* Swartz leaves: chemical seasonality, antimicrobial, and larvicidal activities. *South Afr. J. Bot.* 149, 79–86.
- Abreu, D.B.O., Santoro, F.R., de Albuquerque, U.P., Ladio, A.H., de Medeiros, P.M., 2015. Medicinal plant knowledge in a context of cultural pluralism: a case study in Northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 175, 124–130.
- Barradas, Y.D.M., Borsoi, F.T., Dacoreggio, M.V., Moroni, L.S., Silva Rosa Bonadiman, B. D., Marafon, F., et al., 2022. Phytochemical profiling, antidiabetic, antitumoral and cytotoxic potential of *Psidium cattleianum* Afzel. ex Sabine leaves of red variety. *Nat. Prod. Res.* 1–5.
- Bezerra, J.N., Gomez, M.C.V., Rolón, M., Coronel, C., Almeida-Bezerra, J.W., Fidelis, K. R., et al., 2022. Chemical composition, evaluation of antiparasitary and cytotoxic activity of the essential oil of *Psidium brownianum* MART EX. DC. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 39, 102247.
- Bolson, M., Hefler, S.R., Dall, E.I., Chaves, O., Junior, A.G., Junior, E.L.C., 2015. Ethnomedicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 161, 1–10.
- Bostan, H.B., Mehri, S., Hosseinzadeh, H., 2017. Toxicology effects of saffron and its constituents: a review. *Iranian J. Basic Med. Sci.* 20 (2), 110.
- Brito, M.F., Marín, E.A., Cruz, D.D.D., 2017. Medicinal plants in rural settlements of A protected area in the Littoral of Northeast Brazil. *Ambiente Sociedade* 20, 83–104.
- Campelo, L.M.L., Sá, C.G., Feitosa, C.M., Sousa, G.F., Freitas, R.M., 2013. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). *Rev. Bras. Plantas Med.* 15 (4), 708–716.
- Castro, M.R., Victoria, F.N., Oliveira, D.H., Jacob, R.G., Savegnago, L., Alves, D., 2015. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: antioxidant and antifungal activity. *Pharmaceut. Biol.* 53 (2), 242–250.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., et al., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23 (3), 143–151.
- Costa, W.K., de Oliveira, J.R.S., de Oliveira, A.M., da Silva Santos, I.B., da Cunha, R.X., de Freitas, A.F.S., et al., 2020. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Ind. Crop. Prod.* 144, 112059.
- Costa, W.K., do Nascimento, M.F., Dos Santos, C.R.B., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., Napoleão, T.H., dos Santos Correia, M.T., et al., 2022. Oral administration of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice. *Inflammopharmacology* 30 (2), 599–607.
- Dacoreggio, M.V., Moroni, L.S., Kempka, A.P., 2019. Antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities and surface disinfection of the extract of *Psidium cattleianum* sabine leaves. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 21, 101295.
- Delorino, S.B., 2020. Histologic property of *Psidium guajava* Linn Guava leaf extract in wound. *European J. Mol. Clinical Med.* 7 (11), 1385–1391.
- Deyno, S., Tola, M.A., Bazira, J., Makonnen, E., Alele, P.E., 2021. Acute and repeated-dose toxicity of *Echinops kebericho* Mesfin essential oil. *Toxicol Rep* 8, 131–138.
- Dias, A.L., Batista, H.R., Estevam, E.B., Alves, C.C., Forim, M.R., Nicoletta, H.D., et al., 2019. Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae). *Nat. Prod. Res.* 33 (17), 2566–2570.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate Jr., M., 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res. Lett.* 245 (4), 245–249.
- Houël, E., Fleury, M., Odonne, G., Nardella, F., Bourdy, G., Vonthron-Sénécheau, C., et al., 2015. Antiplasmodial and anti-inflammatory effects of an antimalarial remedy from the wayana amerindians, French Guiana: Takamalaimé (*Psidium acutangulum* Mart. ex DC., Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 166, 279–285.
- Huang, J., Li, C., Ma, J., Xu, K., Chen, X., Jiang, J., Zhang, D., 2021. Chemical constituents of *Psidium guajava* leaves and their antibacterial activity. *Phytochemistry* 186, 112746.
- Jacqueline, A.C., Bruno, P.B., Danilo, H.L., Douglas, D.A.P., James, L.C., Claudio, L.F., es, A., 2011. Ethnobotanical study of traditional uses of medicinal plants: the flora of caatinga in the community of Cravolândia-BA, Brazil. *J. Med. Plants Res.* 5 (10), 1905–1917.
- Kuete, V., 2014. Toxicological Survey of African Medicinal Plants.
- Lin, L., Liu, Y.C., Huang, J.L., Liu, X.B., Qing, Z.X., Zeng, J.G., Liu, Z.Y., 2018. Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): a review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Phytother Res.* 32 (1), 19–48.
- Manekeng, H.T., Mbaveng, A.T., Ntyam Mendo, S.A., Agokeng, A.J.D., Kuete, V., 2019. Evaluation of acute and subacute toxicities of *Psidium guajava* methanolic bark extract: a botanical with in vitro antiproliferative potential. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 2019.
- Moura, D.F., Rocha, T.A., de Melo Barros, D., da Silva, M.M., de Lira, M.A.D.C., dos Santos Souza, T.G., et al., 2020. Evaluation of the cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of the latex extracted from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae). *J. Ethnopharmacol.* 253, 112567.
- Nascimento, K.F., Kassuya, C.A.L., Cabral, M.R.P., Souza, R.I.C., Marangoni, J.A., Silva, R.M.M.F., et al., 2021. Chemical analysis and antioxidant, anti-inflammatory and toxicological evaluations of the hydromethanolic extract of *Psidium guineense* Swartz leaves. *J. Ethnopharmacol.* 281, 114492–114497.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. Guideline for Testing of Chemicals. Guideline: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2016. Test No. 474. In: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, vol. 4. OECD Publishing, Paris.
- Oliveira, A.M., Mesquita, M.D.S., da Silva, G.C., de Oliveira Lima, E., de Medeiros, P.L., Paiva, P.M.G., et al., 2015. Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L.(Moraceae). *Evid. base Compl. Alternative Med.* 2015.
- Oliveira, A.M., da Silva, W.A.V., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., de Medeiros, P.L., Soares, L.A.L., et al., 2019. Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *J. Ethnopharmacol.* 234, 96–105.
- Palheta, I.C., Tavares-Martins, A.C.C., Lucas, F.C.A., Jardim, M.A.G., 2017. Ethnobotanical study of medicinal plants in urban home gardens in the city of Abaetetuba, Pará state, Brazil. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat.* 16 (3), 206–262.
- Pedrollo, C.T., Kinupp, V.F., Shepard Jr., G., Heinrich, M., 2016. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian amazon: ethnobotanical survey and environmental conservation. *J. Ethnopharmacol.* 186, 111–124.
- Purpura, M., Jäger, R., Falk, M., 2021. An assessment of mutagenicity, genotoxicity, acute-, subacute and subchronic oral toxicity of paraxanthine (1, 7-dimethylxanthine). *Food Chem. Toxicol.* 158, 112579.
- Ribeiro, N.E., Pereira, P.S., de Oliveira, T.B., de Arruda Lima, S.M., Silva, T.M.S., Santana, A.L.B.D., et al., 2020. Acute and repeated dose 28-day oral toxicity of *Chrysobalanus icaco* L. leaf aqueous extract. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 113, 104643.
- Santana, B.F., Voeks, R.A., Funch, L.S., 2016. Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. *J. Ethnopharmacol.* 181, 37–49.
- Santos Souza, T.G., da Silva, M.M., Feitoza, G.S., de Melo Alcântara, L.F., da Silva, M.A., de Oliveira, A.M., et al., 2021. Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. *J. Ethnopharmacol.* 272, 113941.
- Shin, S., Yi, J.M., Kim, N.S., Park, C.S., Kim, S.H., Bang, O.S., 2020. Aqueous extract of *Forsythia viridissima* fruits: acute oral toxicity and genotoxicity studies. *J. Ethnopharmacol.* 249, 112381.
- Silva, T.C.D., Silva, J.M.D., Ramos, M.A., 2018. What factors guide the selection of medicinal plants in a local pharmacopoeia? a case study in a rural community from a historically transformed Atlantic forest landscape. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 2018.
- Silva, A.J.A., 2020. Potencialidades medicinais de *Jatropha gossypifolia* e *Cnidioscolus phyllacanthus*. *Cadernos Macambira* 5 (1), 17–18.
- Sousa Coelho, I.D.D., Neto, C.J.C.L., dos Santos Souza, T.G., da Silva, M.A., Chagas, C.A., Dos Santos, K.R.P., et al., 2018. Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during pregnancy. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 832, 52–60.
- Souza Sampaio, R., do Nascimento, E.P., de Menezes, I.R.A., dos Santos Sales, V., Pereira, A.O.B., de Lacerda, G.M., et al., 2020. Antinociceptive activity of the *Psidium brownianum* Mart ex DC. leaf essential oil in mice. *Food Chem. Toxicol.* 135, 111053.
- Tabarraei, H., Hassan, J., Parvizi, M.R., Golshahi, H., 2019. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the black caraway seed essential oil in Wistar rats. *Toxicol Rep* 6, 869–874.
- Tao, Q., Peng, D., Li, P., Lai, L., Li, W., Du, B., 2022. Genotoxicity, acute and subchronic toxicity evaluation of fermented *Morinda officinalis*. *Food Chem. Toxicol.* 163, 113003.
- Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 179 (3), 183–196.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., et al., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (3), 206–221.
- Tomazi, L.B., Aguiar, P.A., Citadini-Zanette, V., Rossato, A.E., 2014. Estudo etnobotânico das árvores medicinais do Parque Ecológico Municipal José Milanese, Criciúma, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Plantas Med.* 16, 450–461.
- Wisse, E., Luo, D., Vermijlen, D., Kanelloupolou, C., De Zanger, R., Braet, F., 1997. On the Function of pit cells, the liver-specific Natural Killer cells. *Semin. Liver Dis.* (17), 265–286.
- World Health Organization (WHO), 2011. The World Medicines Situation: Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges. Geneva, 2011.
- Yu, Y., Sun, X.Y., Xu, K.L., Ma, J., Zang, Y.D., Hou, Q., et al., 2022. Meroterpenoids with unknown skeletons from the leaves of *Psidium guajava* including one anti-inflammatory and anticoagulant compound: psidial F. *Fitoterapia* 159, 105198.

4.2 ARTIGO 2

Evaluation of 28-day repeated doses oral toxicity of essential oil from *Pisidium glaziovianum* Kiaersk leaves

Wêndeo Kennedy Costa^{a*}, Matheus Ferreira do Nascimento^a, Maísa Fernanda dos Santos Barbosa^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Fábio André Brayner dos Santos^b, Márcia Vanusa da Silva^a and Alisson Macário de Oliveira^a

Artigo será submetido ao Journal of Ethnopharmacology



Evaluation of 28-day repeated doses oral toxicity of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves

Wêndeo Kennedy Costa^{a*}, Matheus Ferreira do Nascimento^a, Maísa Fernanda dos Santos Barbosa^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Fábio André Brayner dos Santos^b, Márcia Vanusa da Silva^a and Alisson Macário de Oliveira^a

^a *Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brazil.*

^b *Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife – PE, 50670-420, Brazil.*

*Autor correspondente: Wêndeo Kennedy Costa. E-mail: wendeocosta@gmail.com

Abstract

Ethnopharmacological relevance: The genus *Psidium* L. has a great diversity of species with medicinal application; however, few species had their safety evaluated or safe limits for use were established. *Psidium glaziovianum* is a species found only in Brazil, native to the northeast and southeast regions of the country and has reports of antinociceptive and anti-inflammatory effects.

Aim of the study: This study investigated the toxicity of repeated doses of essential oil from the leaves of *Psidium glaziovianum* (PgEO) as well as the influence of the treatment on the exploratory and locomotor capacity of mice.

Materials and methods: PgEO were orally administered daily for 28 days at concentrations of 250, 500 and 1000 mg/kg in male and female Swiss mice. Hematological, biochemical and histopathological parameters were evaluated, as well as temperature, blood glucose, urinalysis and oxidative stress. Additionally, on days 0, 14 and 28, the mice were evaluated for the influence of PgEO treatment on the exploratory and locomotor capacity of mice in the open field, rota-rod and elevated plus maze tests.

Results: The results demonstrate that treatment with PgEO at different concentrations (250, 500 and 1000 mg/kg) did not show signs of toxicity or affect water and feed intake, weight, hematological and biochemical parameters, in addition to promoting improvement in levels of antioxidant enzymes in mice. Additionally, administration of

PgEO in repeated doses did not promote exploratory or locomotor changes in the animals.

Conclusions: This study provides information that treatment with PgEO administered in repeated doses for 28 days has low toxicity without promoting disturbances in the nervous system, in addition to stimulating the production of antioxidant enzymes.

Keywords: Behavioral Assessment; Caatinga; Oxidative stress; Repeated dose toxicity; Subacute toxicity.

1. Introduction

Medicinal plants have been applied in the treatment of various diseases and serve as sources for the development of new medicines. Its use has increased significantly due to its low cost, in addition to the associated popular knowledge (Delorino et al., 2020; Costa et al., 2022). Secondary metabolites, a vital component of medicinal plants, which may be responsible for biological actions, some of which may have therapeutic potential, while others may have harmful consequences (Lin et al., 2018; Deyno et al., 2021).

Essential oils are one of the extractive products of numerous secondary metabolites generated by plants. These have been used in the field of health and healthcare for a considerable amount of time (Campelo, et al., 2013; Diniz et al., 2019; Costa et al., 2020). On the other hand, kidney and liver toxicity associated with the ingestion of some therapeutic plants have been reported, especially when ingested in large doses or on consecutive days (Taghizadeh et al., 2017; Adokoh et al., 2019; Stojanović et al., 2019).

Ethnopharmacological studies show that species of the genus *Psidium* are used worldwide in the treatment of diseases, in which studies report the effectiveness; however, few studies have reported the toxicity of this genus (Vinholes et al., 2017, Kakuo et al., 2018; Shetty et al., 2019; Delorino et al., 2020; Babatola et al., 2021). Among the *Psidium* species with pharmacological potential is *Psidium glaziovianum* Kiaersk., a small to medium-sized tree, endemic to the Caatinga and Atlantic Forest of Brazil (Landrum, 2017; Tuler et al., 2021). Costa et al., (2022) reported the antinociceptive and anti-inflammatory potential of the essential oil from the leaves of *P. glaziovianum*, however there are no reports of toxicity in repeated doses.

Therefore, the essential oil obtained from the leaves of *P. glaziovianum* was

administered orally for 28 days, aiming to evaluate the safety of use considering physiological, biochemical, hematological and morphological parameters. Additionally, the influence on the central nervous system of male and female mice was investigated.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Leaves of *Psidium glaziovianum* Kiaersk (Myrtaceae) were collected in December 2019 (dry season) in the municipality of Exu (07° 30 '43 "S 39° 43 '27" W), Pernambuco, Brazil, Caatinga region. Exsicata was deposited in the Dárdano de Andrade Lima Herbarium of the Pernambuco Agronomic Institute (IPA), sample 93,728. The plant material was registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen), under number A08E18B.

2.2 Essential oil extraction

Essential oil from leaves of *P. glaziovianum* (PgEO) was obtained according to procedures by Costa et al., 2022. Briefly, the leaves were cleaned and dried and subjected to the hydrodistillation process (900g in 3L of water) for 4 hours. Then, the oil was characterized by gas chromatography - mass spectrometry (GC/MS) showing 48 components constituting 98.22% of the content. The major compounds identified were 1,8-cineol (24.29%), α -pinene (19.73%) and β -pinene (17.31%) (Costa et al., 2022).

2.3 In vivo experiments

For the tests male and female Swiss mice were used, weighing between 30 and 35g, aged between 8 and 10 weeks. All procedures were performed in accordance with Brazilian legislation for animal experimentation and the study has a favorable opinion by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Pernambuco (n° 122/2019).

2.3 Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity

2.3.1 Experimental procedure

Mice were separated into four groups, each group containing 5 males and 5 females (n = 10) and received the following treatments for 28 days: PgEO (250 mg/kg,

500 mg/kg or 1000 mg/kg) or NaCl 0, 9% (Control). The animals were monitored daily for 28 days, water consumption, feed consumption, signs of toxicity (piloerection, diarrhea and changes in locomotor activity) and mortality were observed. Body weight, body temperature and glycemic index were evaluated weekly (OECD, 2008). On the 29th day the animals were euthanized, the urine was collected for analyzes of physical-chemical parameters and sedimentoscopy. Then, the animals were anesthetized (ketamine solution 75 mg/kg and xylazine 15 mg/kg) and blood was collected from the inferior vena cava for analysis of hematological and biochemical parameters. Kidneys, liver and spleen were collected, weighed and processed for histopathological analysis.

2.3.2 Hematological and biochemical analysis

For hematological analyses, peripheral blood was collected in a tube containing EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and analyzes were performed immediately using an automatic hematology analyzer and optical microscopy. Parameters included red blood cell (RBC) count, hemoglobin (HB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean hemoglobin concentration (MCHC), and white blood cell differential (WBC) segmented leukocyte (SEG), lymphocyte (LYM) and monocyte (MON) counts.

For biochemical analyses, blood was collected in a tube without anticoagulant and centrifuged at 3000 rpm for 10 min to obtain serum. The following parameters were determined: albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), total protein (TP), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT) and bilirubin (BIL).

2.3.3 Necropsy and histopathology analysis

Histological analyzes of the kidneys, liver and spleen of mice in the control group and in the PgEO treatment groups were performed by optical microscopy. Organ sections were fixed in buffered formalin (10%, v/v), dehydrated by a graded ethanol series (70–100%), cleared in xylene, and embedded in paraffin. Histological slices (5 μ m) were stained with hematoxylin-eosin and mounted using resin coverslips. Samples were observed using a microscope (Nikon, Japan) coupled to a digital camera (Motic Incorporation, Hong Kong).

2.3.4 Assessment of temperature and blood glucose

On days 0, 7, 14, 21, and 28 after the initiation of therapy, temperature and glycemic index were assessed. The animals were kept at room temperature (25 °C) for temperature monitoring, and the thermometer bulb was put into the anus to measure the temperature. The blood was drawn from the animals' tails and tested using a glucometer to determine the glycemic index (Oliveira et al., 2019).

2.3.5 Physical-chemical analyzes and urine sedimentoscopy

Urine was collected from the bladder using a syringe and the following parameters were analyzed: volume, color, appearance, pH, density, proteins, ketones, urobilinogen, glucose, hemoglobin, nitrite, epithelial cells, leukocytes, red blood cells, crystals, cylinders and mucus filaments.

2.3.6 Analyzes of oxidative stress

Liver, kidney and spleen homogenates (500 µg) were prepared in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate and 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride and centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes at 4° C. The supernatant was collected and used in oxidative stress analyses. Determination of total protein content was performed as described by Bradford (1976). Lipid peroxidation was evaluated by estimating the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), with the results expressed in nmol of malondialdehyde (MDA) per mg of protein (Ohkawa et al., 1979). Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by evaluating the inhibition kinetics of epinephrine autoxidation according to absorbance at 480 nm, with tissue SOD enzymatic activity expressed in U/mg of protein. Catalase activity (CAT) was measured at 240 nm to monitor the change in absorbance between the first and sixth minute, tissue CAT enzymatic activity is expressed in mU/mg protein (Beers and Sizer, 1952).

2.4 Evaluation of Adverse Effects on Behavior and Locomotor Activity

The mice used in the evaluation of toxicity in repeated doses (n=10) were submitted to behavioral evaluation tests. Exploratory capacity in the open field test, forced locomotor capacity through the rota-rod test and anxiety-like behavior in the elevated plus maze test were evaluated, according to the procedures described below. The animals were submitted to tests on days 0, 14 and 28 of treatment.

2.4.1 Open field

The animals were placed individually in a circular acrylic arena measuring 30 cm in height x 30 cm in diameter and at the base divided into 12 quadrants. The mice were evaluated for a period of 5 minutes, with horizontal exploration recorded through the number of crossings of the quadrants (Crossing) and vertical exploration (Rearing) (Archer, 1973).

2.4.2 Rota-rod

To evaluate the time of forced locomotion, the animals were subjected to a rotating bar (7 rpm) and the time that the mice managed to remain on top of the bar for up to 180 seconds was evaluated (Dunham, 1957).

2.4.3 Elevated Plus-Maze Test

To evaluate the possible effects of PgEO treatment, the mice were placed individually in the maze apparatus consisting of two open arms (50x10cm) and two closed arms (50x10x40 cm). During 5 minutes, the number of entries and the time spent in the open and closed arms were recorded. Next, the anxiety index was determined, following the formula: Anxiety Index = $1 - [(time\ spent\ in\ open\ arms / total\ time\ in\ maze) + (number\ of\ open\ arm\ entries / total\ maze\ entries) / 2]$. Anxiety index values range from 0 to 1, and increasing the index expresses anxiety-like behavior (Kraeuter et al., 2019).

2.5 Statistical analysis

The data obtained were analyzed using GraphPad Prism® version 8.0 and expressed as mean $\pm$ SD or mean $\pm$ SEM. Statistically significant differences were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni or Dunnett's test (when necessary). Values were considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

In a previous study, the essential oil from the leaves of *P. glaziovianum* was characterized using GC-MS and 48 compounds were identified, including 1,8-cineol (24.29%), α -pinene (19.73%) and β -pinene (17.31%) the majority. It was suggested

that these compounds promoted antinociceptive and anti-inflammatory effects in animal models (Costa et al., 2022). Thus, in this study we investigated for the first time, the effect of oral administration in repeated doses, as well as the possible adverse effects using the same previously characterized sample.

3.1 Effect of PgEO on physiological and behavioral parameters

Animals treated with PgEO at doses of 250, 500 and 1000 mg/kg for 28 consecutive days did not show behavioral changes (piloerection, diarrhea and changes in locomotor activity) or death. The treatment of male and female mice with PgEO did not compromise the final weight gain (Figure 1), however, in the first week of evaluation, the females in the PgEO 1000 mg/kg group did not gain weight, a situation that was reversed after the second week. Soldin and Mattison (2009) described that females have a 1.5-1.7 times greater risk than males of suffering an adverse drug reaction, which explains greater sensitivity to PgEO. On the other hand, Deyno et al. (2021) demonstrated that the reversal in weight gain can be considered an indication that PgEO is a low toxicity oil even when administered in high concentrations to females.

Regarding feed intake, the females in the PgEO 1000 mg/kg group showed a decrease in the amount of feed consumed during the first week, however water consumption was similar to the control group (Figure 2). In the other treated groups, food and water consumption during the test period was similar to the control group ($p < 0.05$). Despite showing a change in feed intake in the first week, the pattern of water and feed intake in the following weeks contributes to the final weight of the animals and classifies PgEO with low toxicity, considering that toxic substances significantly alter feed intake and water, as observed in the studies using the essential oil of the leaves of *Echinops kebericho* (Deyno et al., 2021) and in the study with the aqueous extract of the leaves of *Chrysobalanus icaco* (Ribeiro et al., 2020).

3.2 Effect of PgEO treatment on serum glucose and temperature

The temperature and glycemic index of male and female mice in the control and PgEO-treated groups were evaluated weekly (Figure 3). Some toxic substances, inflammatory or infectious agents or endotoxins stimulate an increase in body temperature by deregulating thermoregulatory centers in the hypothalamus (Salvemini et al., 1996). However, in the present study, there was no difference between the rectal

temperature of the groups treated with PgEO and the control group, nor between the groups of males and females (Figure 3 A and B) in which, all remaining close to the normal body temperature for mice (36.6 °C) (Reitman, 2018).

The glycemic index of male and female mice treated with PgEO at a concentration of 500 and 1000 mg/kg had a decrease when compared with the control group ($p < 0.05$), a fact that did not occur with the treatment groups with the lowest concentration (250mg/kg). According to Negri (2005), substances that severely decrease blood glucose can promote hypoglycemic shocks and thus consider them toxic, a fact that was not observed with PgEO treatment.

3.3 Effect of PgEO treatment on hematological and biochemical parameters

The analyzes of hematological and biochemical parameters are essential to assess the toxicity of a substance in repeated exposure studies (OECD, 2008). Analyzes of hematological parameters are important due to the sensitivity of the hematopoietic system to toxic agents, which can interfere in the process of cell differentiation and even in circulating blood cells (Silva et al., 2012). Biochemical parameters, on the other hand, evaluate the function of organs and changes in values may indicate possible damage caused by the test substance (Silva et al., 2019).

The results of the hematological analyzes shown in Table 1 show that no significant differences were found in the analyzed parameters, indicating that PgEO does not influence cell production and differentiation, as well as circulating blood cells. Similarly, absence of toxic effects was also observed in the biochemical parameters as shown in Table 2.

The results obtained suggest that PgEO does not have a toxic effect on the hematopoietic system or is capable of causing organ damage in order to alter biochemical markers. Manekeng et al. (2019), described that oral administration for 28 days of the methanolic extract of *P. guajava* bark promoted an increase in serum levels of AST, total cholesterol, LDL cholesterol and urea at concentrations of 250, 500 and 1000 mg/Kg.

The results presented in Table 3 demonstrate that there are no significant differences in the density and pH of the urine of the animals treated with different concentrations of PgEO when compared to the animals in the control group. Urinary glucose, bilirubin, ketone bodies, proteins, urobilinogen, nitrite and blood were absent in treated and untreated mice for both sexes. Thus, these findings corroborate the

biochemical parameters of peripheral blood, indicating that treatment with PgEO does not cause kidney damage.

Urine can contain important information about various aspects of the body, where any decompensation, disorder or disease can influence its composition and appearance. Therefore, urine analysis is used to aid in the diagnosis of changes in the body (Piech and Wycislo, 2018). For example, an aqueous extract obtained from the stem of *P. gounellei* was also evaluated for its ability to cause changes in the urine, and only at a concentration of 1000 mg/kg was there the presence of proteins in the samples of both sexes, possibly indicating kidney damage (Oliveira et al., 2019), different from what was observed in the study with PgEO.

3.4 Histopathological evaluation

According to the OECD (2008), when evaluating the toxicity of a substance, it is necessary to analyze the influence of that substance on the organs and possible histological alterations. Therefore, the kidneys, liver and spleen of control and PgEO-treated mice were collected. In the macroscopic analysis, no changes in color or texture were observed in the organs of the treated animals when compared to the animals in the control groups. Additionally, the administration of PgEO was not able to alter the absolute mass of organs in treated mice compared to animals in control groups (Table 4).

Histopathological examination of the organs did not reveal significant changes in the organs of male (Figure 4) and female (Figure 5) mice. Analysis of liver sections showed hexagonal arrangement of hepatocytes in lobules around a central vein. The kidney presented glomerulus and Bowman's capsule and renal tubules without alterations. Spleen sections showed normal lymphoid tissues with appropriate distinction between red and white pulps. The results of the present study suggest that repeated oral administration of PgEO is as safe for male as for female mice.

3.1 Assessment of oxidative stress

The influence of PgEO treatment on the oxidative system is shown in Table 5. The results demonstrate that the administration of PgEO for 28 days did not alter MDA levels in the liver, spleen and kidney of mice of both sexes for all concentrations tested, compared to the control group ($p < 0.05$). A significant increase in SOD activity in the liver, kidney and spleen in the 500 and 1000 mg/Kg PgEO treatments when compared

to the control ($p < 0.05$). In the quantification of CAT activity levels, there was a significant increase in the three organs evaluated for concentrations above 500 mg/kg.

Some substances that have toxic effects on the body promote an imbalance between increased production of oxidizing compounds and decreased antioxidants, leading to the oxidation of biomolecules and causing tissue damage leading to loss of organ function (Pizzino et al., 2017; Krishnaiah et al., 2021). On the other hand, increased production of SOD and CAT are indicative of antioxidant activity promoting dismutation O_2^- to H_2O and O_2 , consequently inhibiting oxidative damage caused by free radicals (Barbosa et al., 2010; Nanda and Madan 2021). These data may suggest that PgEO in high doses may protect the liver, spleen and kidney of males and females against free radicals.

3.3 Evaluation of Adverse Effects on Behavior and Locomotor Activity

The neurotoxicity of substances must be evaluated because these often alter the functionality of the organism, modifying the normal state of cognition, alertness and coordination, and may cause lethargy, coma and even death (Tisserand and Balacs, 1996; Priestley et al., 2003; Rojas-Armas et al., 2019). In order to evaluate the effect of the treatment for 28 days with PgEO on the nervous system, the exploratory and locomotor capacity tests of the animals were investigated on days 0, 14 and 28 and the results are shown in Table 6.

In the open field test, general parameters of central action of a drug are evaluated, since the animal in a new environment tends to explore it, and a decrease in this parameter would indicate a possible sedative effect (Karim et al., 2015; Diniz et al., 2019). The results presented in Table 6 demonstrate that there was no significant difference ($p > 0.05$) in locomotor or exploratory activity, since the number of quadrant crossings and vertical exploration in the groups treated with PgEO and the control group in both genders were similar on the days of treatment evaluated.

Additionally, the animals were submitted to the rotating bar test (rota-rod). This test is often used in the initial stages of selection of bioactive substances and in drug development, as it evaluates the action of these substances on the motor coordination of animals (Bohlen et al., 2009). The results of the rota-rod test (table 6) show that there was no impairment in the motor coordination of the mice treated with the different concentrations of PgEO when compared with the respective control groups in both genders.

The elevated plus maze test, on the other hand, is used to detect substances that have psychoactive or anxiolytic characteristics, and is based on the natural fear of rodents of heights and open spaces, so when subjected to this test, animals tend to avoid open arms (Oliveira Junior et al., 2018). The results indicated in Table 6 show that the behavior of the mice treated with PgEO and the control group did not show agitation or anxiolytic behavior. This finding is due to the fact that in both groups the number of entries and the time spent in the closed arms were greater than in the open arms, resulting in the calculated anxiety indices (table 6) not being close to 1 (indicating behavioral alteration).

Diniz et al. (2019) described that acute treatment with essential oil from *Annona vepretorum* leaves promoted anxiolytic and sedative effect. Oliveira Júnior et al. (2018) demonstrated that the essential oil of *Croton conduplicatus* was able to change the behavior of mice in the elevated plus maze test. Monteiro et al., (2019) demonstrated that treatment with the essential oil of *Hyptis martiusii* was able to decrease exploration time in the open field, however, it did not cause changes in the number of entries to the open arms compared to the control group in the elevated plus maze. This variety in the pharmacological effect can be explained by the great structural diversity of the constituents of essential oils (Passos et al., 2009).

Conclusion

In summary, treatment with PgEO did not promote signs of toxicity or death in mice of both sexes when administered orally in repeated doses for 28 days. Furthermore, treatment with concentrations of 500 and 1000 mg/kg promoted a hypoglycemic effect. In addition to being safe, treatment with PgEO did not cause changes in the animals' exploratory and locomotor capacity. In general, PgEO can be considered well tolerated on repeated dose exposures over 28 days. This work contributes to the knowledge of the toxicity of plants of the genus *Psidium*, which until now are scarce.

References

- Adeniyi, A., Asase, A., Ekpe, P. K., Asitoakor, B. K., Adu-Gyamfi, A., & Awekor, P. Y. (2018). Ethnobotanical study of medicinal plants from Ghana; confirmation of ethnobotanical uses, and review of biological and toxicological studies on medicinal plants used in Apra Hills Sacred Grove. *Journal of herbal medicine*,

14, 76-87.

- Adokoh, C. K., Asante, D. B., Acheampong, D. O., Kotsuchibashi, Y., Armah, F. A., Sirikiyi, I. H., ... & Abdul-Rauf, S. (2019). Chemical profile and in vivo toxicity evaluation of unripe *Citrus aurantifolia* essential oil. *Toxicology reports*, 6, 692-702.
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal behavior*, 21(2), 205-235.
- Babatola, L. J., & Oboh, G. (2021). Extract of varieties of guava (*Psidium guajava* L.) leaf modulate angiotensin-1-converting enzyme gene expression in cyclosporine-induced hypertensive rats. *Phytomedicine Plus*, 1(4), 100045.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*, 23(4), 629-643.
- Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol chem*, 195(1), 133-140.
- Bostan, H. B., Mehri, S., & Hosseinzadeh, H. (2017). Toxicology effects of saffron and its constituents: a review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(2), 110.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bohlen, M., Cameron, A., Metten, P., Crabbe, J. C., & Wahlsten, D. (2009). Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. *Journal of neuroscience methods*, 178(1), 10-14.
- Buchholzer, M. L., Kirch, M., Kirchner, C., & Knoess, W. (2019). Toxicological assessment compilation of selected examples of raw materials for homeopathic medicinal products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 103, 253-273.
- Campelo, L. M. L., Sá, C. G., Feitosa, C. M., Sousa, G. F., & Freitas, R. M. (2013). Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15(4), 708-716.
- Costa, W. K., de Oliveira, J. R. S., de Oliveira, A. M., da Silva Santos, I. B., da Cunha, R. X., de Freitas, A. F. S., ... & Navarro, D. M. D. A. F. (2020). Essential oil from

- Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Industrial Crops and Products*, 144, 112059.
- Costa, W. K., do Nascimento, M. F., Dos Santos, C. R. B., do Amaral Ferraz Navarro, D. M., Napoleão, T. H., dos Santos Correia, M. T., ... & da Silva, M. V. (2022). Oral administration of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice. *Inflammopharmacology*, 30(2), 599-607.
- Delorino, S. B. (2020). Histologic Property of *Psidium guajava* Linn Guava Leaf Extract in Wound. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7(11), 1385-1391.
- Deyno, S., Tola, M. A., Bazira, J., Makonnen, E., & Alele, P. E. (2021). Acute and repeated-dose toxicity of *Echinops kebericho* Mesfin essential oil. *Toxicology Reports*, 8, 131-138.
- Diniz, T. C., de Oliveira Júnior, R. G., Medeiros, M. A. M. B., e Silva, M. G., de Andrade Teles, R. B., dos Passos Menezes, P., ... & da Silva Almeida, J. R. G. (2019). Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 1074-1087.
- Dunham, N. W. (1957). A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Ass*, 46, 208-209.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, 126(1), 131-138.
- Kakuo, S., Fushimi, T., Kawasaki, K., Nakamura, J., & Ota, N. (2018). Effects of *Psidium guajava* Linn. leaf extract in Japanese subjects with knee pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel pilot study. *Aging clinical and experimental research*, 30(11), 1391-1398.
- Karim, N., Irshad, S., Khan, I., Mohammad, A., Anis, I., Shah, M. R., ... & Chebib, M. (2015). GABAA receptor modulation and neuropharmacological activities of viscosine isolated from *Dodonaea viscosa* (Linn). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 136, 64-72.
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. In *Pre-Clinical Models* (pp. 69-74).

- Humana Press, New York, NY.
- Krishnaiah, D., Khiari, M., Klibet, F., & Kechrid, Z. (2021). Oxidative stress toxicity effect of potential metal nanoparticles on human cells. In *Toxicology* (pp. 107-117). Academic Press.
- Kuete, V. (2014). Toxicological survey of African medicinal plants.
- Landrum, L. R. (2017). The genus *Psidium* (Myrtaceae) in the state of Bahia, Brazil. Herbarium, Natural History Collections, School of Life Sciences, Arizona State University.
- Lin, L., Liu, Y. C., Huang, J. L., Liu, X. B., Qing, Z. X., Zeng, J. G., & Liu, Z. Y. (2018). Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): A review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Phytotherapy Research*, 32(1), 19-48.
- Manekeng, H. T., Mbaveng, A. T., Ntyam Mendo, S. A., Agokeng, A. J. D., & Kuete, V. (2019). Evaluation of acute and subacute toxicities of *Psidium guajava* methanolic bark extract: a botanical with in vitro antiproliferative potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Monteiro, Á. B., de Menezes, I. R. A., dos Santos Sales, V., do Nascimento, E. P., de Souza Rodrigues, C. K., Primo, A. J. B., ... & Kerntopf, M. R. (2019). Effects of the *Hyptis martiusii* Benth. leaf essential oil and 1, 8-cineole (eucalyptol) on the central nervous system of mice. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110802.
- Nanda, S., & Madan, K. (2021). The role of Safranal and saffron stigma extracts in oxidative stress, diseases and photoaging: A systematic review. *Heliyon*, 7(2), e06117.
- Negri, G. (2005). Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(2), 121-142.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), (2001) Guideline for Testing of Chemicals. Guideline: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), (2008). Test No. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. OECD Publishing.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.

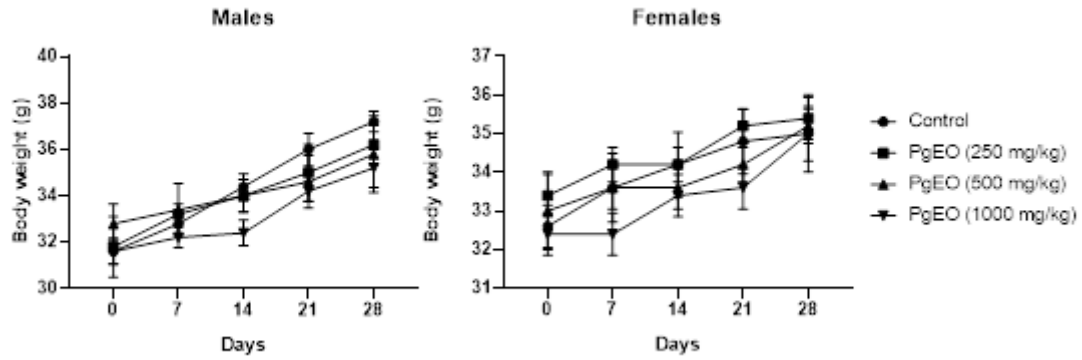
- Oliveira, A. M., Mesquita, M. D. S., da Silva, G. C., de Oliveira Lima, E., de Medeiros, P. L., Paiva, P. M. G., ... & Napoleão, T. H. (2015). Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L.(Moraceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Oliveira, A. M., da Silva, W. A. V., Ferreira, M. R. A., Paiva, P. M. G., de Medeiros, P. L., Soares, L. A. L., ... & Napoleão, T. H. (2019). Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 234, 96-105.
- Oliveira Júnior, R. G., Ferraz, C. A. A., Silva, J. C., de Andrade Teles, R. B., Silva, M. G., Diniz, T. C., ... & da Silva Almeida, J. R. G. (2018). Neuropharmacological effects of essential oil from the leaves of *Croton conduplicatus* Kunth and possible mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology*, 221, 65-76.
- Passos, C. S., Arbo, M. D., Rates, S. M., & Poser, G. L. V. (2009). Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 140-149.
- Piech, T. L., & Wycislo, K. L. (2018). Importance of Urinalysis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 49(2), 233-245.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Priestley, C. M., Williamson, E. M., Wafford, K. A., & Sattelle, D. B. (2003). Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British journal of pharmacology*, 140(8), 1363-1372.
- Reitman, M. L. (2018). Of mice and men—environmental temperature, body temperature, and treatment of obesity. *FEBS letters*, 592(12), 2098-2107.
- Ribeiro, N. E., Pereira, P. S., de Oliveira, T. B., de Arruda Lima, S. M., Silva, T. M. S., Santana, A. L. B. D., ... & da Silva, T. G. (2020). Acute and repeated dose 28-day oral toxicity of *Chrysobalanus icaco* L. leaf aqueous extract. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 113, 104643.
- Rojas-Armas, J., Arroyo-Acevedo, J., Ortiz-Sánchez, M., Palomino-Pacheco, M., Castro-Luna, A., Ramos-Cevallos, N., ... & Herrera-Calderón, O. (2019). Acute

- and repeated 28-day oral dose toxicity studies of *Thymus vulgaris* L. essential oil in rats. *Toxicological research*, 35(3), 225-232.
- Salvemini, D., Wang, Z. Q., Wyatt, P. S., Bourdon, D. M., Marino, M. H., Manning, P. T., & Currie, M. G. (1996). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British journal of pharmacology*, 118(4), 829-838.
- Shetty, P., Chacko, N., Alva, A., Kumar, V., Kandige, P. S., & Gururaj, M. P. (2019). Wound Healing Potential of *Psidium guajava* var. *Pyrifera*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(12), 6067-6070.
- Silva, S. D. N., Abreu, I. C., Silva, G. F. C., Ribeiro, R. M., Lopes, A. D. S., Cartágenes, M. D. S. D. S., ... & Borges, M. O. D. R. (2012). The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(1), 102-108.
- Silva, J. C., Diniz, T. C., Lavor, É. M., Silva, M. G., Lima-Saraiva, S. R., Oliveira-Junior, R. G., ... & Almeida, J. R. (2019). Acute and Subacute Toxicological Studies of *Annona vepretorum* in Experimental Animals. *Planta Medica International Open*, 6(01), e15-e22.
- Silva, A. J. A. (2020). POTENCIALIDADES MEDICINAIS DE *Jatropha gossypifolia* E *Cnidocolus phyllacanthus*. *Cadernos Macambira*, 5(1), 17-18.
- Soldin, O. P., & Mattison, D. R. (2009). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical pharmacokinetics*, 48(3), 143-157.
- Stojanović, N. M., Randjelović, P. J., Mladenović, M. Z., Ilić, I. R., Petrović, V., Stojilković, N., ... & Radulović, N. S. (2019). Toxic essential oils, part VI: Acute oral toxicity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) essential oil in BALB/c mice. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110794.
- Sucher, N. J., & Carles, M. C. (2015). A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 52, 308-318.
- Taghizadeh, M., Ostad, S. N., Asemi, Z., Mahboubi, M., Hejazi, S., Sharafati-Chaleshtori, R., ... & Sharifi, N. (2017). Sub-chronic oral toxicity of *Cuminum cyminum* L.'s essential oil in female Wistar rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88, 138-143.
- Teo, S, Stirling, D, Thomas, S, Hoberman, A, Kiorpes, A, & Khetani, V. (2002). A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology*, 179(3), 183-196.

- Tisserand, R., & Balacs, T. (1996). Essential oil safety. *Int J Aromather*, 7(3), 28-32.
- Tuler, A.C.; Proença, C.E.B.; Costa, I.R. 2020. *Psidium* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10853>>. Acesso em: 18 ago. 2021.
- Unuofin, J. O., Otunola, G. A., & Afolayan, A. J. (2018). Evaluation of acute and subacute toxicity of whole-plant aqueous extract of *Vernonia mespilifolia* Less. in Wistar rats. *Journal of integrative medicine*, 16(5), 335-341.
- Vinholes, J., Lemos, G., Barbieri, R. L., Franzon, R. C., & Vizzotto, M. (2017). In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. *Food bioscience*, 19, 92-100.
- Wisse, E.; Luo, D.; Vermijlen, D.; Kanellopoulou, C.; De Zanger, R.; Braet, F. (1997). On the Function of Pit Cells, the Liver-Specific Natural Killer Cells. *Semin. Liver Dis.* (17), 265–286.
- World Health Organization (WHO) (2011). The world medicines situation: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva, 2011.

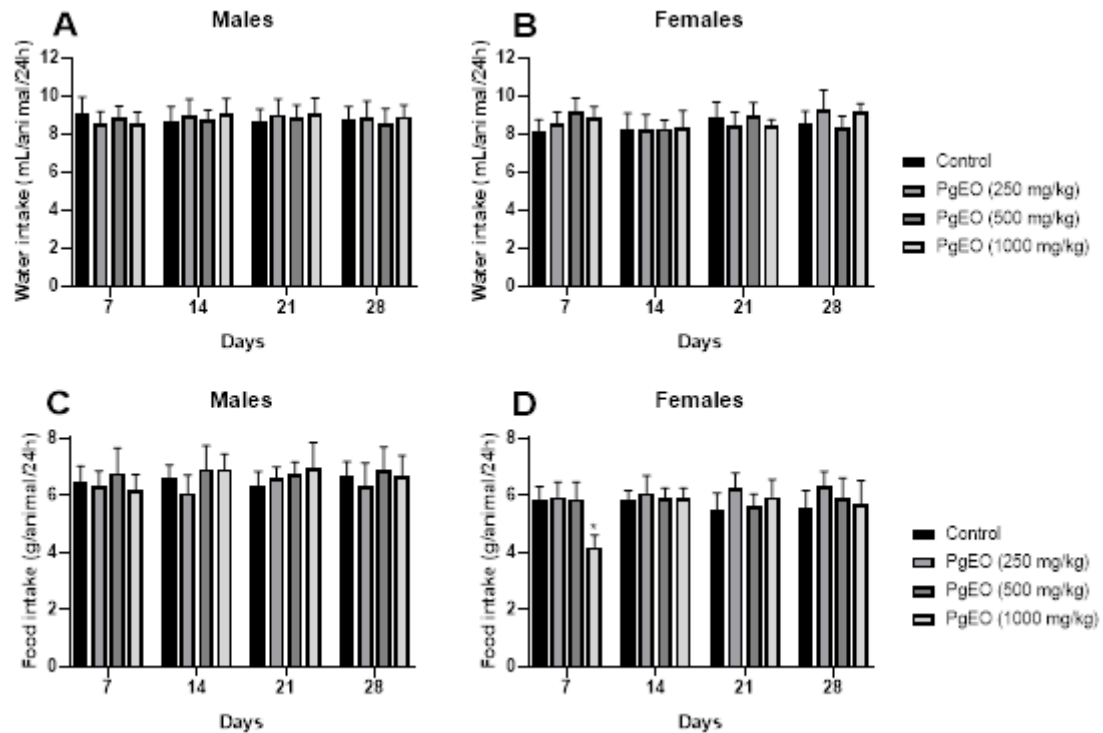
Figures

Figure 1: Effect of the *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) on the body weight of males (A) and females (B).



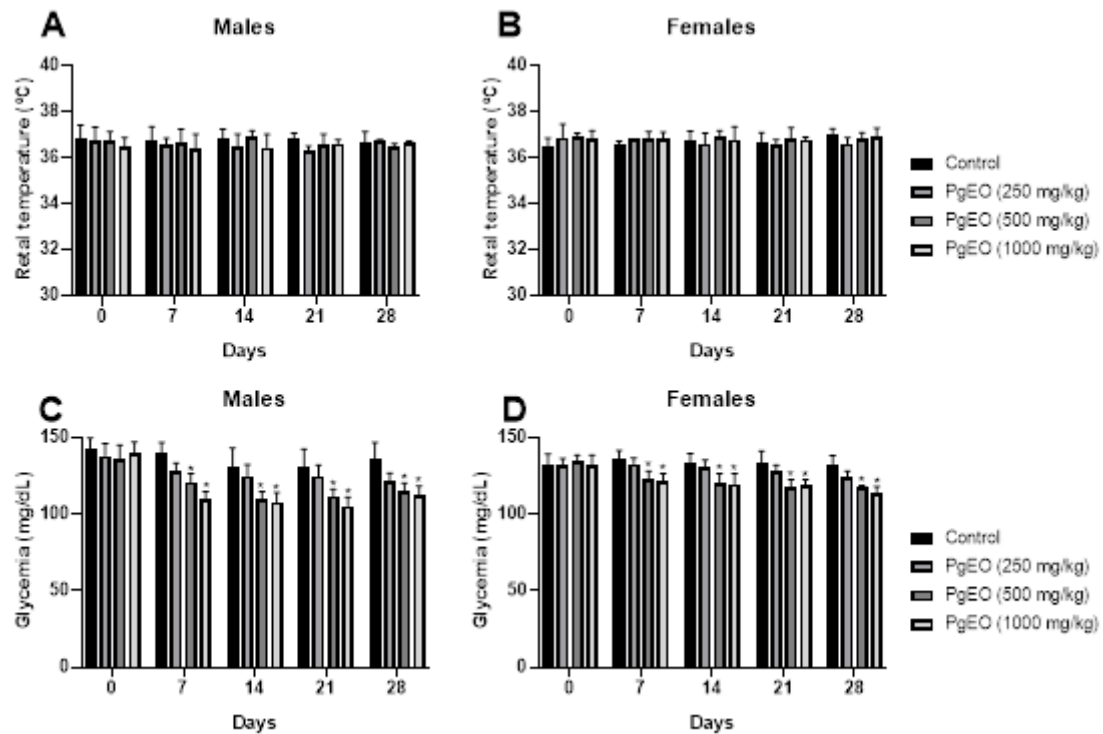
PgEO: *Psidium glaziovianum* Essential Oil. Values represent the mean $\pm$ SEM (n=5/group).

Figure 2: Consumption of water and food by male and female mice treated with *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO).



Daily consumption of water (A and B) and food (C and D) by male and female mice from control groups and daily treated with PgEO (250, 500 and 1000 mg/kg). Values represented as mean $\pm$ SEM (n=5/group). (*) represent significant differences (p < 0.05) with the control group.

Figure 3: Evaluation of glycemia and temperature in male and female mice treated with *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO).



Daily consumption of water (A and B) and food (C and D) by male and female mice from control groups and daily treated with PgEO (250, 500 and 1000 mg/kg). Values represented as mean $\pm$ SEM (n=5/group). (*) represent significant differences (p > 0.05) with the control group.

Figure 4: Histopathological analysis of the liver, spleen and kidney of mice males in the control group and the groups treated with *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentrations of 250, 500 and 1,000 mg/kg.

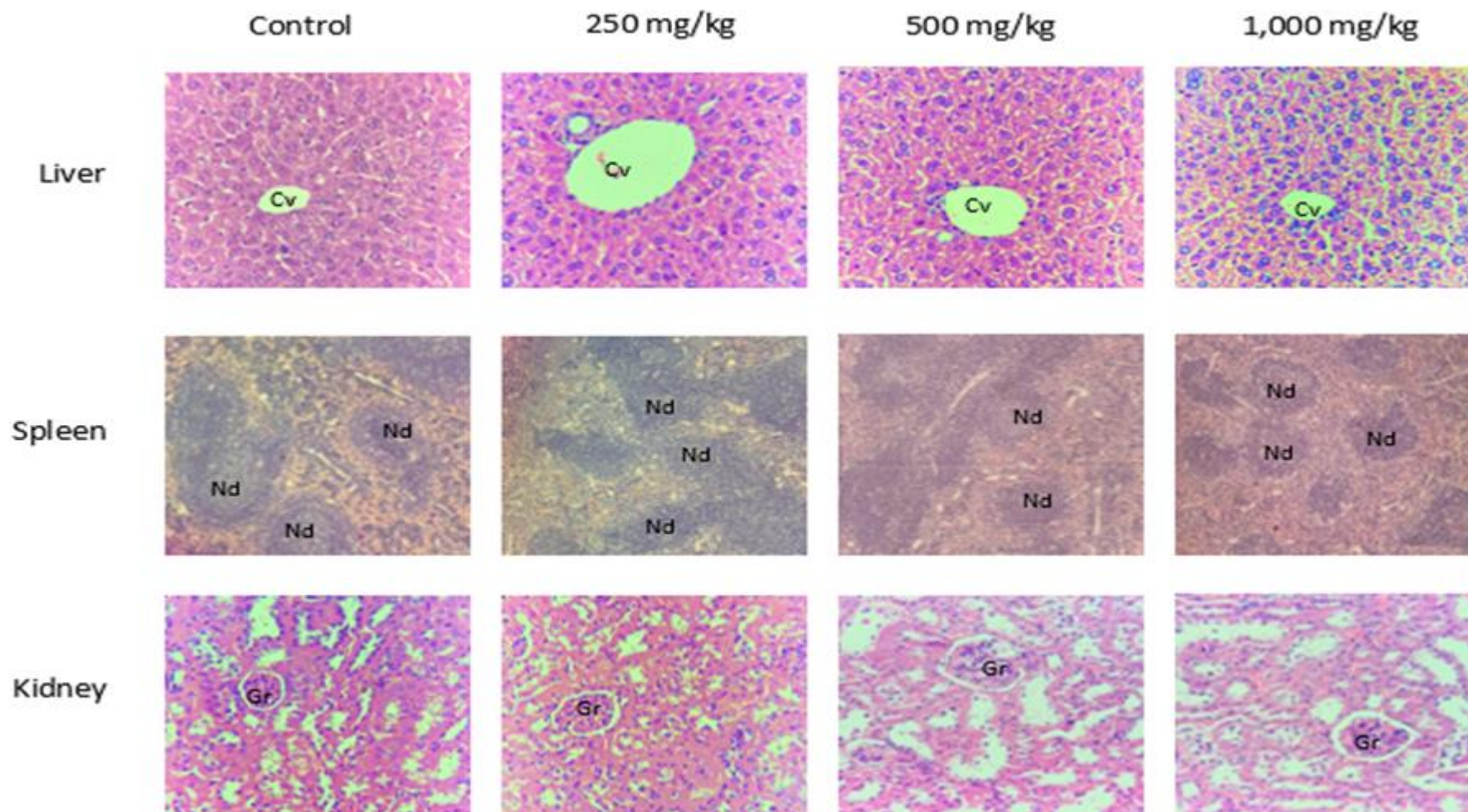


Figure 5: Histopathological analysis of the liver, spleen and kidney of mice females in the control group and the groups treated with *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) at concentrations of 250, 500 and 1,000 mg/kg.

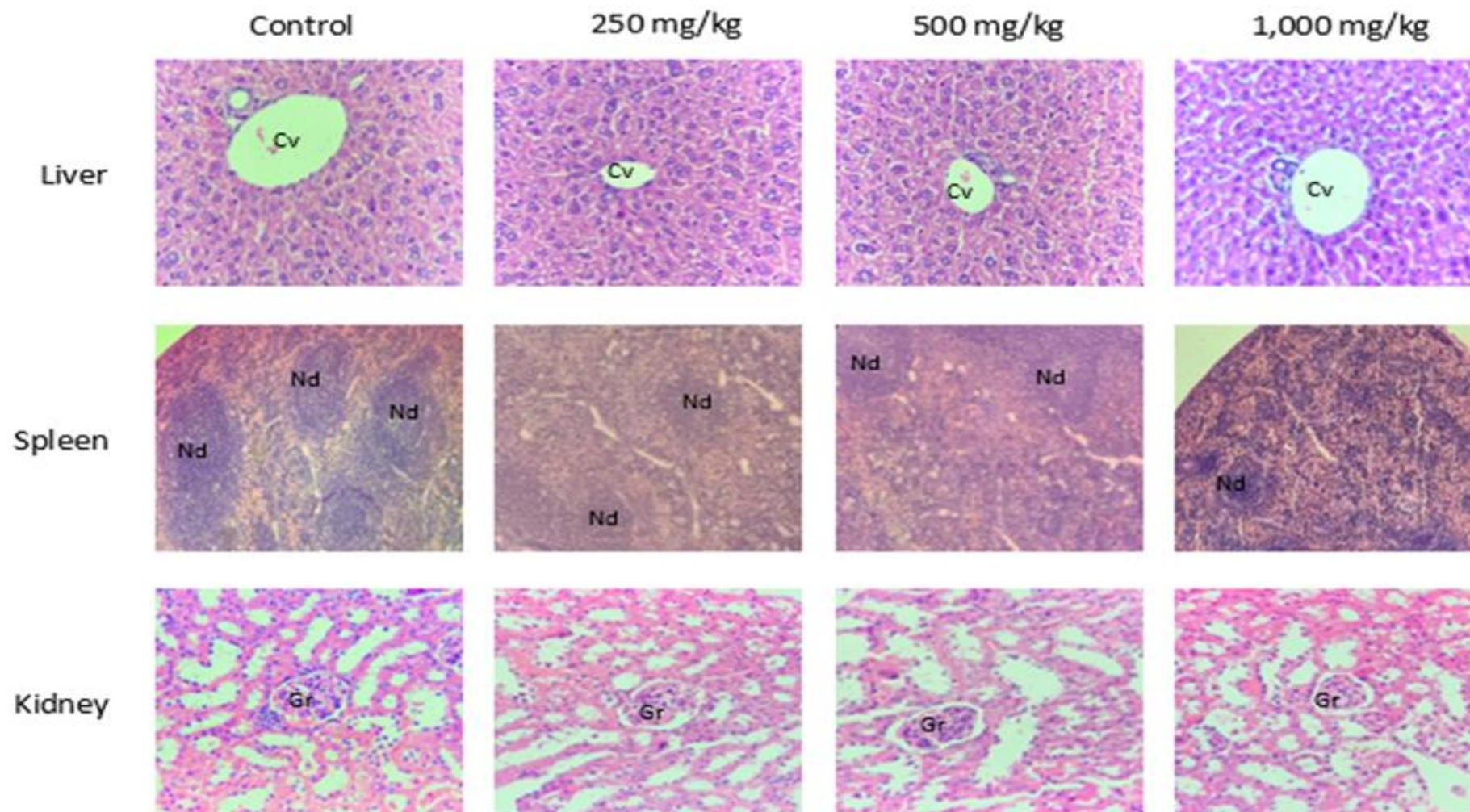


Table 1: Effect of the *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) on hematological parameters of mice male and female.

Parameter	Control		PgEO					
			250 mg/kg		500 mg/kg		1000 mg/kg	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	8.64±0.49	8.61±0.32	8.66±0.32	8.41±0.38	8.31±0.62	8.94±0.73	8.62±0.45	8.57±0.85
HCT (%)	44.16±0.55	44.54±0.35	45.09±0.67	45.17±0.89	44.43±0.67	46.07±0.41	46.52±0.56	45.76±0.52
HB (g/dL)	14.37±0.65	15.42±0.52	16.11±0.52	14.79±0.56	16.33±0.75	15.49±0.34	16.62±0.80	15.33±0.76
MCV (%)	49.12±0.36	48.31±0.48	49.76±0.46	49.12±0.57	51.08±0.65	50.52±0.57	51.65±0.56	49.17±0.77
MCH (%)	16.68±0.47	16.21±0.41	15.73±0.35	17.11±0.43	16.78±0.43	15.43±0.54	17.13±0.62	16.09±0.44
MCHC (%)	36.78±0.38	37.45±0.89	37.23±0.57	37.67±0.77	36.97±0.58	38.03±0.41	37.55±0.78	38.43±0.67
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	8.45±1.33	9.76±1.07	10.12±1.21	9.35±1.79	10.78±0.99	11.07±1.12	10.54±1.13	9.52±0.88
SEG (%)	61.44±0.88	59.83±0.73	59.52±0.45	61.44±1.08	61.01±0.97	59.31±0.81	58.89±1.07	60.76±0.72
LYM (%)	41.86±0.67	40.20±0.67	42.42±0.61	43.23±1.21	39.78±0.51	41.17±0.66	39.75±0.85	40.87±1.13
MON (%)	12.48±0.76	13.50±0.45	11.96±0.74	11.56±0.53	13.12±0.43	11.65±0.75	13.45±0.82	12.13±0.59

RBC: red blood cells; HCT: hematocrit; Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC: white blood cells; SEG: segmented; LYM: lymphocytes; MON: monocytes. Values represent the mean $\pm$ SEM (n = 3/group). Values represent the mean $\pm$ SEM (n=5/group). p <0.05 in comparison with control.

Table 2: Effect of the *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) on biochemical parameters of mice male and female.

Parameter	Control		PgEO					
			250 mg/kg		500 mg/kg		1000 mg/kg	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
ALB (g/dL)	3.33±0.55	3.43±0.26	3.64±0.49	3.70±0.34	3.68±0.41	3.54±0.41	3.53±0.41	3.64±0.56
ALT (U/L)	60.42±0.43	58.13±0.44	57.92±0.49	56.54±0.58	57.50±0.53	59.74±0.32	58.71±0.58	57.79±0.64
AST (U/L)	98.23±0.23	101.10±0.61	104.3±0.55	99.8±0.65	101.5±0.71	100.4±0.53	101.4±0.62	99.8±0.71
ALP (U/L)	97.50±3.78	101.83±2.54	98.06±6.33	99.62±8.52	100.25±7.50	102.19±4.34	101.15±3.27	102±4.72
GGT	12.41±0.73	12.50±0.84	13.54±0.71	13.54±0.71	11.97±0.58	10.98±0.78	12.78±0.64	12.41±0.81
TP (g/dL)	7.59±0.42	7.49±0.51	6.94±0.73	7.21±0.77	7.13±0.77	7.83±0.69	7.64±0.63	6.92±0.55
BUN (mg/dL)	54.58±0.82	53.63±0.76	56.94±1.12	53.78±1.08	55.53±0.73	55.57±0.83	56.14±0.56	55.56±0.53
CRE (mg/dL)	0.36±0.18	0.34±0.15	0.31±0.21	0.33±0.24	0.35±0.14	0.31±0.14	0.33±0.09	0.35±0.08
BIL (mg/dL)	0.16±0.07	0.18±0.04	0.19±0.05	0.17±0.04	0.19±0.05	0.19±0.06	0.18±0.04	0.19±0.04
CT (mg/dL)	106.41±9.45	104.82±10.26	106.54±11.33	104.14±10.34	108.31±9.87	110.73±9.44	108.34±9.91	104.43±8.77
TG (mg/dL)	107.57±5.65	105.71±6.63	106.67±7.28	107.10±9.31	105.32±6.24	102.93±8.45	105.70±11.09	103.15±8.97

ALB: albumin; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; GGT: gamma-glutamyl transferase; TP: total protein; BUN: blood urea nitrogen; CRE: creatinine; BIL: bilirubin; CT: cholesterol total; TG: triglycerides. Values represent the mean ± SEM (n = 5/group). (*) indicates significant difference (p < 0.05) in comparison with control.

Table 3: Effect of the *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) on urinalysis of mice male and female.

Parameter	Control		PgEO					
			250 mg/kg		500 mg/kg		1000 mg/kg	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Density	1.020±0.05	1.015±0.05	1.020±0.05	1.020±0.05	1.020±0.00	1.015±0.00	1.020±0.05	1.015±0.05
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-
Bilirubin	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketones	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	6.7±0.3	6.5±0.3	6.6±0.2	6.6±0.2	6.5±0.3	6.7±0.4	6.7±0.3	6.8±0.3
Protein	-	-	-	-	-	-	-	-
Urobilinogen	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrite	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): absent. (+): present. Values represent the mean ± SEM (n=5/group). p < 0.05 in comparison with control.

Table 4: Effects of oral administration of *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) on organ weight.

Organ	Control		PgEO					
			250 mg/kg		500 mg/kg		1000 mg/kg	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Kidney (g)	0.25±0.06	0.19±0.04	0.26±0.04	0.20±0.05	0.25±0.03	0.19±0.05	0.24±0.04	0.21±0.03
Liver (g)	2.54±0.18	2.14±0.16	2.48±0.28	2.12±0.19	2.43±0.29	2.09±0.22	2.51±0.21	2.15±0.28
Spleen (g)	0.38±0.09	0.25±0.11	0.36±0.11	0.27±0.10	0.33±0.09	0.30±0.09	0.35±0.10	0.32±0.02

Values represent the mean ± SEM (n=5/group). p < 0.05 in comparison with control.

Table 5: Effect of the *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) on Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) levels in organs of mice.

Parameter	Control		PgEO					
			250 mg/kg		500 mg/kg		1000 mg/kg	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Liver								
MDA	6.13±1.14	5.63±0.86	6.56±0.78	5.77±0.54	5.92±0.92	5.81±0.83	5.98±0.76	5.51±0.69
SOD	12.63±0.63	11.94±0.55	12.81± 0.54	11.88±0.71	14.71±0.58*	15.65±0.06*	14.94±0.59*	14.92±0.51*
CAT	0.48±0.11	0.42±0.09	0.45±0.08	0.46±0.09	0.67±0.10*	0.68±0.11*	0.69±0.11*	0.70±0.08*
Spleen								
MDA	1.23±0.22	1.25±0.31	1.17±0.12	1.24±0.21	1.23±0.18	1.25±0.31	1.23±0.18	1.26±0.26
SOD	0.61±0.08	0.60±0.09	0.80±0.10*	0.78±0.08*	0.83±0.08*	0.79±0.07*	0.80±0.05*	0.81±0.08*
CAT	3.61±0.18	3.52±0.13	3.57±0.19	3.48±0.14	3.92±0.16*	3.83±0.15*	3.99±0.13*	3.80±0.11*
Kidney								
MDA	4.44±0.78	4.50±0.73	4.38±0.72	4.32±0.67	4.38±0.66	4.59±0.64	4.46±0.56	4.48±0.69
SOD	0.66±0.17	0.63±0.14	0.69±0.15	0.71±0.13	0.89±0.05*	0.86±0.08*	0.95±0.10*	0.91±0.11*
CAT	0.023±0.004	0.022±0.009	0.021±0.008	0.021±0.009	0.042±0.004*	0.048±0.009*	0.041±0.007*	0.043±0.006*

Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Values represent the mean ± SEM (n = 5/group). (*) indicates significant difference (p < 0.05) in comparison with control.

Table 6: Effects of oral administration of *Psidium glaziovianum* essential oil (PgEO) on behavioral assessment.

Parameter	Control		PgEO					
			250 mg/kg		500 mg/kg		1000 mg/kg	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Crossing								
Day 0	49.67±5.31	41.33±3.91	50.13±5.06	42.45±3.23	44.45±3.91	42.97±1.88	47.77±2.31	42.56±2.73
Day 14	47.35±4.29	42.51±3.78	48.51±3.34	42.12±2.81	46.33±3.39	45.33±4.47	43.20±3.91	44.42±2.27
Day 28	46.89±3.79	44.11±5.24	48.77±4.10	42.99±4.19	43.14±4.61	43.78±4.07	43.45±3.27	44.76±3.78
Rearing								
Day 0	8.34±1.31	8.23±0.56	9.14±1.01	8.17±1.16	8.91±1.53	8.13±0.77	9.14±1.26	8.23±0.56
Day 14	8.35±0.89	9.15±0.75	10.16±1.46	9.97±1.93	10.33±1.24	8.33±0.48	10.01±1.20	8.44±0.76
Day 28	9.17±1.23	8.17±0.74	9.64±1.17	8.54±0.67	10.01±1.01	8.77±0.69	10.25±0.73	8.63±0.69
Rota-rod								
Day 0	179.4±0.89	179.4±0.54	178.6±1.51	178.8±0.83	179.2±0.44	179.6±0.54	178.2±2.16	177.4±1.51
Day 14	179.2±0.83	179.0±1.22	178.8±1.30	178.8±0.83	179.4±0.54	179.8±0.44	179.2±0.83	179.4±0.54
Day 28	179.2±0.54	179.4±0.54	179.0±1.00	179.0±0.70	179.0±0.70	178.6±1.51	179.4±0.54	178.8±0.83
Anxiety index								
Day 0	0.45±0.05	0.54±0.04	0.49±0.06	0.47±0.07	0.50±0.10	0.45±0.04	0.59±0.09	0.48±0.08
Day 14	0.47±0.07	0.50±0.08	0.49±0.07	0.49±0.08	0.54±0.11	0.54±0.07	0.48±0.08	0.54±0.08
Day 28	0.47±0.08	0.51±0.09	0.53±0.06	0.48±0.12	0.52±0.09	0.51±0.07	0.52±0.07	0.57±0.10

Values represent the mean ± SEM (n=5/group). p < 0.05 in comparison with control.

4.3 ARTIGO 3

Oral administration of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice

Wêndeo Kennedy Costa; Matheus Ferreira do Nascimento; Cícero Ramon Bezerra dos Santos; Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias Aguiar; Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro; Thiago Henrique Napoleão; Maria Tereza dos Santos Correia; Fábio André Brayner; Alisson Macário de Oliveira; Márcia Vanusa da Silva

Artigo publicado na Inflammopharmacology, Volume 30, páginas 599–607





Oral administration of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice

Wêndeo Kennedy Costa¹ · Matheus Ferreira do Nascimento¹ · Cícero Ramon Bezerra dos Santos¹ · Júlio César Ribeiro dede Oliveira Farias Aguiar² · Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro² · Thiago Henrique Napoleão¹ · Maria Tereza dos Santos Correia² · Fábio André Brayner^{3,4} · Alisson Macário de Oliveira¹ · Márcia Vanusa da Silva¹

Received: 3 June 2021 / Accepted: 9 February 2022 / Published online: 8 March 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

Abstract

Plants of the genus *Psidium* have been employed in “in natura” consumption and agroindustry, and owing to the diversity of phytochemicals, the development of new pharmaceutical forms has received remarkable research interest. In this study, the essential oil obtained from *Psidium glaziovianum* (PgEO) leaves were evaluated antinociceptive and anti-inflammatory activities were evaluated in mouse models. Initially, PgEO was characterized by gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography with flame ionization detection, and the profile was dominated by sesquiterpene compounds. In the evaluation of acute antinociceptive activity (abdominal contortions induced by acetic acid, formalin, tail immersion, and hot plate tests), PgEO promoted a reduction in nociception in the chemical and thermal models. Additionally, the potential underlying mechanism was investigated using pain pathway blockers, and the results revealed a combined action of opioidergic and muscarinic pathways. The anti-inflammatory potential was confirmed by anti-edematogenic action, reduced cell migration, pro-inflammatory cytokine production, and granuloma formation in chronic processes. This study provides evidence that PgEO can be effective for the treatment of pain and acute and chronic inflammation.

Keywords Myrtaceae · Araçá-doce · Antinociceptive activity · Anti-inflammatory activity · Essential oil

✉ Wêndeo Kennedy Costa
wendeocosta@gmail.com

Matheus Ferreira do Nascimento
matheus.ferreira12@hotmail.com

Cícero Ramon Bezerra dos Santos
ramonsantosbezerra@hotmail.com

Júlio César Ribeiro dede Oliveira Farias Aguiar
julioicrofa@gmail.com

Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro
navarrix@uol.com.br

Thiago Henrique Napoleão
thiago.napoleao@ufpe.br

Maria Tereza dos Santos Correia
mtscorreia@gmail.com

Fábio André Brayner
brayner.santos@gmail.com

Alisson Macário de Oliveira
alissonmacario@hotmail.com

Márcia Vanusa da Silva
marcia.vanusa@ufpe.br

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

² Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

³ Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE 50670-420, Brazil

⁴ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

Introduction

Inflammation is a process defined as a protective response against external agents caused by injury or the action of microorganisms. Such a process is mediated by the activation of immune cells, production of pro-inflammatory cytokines, increased nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (Maleki et al. 2019; Kim et al. 2020). However, deregulation and overproduction of these factors can trigger acute or chronic inflammatory diseases, causing excessive damage to the body (Kotas and Medzhitov 2015). In this context, therapeutic control by steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs is recommended; however, adverse effects are reported, such as gastritis, ulcers, renal failure and drug hepatitis (Drini 2017; Bjarnason et al. 2018).

In the event of an inflammatory process, pain is seen as one of the main collateral signs, represented as an unpleasant emotional clinical manifestation associated with tissue damage (Raja et al. 2020). Clinically, analgesics are highly effective; however, adverse effects on the body are evidenced, such as constipation, nausea, vomiting, respiratory depression and sedation (Baldo and Rose 2020). Thus, prospecting for new effective compounds, with no toxicity and minimal adverse effects for the treatment of pain and inflammation has become the focus of research in recent years (Maleki et al. 2019).

In this scenario, ethnopharmacological studies of medicinal plants have been pointed out as effective alternatives for the treatment of several inflammatory diseases (Tasneem et al. 2019). Such plants have a variety of bioactive compounds that vary according to the extraction method, and thus essential oils have aroused great industrial interest because they present in addition to a source of compounds with biological properties, they can have food, food, etc. (Costa et al. 2017).

The genus *Psidium*, which belongs to the family Myrtaceae, has a high therapeutic potential for pain and inflammation (Santos et al. 1998; Sekhar et al. 2014; Souza et al. 2019). In Brazil, this genus is widely distributed in the north, northeast, and southeast regions, is prevalent in the Amazon, Atlantic Forest, Cerrado, and Caatinga regions, and has been applied for “*in natura*” consumption and in agricultural and pharmaceutical industries (Calvi et al. 2017; Tuler et al. 2019). *Psidium glaziovianum* is a small-to medium-sized tree that reaches up to 5 m in height, with pinnate compound leaves, 4–65 cm leaflets, smooth, dark red to purple oval fruit with sweet acid red pulp, and 5–7 seeds (Landrum 2017).

Considering that there are no pharmacological activity studies of *P. glaziovianum* and based on the anti-inflammatory and antinociceptive potential described in the

literature for the genus *Psidium*, we evaluate the therapeutic potential in pain and inflammation of *P. glaziovianum* leaves essential oil in mice. In addition, the chemical composition of the essential oil was determined for the first time.

Materials and methods

Vegetal material and essential oil extraction

The plant species was collected on 17 Oct 2019, in the municipality of Exu, Pernambuco, Brazil (7° 21 '16, 3 "S 39° 53 '15, 5" O) and identified by Dr. Marcos Eduardo Guerra Sobral and Herbário Dárdano de Andrade Lima from the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA/PE) under number 93,728 and access registration in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen). To obtain the oil, *P. glaziovianum* Kiaersk leaves were sanitized with plenty of distilled water and dried under a temperature of 25 °C. Then, the leaves were partially broken and submitted to the hydro-distillation apparatus (Clevenger) to obtain the essential oil from leaf leaves of *P. glaziovianum* (PgEO).

Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

To determine the chemical composition of PgEO, an aliquot (1 µL) was injected into gas chromatography (GC) equipment associated with Agilent 5975C GC/MSD mass spectrometry (MS), equipped with a fused silica capillary column DB- 5 unpolished Agilent J; W (30 m×0.25 mm film: thickness: 0.25 µm) using helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The initial temperature was set at 50 °C to a temperature of 230 °C (rise of 4 °C/min).

Chemical constituents were determined from retention indices and compared with the data available in the mass spectral library of the GC–MS system (MassFinder 4, scientific consultancy Dr. Hochmuth, Hamburg, Germany) and Mass Spectral Library NIST08 (ChemSW Inc. Fairfield, CA, USA). The process was carried out in triplicate and three independent experiments.

Ethical permission and approval

All the experimental procedures are in accordance with the Brazilian laws for animal experimentation and were submitted to the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal de Pernambuco and received a favorable opinion in accordance with protocol no 122/2019. Male mice (*Mus musculus*) weighing 30–40 g, with an average of 60 days of life, were obtained at the bioterium of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA) and adapted for 2

weeks at the Animal Experimentation Laboratory of the biochemistry department of Federal University from Pernambuco, Brazil, under a 12-h light–dark cycle and a controlled temperature of 24 °C. Before the experimental procedures, the animals were fasted for 6 h with water *ad libitum*.

Antinociceptive activity

For each test, the male mice were selected in a randomized form in six distinct treatment groups ($n = 6$): Group I: saline solution (0.9% *per os*); Group II, III and IV: PgEO (25, 50 or 100 mg/kg/bw/*per os*), respectively; Group V and VI: Morphine (10 mg/kg/*i.p.*) or indomethacin (20 mg/kg/*i.p.*), respectively.

Due to the difference of route of administration, saline and PgEO were given 1 h before the start of the tests, while the standard drugs, morphine and indomethacin were applied 30 min before the experiences.

Acetic acid-induced abdominal writhing test

Abdominal contortion test was based according to methods described by Oliveira et al. (2018). After the treatments, mice received an acetic acid solution (0.85% v/v) intraperitoneally (0.1 mL/10 g b.w) and immediately placed in a polyethylene box to record the number of contortions in the corresponding interval from 5 to 15 min after injection.

Formalin test

For evaluation in the formalin test, the mice received 20 μ L of formalin (2.5%, v/v) in the subplantar region of the right hind paw. The time spent by the animal licking its paw was recorded during the first 5 min (first phase), and in the corresponding interval of 15–30 min following (second phase) after the formalin injection. The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of the licking-time.

Tail immersion

The animals (36 male mice) used in the study were pre-selected 24 h before the experiments by immersing their tails in warm water (55 ± 1 °C), those who kept their tails immersed for more than 5 s were excluded, and the animals selected were separated into groups ($n = 6$). The selected animals received treatment and had their tails immersed in warm water at times 0, 30, 60, 90 and 120 min after treatment and the latency time for a discomfort reaction was recorded, not exceeding 20 s (Khatun et al. 2015).

Hot plate

Twenty-four hours before the experiments, the animals were pre-selected, using a hot plate device (Insight, Brazil) maintained at 55 ± 0.5 °C, those that did not show a discomfort reaction in less than 5 s were excluded and the selected animals were divided into groups ($n = 6$). On the day of the experiment, the animals were treated and subjected to the hot plate test, the latency time for a discomfort reaction (paw or jump) was recorded, not exceeding 20 s (Khatun et al. 2015).

Investigation of possible mechanisms of antinociceptive activity

To assess the antinociceptive mechanism, the animals were pre-treated intraperitoneally with naloxone 2 mg/kg (non-selective opioid receptor antagonist), atropine 1 mg/kg (muscarinic receptor antagonist), glibenclamide 5 mg/kg (channel blocker K^+), prazosin 1 mg/kg (α -1 adrenergic antagonist), or 1 mg/kg yohimbine (α -2 adrenergic antagonist). Subsequently, the animals were treated with PgEO (100 mg/kg v.o.), saline solution (0.9% v.o.) or morphine (10 mg/kg *i.p.*) and were submitted to the formalin test, as described in item 2.5.2.

Anti-inflammatory activity

To evaluate the effect of the treatment with PgEO in inflammation, the paw edema, peritonitis and granuloma models were investigated. For this, in each test, male mice were divided into circling groups ($n = 5$): Group I: Saline Solution (0.9% *per os*); Group II, III and IV: PgEO (25, 50 or 100 mg/kg/bw/*per os*), respectively; Group V: Indomethacin (20 mg/kg/*i.p.*). Saline and PgEO were given 60 min before the start of the tests, and indomethacin was applied 30 min before the experiences.

Carrageenan-induced paw edema

The animals had the volume of their hind legs measured by plethysmometry. Subsequently, the animals were treated and paw edema was induced using 2% carrageenan (15 μ L) which was injected into the subplantar region of the right paw. The difference between the initial volume of the legs and the volume at times 1, 2, 3 and 4 h was determined and the change was calculated: Percentage change = [(Final volume of the paw–Initial volume of the paw)/(Initial volume of the paw)] $\times$ 100 (Winter et al. 1962).

Peritonitis

Initially the animals received their respective treatments and then a 1% carrageenan solution (100 µL/10 g animal) was applied intraperitoneally. After 4 h of application of the phlogistic agent, the animals were sacrificed and 2 mL of heparinized PBS was injected into the peritoneal cavity, and immediately afterwards, the exudate was removed. The leukocyte count of the peritoneal lavage was performed using a hematological analyzer and expressed as a percentage in relation to the control (Lapa et al. 2008). Additionally, the quantification of cytokine levels in the peritoneal fluid (TNF- α and IL-1 β) was performed (Oliveira et al. 2016).

Granuloma assay

The animals used in the study had four cotton pellets implanted in the dorsal region (10 mg/each) and were treated for 10 days with saline or different concentrations of PgEO. On the 11th day, the animals were euthanized and the cotton pellets were removed and dried in an oven (37 °C/24 h) and then weighed again. Subsequently, the cotton granules were homogenized and protein quantification was performed using the biuret method in a spectrophotometer (550 nm) and a standard solution of 40 mg/mL of albumin was used as a positive control (Swingle and Shideman 1972).

Statistical analysis

The data obtained were analyzed using GraphPad Prism® version 8.0 and expressed as mean values with standard deviation ($\pm$ SD). Statistically significant differences were calculated using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni or Dunnett's test (when necessary). Values were considered significantly different at $p < 0.001$ for antinociceptive and anti-inflammatory tests.

Results and discussion

Chemical characterization

The chemical characterization of PgEO was performed using GC–MS. It was identified and quantified 48 compounds, accounting for 98.22% of the total oil components. Among these, 1,8-cineole (24.29%), α -pinene (19.73%), and β -pinene (17.31%) were the most abundant compounds, as shown in Table 1.

To the best of our knowledge, this is the first report on the chemical composition of the essential oil extracted from *P. glaziovianum* leaves, and the composition was dominated by monoterpenes. The essential oil of the leaves of *Psidium* spp., such as *P. guajava* (Souza et al. 2017), *P. guineense*

(Nascimento et al. 2018), *P. brownianum* (Souza et al. 2019), and *P. myrtilloides* (Macêdo et al. 2020), predominantly contain monoterpene compounds.

Antinociceptive activity

Acetic acid-induced abdominal contortion test

Treatment with PgEO at different concentrations proved to be effective in reducing the number of acetic acid-induced abdominal contortions (Fig. 1). The groups treated with PgEO at concentrations of 100, 50, and 25 mg/kg demonstrated a reduction ($p < 0.001$) of 96.47, 75.89, and 61.17%, respectively. The positive control groups treated with morphine and indomethacin showed reductions of 98.83 and 85.88%, respectively, compared with the negative control group ($p < 0.001$).

Similar results were observed in a study using the essential oil from the leaves of *P. brownianum* at a concentration of 200 mg/kg, which was effective in reducing contortions by 41.79% (Souza et al. 2019). In a study by Santos and Rao (2000) using 1,8-cineole, a major compound in PgEO, the compound at a concentration of 200 mg/kg could reduce abdominal contortions by 53% compared with the control group.

The results obtained in the abdominal contortion test induced by acetic acid were satisfactory but had little specificity (Oliveira et al. 2018). Therefore, to focus on the potential antinociceptive action, PgEO was subjected to formalin, tail immersion, and hot plate tests.

Formalin test

In the first phase, oral treatment with PgEO at concentrations of 100, 50, and 25 mg/kg significantly reduced the licking time of the formalin-injected paw, compared with the control, by 79.03, 68.53, and 41.95%, respectively (Fig. 2). Morphine significantly decreased the licking time by 86.51%, whereas indomethacin did not present a significant difference in the licking time compared with that in the control. In the second phase of the test, treatment with PgEO at concentrations of 100, 50, and 25 mg/kg reduced the paw licking time by 83.45, 70.59, and 46.78%, respectively. The positive controls indomethacin (20 mg/kg) and morphine (10 mg/kg) significantly reduced the licking time by 91.99 and 86.30%, respectively, compared with the control ($p < 0.001$).

Similar results were observed in a study on the essential oil from *P. brownianum*, which showed a capacity to reduce licking in both phases of the formalin test, with a reduction of 49.02% in the first phase and 68.04% in the second phase, at a concentration of 100 mg/kg (Souza et al. 2019). The essential oil of *P. pohliianum* showed

Table 1 Chemical composition of the essential oil obtained from the leaves of *P. glaziovianum* (PgEO)

Compounds	RI ^a	RI ^b	%	Compounds	RI ^a	RI ^b	%
α -thujene	924	926	0.84	α -copaene	1374	1376	0.46
α -pinene	932	932	19.73	β -bourbonene	1387	1385	0.4
Camphene	946	945	0.23	β -elemene	1389	1392	0.24
Verbenene	961	952	0.11	(E)-caryophyllene	1417	1420	2.83
β -pinene	974	974	17.31	copaene < β ->	1430	1433	1.56
Myrcene	988	991	1.24	cis-cadina-1(6),4-diene	1461	1458	1.25
α -phellandrene	1002	1003	0.17	dauca-5,8-diene	1471	1470	1.51
α -terpinene	1014	1015	0.53	germacrene D	1480	1482	1.16
1,8-cineole	1026	1030	24.29	Bicyclogermacrene	1500	1497	1.78
(Z)- β -ocimene	1032	1038	0.08	γ -cadinene	1513	1515	0.35
(E)- β -ocimene	1044	1048	0.17	δ -cadinene	1522	1525	2.09
γ -terpinene	1054	1058	0.74	trans-cadina-1,4-diene	1533	1533	0.09
terpinolene	1086	1087	0.4	α -cadinene	1537	1539	0.12
Linalool	1095	1100	0.46	α -calacorene	1544	1544	0.12
endo-fenchol	1114	1112	0.05	Elemol	1548	1550	2.55
α -campholenal	1123	1225	0.07	Spathulenol	1577	1579	0.83
trans-pinocarveol	1135	1236	0.32	caryophyllene oxide	1582	1585	0.79
pinocarvone	1160	1162	0.12	Viridiflorol	1592	1593	0.24
terpinen-4-ol	1174	1176	0.65	Guaiol	1600	1599	0.23
α -terpineol	1186	1190	2.04	Ledol	1602	1605	0.25
Myrtenal	1195	1195	0.34	10-epi- γ -eudesmol	1622	1621	0.26
Verbenone	1204	1209	0.05	γ -eudesmol	1630	1633	2.9
myrtenyl acetate	1324	1326	0.05	epi- α -muurolol	1640	1643	0.78
α -cubebene	1348	1350	0.08	β -eudesmol	1649	1652	5.31
				Total	98,22		

RI^a=Retention rate determined; RI^b=Retention index specialized literature; %=area of compost relative to PgEO

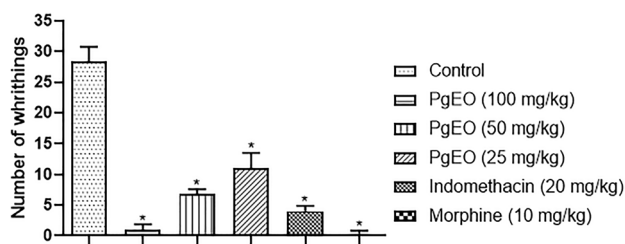


Fig. 1 Antinociceptive effect of *P. glaziovianum* essential oil (PgEO) on abdominal contortions induced by acetic acid. *P. glaziovianum* essential oil. Values represent the mean ± SEM. * $p < 0.001$ compared with control, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test

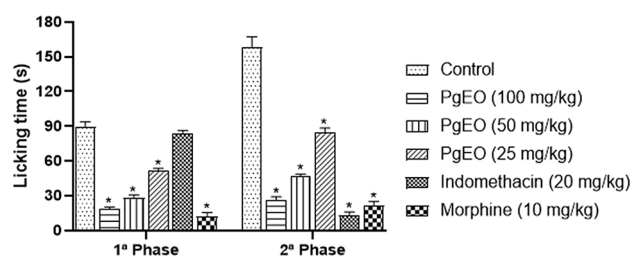


Fig. 2 Antinociceptive effect of *P. glaziovianum* essential oil (PgEO) on both phases of the formalin assay. Values represent the mean ± SEM. * $p < 0.001$ compared with control, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test

reductions of 84% and 100% in the first and second phases, respectively (Santos et al. 1996).

These results indicate that PgEO has a strong peripheral and central mechanism of action in pain. Lenardão et al. (2016) demonstrated that drugs with mainly central action mechanisms, such as opioids and narcotics, inhibit both phases of formalin-induced pain. To confirm the

hypothesis that PgEO functions via these mechanisms, immersion tests of the tail and hot plate were performed.

Tail immersion test

The tail immersion test is used to assess the action of drugs on the central nervous system and is highly sensitive to

opiate drugs (Khatun et al. 2015; Oliveira et al. 2018). The latency time of animals treated with PgEO or morphine significantly increased ($p < 0.001$) compared with that of the control group after 30 min of treatment (Fig. 3). At 60 min, the groups treated with PgEO at concentrations of 100, 50, and 25 mg/kg showed maximum efficiency in the latency time of 96.65, 86.65, and 69.11%, respectively. The group treated with the standard drug (morphine) showed efficiencies of 96.65, 97.5, 93.3, and 94.15% at 30, 60, 90, and 120 min after treatment, respectively. On the basis of these findings, it can be concluded that PgEO has antinociceptive activity with a central action mechanism, similar to morphine.

Hot plate test

Treatment with PgEO at concentrations of 100, 50, and 25 mg/kg increased the time spent in the plate by 90, 76.65, and 58.30%, respectively, compared with the control at 60 min after treatment. The morphine-treated group showed an increase in plate latency time by 95.80% in the first 30 min (Fig. 4). PgEO prolonged the latency time at all concentrations tested, indicating a possible action on the supraspinal mechanisms (Le Bars et al. 2001).

Evaluation of mechanisms of antinociceptive activity

The results presented in Fig. 5 demonstrate that animals pretreated with glibenclamide (K⁺ channel blocker), prazosin (α -1 adrenergic antagonist), or yohimbine (α -2 adrenergic antagonist) and subsequently treated with 100 mg/kg PgEO showed no significant difference ($p > 0.001$) from the group treated with PgEO 100 mg/kg alone. However, when the animals were previously treated with naloxone (an opioid antagonist), there was a partial reversal of the antinociceptive effect of PgEO, reducing the activity in the first phase to 20.04% and in the second phase to 34.87%. This suggested that the antinociceptive action involves the opioid system.

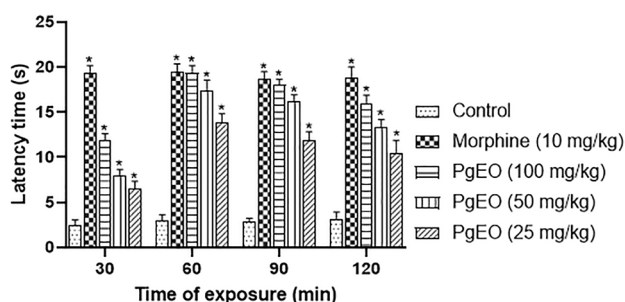


Fig. 3 Antinociceptive effect of *P. glaziovianum* essential oil (PgEO) in the tail-immersion assay. Values represent the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ compared with control, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test

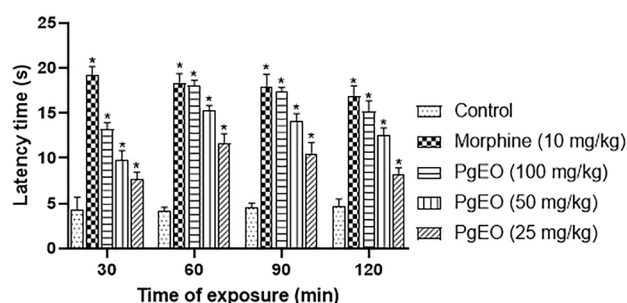


Fig. 4 Antinociceptive effect of *P. glaziovianum* essential oil (PgEO) in the hot-plate test. Values represent the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ compared with control, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test

Additionally, pretreatment with atropine, an antagonist of muscarinic receptors, reversed PgEO antinociceptive activity, with no significant difference from the control group ($p < 0.001$), suggesting that PgEO can also act as a probable agonist of muscarinic receptors.

Liapi et al. (2007) reported that 1,8-cineole isolated from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves did not show a reversal in the antinociceptive activity of naloxone. In contrast, β -pinene isolated from *E. camaldulensis* reversed the antinociceptive activity when the animals were pretreated with naloxone, demonstrating that this compound acts via the opioid route.

Anti-inflammatory activity

Carrageenan-induced paw oedema

The reduction in abdominal contortions induced by acetic acid and the licking time in the second stage of the formalin test after treatment with PgEO indicated an anti-inflammatory effect (Guihon et al. 2011). The results demonstrated that compared with the control group, the groups treated with PgEO showed a significant reduction ($p < 0.001$) in the volume of paw edema in the first hour, with 89.23, 83.53, and 59.22% inhibition at PgEO concentrations of 100, 50, and 25 mg/kg, respectively. The group treated with indomethacin showed a reduction in edema volume of 88.44%. The activity of PgEO and indomethacin in the inhibition of edema remained constant during the 4-h test (Fig. 6).

Psidium spp. have been proven to be efficient in inhibiting carrageenan-induced paw edema; for example, the essential oil obtained from *P. guineense* leaves when tested at concentrations of 30, 100, and 300 mg/kg showed a reduction of 48.48, 51.03, and 59.46%, respectively (Nascimento et al. 2018). Furthermore, 1,8-Cineole showed an anti-edematogenic effect, and at a dose of 400 mg/kg, it reduced edema by 46% (Santos and Rao 2000). Thus, it is suggested suggest that the anti-edematogenic activity of PgEO can be

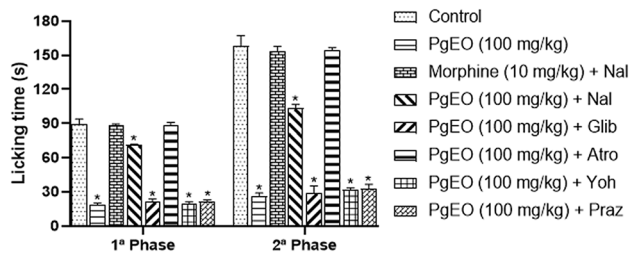


Fig. 5 Investigation of mechanisms of antinociceptive activity of the *P. glaziovianum* essential oil (PgEO) in the formalin test. *Nal*, Naloxone (2 mg/kg); *Glib*, Glibenclamide (5 mg/kg); *Atro*, Atropine (1 mg/kg); *Yoh*, Yohimbine (1 mg/kg); *Praz*, Prazosin (1 mg/kg). Values represent the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ compared with control, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test

attributed to the presence of 1,8-cineole, which significantly inhibits the production of cytokines (Martins et al. 2017).

Peritonitis

In the carrageenan-induced peritonitis model, animals treated with PgEO at concentrations of 100, 50, and 25 mg/kg showed a significant decrease in the migration of the total number of leukocytes (83.95, 71.60, and 61.72%, respectively) and neutrophils (77.35, 67.92, and 58.49%, respectively).

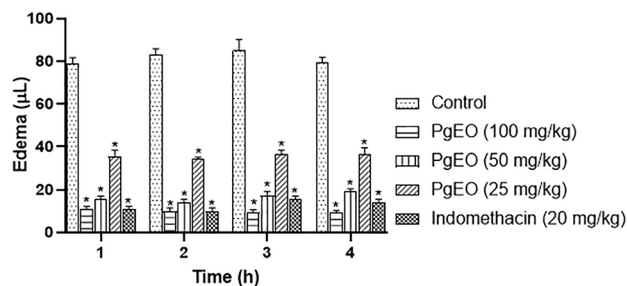


Fig. 6 Anti-inflammatory effect of different concentrations of *P. glaziovianum* essential oil (PgEO) on paw edema induced by carrageenan. Values represent the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ compared with control, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test

respectively), whereas the indomethacin group showed a reduction in leukocyte migration by 79.01% and neutrophils by 71.69% (Table 2). The essential oil from *P. guajava* leaves at a concentration of 100 mg/kg reduced eosinophil migration by 76% (Siani et al. 2013).

As shown in Fig. 7, PgEO at all concentrations tested significantly decreased ($p < 0.001$) the production of TNF- α and IL-1 β in comparison with the control. In a study by Ehrnhöfer-Ressler et al. (2013), 1,8-cineole at a concentration of 1.5 μ g/mL was applied to monocytes stimulated with LPS and showed a significant reduction of 99 and 84% in the TNF- α and IL-1 β levels, respectively.

Granuloma assay

In the granuloma assay, which mimics a chronic inflammation profile, PgEO at concentrations of 100, 50, and 25 mg/kg caused a significant reduction ($p < 0.001$) in the mass of granulomatous tissue by 75.13, 50.25, and 27.50%, whereas indomethacin reduced the pellet mass by 54.41%, compared with the control. The amount of proteins present in the granuloma was reduced at all concentrations of PgEO, with 100 mg/kg being the most effective, showing a reduction of 48.15%. The standard medication, indomethacin, decreased the amount of proteins present in the granuloma by 38.28% (Table 3).

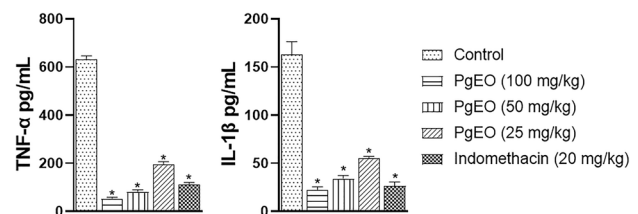


Fig. 7 Anti-inflammatory effect of *P. glaziovianum* essential oil (PgEO) on the levels of TNF- α and IL-1 β in the peritoneal fluid after treatment with carrageenan solution. Values represent the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ compared with control, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test

Table 2 Effect of vehicle (saline), PgEO (25, 50 and 100 mg/kg) and indomethacin (20 mg/kg) administered orally on leukocyte migration and neutrophil in peritoneal fluid of female mice in carrageenan-induced peritonitis

Treatments	Dose (mg/kg)	Leukocytes (10^5 /mL)	Inhibition (%)	Neutrophils (10^5 /mL)	Inhibition (%)
Vehicle	—	8.1 $\pm$ 0.9	—	5.3 $\pm$ 0.5	—
Indomethacin	20	1.7 $\pm$ 0.6*	79.01	1.5 $\pm$ 0.3*	71.69
PgEO	100	1.3 $\pm$ 0.9*	83.95	1.2 $\pm$ 0.4*	77.35
	50	2.3 $\pm$ 0.6*	71.60	1.7 $\pm$ 0.4*	67.92
	25	3.1 $\pm$ 0.7*	61.72	2.2 $\pm$ 0.3*	58.49

Values represent the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$ compared with Control, one-way ANOVA followed by Dunnett's Test

Table 3 Effects of oral treatment with PgEO in mice subjected to granulomatous lesion induced by the implantation of cotton pellets

Treatments	Dose (mg/kg)	Mass of pellets (g)	Protein
Vehicle	–	0.193 ± 0.013	0.081 ± 0.01
Indomethacin	20	0.088 ± 0.010*	0.050 ± 0.03*
PgEO	100	0.048 ± 0.006*	0.042 ± 0.02*
	50	0.096 ± 0.007*	0.054 ± 0.01*
	25	0.140 ± 0.008*	0.066 ± 0.01*

Values represent the mean ± SEM. * $p < 0.001$ compared with Control, one-way ANOVA followed by Dunnett's Test

Santos and Rao (2000) reported that 1,8-cineol at a dose of 400 mg/kg reduced up to 37% of the granuloma formation induced by cotton pellets after 7 days of treatment. They also reported that both the wet weight and dry weight of the granulation tissue around the pellets were significantly lower in the group treated with 1,8-cineol than in the group treated with indomethacin.

Based on these results, the hypothesis hypothesized that the anti-inflammatory effect of PgEO can be attributed to the composition of 1,8-cineole and α -pinene in improving the inflammatory condition in the tests (Türkez and Aydın 2016; Martins et al. 2017).

Conclusions

The essential oil extracted from *P. glaziovianum* leaves predominantly contained monoterpenes, with 1,8-cineole, α -pinene, and β -pinene being the most abundant compounds. PgEO showed antinociceptive action with peripheral and central action mechanisms, possibly acting through the opioidergic and muscarinic pathways. Additionally, PgEO was effective in combating acute and chronic inflammation. Overall, PgEO proved to be effective for the treatment of pain and inflammation.

Acknowledgements The authors express their gratitude to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance Code 001) and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants (DMAFN, THN, MTSC). WKC and MFN would like to thank CNPq for graduate scholarship. AMO would like to thank FACEPE (BFP-0122-4.03/19) for the post-doctoral scholarship. We thank the Paus dóia community for their welcome in collecting botanical material.

Funding Funding was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance Code 001) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Data availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Baldo BA, Rose MA (2020) The anaesthetist, opioid analgesic drugs, and serotonin toxicity: a mechanistic and clinical review. *Br J Anaesth* 124(1):44–62
- Bjarnason I, Scarpignato C, Holmgren E, Olszewski M, Rainsford KD, Lanas A (2018) Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology* 154(3):500–514
- Calvi GP, Aud FF, Ferraz IDK, Pritchard HW, Kranner I (2017) Analyses of several seed viability markers in individual recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh with totipotent germination. *Plant Biol* 19(1):6–13
- Costa MDCMFD, Silva AGD, Silva APSAD, Lima VLDM, Bezerra-Silva PC, Rocha SKLD, Paiva PMG (2017) Essential oils from leaves of medicinal plants of Brazilian flora: chemical composition and activity against *Candida* species. *Medicines* 4(2):27
- Drini M (2017) Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aust Prescr* 40(3):91
- Ehrnhöfer-Ressler MM, Fricke K, Pignitter M, Walker JM, Walker J, Rychlik M, Somoza V (2013) Identification of 1, 8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *J Agric Food Chem* 61(14):3451–3459
- Guilhon CC, Raymundo LJ, Alviano DS, Blank AF, Arrigoni-Blank MF, Matheus ME, Fernandes PD (2011) Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. *J Ethnopharmacol* 135(2):406–413
- Khatun A, Imam MZ, Rana MS (2015) Antinociceptive effect of methanol extract of leaves of *Persicaria hydropiper* in mice. *BMC Complement Altern Med* 15(1):63
- Kim T, Song B, Cho KS, Lee IS (2020) Therapeutic potential of volatile terpenes and terpenoids from forests for inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 21(6):2187
- Kotas ME, Medzhitov R (2015) Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell* 160(5):816–827
- Landrum LR (2017) The genus *Psidium* (Myrtaceae) in the state of Bahia. Herbarium, Natural History Collections, School of Life Sciences, Arizona State University, Brazil
- Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman TR, Castro MAS, Lima TCM (2008) Plantas medicinais: métodos de avaliação da atividade farmacológica. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 144
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53(4):597–652
- Lenardão EJ, Savegnago L, Jacob RG, Victoria FN, Martinez DM (2016) Antinociceptive effect of essential oils and their constituents: an update review. *J Braz Chem Soc* 27(3):435–474
- Liapi C, Anifantis G, Chinou I, Kourounakis AP, Theodosopoulos S, Galanopoulou P (2007) Antinociceptive properties of 1, 8-cineole and β -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Med* 73(12):1247–1254
- Macêdo DG, de Almeida Souza MM, Moraes-Braga MFB, Coutinho HDM, dos Santos ATL, Machado AJT, de Menezes IRA (2020)

- Seasonality influence on the chemical composition and antifungal activity of *Psidium myrtilloides* O Berg. S Afr J Bot 128:9–17
- Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B (2019) Anti-inflammatory effects of flavonoids. Food Chem 299:125124
- Martins AOBPB, Rodrigues LB, Cesário FRAS, de Oliveira MRC, Tintino CDM, e Castro FF, Wanderley AG (2017) Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1, 8-cineole (eucalyptol). Biomed Pharmacother 96:384–395
- Nascimento KF, Moreira FMF, Santos JA, Kassuya CAL, Croda JHR, Cardoso CAL, Formagio ASN (2018) Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. J Ethnopharmacol 210:351–358
- Oliveira AM, doNascimento MF, Ferreira MRA, deMoura DF, dos-SantosSouza TG, daSilva GC, Napoleão TH (2016) Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. J Ethnopharmacol 194:162–168
- Oliveira AM, de Luna Freire MO, da Silva WAV, Ferreira MRA, Paiva PMG, Soares LAL, Napoleão TH (2018) Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. Regul Toxicol Pharmacol 95:289–297
- Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Vader K (2020) The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. Pain 161(9):1976–1982
- Santos FA, Rao VSN (2000) Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytother Res 14(4):240–244
- Santos FA, Rao VSN, Silveira ER (1996) Naloxone-resistant antinociceptive activity in the essential oil of *Psidium pohlianum* Berg. Phytomedicine 3(2):197–201
- Santos FA, Rao VSN, Silveira ER (1998) Investigations on the antinociceptive effect of *Psidium guajava* leaf essential oil and its major constituents. Phytother Res 12(1):24–27
- Sekhar NC, Jayasree T, Ubedulla S, Dixit R, M VS (2014) Evaluation of antinociceptive activity of aqueous extract of bark of *Psidium guajava* in albino rats and albino mice. J Clin Diagn Res 8(9):01
- Siani AC, Souza MC, Henriques MG, Ramos MF (2013) Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. Pharm Biol 51(7):881–887
- Souza TDS, da Silva Ferreira MF, Menini L, de Lima Souza JRC, Pereira LA, Cecon PR, Ferreira A (2017) Essential oil of *Psidium guajava*: influence of genotypes and environment. Sci Hortic 216:38–44
- Souza SR, Petícia DNE, Alencar DMI, Sales VDS, Brito PA, Mendes DLG, Vieira NB (2019) Antinociceptive activity of the *Psidium brownianum* Mart ex DC leaf essential oil in mice. Food Chem Toxicol 135:111053
- Swingle KF, Shideman FE (1972) Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain antiinflammatory agents. J Pharmacol Exp Ther 183(1):226–234
- Tasneem S, Liu B, Li B, Choudhary MI, Wang W (2019) Molecular pharmacology of inflammation: medicinal plants as anti-inflammatory agents. Pharmacol Res 139:126–140
- Tuler AC, Carrijo TT, Peixoto AL, Garbin ML, da Silva Ferreira MF, Carvalho CR, Clarindo WR (2019) Diversification and geographical distribution of *Psidium* (Myrtaceae) species with distinct ploidy levels. Trees 33(4):1101–1110
- Türkez H, Aydın E (2016) In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of α -pinene. Toxicol Ind Health 32(1):168–176
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc Soc Exp Biol Med 111(3):544–547

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.4 ARTIGO 4

O óleo essencial de *Psidium glaziovianum* alivia os efeitos da artrite induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA), regulando a inflamação e o estresse oxidativo

Wêndeo Kennedy Costa; João Victor de Oliveira Alves; Valquíria Bruna Guimarães; Rafael Jardim Ferreira; Bruno Vinicius Souza da Silva; Thiago Henrique Napoleão; Patrícia Maria Guedes Paiva; Maria Tereza dos Santos Correia; Fábio André Brayner dos Santos; Alisson Macário de Oliveira and Márcia Vanusa da Silva

Artigo a ser submetido na Inflammopharmacology



O óleo essencial de *Psidium glaziovianum* alivia os efeitos da artrite induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA), regulando a inflamação e o estresse oxidativo

Wêndeo Kennedy Costa^a; João Victor de Oliveira Alves^a; Valquíria Bruna Guimarães^a; Rafael Jardim Ferreira^b; Bruno Vinicius Souza da Silva^a; Thiago Henrique Napoleão^a; Patrícia Maria Guedes Paiva^a; Maria Tereza dos Santos Correia^a; Fábio André Brayner dos Santos^c; Alisson Macário de Oliveira^a and Márcia Vanusa da Silva^a

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brasil.

^b Faculdade de Odontologia de Pernambuco, Universidade de Pernambuco, Camaragibe – PE, 52171-011, Brasil

^cInstituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife – PE, 50670-420, Brasil.

*Autor correspondente: Wêndeo Kennedy Costa. E-mail: wendeocosta@gmail.com

Resumo

Milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de artrite reumatóide (AR), que pode ser causada por causas ambientais e genéticas, como estresse, esforço repetido e tabagismo. O método de terapia muitas vezes tem resultados ineficazes ou pode ter efeitos colaterais prejudiciais. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade do óleo de *Psidium glaziovianum* (PgEO) para tratar camundongos com AR provocada pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA). De acordo com os achados, a medicação nas doses de 50 e 100 mg/kg pode prevenir as alterações osteoarticulares provocadas pela CFA e diminuir o edema em camundongos com artrite. Citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo, dois componentes adicionais diretamente ligados ao desenvolvimento da patologia, também puderam ser diminuídos pela terapia. Assim, com base em nossos achados, a administração oral de PgEO parece reduzir significativamente os sintomas da artrite.

Palavras-chaves: Antiartrítico; Anti-inflamatório; Caatinga; Estresse oxidativo, Inflamação.

1. Introdução

A artrite reumatóide (AR) afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, podendo atingir indivíduos de qualquer idade, embora seja mais comum em mulheres e pessoas com mais de 40 anos (Chen et al., 2019). A AR é causada por fatores genéticos e ambientais, como estresse, esforço repetitivo e tabagismo (Yarwood et al., 2016). Nos estágios finais, desenvolvem-se rigidez articular e deformidades ósseas, além disso, os mediadores pró-inflamatórios como as citocinas e o estresse oxidativo são responsáveis pela destruição óssea na membrana sinovial, gerando transtorno nas articulações (Guo et al., 2018).

O procedimento terapêutico da AR é baseado no uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), glicocorticoides e medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs), entretanto, alguns pacientes não respondem eficientemente ao tratamento, e o uso a longo prazo destas terapias podem produzir sérios efeitos adversos gastrointestinais e renais (Siebert et al., 2015; Lee et al., 2022). Diante disso, a busca por novos compostos com potencial ação antiartrítico, baratos e seguros se faz necessário. Como alternativa, as plantas medicinais têm se apresentado como estratégia promissora, tendo em vista que algumas plantas são usadas para tratar diversos tipos de doenças, incluindo inflamações (Tseuguem et al., 2019; Shamlan et al., 2021).

Psidium é um gênero da família Myrtaceae, e inclui 118 espécies aceitas em todo o mundo (The Plant List, 2022). Com distribuição em regiões tropicais e subtropicais do mundo, este gênero é conhecido por possuir diversas atividades biológicas, como analgésica (Alabi et al., 2019; Souza Sampaio et al., 2019; Costa et al., 2022), antiinflamatória (Naseer et al., 2018; Nascimento et al., 2021; Costa et al., 2022), gastroprotetora (Ibeh et al., 2022; Shady et al., 2022), antimicrobiana (Arroyo et al., 2020; Zandoná et al., 2020; Chaturvedi et al., 2021), entre outros. Dentre estas espécies, temos *Psidium glaziovianum*, popularmente conhecida como araçá-pitanga, cresce nas regiões nordeste e sudeste do Brasil, e foi relatada atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, além de apresentar baixa toxicidade aguda para camundongos (Costa et al., 2022).

Assim, diante dos relatos de efeito anti-inflamatório em diferentes ensaios em camundongos descritos por Costa et al., (2022), o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antiartrítico (inflamação crônica) de óleo essencial obtido de folhas de *Psidium glaziovianum* em AR induzidos por Adjuvante Completo de Freund (CFA)

em camundongos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

As folhas de *Psidium glaziovianum* Kiaersk (Myrtaceae) foram coletadas em dezembro de 2019 (período de seca) no município de Exu (07° 30 '43 "S 39° 43 '27" W), Pernambuco, Brasil, região da Caatinga. Exsicata foi depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), amostra 93,728. O material vegetal foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), no número A08E18B.

O óleo essencial foi obtido de folhas de *P. glaziovianum* (PgEO) por hidrodestilação foi caracterizado por cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa (GC/MS), os resultados descritos anteriormente por Costa et al. (2022), com a presença de 48 compostos, representando 98,22% da composição e dominada por 1,8-cineol (24,29%), α -pineno (19,73%) e β -pineno (17,31%).

2.2 Experimentos in vivo

Para os testes foram utilizados Camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 30 e 35g e com idade entre 8 e 10 semanas. Os animais foram alojados em salas com temperatura controlada (22–25 °C) sob um ciclo claro/escuro de 12/12 h e receberam água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos de execução estão de acordo com as legislações brasileiras para experimentação animal e o estudo tem parecer favorável pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (nº 122/2019).

2.3 Modelo de inflamação crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA)

Camundongos Swiss fêmeas tiveram o tamanho de suas patas traseira direita medidas e foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n = 6/grupo) e nos dias um e quatro foi injetado 20 μ l de CFA (suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* em óleo) na pata traseira direita (intraplantar). Do sétimo ao vigésimo dia após a indução inicial da artrite os animais receberam os seguintes tratamentos: Grupo I: PgEO 25 mg/kg v.o.; Grupo II: PgEO 50 mg/kg v.o.; Grupo III: PgEO 100 mg/kg v.o.; Grupo IV: Indometacina 4 mg/kg i.p. (controle positivo); Grupo V: NaCl 0,9% v.o. (controle

negativo). No 21º dia após a primeira indução da artrite, todos os camundongos foram sacrificados por anestesia para a coleta da pata e do soro por punção cardíaca.

2.4 Medição do tamanho do edema

O tamanho da pata foi medido usando um paquímetro eletrônico nos dias 0, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 após a administração inicial do CFA. Resumidamente, os camundongos foram contidos e o diâmetro da pata foi medido no espaço entre todas as almofadas das patas da parte de trás (superfície dorsal) até a frente (superfície plantar) da pata.

2.5 Imagens Macroscópicas e Radiográficas

No 21º após a indução inicial da artrite por CFA foram capturadas imagens macroscópicas e radiográficas das patas dos camundongos. Inicialmente os animais foram anestesiados com xilazina a 2% (1 mg/kg) e cetamina a 10% (50 mg/kg, via i.p.) e posicionados em decúbito ventral, logo em seguida as patas foram fotografadas para evidencia dos edemas. Posteriormente os animais foram transferidos para obtenção das radiografias da projeção plantar. Para a realização das radiografias foi utilizado o aparelho de Raio-x Kodak com resolução de 2000/40x com abertura do diafragma da máquina de 2,6 cm e o tempo de exposição dos animais de 60 segundos.

2.6 Medição dos níveis de citocinas no soro

No 21th dia após a indução da artrite com CFA e após anestesia, foi realizado coleta de sangue por punção cardíaca nos camundongos. Em seguida, o soro foi obtido após centrifugação a 3000 rpm por 15 min. Os níveis de TNF- α e IL-1 β no soro foram medidos por kits de ELISA de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os resultados são expressos como pictogramas de citocinas por mililitro de soro (pg/ml).

2.7 Análise do estresse oxidativo

A determinação do conteúdo total de proteínas do soro sanguíneo foi realizada como descrito por Bradford (1976). A peroxidação lipídica foi avaliada estimando-se o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo os resultados expressos em nmol de malondialdeído (MDA) por mg de proteína (Ohkawa et al., 1979). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida avaliando-se a cinética

de inibição da autooxidação da epinefrina de acordo com a absorbância a 480 nm, sendo a atividade enzimática da SOD do tecido expressa em U/mg de proteína. A atividade de catalase (CAT) foi medida a 240 nm para monitorar a mudança na absorbância entre o primeiro e o sexto minuto, a atividade enzimática do tecido CAT é expressa em mU/mg de proteína (Beers e Sizer, 1952).

2.8 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

O potencial antioxidante de PgEO foi avaliado por diferentes métodos utilizando concentrações variando de 31,25 a 1000 µg/mL. Os métodos de inibição de radicais foram DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) (Brand-Williams; Cuvelier; Berset 1995) e ABTS (2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfônico)) (Re et al., 1999). O ácido ascórbico foi o padrão utilizado como controle positivo. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada pela seguinte equação: $I\% = [(Ac-As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. As concentrações das amostras responsáveis por 50% da diminuição da atividade inicial do radical livre (IC₅₀) foram calculadas por meio de regressão linear.

O método Fosfomolibdênio foi utilizado para determinar a capacidade antioxidante total (TAC). A capacidade antioxidante das amostras foi calculada como atividade antioxidante relativa em relação ao ácido ascórbico, calculada pela fórmula: $CAT\% = [(Aa-Ac) / (Aaa-Ac)] \times 100$, onde Aa é a absorbância do amostra, Ac é a absorbância do controle e Aaa é a absorbância do ácido ascórbico (Aguilar; Pineda; Prieto, 1999).

2.9 Análises estatísticas

A análise estatística foi feita usando o software Graph Pad Prism versão 8.0. A ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada ao analisar os dados de uma variável independente. Os dados foram expressos como média ± SEM, e p < 0,001 foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados e Discussão

Em estudo anterior o PgEO se mostrou eficaz no tratamento da inflamação aguda e no ensaio de inflamação crônica no ensaio de granuloma (Costa et al., 2022). Diante disso, utilizando a mesma amostra, avaliamos o efeito de tratamento de PgEO sobre um modelo de inflamação crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund

(CFA). O modelo de camundongo com artrite induzida por CFA é um exemplo bem conhecido de uma articulação artrítica dolorosa que resulta em comportamentos relacionados à inflamação, como aumento do edema, citocinas pró-inflamatórias, peso reduzido e diminuição do uso da articulação artrítica (Montilla-García et al., 2017; Heimfarth et al., 2022).

A injeção intra-articular repetida de CFA induziu uma inflamação articular de longa duração com a articulação marcadamente inchada e as alterações acumuladas foram consistentes com inflamação crônica. O tratamento durante 14 dias com PgEO nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg promoveram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo dos sinais inflamatórios, medida como tamanho do edema artrítico a cada dois dias, conforme observado na Figura 1.

Após duas aplicações de CFA os animais do grupo controle apresentaram tamanho do edema em $15,03 \pm 0,22$ e após 14 dias o grupo apresentou tamanho médio em $15,63 \pm 0,56$, mantendo o edema articular. Já os grupos tratados com PgEO nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg apresentaram tamanhos dos edemas no dia 7 em $15,56 \pm 0,13$; $15,58 \pm 0,25$ e $15,68 \pm 0,06$, respectivamente. Após 14 dias de tratamento, em comparação ao grupo controle negativo os edemas reduziram significativamente ($p < 0,001$) para tamanhos médios de $14,40 \pm 0,10$ (25 mg/kg), $13,45 \pm 0,06$ (50 mg/kg) e $12,96 \pm 0,13$ (100 mg/kg). Já a Indometacina (4mg/kg) apresentou no dia 7 média inicial do tamanho em $15,40 \pm 0,06$ e reduziu o tamanho do edema para $13,03 \pm 0,07$.

Estudo anterior demonstrou que outras espécies de *Psidium* spp. são eficazes na prevenção do edema de pata induzido por outros agentes flogístico diferentes do CFA; por exemplo, a administração oral do PgEO é eficaz na redução do edema de pata induzida por carragenina de camundongos, os resultados demonstram redução do edema em 89.23% na concentração de 100 mg/kg (Costa et al., 2022). Quando avaliado nas dosagens de 30, 100 e 300 mg/kg, o óleo essencial das folhas de *P. guineense* apresentou redução do edema em 48,48, 51,03 e 59,46%, respectivamente (Nascimento et al. 2018).

Essa atividade antiedematogênica do PgEO pode estar associado aos compostos majoritários presentes no óleo. Santos e Rao (2000) descreveram que o tratamento com 400 mg/kg de 1,8-cineol diminuiu o edema em 46%. Martins et al. (2017) também descreveu que 1,8-cineol suprime fortemente a geração de citocinas, fator responsável pelo efeito edematogênico. Adicionalmente, Khoshnazar et al.,

(2019) evidenciou que o α -pineno (50 e 100 mg/kg) provocou uma diminuição significativa no tamanho do edema. Além disso, o β -pineno (50 mg/kg) reduziu significativamente o edema de pata na 4ª hora de avaliação em 36% (Santos et al., 2022).

A análise do edema e de imagem radiográfica são métodos utilizados para avaliar a gravidade e o desenvolvimento das doenças articulares crônicas. Estas metodologias são consideradas como principais abordagens utilizadas na prática clínica para o diagnóstico e prognóstico de indivíduos acometidos por determinadas doenças osteoarticulares (Choi et al., 2011). Assim, para correlacionar com a prática clínica no diagnóstico da AR, ao final do tratamento no modelo experimental de AR induzida por CFA os edemas das patas foram fotografados seguido de realização de exames radiológicos para verificar se o agente indutor promoveu alterações osteoarticular, bem como se o tratamento com o PgEO reduziu os danos gerados nos animais (Figura 2).

Os animais dos grupos controle e tratados com PgEO na dose de 25 mg/kg apresentaram aumento significativo dos tecidos moles. Já os animais tratados com PgEO nas concentrações de 50 e 100 mg/kg e o grupo tratado com indometacina (4 mg/kg) apresentaram aumento dos tecidos menores que os grupos controles e tratados com PgEO 25 mg/kg. Quando comparada ao grupo controle e aos que receberam a dose de 25 mg/kg, a terapia foi capaz de evitar alterações osteoarticulares provocadas pela droga indutora, além de minimizar o edema (Figura 2).

Os grupos PgEO 25 mg/kg e controle apresentam um espaço entre as articulações, de acordo com a interpretação das imagens radiográficas fornecidas, evidenciando que a inoculação de CFA ocasionou aumento do tamanho do edema. Essas alterações foram observadas no presente estudo, bem como em pesquisas anteriores com o mesmo agente inflamatório (Shamlan et al., 2021; Gupta et al., 2022; Lee et al., 2022). O impacto irritante da CFA é o que causa o primeiro aumento do edema, uma característica observada em todos os animais, e o espessamento do tecido mole (Montilla-García et al., 2017).

Kany et al., (2019) descreveu que o estado patológico da artrite está diretamente ligado ao aumento dos mediadores pró-inflamatórios, pois estes são cruciais para o início e a progressão da artrite. Além disso, diversas células inflamatórias presentes no líquido sinovial produzem citocinas pró-inflamatórias,

desempenhando um papel importante na destruição da cartilagem articular do tecido adjacente e do osso, tais como TNF- α e outras interleucinas IL-1 β e IL-6 (Chen et al., 2019; Ou et al., 2019; Liu et al., 2020). Diante disso, avaliamos a influencia do tratamento com PgEO no perfil inflamatório dos camundongos submetidos ao ao ensaio antiartrítico.

Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram que o tratamento com PgEO em diferentes concentrações (25, 50 e 100 mg/kg) reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). TNF- α apresentou redução de 29,72%, 74,52% e 81,19%, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Já IL-1 β apresentou redução de 19,96% (25 mg/kg), 46,64% (50 mg/kg) e 59,81% (100 mg/kg). A indometacina reduziu TNF- α e IL-1 β em 85,41% e 63,98%, respectivamente.

Esses resultados estão de acordo com o observado por Aiyalu et al. (2017), que afirmaram que o aumento dos níveis séricos de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β é uma característica da artrite, logo, uma redução nesses mediadores diminui os danos inflamatórios. Anteriormente o PgEO se mostrou eficaz na redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos ensaios de inflamação aguda (Costa et al., 2022). Além disso, em um modelo animal de inflamação pulmonar induzida por LPS, o 1,8-cineol inibiu TNF α , IL-1 β , além de aumentar a citocina anti-inflamatória IL-10 nos tecidos pulmonares (Greiner et al., 2013).

Aliado ao perfil inflamatório, o estresse oxidativo é um fator fundamental no agravamento da doença articular inflamatória crônica (Pizzino et al., 2017; Krishnaiah et al., 2021). Tanto as espécies reativas de oxigênio (EROs), quanto a peroxidação lipídica e a diminuição nas defesas antioxidantes estão envolvidas nos processos metabólicos do organismo e alterações nesses compostos causam danos aos componentes celulares e teciduais (Fonseca et al., 2019; Behl et al., 2021).

Assim, na tabela 1 apresenta dados que o tratamento com PgEO atenua o estresse oxidativo nos animais artríticos. Os animais do grupo controle apresentaram elevação dos níveis de MDA, enquanto os níveis dos antioxidantes endógenos SOD e CAT diminuíram. Por outro lado, os resultados demonstram que os animais com artrite e tratados com PgEO nas concentrações de 50 e 100 mg/kg apresenta diminuição dos níveis de MDA em 42,03 e 47,25%, respectivamente, quando comparados aos animais do grupo controle. Já os níveis de SOD aumentaram em 253,19 e 288,95%, enquanto os níveis de CAT aumentaram 382,60 e 386,95%,

respectivamente. Os animais tratados com PgEO na concentração de 25 mg/kg não apresentaram diferença significativa do grupo controle.

Estudos recentes sobre a atividade antioxidante de óleos essenciais *in vivo* relataram atividade em enzimas antioxidantes (catalases, SOD, glutathione redutase (GR), heme oxigenase 1 (HO1), glutathione peroxidase (GPx)) (Birmann et al., 2022; Meng et al., 2022; Sallam et al., 2022). Suplementarmente, 1,8-cineol ao ser aplicado em monócitos humanos normais estimulados com soro fetal de vitela (FCS) *in vitro* inibiu O_2 (-53%) e H_2O_2 (-48%), compostos envolvidos no estresse oxidativo (Juergens et al., 2018). Além disso, o α -pineno (100 mg/kg) restaurou a função da superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e reduziu a concentração de MDA (Khoshnazar et al., 2019).

Dada a relevância do estresse oxidativo na patogênese de doenças inflamatórias, avaliamos as propriedades antioxidantes do PgEO usando diferentes métodos *in vitro*: DPPH, ABTS e TAC (Tabela 2). O óleo inibiu os radicais DPPH e ABTS com IC_{50} de 39,47 e 122,10 μ g/mL, respectivamente. No ensaio que avalia a capacidade antioxidante total o PgEO apresentou alto potencial antioxidante total, com inibição de 87,32% quando comparado ao ácido ascórbico.

Uma abordagem para o tratamento da AR é empregar antioxidantes, tendo em vista que os radicais livres são espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado capazes de destruir lipídios de membrana, proteínas, DNA e até mesmo tecidos cartilaginoso e ósseo (Arulselvan et al., 2016). Portanto, os tratamentos que reduzem os níveis de oxidantes e/ou aumentam os níveis de antioxidantes têm grande potencial como medicamentos anti-inflamatórios para o tratamento de vários distúrbios relacionados ao estresse oxidativo (Fonseca et al., 2019). Nesse sentido, a terapia antioxidante com plantas medicinais como *P. glaziovianum* pode possivelmente oferecer novas opções de tratamento adjuvante/complementar visando um melhor controle da doença.

Conclusão

O presente estudo explorou a eficiência do PgEO no tratamento da artrite e os resultados indicam que a terapia nas concentrações de 50 e 100 mg/kg é capaz de evitar alterações osteoarticulares provocadas pela CFA, além de minimizar o edema de camundongos artríticos. Adicionalmente, o tratamento foi capaz de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo, fatores diretamente relacionados

com o desenvolvimento da patologia. Diante disso, nossos resultados sugerem que a administração oral de PgEO apresenta significativo efeito anti-artrítico.

Referências

- Alabi, A. O., Ajayi, A. M., Omorogbe, O., & Umukoro, S. (2019). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of an aqueous extract of blended leaves of *Ocimum gratissimum* and *Psidium guajava*. *Clinical Phytoscience*, 5(1), 1-9.
- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Arroyo, B. J., Bezerra, A. C., Oliveira, L. L., Arroyo, S. J., de Melo, E. A., & Santos, A. M. P. (2020). Antimicrobial active edible coating of alginate and chitosan add ZnO nanoparticles applied in guavas (*Psidium guajava* L.). *Food chemistry*, 309, 125566.
- Behl, T., Upadhyay, T., Singh, S., Chigurupati, S., Alsubayiel, A. M., Mani, V., ... & Bungau, S. G. (2021). Polyphenols targeting MAPK mediated oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis. *Molecules*, 26(21), 6570.
- Birmann, P. T., Casaril, A. M., Zugno, G. P., Acosta, G. G., Sousa, F. S. S., Collares, T., ... & Hartwig, D. (2022). Flower essential oil of *Tagetes minuta* mitigates oxidative stress and restores BDNF-Akt/ERK2 signaling attenuating inflammation-and stress-induced depressive-like behavior in mice. *Brain Research*, 1784, 147845.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Chaturvedi, T., Singh, S., Nishad, I., Kumar, A., Tiwari, N., Tandon, S., ... & Verma, R. S. (2021). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of senescent leaves of guava (*Psidium guajava* L.). *Natural product research*, 35(8), 1393-1397.
- Chen, Z., Bozec, A., Ramming, A., & Schett, G. (2019). Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 15(1), 9-17.
- Choi, S., Chae, S. J., Kang, S. W., Cheong, Y., Hong, S. J., & Park, H. K. (2011). Non-invasive screening of progressive joint defects in the Type II collagen-

induced arthritis animal model using radiographic paw images. *Inflammation Research*, 60(5), 447-456.

- Costa, W. K., do Nascimento, M. F., Dos Santos, C. R. B., do Amaral Ferraz Navarro, D. M., Napoleão, T. H., dos Santos Correia, M. T., ... & da Silva, M. V. (2022). Oral administration of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice. *Inflammopharmacology*, 30(2), 599-607.
- Fonseca, L. J. S. D., Nunes-Souza, V., Goulart, M. O. F., & Rabelo, L. A. (2019). Oxidative stress in rheumatoid arthritis: What the future might hold regarding novel biomarkers and add-on therapies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Greiner, J. F. W., Müller, J., Zeuner, M. T., Hauser, S., Seidel, T., Klenke, C., ... & Kaltschmidt, C. (2013). 1, 8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF- κ B p65 and NF- κ B-dependent transcriptional activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), 2866-2878.
- Guo, Q., Wang, Y., Xu, D., Nossent, J., Pavlos, N. J., & Xu, J. (2018). Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone research*, 6(1), 1-14.
- Gupta, S., Mishra, K. P., Kumar, B., Singh, S. B., & Ganju, L. (2020). Andrographolide attenuates complete freund's adjuvant induced arthritis via suppression of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. *Journal of ethnopharmacology*, 261, 113022.
- Heimfarth, L., Rezende, M. M., Pereira, E. W. M., Passos, F. R. S., Monteiro, B. S., Santos, T. K. B., ... & Quintans, J. D. S. S. (2022). Pharmacological effects of a complex α -bisabolol/ β -cyclodextrin in a mice arthritis model with involvement of IL-1 β , IL-6 and MAPK. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 151, 113142.
- Ibeh, L. N., Ijioma, S. N., Emmanuel, O., Timothy, C. O., & Ugbogu, E. A. (2021). *Psidium guajava* leaf extract improves gastrointestinal functions in rats and rabbits: an implication for ulcer and diarrhoea management. *Biomarkers*, 26(8), 737-746.
- Juergens, L. J., Tuleta, I., Stoeber, M., Racké, K., & Juergens, U. R. (2018). Regulation of monocyte redox balance by 1, 8-cineole (eucalyptol) controls oxidative stress and pro-inflammatory responses in vitro: A new option to increase the antioxidant effects of combined respiratory therapy with

- budesonide and formoterol?. Synergy, 7, 1-9.
- Khoshnazar, M., Bigdeli, M. R., Parvardeh, S., & Pouriran, R. (2019). Attenuating effect of α -pinene on neurobehavioural deficit, oxidative damage and inflammatory response following focal ischaemic stroke in rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(11), 1725-1733.
- Krishnaiah, D., Khiari, M., Klibet, F., & Kechrid, Z. (2021). Oxidative stress toxicity effect of potential metal nanoparticles on human cells. In *Toxicology* (pp. 107-117). Academic Press.
- Lee, J., Bae, Y., Kim, N. J., Lim, S., Kim, Y. M., Kim, J., & Chin, Y. W. (2022). Anti-rheumatic, and analgesic effects by the parent tuberous roots of *Aconitum jaluense* in adjuvant induced arthritis rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 289, 114518.
- Martins, A. O. B. P. B., Rodrigues, L. B., Cesário, F. R. A. S., de Oliveira, M. R. C., Tintino, C. D. M., e Castro, F. F., ... & Wanderley, A. G. (2017). Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1, 8-cineole (eucalyptol). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 384-395.
- Meng, R., Wu, S., Chen, J., Cao, J., Li, L., Feng, C., ... & Huang, Z. (2022). Alleviating effects of essential oil from *Artemisia vulgaris* on enteritis in zebrafish via modulating oxidative stress and inflammatory response. *Fish & Shellfish Immunology*, 131, 323-341.
- Montilla-García, Á., Tejada, M. Á., Perazzoli, G., Entrena, J. M., Portillo-Salido, E., Fernández-Segura, E., ... & Cobos, E. J. (2017). Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. *Neuropharmacology*, 125, 231-242.
- Nascimento, K. F., Kassuya, C. A. L., Cabral, M. R. P., Souza, R. I. C., Marangoni, J. A., Silva, R. M. M. F., ... & Formagio, A. S. N. (2021). Chemical analysis and antioxidant, anti-inflammatory and toxicological evaluations of the hydromethanolic extract of *Psidium guineense* Swartz leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 114492.
- Naseer, S., Hussain, S., Naeem, N., Pervaiz, M., & Rahman, M. (2018). The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava). *Clinical Phytoscience*, 4(1), 1-8.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto,

- A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Sallam, M. F., Ahmed, H. M., Diab, K. A., El-Nekeety, A. A., Abdel-Aziem, S. H., Sharaf, H. A., & Abdel-Wahhab, M. A. (2022). Improvement of the antioxidant activity of thyme essential oil against biosynthesized titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative stress, DNA damage, and disturbances in gene expression in vivo. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 73, 127024.
- Santos, E. S., Abrantes Coelho, G. L., Saraiva Fontes Loula, Y. K., Saraiva Landim, B. L., Fernandes Lima, C. N., Tavares de Sousa Machado, S., ... & Kerntopf, M. R. (2022). Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022.
- Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(4), 240-244.
- Shady, N. H., Abdullah, H. S., Maher, S. A., Albohy, A., Elrehany, M. A., Mokhtar, F. A., ... & Abdelmohsen, U. R. (2022). Antiulcer Potential of *Psidium guajava* Seed Extract Supported by Metabolic Profiling and Molecular Docking. *Antioxidants*, 11(7), 1230.
- Shamlan, G., Al-Nouri, D. M., Alathbah, A. A., Arzoo, S., & Habibullah, M. M. (2021). Antiarthritic, anti-inflammatory activity of *Moringa peregrina* seed oil and leaves in Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of King Saud University-Science*, 33(3), 101350.
- Siebert, S., Tsoukas, A., Robertson, J., & McInnes, I. (2015). Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases.

Pharmacological reviews, 67(2), 280-309.

Souza Sampaio, R., do Nascimento, E. P., de Menezes, I. R. A., dos Santos Sales, V., Pereira, A. O. B., de Lacerda, G. M., ... & Kerntopf, M. R. (2020).

Antinociceptive activity of the *Psidium brownianum* Mart ex DC. leaf essential oil in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 111053.

The Plant List (2022). *Psidium* L. Published on the internet;

<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae/Psidium/> (accessed 06 november 2022).

Tseuguem, P. P., Ngangoum, D. A. M., Pouadjeu, J. M., Piégang, B. N., Sando, Z., Kolber, B. J., ... & Nguelefack, T. B. (2019). Aqueous and methanol extracts of *Paullinia pinnata* L. (Sapindaceae) improve inflammation, pain and histological features in CFA-induced mono-arthritis: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Journal of ethnopharmacology*, 236, 183-195.

Yarwood, A., Huizinga, T. W., & Worthington, J. (2016). The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA. *Rheumatology*, 55(2), 199-209.

Zandoná, G. P., Bagatini, L., Woloszyn, N., de Souza Cardoso, J., Hoffmann, J. F., Moroni, L. S., ... & Rombaldi, C. V. (2020). Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (*Psidium cattleianum*) leaf: Putative antioxidant and antimicrobial properties. *Food Research International*, 137, 109573.

Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in inflammatory disease. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6008.

Ou, Z., Zhao, J., Zhu, L., Huang, L., Ma, Y., Ma, C., ... & Yi, J. (2019). Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109347.

Chen, Z., Bozec, A., Ramming, A., & Schett, G. (2019). Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 15(1), 9-17.

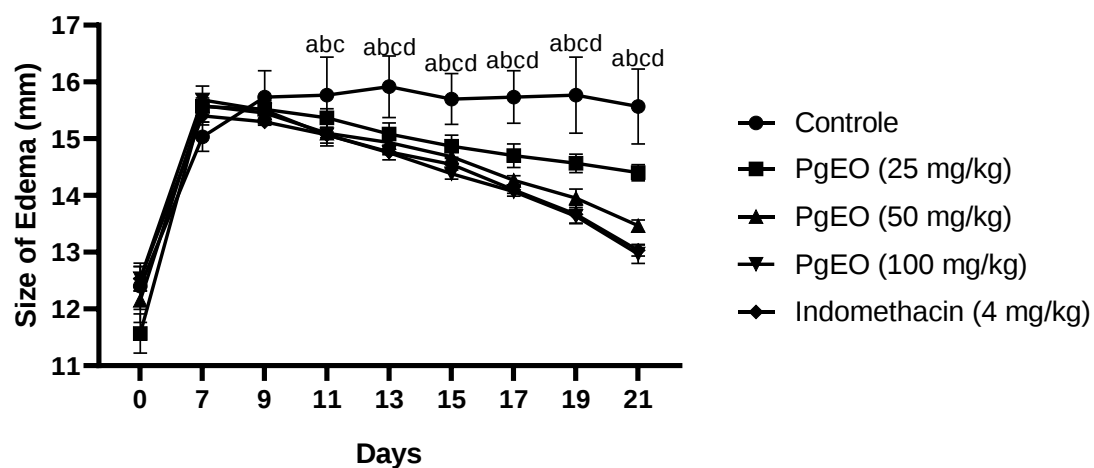
Liu, H., Zhu, Y., Gao, Y., Qi, D., Zhao, L., Zhao, L., ... & Xiao, J. (2020). NR1D1 modulates synovial inflammation and bone destruction in rheumatoid arthritis. *Cell death & disease*, 11(2), 1-18.

Aiyalu, R., Subramaniam, I., Govindarajan, A., & Ramasamy, A. (2017). Formulation

and Evaluation of Novel Herbal Aerosol for Arthritis.

Lee, Y. S., Kim, S. M., Park, E. J., & Lee, H. J. (2022). Anti-arthritic effects of *Schisandra chinensis* extract in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats. *Inflammopharmacology*, 1-12.

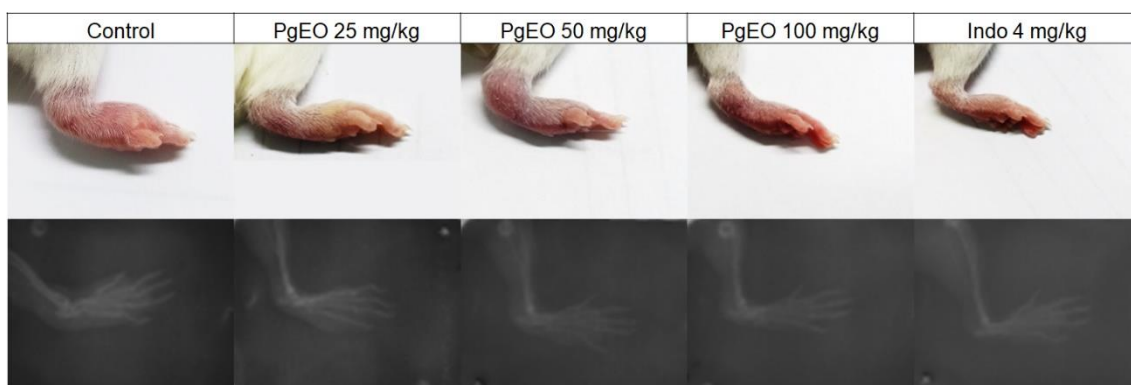
Figura 1: Efeito da administração durante 14 dias de PgEO no edema artrítico induzido por CFA



Os

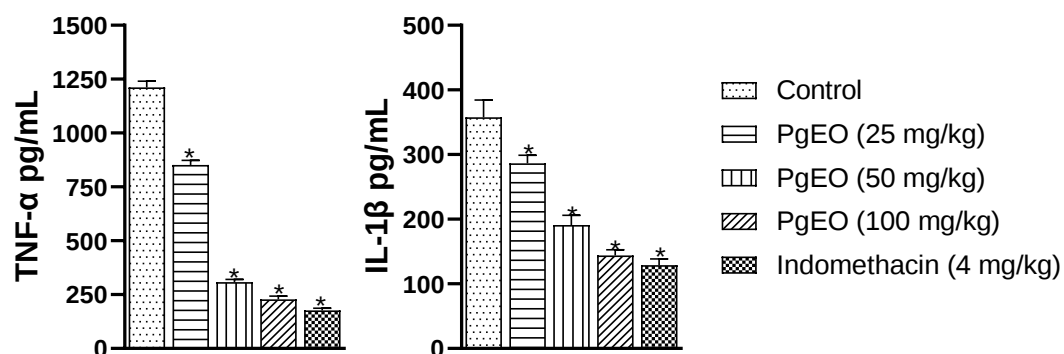
Resultados são expressos como média $\pm$ SEM de 6 animais por grupo ($p < 0,001$). a: Indometacina vs grupo controle; b: 100 mg/kg vs grupo controle; c: 50 mg/kg vs grupo controle; d: 25 mg/kg vs grupo controle.

Figura 2: Imagens macroscópicas e Imagens radiológicas do efeito da administração durante 14 dias de PgEO no edema artrítico induzido por CFA.



Efeito do tratamento com PgEO (*Psidium glaziovianum* Essential Oil) 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. na articulação de camundongos com artrite crônica induzida por CFA.

Figura 3: Efeito da administração durante 14 dias de PgEO nos níveis de TNF- α e IL-1 β na artrite induzido por CFA.



Os valores representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,001$ em comparação com o controle, análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Dunnett.

Tabela 1: Efeito do óleo essencial de *Psidium glaziovianum* (PgEO) nos níveis de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em camundongos com artrite.

Parameter	Control	PgEO			Indomethacin
		25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	4 mg/kg
MDA	12.04±0.78	11.56±0.81	6.98±0.70*	6.35±0.44*	5.20±0.21*
SOD	3.44±0.57	4.01±0.63	8.71±0.77*	9.94±0.81*	8.44±0.69*
CAT	0.23±0.11	0.30±0.09	0.88±0.11*	0.89±0.09*	1.33±0.12*

Malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os valores representam a média ± SEM (n = 5/grupo). (*) indica diferença significativa (p < 0,05) em comparação com o controle.

Tabela 2: Atividades antioxidantes usando os métodos ABTS, DPPH e TAC.

Samples	IC ₅₀ (µg/mL)		%
	DPPH	ABTS	Inhibition TAC
PgEO	39,41	122,10	87,32
Ascorbic acid	12,74	72,54	100

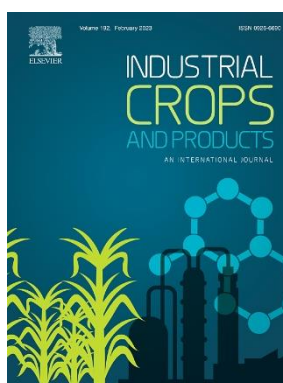
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico; TAC: Capacidade Antioxidante Total IC50: Concentração de PgEO ou Ácido Ascórbico necessária para diminuir a concentração inicial em 50%.

4.5 ARTIGO 5

Desenvolvimento de gel contendo óleo essencial de *Psidium glaziovianum* tem atividade antimicrobiana *in vitro* e melhora a cicatrização de feridas excisionais em camundongos

Wêndeo Kennedy Costa; Valquíria Bruna Guimarães; Bruno Vinicius Souza da Silva; Magda Rhayanny Assunção Ferreira; Luiz Alberto Lira Soares; Thiago Henrique Napoleão; Patrícia Maria Guedes Paiva; Maria Tereza dos Santos Correia; Fábio André Brayner dos Santos; Márcia Vanusa da Silva; and Alisson Macário de Oliveira

Artigo a ser submetido na publicado na Industrial Crops and Products



Desenvolvimento de gel contendo óleo essencial de *Psidium glaziovianum* tem atividade antimicrobiana *in vitro* e melhora a cicatrização de feridas excisionais em camundongos

Wêndeo Kennedy Costa^{a*}, Valquíria Bruna Guimarães^a, Bruno Vinicius Souza da Silva^a, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^b, Luiz Alberto Lira Soares^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Fábio André Brayner dos Santos^c, Márcia Vanusa da Silva^a and Alisson Macário de Oliveira^a

^a*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brasil.*

^b*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brasil.*

^c*Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife – PE, 50670-420, Brasil.*

*Autor correspondente: Wêndeo Kennedy Costa. E-mail: wendeocosta@gmail.com

Resumo

Feridas são danos físicos, químicos, biológicos ou mesmo relacionados a procedimentos médicos na pele ou nas mucosas. Um dos grandes problemas no tratamento de feridas é o desenvolvimento de infecções, pois causam danos sistêmicos ao paciente, retardando a recuperação da lesão. A fim de acelerar o processo de cicatrização, atualmente existe o interesse em encontrar medicamentos que possam interagir com o tecido ferido e combater as infecções associadas. Anteriormente o óleo essencial de *P. glaziovianum* (PgEO) demonstrou ter propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias, bem como toxicidade oral mínima. Diante disso, nosso objetivo foi avaliar o impacto da aplicação tópica de uma formulação de gel contendo PgEO em feridas excisionais de camundongos. Adicionalmente uma avaliação antimicrobiana *in vitro* também foi realizada. Os resultados desta pesquisa demonstram que o gel contendo óleo essencial de *P. glaziovianum* tem ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como fungos. Além disso, os resultados mostram que a terapia com gel de PgEO melhora a cicatrização de feridas na pele, presumivelmente como consequência de sua

capacidade de estimular enzimas antioxidantes e inibir citocinas pró-inflamatórias. O gel também demonstrou mínima toxicidade eritrocitária e irritação cutânea, o que pode ser promissor para futuros estudos pré-clínicos e clínicos em vários tipos de feridas.

Palavras-Chaves: Antibacteriano; Antifungico; Caatinga; Cicatrização de feridas; Estresse oxidativo.

1. Introdução

As feridas são danos causados na pele ou nas mucosas causada por algum trauma físico, químico, biológico ou até mesmo por procedimentos médicos. A cicatrização de feridas é uma reação natural do corpo formada como uma resposta tecidual à lesão, ela é um processo dividido em três fases interativas e sobrepostas: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou de maturação (Saporito et al., 2018; Salas-Oropeza et al., 2020; Andjić et al., 2022).

Durante o tratamento de feridas um dos maiores problemas está no surgimento de infecções, pois retardam a cicatrização da lesão, acarretando em prejuízos sistêmicos para o portador. Ainda, é válido destacar que a proliferação da carga microbiana, sobrecarrega a resposta do sistema imunológico podendo levar à colonização crítica e até à sepse (Wang et al., 2021; Alanazi et al., 2022).

Anualmente as despesas médicas aumentam para o tratamento de feridas, representando uma pressão financeira considerável no sistema de saúde global, e assim, aumentando o interesse na busca de medicamentos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo cicatricial (Andjić et al., 2022). Com isso, alguns tem sido realizado estudos com plantas medicinais com ênfase no processo de cicatrização e com finalidade de trazer novas alternativas terapêuticas para o tratamento de feridas cutâneas (Farahpour et al., 2020; Andjić et al., 2022).

Psidium glaziovianum Kiaersk. é uma árvore de pequeno a médio porte, sendo considera espécie endêmica do Brasil e com distribuição na Caatinga e Mata atlântica (Landrum et al., 2017). Anteriormente, um óleo essencial de folhas de *P. glaziovianum* (PgEO) foi descrita por apresentar atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (Costa et al., 2022) e por apresentar baixa toxicidade oral (Costa et al., 2023).

Assim, em vista que PgEO apresenta efeito anti-inflamatório e sendo a inflamação como uma fase crucial do processo cicatricial, avaliamos o efeito do

tratamento tópico de uma formulação em gel contendo o PgEO em feridas excisionais em camundongos. Adicionalmente, uma avaliação antimicrobiana *in vitro* foi realizada.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

As folhas de *Psidium glaziovianum* Kiaersk (Myrtaceae) foram coletadas em dezembro de 2019 (período de seca) no município de Exu (07° 30 '43 "S 39° 43 '27" W), Pernambuco, Brasil, região da Caatinga. Exsicata foi depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), amostra 93,728. O material vegetal foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), no número A08E18B.

O óleo essencial foi obtido das folhas de *P. glaziovianum* (PgEO) por hidrodestilação e caracterizado por cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa (GC/MS), os resultados foram publicados anteriormente por Costa et al. (2022), contendo 48 compostos e representando 98,22% da composição dominada pela presença de 1,8-cineol (24,29%), α -pineno (19,73%) e β -pineno (17,31%).

2.2 Preparação do gel contendo PgEO

Inicialmente adicionou-se 7,6 g de água destilada e 0,05 g de Carbopol ® 940 e submeteu-se ao processo de homogeneização usando Ultra-Turrax (Modelo T-10, IKA ® , Alemanha) a 13.000 rpm durante 5 min. O óleo essencial das folhas de *P. glaziovianum* (0,1 g) foi adicionado ao propilenoglicol (0,2 g) e a agitação foi mantida a 13.000 rpm durante 5 minutos. Por fim, os conservantes propilparabeno (Nipazol – 0,025 g) e metilparabeno (Nipagin – 0,025 g) foram adicionados, mantendo-se a agitação por mais 1 minuto. O gel obtido foi chamado PgEO-gel 1%.

2.3 Caracterização do PgEO-gel

O PgEO-gel foi avaliado para detectar modificações visíveis ou instabilidades tais como cor e separação de fases. A análise foi realizada 24 h após o preparo. O teste de resistência à centrifugação foi realizado submetendo a amostra a rotações crescentes de 980, 1800 e 3000 rpm durante mesmo período em cada rotação (5 min), à temperatura ambiente (25 °C). O valor de pH foi mensurado em pHmetro (pH 21, Hanna instruments) e devidamente pré-calibrado à temperatura ambiente. Para determinação da viscosidade foi utilizado o viscosímetro (Rotavisc hi-vi II, IKA ®) com

spindle 1 e rotação adequada (5 rpm), em temperatura ambiente estabilizada.

2.4 Experimentos *in vivo*

Para os testes foram utilizados Camundongos Swiss machos, pesando entre 30 e 35g e com idade entre 8 e 10 semanas. Os animais foram alojados em salas com temperatura controlada (22–25 °C) sob um ciclo claro/escuro de 12/12 h e receberam água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos de execução estão de acordo com as legislações brasileiras para experimentação animal e o estudo tem parecer favorável pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (nº 122/2019).

2.5 Avaliação da capacidade hemolítica do PgEO-gel

A triagem toxicológica do PgEO-gel foi avaliada no ensaio de atividade hemolítica conforme descrito por Costa et al, (2020). Resumidamente, uma punção cardíaca foi realizada em camundongos anestesiados e, em seguida, transferida para um tubo contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e centrifugado a 3.000 rpm por 10 min. Posteriormente, o pellet celular foi homogeneizado com solução salina até uma concentração de 2% (v/v). Diferentes concentrações do PgEO-gel (0,250 - 10,0 mg/mL) foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas por 60 minutos a 28 °C com a solução de eritrócitos em triplicata. Após o período de incubação, nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições mencionadas e o sobrenadante foi coletado para determinação da hemoglobina liberada em leitor de espectrofotômetro a 540 nm. Para o controle positivo foi utilizado o Triton X.

2.6 Irritação dérmica aguda

O teste de irritação dérmica aguda foi realizado em camundongos Swiss machos. O protocolo experimental foi conduzido de acordo com as diretrizes 404 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2002). Os camundongos foram agrupados em um único grupo (n=3) e 500 mg de PgEO gel foram aplicados topicamente nas áreas raspadas. Os animais foram observados quanto à mortalidade e alguns sinais de toxicidade (tremores, salivação, convulsões e diarreia) ou efeitos deletérios na pele (irritação, edema, prurido e eritema) com atenção especial nas primeiras 4 horas e depois uma vez ao dia por um período de 14 dias.

2.7 Cepas microbianas

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas quatro cepas de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *S. aureus* UFPEDA 670; *S. epidermidis* UFPEDA 183 e *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138), sete cepas de bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922; *E. coli* UFPEDA 224; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; *K. pneumoniae* UFPEDA 396; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *P. aeruginosa* UFPEDA 416 e *Proteus mirabilis* UFPEDA 737) e cinco espécies de *Candida* (*Candida albicans* URM 5852; *C. krusei* URM 6391; *C. glabrata* URM 6343; *C. tropicalis* URM 6557 e *C. parapsilosis* URM 6711). As cepas ATCC foram obtidas da American Type Culture Collection, as cepas UFPEDA foram obtidas da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e os fungos foram obtidos da coleção de culturas URM (Universidade Recife Mycologia) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

2.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM)

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e microbicidas mínimas (CMM) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo seguindo os protocolos CLSI M100 e M60. Diluições seriadas do PgEO e do PgEO-gel (2048 – 1 µg/ml) foram preparadas em caldo Mueller-Hinton (bactéria) e RPMI-1640 (levedura), seguidas foram adicionadas aos poços microrganismos padronizados em uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias e 10^7 UFC/mL para leveduras e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias ou 25 °C por 48 h para leveduras. Após esse período, 10 µL de resazurina 0,01% foram adicionados como um indicador colorimétrico de viabilidade celular. Em seguida, as microplacas foram incubadas novamente por 4 horas e a menor concentração que inibiu o crescimento microbiano foi registrada como MIC.

Alíquotas de 10 µL dos poços antes da aplicação de resazurina foram transferidas para placas de Petri contendo Mueller-Hinton-Agar (MHA) para bactérias ou Sabouraud Dextrose Agar (SDA) para leveduras e incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias ou 25 °C por 48 h para leveduras. CMM foi considerada a menor concentração a partir da qual nenhum crescimento microbiano foi observado após o

cultivo. Os ensaios foram realizados em triplicata e Ampicilina e Fluconazol foram usados como controles positivos.

2.9 Modelo de ferida

No dia 0, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal da mistura de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (5 mg/kg) e o dorso raspado e limpo com álcool etílico a 70% e as feridas de excisão abertas de tamanho 1 × 1 cm e profundidade de 2 mm com auxílio de um punch. Após a indução da ferida, os camundongos foram alojados em gaiolas (Boudjelal et al., 2020).

2.10 Design experimental

Após a indução das feridas, os camundongos foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=8). 24 h após a indução das feridas, os seguintes grupos de tratamento foram realizados; grupo I, controle negativo onde as feridas não tiveram tratamento; grupo II, controle positivo onde os animais foram tratados com a pomada FitoScar®; e o grupo III, tratado com formulação de PgEO-gel 1%.

Todos os tratamentos foram aplicados topicamente uma vez ao dia durante 14 dias, por meio de Swab estéril, na quantidade de 0,5 g. No 15º dia após o início do tratamento, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de mistura de cetamina (10 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). As amostras de sangue foram coletadas.

2.11 Contração da ferida

A ferida de cada camundongo foi fotografada imediatamente após a formação e no 8º e 15º dia após a indução lesão e a área da ferida foi medida usando o software Image J. A porcentagem de contração da ferida foi calculada seguindo o modelo descrito por Boudjelal et al. (2020) para cada animal em vários dias usando a seguinte fórmula: % Contração da ferida = $[(\text{Área inicial da ferida} - \text{Área específica do dia da ferida}) / \text{Área inicial da ferida}] * 100$.

2.12 Medição dos níveis de citocinas no soro

Os níveis de TNF- α e IL-1 β no soro foram medidos por kits de ELISA de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os resultados são expressos como pictogramas de citocinas por mililitro de soro (pg/ml).

2.13 Determinação de parâmetros do sistema de defesa antioxidante

As avaliações dos parâmetros do estresse oxidativo foram realizadas em amostras de sangue coletadas por punção cardíaca no momento da eutanásia dos animais. Após a centrifugação das amostras de sangue, foi obtido o soro e determinado o conteúdo de proteínas pelo método descrito por Bradford (1976). A peroxidação lipídica foi avaliada estimando-se o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo os resultados expressos em nmol de malondialdeído (MDA) por mg de proteína (Ohkawa et al., 1979). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida avaliando-se a cinética de inibição da autooxidação da epinefrina de acordo com a absorbância a 480 nm, sendo a atividade enzimática da SOD do tecido expressa em U/mg de proteína. A atividade de catalase (CAT) foi medida a 240 nm para monitorar a mudança na absorbância entre o primeiro e o sexto minuto, a atividade enzimática do tecido CAT é expressa em mU/mg de proteína (Beers e Sizer, 1952).

2.15 Análises estatísticas

A análise estatística foi feita usando o software Graph Pad Prism versão 8.0. A ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada ao analisar os dados de uma variável independente. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM, e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados e Discussão

O tratamento de feridas pode ser feito com diferentes agentes farmacológicos, que podem ser administrados localmente ou sistemicamente. Contudo, os benefícios das formulações tópicas em relação aos medicamentos administrados sistemicamente incluem penetração cutânea mais profunda, maior biodisponibilidade e ação imediata no local da aplicação (Dantas et al., 2016; Kazemi et al., 2020). Adicionalmente, a administração tópica usando géis pode prolongar a duração da resistência cutânea do medicamento e aumentar a entrega e liberação do medicamento, prolongando a permanência do medicamento no local da injeção (Karadzovska et al., 2013). Diante disso, em nosso estudo foi produzido um gel contendo o óleo essencial obtido das folhas de *P. glaziovianum* e realizado tratamento em feridas excisionais em camundongos.

Como o comportamento físico-químico e a estabilidade da preparação durante

a fabricação, armazenamento e aplicação podem ser antecipados em ensaios físico-químico, realizamos a caracterização do PgEO-gel na primeira parte de nosso estudo. O PgEO-gel foi avaliado após 24 h de sua obtenção, e apresentou coloração branca translúcida, com odor característico do óleo essencial de *P. glaziovianum*, sem sinais de instabilidade macroscópica mesmo após o ensaio de resistência à centrifugação. Quando avaliado o pH da formulação tivemos valor de $5,03 \pm 0,0156$ (0,32) e a viscosidade foi igual a 134.810 ± 3505 mPa.s (2,06%).

Após a caracterização, o PgEO gel foi submetido a ensaios de avaliação de segurança de uso. Inicialmente foi avaliada a capacidade do gel em causar hemólise de eritrócitos e os resultados demonstraram que a taxa de hemólise variou de 0,12% a 0,17%, indicando baixa capacidade em causar hemólise. Adicionalmente foi realizada a avaliação da irritação dérmica, os animais submetidos à aplicação tópica de PgEO-gel não apresentaram sinais clínicos de toxicidade dérmica e outras reações adversas como prurido, eritema, inflamação e edema durante 14 dias de observação. Esses resultados demonstram que o PgEO gel apresenta baixa toxicidade ou é atóxico para o desenvolvimento de formulações tópicas.

Anteriormente o PgEO foi avaliado quanto a segurança de uso, a taxa de hemólise mostrou que PgEO tem uma capacidade limitada de lisar células (0,33–1,78%). A administração oral com até 5.000 mg/kg não apresentou mortalidade ou anormalidades fisiológicas durante a investigação de toxicidade aguda (Costa et al., 2023).

Embora vários produtos terapêuticos apresentem em sua formulação antibióticos, antissépticos e agentes anti-inflamatórios para o tratamento de feridas, a infecção é um problema que retarda a cicatrização porque pode prolongar o estágio inflamatório destruindo o tecido, retardando a formação de colágeno e retardando os componentes da epitelização (Farahpour et al., 2020; Joughi et al., 2022). Diante disso, a atividade antimicrobiana do PgEO e do PgEO-gel foram avaliadas contra bactérias gram positivas e gram negativas, bem como leveduras.

PgEO mostrou atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, exibindo concentração inibitória mínima (CIMs) de 256–1024 µg/mL. A CIM contra levedura variou entre 512 e 1024 µg/mL. O gel contendo PgEO exibiu CIM que variou entre 512 e 1024 µg/mL contra bactérias gram-positivas e negativas, entretanto não apresentou resultado contra *Pseudomonas aeruginosa*. Em relação as leveduras o PgEO gel apresentou MIC que variou de 1024 a 2048 µg/mL para as diferentes

espécies de *Candida* (Tabela 1).

Este potencial bactericida do PgEO e PgEO-gel pode ser devido à presença dos compostos majoritários 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno presentes no óleo essencial. Estudos realizados por Li et al. (2014) demonstraram que 1,8-cineol altera a forma e o tamanho da célula bacteriana tanto de bactérias gram-negativas, quanto de gram-positivas, pois cepas de *S. aureus* apresentaram forte condensação da cromatina nuclear, característico de apoptose. Já cepas de *E. coli* apresentaram redução da nucleoplasma e cromatina nuclear, característico de necrose. Li et al. (2022) também evidenciou que o 1,8 cineol teve um efeito inibitório significativo sobre dermatófitos.

Estudos mostraram que o α -pineno apresenta atividade antimicrobiana contra gram positivas e gram negativas (Sousa Eduardo et al., 2018; Freitas et al., 2021), Adicionalmente, este composto é capaz de inibir bombas de efluxo de *S. aureus*, importante mecanismo de resistência e virulência (Freitas et al., 2021), além de exibir forte atividade antifúngica contra as leveduras *Candida* não albicans (Mandras et al., 2021). Já o β -pineno apresentou atividade antimicrobiana e sinérgica contra MRSA (Silva Rivas et al., 2012). Além disso, essa substância também inibe a aderência de espécies de *Candida* e o desenvolvimento do biofilme, além de eliminar as populações maduras do biofilme de *Candida* (Alves-Silva et al., 2019).

O PgEO gel aumentou efetivamente a cicatrização de feridas de excisão sem causar qualquer irritação perceptível na pele. A contração da ferida calculada como redução percentual na área da ferida foi monitorada em todos os grupos examinados a cada sete dias. Os resultados apresentados na Figura 1 evidenciam que a aplicação tópica do PgEO gel aumenta a taxa de contração de feridas em $90,62\% \pm 7,89$ após 14 dias de tratamento. O grupo controle positivo, tratado com medicamento de referência FitoScar® apresentou contração de $78\% \pm 4,07$. Já o grupo controle negativo apresentou contração de fechamento de ferida de $32,75\% \pm 3,53$.

Anteriormente o PgEO demonstrou que apresenta a capacidade de modular a resposta inflamatória (Costa et al., 2022), a composição do óleo essencial e seus componentes majoritários, como 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno, que desempenharam um papel significativo na condução da atividade anti-inflamatória, provavelmente são a causa da eficiência de cicatrização mais rápida do PgEO-gel.

Mohammed et al. (2022) produziram uma pomada contendo o 1,8-cineol que acelerou a cicatrização de feridas de queimaduras, além de exercer efeitos

antioxidantes e anti-inflamatórios. O reparo da ferida pode ter sido estimulado pela regulação da resposta inflamatória, essa fase da cicatrização é conhecida por controlar a proliferação e a síntese de colágeno e de fibroblastos, produção de tecido de granulação da ferida e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos no tecido de granulação (Rezvani Ghomi et al., 2019). Ainda mais, os componentes majoritários presentes no PgEO foram identificados como agentes anti-inflamatórios que inibem diversos fatores envolvidos na inflamação (Khoshnazar et al., 2019; Zhang et al., 2020; Santos et al., 2022).

As citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α são liberadas em grandes quantidades em resposta ao dano tecidual, o que lhes permite desempenhar um papel significativo na resposta inflamatória e diminuem gradualmente com o progresso do processo de cicatrização (Landén, Li, Ståhle 2016; Arabska et al., 2020). Diante disso avaliamos a influência do PgEO-gel nos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Os resultados apresentados na Figura 2 demonstram que o tratamento com PgEO gel foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α em 48,17%, já IL-1 β apresentou redução de 43,79%. FitoScar® reduziu TNF- α e IL-1 β em 48,29% e 35,00%, respectivamente.

O nível de IL-1 β e TNF- α foi significativamente restaurado pelo tratamento dos animais por 14 dias com PgEO gel, demonstrando melhora notável na inflamação com aplicação tópica. Esses resultados são consistentes com pesquisas publicadas anteriormente utilizando o PgEO, em que os valores de IL-1 β e TNF- α diminuíram com tratamento oral, atenuando a condição inflamatória (Costa et al., 2022). Essa diminuição pode ser efeito da presença do 1,8-cineol, pois em pesquisa realizada por Ehrnhofer-Ressler et al. (2013), 1,8-cineol foi aplicado sobre monócitos estimulados com LPS na concentração de 1,5 μ g/mL, os resultados revelaram queda considerável dos níveis de TNF- e IL-1 β , com redução de 99 e 84%, respectivamente.

Para avaliar o envolvimento do tratamento de PgEO-gel na modulação do perfil oxidativo, foram avaliados os níveis plasmáticos de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Malondialdeído (MDA). Os resultados dos parâmetros do estresse oxidativo medidos estão resumidos na Tabela 2. Após 14 dias de tratamento com PgEO-gel um aumento significativo dos níveis de CAT (294,11%) e SOD (220,86%) e redução dos níveis de MDA (27,90%). Resultados semelhantes foram observados no grupo tratado com FitoScar® (CAT: 370,58%; SOD: 211,73% e MDA (26,13%). No entanto, a menor atividade antioxidante foi observada no grupo controle negativo.

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e de espécies reativas de oxigênio assumindo um papel negativo no processo de reparação de feridas. Assim, medir a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e CAT é importante, por promover redução dos radicais livres (Andjić et al., 2022; Mohammed et al., 2022). Os resultados do presente estudo relataram que PgEO gel possui efeitos antioxidantes possivelmente pela presença de componentes ativos como os terpenos, que exercem atividade antioxidante e capacidade de reparação de feridas.

Em um estudo anterior, 1,8-cineol e α -pineno protegeram as células PC12 (feocromocitoma de rato) contra danos oxidativos induzidos por peróxido de hidrogênio, reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular enquanto aumentavam significativamente a expressão de enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (Porres-Martínez et al., 2016).

Conclusão

Os achados deste estudo mostram que o gel contendo óleo essencial de *P. glaziovianum* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. Além disso, os resultados indicam que o tratamento com PgEO-gel melhora a reparação de feridas cutâneas possivelmente por ação anti-inflamatória e estimuladora de enzimas antioxidantes. Adicionalmente, o gel apresentou baixa toxicidade em eritrócitos e irritação dérmica, o que pode ser encorajador para novos ensaios pré-clínicos e clínicos em diferentes tipos de feridas.

Referências

- Alanazi, A. K., Alqasmi, M. H., Alrouji, M., Kuriri, F. A., Almuhanha, Y., Joseph, B., & Asad, M. (2022). Antibacterial Activity of *Syzygium aromaticum* (Clove) Bud Oil and Its Interaction with Imipenem in Controlling Wound Infections in Rats Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 27(23), 8551.
- Alves-Silva, J. M., Zuzarte, M., Goncalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2019). Unveiling the bioactive potential of the essential oil of a Portuguese endemism, *Santolina impressa*. *Journal of ethnopharmacology*, 244, 112120.

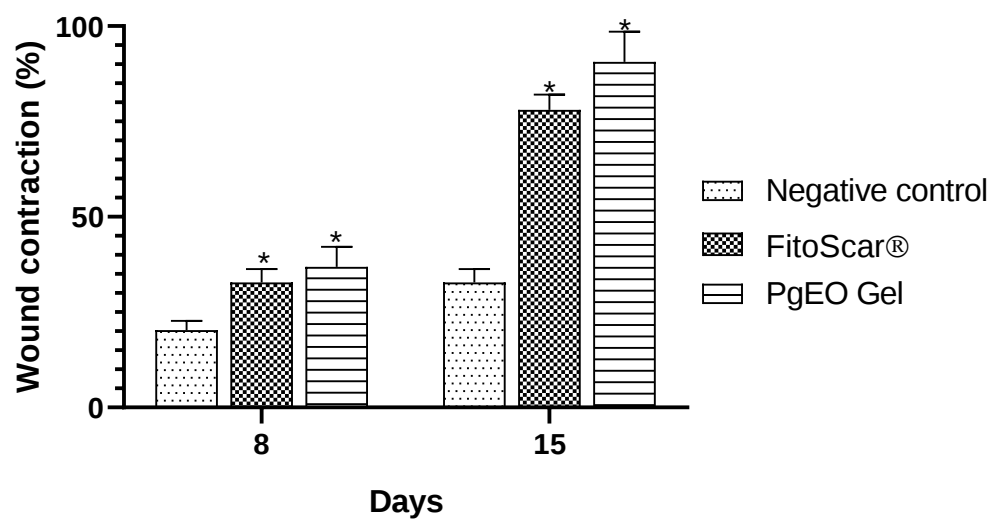
- Andjić, M., Draginić, N., Kočović, A., Jeremić, J., Vučićević, K., Jeremić, N., ... & Bradić, J. (2022). Immortelle essential oil-based ointment improves wound healing in a diabetic rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 112941.
- Arabska, J., Strzelecki, D., Kozłowska, E., Brzezińska-Błaszczuk, E., & Wysokiński, A. (2020). The association between serum levels of TNF- α and IL-6 in schizophrenic patients and their metabolic status—A case control study. *Journal of Neuroimmunology*, 347, 577344.
- Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol chem*, 195(1), 133-140.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Boudjelal, A., Smeriglio, A., Ginestra, G., Denaro, M., & Trombetta, D. (2020). Phytochemical profile, safety assessment and wound healing activity of *Artemisia absinthium* L. *Plants*, 9(12), 1744.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI supplement M60. Wayne, PA: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100.
- Costa, W. K., de Oliveira, J. R. S., de Oliveira, A. M., da Silva Santos, I. B., da Cunha, R. X., de Freitas, A. F. S., ... & da Silva, M. V. (2020). Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Industrial Crops and Products*, 144, 112059.
- Costa, W. K., do Nascimento, M. F., Dos Santos, C. R. B., do Amaral Ferraz Navarro, D. M., Napoleão, T. H., dos Santos Correia, M. T., ... & da Silva, M. V. (2022). Oral administration of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves alleviates pain and inflammation in mice. *Inflammopharmacology*, 30(2), 599-607.
- Costa, W. K., do Nascimento, M. F., Barbosa, É. L. S., dos Santos Souza, T. G., Chagas, C. A., Napoleão, T. H., ... & da Silva, M. V. (2023). Cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity evaluation of essential oil from *Psidium glaziovianum* Kiaersk leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 303, 115955.

- Dantas, M. G. B., Reis, S. A. G. B., Damasceno, C. M. D., Rolim, L. A., Rolim-Neto, P. J., Carvalho, F. O., ... & Almeida, J. R. G. D. S. (2016). Development and evaluation of stability of a gel formulation containing the monoterpene borneol. *The Scientific World Journal*, 2016.
- Ehrnhöfer-Ressler, M. M., Fricke, K., Pignitter, M., Walker, J. M., Walker, J., Rychlik, M., & Somoza, V. (2013). Identification of 1, 8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(14), 3451-3459.
- Farahpour, M. R., Pirkhezer, E., Ashrafi, A., & Sonboli, A. (2020). Accelerated healing by topical administration of *Salvia officinalis* essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infected wound model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110120.
- Freitas, P. R., de Araújo, A. C. J., Barbosa, C. R., Muniz, D. F., Tintino, S. R., Ribeiro-Filho, J., ... & Coutinho, H. D. (2021). Inhibition of Efflux Pumps by Monoterpene (α -Pinene) and impact on *Staphylococcus aureus* Resistance to Tetracycline and Erythromycin. *Current Drug Metabolism*, 22(2), 123-126.
- Joughi, N. F. G., Farahpour, M. R., Mohammadi, M., Jafarirad, S., & Mahmazi, S. (2022). Investigation on the antibacterial properties and rapid infected wound healing activity of silver/laterite/chitosan nanocomposites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.
- Juergens, U. R. (2014). Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Research*, 64(12), 638-646.
- Karadzovska, D., Brooks, J. D., Monteiro-Riviere, N. A., & Riviere, J. E. (2013). Predicting skin permeability from complex vehicles. *Advanced drug delivery reviews*, 65(2), 265-277.
- Kazemi, M., Mohammadifar, M., Aghadavoud, E., Vakili, Z., Aarabi, M. H., & Talaei, S. A. (2020). Deep skin wound healing potential of lavender essential oil and licorice extract in a nanoemulsion form: Biochemical, histopathological and gene expression evidences. *Journal of tissue viability*, 29(2), 116-124.
- Khoshnazar, M., Bigdeli, M. R., Parvardeh, S., & Pouriran, R. (2019). Attenuating effect of α -pinene on neurobehavioural deficit, oxidative damage and inflammatory response following focal ischaemic stroke in rat. *Journal of Pharmacy and*

- Pharmacology, 71(11), 1725-1733.
- Landén, N. X., Li, D., & Ståhle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(20), 3861-3885.
- Landrum, L. R. (2017). The genus *Psidium* (Myrtaceae) in the state of Bahia, Brazil. Herbarium, Natural History Collections, School of Life Sciences, Arizona State University.
- Li, L., Li, Z. W., Yin, Z. Q., Wei, Q., Jia, R. Y., Zhou, L. J., ... & Yu, W. (2014). Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(7), 1721.
- Li, L., He, M., Fang, C., Zhang, Y., Wang, Y., Song, X., ... & Yin, Z. (2022). Preparation, characterization, *ex vivo* transdermal properties and skin irritation evaluation of 1, 8-cineole nanoemulsion gel. *International Journal of Pharmaceutics*, 624, 121982.
- Mandras, N., Roana, J., Scalas, D., Del Re, S., Cavallo, L., Ghisetti, V., & Tullio, V. (2021). The inhibition of non-albicans candida species and uncommon yeast pathogens by selected essential oils and their major compounds. *Molecules*, 26(16), 4937.
- Mohammed, H. A., Mohammed, S. A., Khan, O., & Ali, H. M. (2022). Topical Eucalyptol Ointment Accelerates Wound Healing and Exerts Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in Rats' Skin Burn Model. *Journal of Oleo Science*, 71(12), 1777-1788.
- OECD (2002), Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070622-en>.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2016). *In vitro* neuroprotective potential of the monoterpenes α -pinene and 1, 8-cineole against H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(7-8), 191-199.
- Rezvani Ghomi, E., Khalili, S., Nouri Khorasani, S., Esmaeely Neisiany, R., & Ramakrishna, S. (2019). Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(27), 47738.

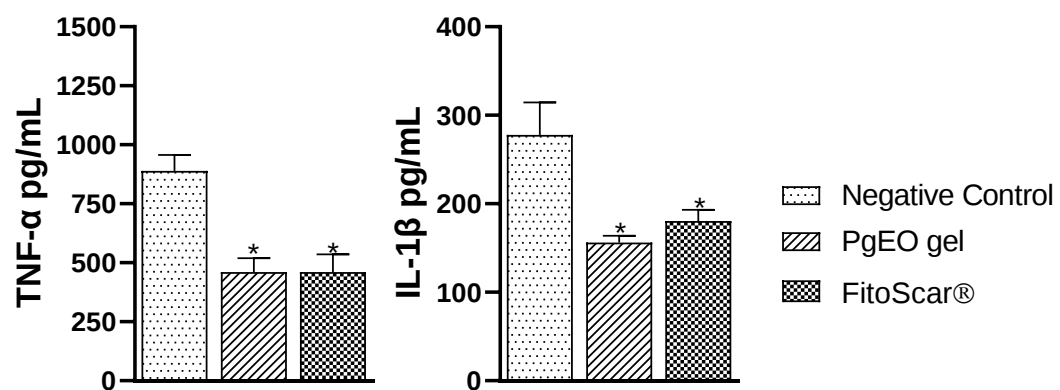
- Salas-Oropeza, J., Jimenez-Estrada, M., Perez-Torres, A., Castell-Rodriguez, A. E., Becerril-Millan, R., Rodriguez-Monroy, M. A., & Canales-Martinez, M. M. (2020). Wound healing activity of the essential oil of *Bursera morelensis*, in mice. *Molecules*, 25(8), 1795.
- Santos, E. S., Abrantes Coelho, G. L., Saraiva Fontes Loula, Y. K., Saraiva Landim, B. L., Fernandes Lima, C. N., Tavares de Sousa Machado, S., ... & Kerntopf, M. R. (2022). Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022.
- Saporito, F., Sandri, G., Bonferoni, M. C., Rossi, S., Boselli, C., Cornaglia, A. I., ... & Ferrari, F. (2018). Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. *International journal of nanomedicine*, 13, 175.
- Silva Rivas, A. C., Lopes, P. M., de Azevedo Barros, M. M., Costa Machado, D. C., Alviano, C. S., & Alviano, D. S. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-6316.
- Sousa Eduardo, L., Farias, T. C., Ferreira, S. B., Ferreira, P. B., Lima, Z. N., & Ferreira, S. B. (2018). Antibacterial Activity and Time-kill Kinetics of Positive Enantiomer of α -pinene Against Strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(11), 917-924.
- Wang, H., Liu, Y., Cai, K., Zhang, B., Tang, S., Zhang, W., & Liu, W. (2021). Antibacterial polysaccharide-based hydrogel dressing containing plant essential oil for burn wound healing. *Burns & trauma*, 9.
- Zhang, B., Wang, H., Yang, Z., Cao, M., Wang, K., Wang, G., & Zhao, Y. (2020). Protective effect of alpha-pinene against isoproterenol-induced myocardial infarction through NF- κ B signaling pathway. *Human & Experimental Toxicology*, 39(12), 1596-1606.

Figura 1: Efeitos do tratamento com PgEO gel na contração da ferida em camundongos.



Os valores representam a média $\pm$ SEM ($n = 8/\text{grupo}$). (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o controle.

Figura 2: Efeito do tratamento com PgEO gel nos níveis de TNF- α e IL-1 β .



Os valores representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em comparação com o controle, análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Dunnett

Tabela 1: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (MMC) do PgEO e do gel contendo PgEO.

Cepas	PgEO (µg/mL)		PgEO Gel (µg/mL)		Amp (µg/mL)	Flu (µg/mL)
	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MIC
Gram-positiva						
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	256	256	512	512	0,5	-
<i>S. aureus</i> UFPEDA 670	256	256	512	1024	4	-
<i>S. epidermidis</i> UFPEDA 183	256	512	512	1024	4	-
<i>E. faecalis</i> UFPEDA 138	256	512	512	1024	1	-
Gram-negativa						
<i>E. coli</i> ATCC 25922	256	1024	1024	1024	4	-
<i>E. coli</i> UFPEDA 224	256	1024	1024	1024	4	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	512	1024	1024	2048	4	-
<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA 396	1024	1024	1024	2048	8	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	512	1024	>2048	>2048	>128	-
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 416	1024	2048	>2048	>2048	>128	-
<i>P. mirabilis</i> UFPEDA 737	512	1024	1024	2048	4	-
Levedura						
<i>C. albicans</i> URM 5852	512	1024	1024	2048	-	0,5
<i>C. krusei</i> URM 6391	512	1024	1024	2048	-	0,25
<i>C. glabrata</i> URM 6343	1024	1024	2048	>2048	-	1
<i>C. tropicalis</i> URM 6557	1024	1024	2048	>2048	-	1
<i>C. parapsilosis</i> URM 6711	1024	1024	2048	>2048	-	2

MIC: concentração inibitória mínima; MMC: concentração mínima microbicida. Amp: Ampicilina; Gripe: Fluconazol.

Tabela 2: Efeito do tratamento com PgEO gel nos níveis de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em camundongos.

Parameter	Negative Control	PgEO gel	FitoScar®
MDA	6.81±0.66	4.91±0.51*	5.03±0.30*
SOD	2.30±0.35	5.08±0.65*	4.87±0.43*
CAT	0.17±0.09	0.51±0.08*	0.63±0.09*

Malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os valores representam a média $\pm$ SEM (n = 8/grupo). (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o controle.

5 CONCLUSÕES

A cromatografia gasosa com espectrometria de massa mostrou que 1,8-cineol (24,29%), α -pineno (19,73%) e β -pineno (17,31%) dominaram o PgEO. Na avaliação de segurança de uso os eritrócitos de camundongos demonstraram hemólise moderada (0,33% a 1,78%) quando tratados com PgEO. Já na toxicidade oral aguda PgEO causou alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas com o tratamento de 5.000 mg/kg, mas não com 2.000 mg/kg. Na genotoxicidade 5.000 mg/kg promoveu aumento nos índices e frequência de danos de células sanguíneas nucleadas. PgEO (250, 500 ou 1000 mg/kg) não afetou aos parâmetros hematológicos, bioquímicos, urinários ou histopatológica em ambos os sexos após 28 dias de tratamento no teste de toxicidade subaguda. Em comparação com os controles, os animais demonstraram uma diminuição dependente da dose na glicose no sangue e um aumento na SOD e CAT no baço e no fígado. Ao longo de 28 dias de tratamento a atividade motora e exploratória dos camundongos não se alterou. O PgEO (25, 50 e 100 mg/kg) diminuiu as contorções abdominais causadas pelo ácido acético, o tempo de lambertura em ambas as etapas do teste da formalina e o tempo de latência nos testes térmicos. O mecanismo analgésico incluiu as vias opioidérgica e muscarínica. O efeito anti-inflamatório do PgEO (25, 50 e 100 mg/kg) reduziu o edema da pata em até 89,23%, diminuiu leucócitos, neutrófilos, TNF- α e IL-1 β no teste de peritonite, e reduziu o peso do granuloma. PgEO (50 e 100 mg/kg) diminuiu as alterações osteoarticulares, edema, citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo na inflamação crônica induzida por CFA. E o gel de PgEO (1%) também inibiu bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos. Usando o sistema redox e citocinas inflamatórias, o gel reduziu feridas experimentais em camundongos. Esta pesquisa mostra que o PgEO é seguro em grandes doses, apresenta baixa toxicidade quando administrados por até 28 dias. Além disso, o PgEO tem propriedades antinociceptiva, antiinflamatória, antimicrobiana e cicatrizantes.

REFERÊNCIAS

- ABU-DARWISH, Mohammad S.; EFFERTH, Thomas. Medicinal plants from near east for cancer therapy. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 56, 2018.
- AGUIAR, G. P. et al. Antifungal activity of the essential oils of *Plectranthus neochilus* (Lamiaceae) and *Tagetes erecta* (Asteraceae) cultivated in Brazil. **Int J Complement Alt Med**, v. 11, n. 1, p. 00343, 2018.
- AL-SNAFI, Ali Esmail. Arabian medicinal plants with anti-inflammatory effects-plant based review (part 1). **Journal of Pharmacy**, v. 8, n. 7, p. 55-100, 2018.
- ALABI, Akinyinka O. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of an aqueous extract of blended leaves of *Ocimum gratissimum* and *Psidium guajava*. **Clinical Phytoscience**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2019.
- ALBUQUERQUE, Bianca R. et al. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.
- ALMEIDA LOPES, Mônica M.; OLIVEIRA SILVA, Ebenezer. Araça—*Psidium cattleianum* Sabine. In: Exotic Fruits. Academic Press, 2018. p. 31-36.
- ATEBA, Sylvain Benjamin; NJAMEN, Dieudonné; KRENN, Liselotte. The genus *Eriosema* (Fabaceae): From the ethnopharmacology to an evidence-based Phyto therapeutic perspective. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.
- BABATOLA, Leye Jonathan; OBOH, Ganiyu. Extract of varieties of guava (*Psidium guajava* L.) leaf modulate angiotensin-1-converting enzyme gene expression in cyclosporine-induced hypertensive rats. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100045, 2021.
- BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. 2011. 2017.
- BANERJEE, Aditya; ROYCHOUDHURY, Aryadeep. Effect of salinity stress on growth and physiology of medicinal plants. In: **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. Springer, Cham, 2017. p. 177-188.
- BATIHA, Gaber El-Saber et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, 2020.
- BEIDOKHTI, Maliheh N. et al. Evaluation of the antidiabetic potential of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) using assays for α -glucosidase, α -amylase, muscle glucose uptake, liver glucose production, and triglyceride accumulation in adipocytes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 257, p. 112877, 2020.
- BIANCHI, Marco E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.

BIFFIN, Ed et al. Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy-fruited Myrtaceae. **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 79-93, 2010.

BINDU, Samik; MAZUMDER, Somnath; BANDYOPADHYAY, Uday. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, p. 114147, 2020.

BJARNASON, Ingvar et al. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Gastroenterology**, v. 154, n. 3, p. 500-514, 2018.

BLANCO, Lilian; THIAGARAJAN, Thippi. Ethno-botanical study of medicinal plants used by the Yucatec maya in the northern district of Belize. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 5, p. 33-42, 2017.

BONDANCIA, Thalita J. et al. A new approach to obtain cellulose nanocrystals and ethanol from eucalyptus cellulose pulp via the biochemical pathway. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 4, p. 1085-1095, 2017.

BORGES, Cristine Vanz et al. Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. In: **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. Springer, Cham, 2017. p. 259-277.

BOSTAN, Hasan Badie; MEHRI, Soghra; HOSSEINZADEH, Hossein. Toxicology effects of saffron and its constituents: a review. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 20, n. 2, p. 110, 2017.

BUBALO, Marina Cvjetko et al. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 52-73, 2018.

CAÑEDO-DORANTES, Luis; CAÑEDO-AYALA, Mara. Skin acute wound healing: a comprehensive review. **International journal of inflammation**, v. 2019, 2019.

CARVALHO JÚNIOR, Alexsander R. et al. Use of some asteraceae plants for the treatment of wounds: from ethnopharmacological studies to scientific evidences. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 784, 2018.

CASCAES, Márcia Moraes et al. Constituents and pharmacological activities of Myrcia (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881-23904, 2015.

CASTANHEIRA, Fernanda VS; KUBES, Paul. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.

CERAVOLO, I. P. et al. *Aspidosperma pyrifolium*, a medicinal plant from the Brazilian caatinga, displays a high antiplasmodial activity and low cytotoxicity. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-11, 26 nov. 2018.

CHANDEL, Nisha et al. Guava nectar as a refreshing beverage an overall. **Plant Archives**, v. 18, n. 1, p. 1163-1169, 2018.

CHEN, Linlin et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204, 2018.

CHEN, Shujuan et al. A review of the ethnobotanical value, phytochemistry, pharmacology, toxicity and quality control of *Tussilago farfara* L.(coltsfoot). **Journal of Ethnopharmacology**, p. 113478, 2020.

CHRISTENHUSZ, Maarten JM; BYNG, James W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.

CHOUBIN, B. et al. An ensemble forecast of semi-arid rainfall using large-scale climate predictors. **Meteorological Applications**, v. 24, n. 3, p. 376-386, 2017.

CHOUDHARY, Madan Lal et al. Evaluation of guava (*Psidium guajava* L.) varieties and standardization of recipe for nectar preparation. **Journal of Horticultural Sciences**, v. 3, n. 2, p. 161-163, 2008.

COOKE, John P. Inflammation and its role in regeneration and repair: A caution for novel anti-inflammatory therapies. **Circulation research**, v. 124, n. 8, p. 1166-1168, 2019.

COSTA, G. et al. Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery. *Curr. Med. Chem.*, v.19, p. 2876-2900. 2012.

COSTA, Wendeo Kennedy et al. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112059, 2020.

DAVID, Bruna A.; KUBES, Paul. Exploring the complex role of chemokines and chemoattractants in vivo on leukocyte dynamics. **Immunological reviews**, v. 289, n. 1, p. 9-30, 2019

DELORINO, Sarah B. Histologic Property of *Psidium guajava* Linn Guava Leaf Extract in Wound. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**, v. 7, n. 11, p. 1385-1391, 2020.

DEYNO, Serawit et al. Acute and sub-acute toxicity of *Echinops kebericho* decoction in rats. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2020.

DONADO-PESTANA, Carlos M. et al. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current opinion in food science**, v. 19, p. 42-49, 2018.

DUTTA, Trishala et al. Pharmacological evidence for the use of *Cissus assamica* as a medicinal plant in the management of pain and pyrexia. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 21, p. 100715, 2020.

ELIAS, Abayneh et al. The effect of ethanol *Psidium guajava* leaf extract on KCl induced contracted aortic tissues of guinea pigs. **J Dis Med Plants**, v. 3, p. 7-11, 2017.

ELLIS, Samantha; LIN, Elaine J.; TARTAR, Danielle. Immunology of wound healing. **Current dermatology reports**, v. 7, n. 4, p. 350-358, 2018.

FIRDOUS, Sayeed Mohammed; SAUTYA, Dippayan. Medicinal plants with wound healing potential. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 41-52, 2018.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq.*, v. 18, n. especial, 2011.

FOROUZANFAR, Fatemeh; HOSSEINZADEH, Hossein. Medicinal herbs in the treatment of neuropathic pain: a review. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 21, n. 4, p. 347, 2018.

FREZZA, Claudio et al. Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology, and nutraceuticals of Lamiaceae. In: **Studies in natural products chemistry**. Elsevier, 2019. p. 125-178.

GOLDONI, Fernanda Capitanio et al. Effects of *Eugenia umbelliflora* O. Berg (Myrtaceae)-leaf extract on inflammation and hypersensitivity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 244, p. 112133, 2019.

GOVAERTS, Rafaël et al. **World checklist of Myrtaceae**. Royal Botanic Gardens, 2008.

GUTIÉRREZ, Rosa Martha Pérez; MITCHELL, Sylvia; SOLIS, Rosario Vargas. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.

HAKAMADA, Rodrigo et al. Biomass production and potential water stress increase with planting density in four highly productive clonal Eucalyptus genotypes. **Southern Forests: A Journal of Forest Science**, v. 79, n. 3, p. 251-257, 2017.

HAMIDZADEH, Kajal et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation. **Annual review of physiology**, v. 79, p. 567-592, 2017.

HARTUNG, Thomas. Evolution of toxicological science: the need for change. **International Journal of Risk Assessment and Management**, v. 20, n. 1-3, p. 21-45, 2017.

HELFAND W.H. COWEN D.L. *Pharmacy – an illustrated history*, Harry N. Abrams, New York, 1990.

HIRUDKAR, Jayshri R. et al. The antidiarrhoeal evaluation of *Psidium guajava* L. against enteropathogenic *Escherichia coli* induced infectious diarrhoea. **Journal of ethnopharmacology**, v. 251, p. 112561, 2020.

HOTTA, Santanu Kumar; NEELIMA, N. In Vitro Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Methanolic and Ethanolic Leaf Extract of *Psidium guajava*. **World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research**, p. 159-165, 2020.

HUSSEIN, Rehab A.; EL-ANSSARY, Amira A. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. **Herbal medicine**, v. 1, p. 13, 2019.

ILOKA, Ogechukwu Celestina. Anti-Diabetic Effect of White *Psidium guajava* Linnaeus Fruit Purée in Alloxan-Induced Diabetic Rats. 2017. Tese de Doutorado.

JAIN, Nem Kumar et al. Formulation and evaluation of polyherbal aqueous gel from *Psidium guajava*, *Piper betel* and *Glycerrhiza glabra* extract for mouth ulcer treatment. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 12, n. 3, p. 145-148, 2020.

JAMSHIDI-KIA, Fatemeh; LORIGOOINI, Zahra; AMINI-KHOEI, Hossein. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of herbmed pharmacology**, v. 7, n. 1, 2018.

JAYAKUMARI, S. Formulation and evaluation of herbal gel from tannin-enriched fraction of *Psidium guajava* Linn. leaves for diabetic wound healing. **International Journal of Green Pharmacy (IJGP)**, v. 12, n. 03, 2018.

JIE, Chen; CRAVEN, Lyn A. Taxonomic notes on some Myrtaceae of China. **Harvard Papers in Botany**, v. 11, n. 1, p. 25-28, 2006.

JOHNSON III, Bobby L. et al. Neutrophil derived microparticles increase mortality and the counter-inflammatory response in a murine model of sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 10, p. 2554-2563, 2017.

JUVIK, O. et al. Non-Polar Natural Products from *Bromelia laciniosa*, *Neoglaziovia variegata* and *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae). **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.1-13, 6 set. 2017. MDPI AG.

KAFLE, Arjun et al. A review on medicinal properties on *Psidium guajava*. **J Med Plants Stud**, v. 6, p. 44-47, 2018.

KAKUO, Shingo et al. Effects of *Psidium guajava* Linn. leaf extract in Japanese subjects with knee pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel pilot study. **Aging clinical and experimental research**, v. 30, n. 11, p. 1391-1398, 2018.

KORIEM, Khaled MM; ARBID, Mahmoud S.; SALEH, Hend N. Antidiarrheal and protein conservative activities of *Psidium guajava* in diarrheal rats. **Journal of integrative medicine**, v. 17, n. 1, p. 57-65, 2019.

KUETE, Victor. Toxicological survey of African medicinal plants. 2014.

KULINSKY, V. I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 6, p. 595-607, 2007.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Robbins basic pathology e-book**. Elsevier Health Sciences, 2017.

LANDAZURI, Patricia; CHAMORRO, Nelsy Loango; CORTES, Beatriz Restrepo. Ethnopharmacology of Wild Plants Used in Diabetes. In: **Ethnopharmacology of Wild Plants**. CRC Press, 2021. p. 65-78.

LANDRUM, Leslie R. Re-evaluation of *Psidium acutangulum* (Myrtaceae) and a new combination in *Psidium*. **Brittonia**, v. 68, n. 4, p. 409-417, 2016.

LANDRUM, Leslie R. **The genus *Psidium* (Myrtaceae) in the state of Bahia, Brazil**. Herbarium, Natural History Collections, School of Life Sciences, Arizona State University, 2017.

LAVAND'HOMME, Patricia. The progression from acute to chronic pain. *Current Opinion in Anesthesiology*, v. 24, n. 5, p. 545-550, 2011.

LESSA, Thainá et al. Known unknowns: Filling the gaps in scientific knowledge production in the Caatinga. **Plos one**, v. 14, n. 7, p. e0219359, 2019.

LIN, Chia-Fa et al. Quercetin-rich guava (*Psidium guajava*) juice in combination with trehalose reduces autophagy, apoptosis and pyroptosis formation in the kidney and pancreas of type II diabetic rats. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 334, 2016.

LIN, Li et al. Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): A review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 1, p. 19-48, 2018.

LINDSAY, Sharon; OATES, Angela; BOURDILLON, Katie. The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing. **International wound journal**, v. 14, n. 6, p. 1237-1247, 2017.

LU, Junjia et al. Changes of intestinal microflora diversity in diarrhea model of KM mice and effects of *Psidium guajava* L. as the treatment agent for diarrhea. **Journal of infection and public health**, v. 13, n. 1, p. 16-26, 2020.

LUFULUABO, Lufuluabo G. et al. A review on the Phytochemistry and Pharmacology of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and Future direction. **Discovery Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 7-13, 2018.

MACEDO, Julimery Gonçalves Ferreira et al. Therapeutic indications, chemical composition and biological activity of native Brazilian species from *Psidium* genus (Myrtaceae): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114248, 2021.

MACHABA, T. C.; MAHLO, S. M. Antifungal activity of medicinal plants used traditionally for the treatment of fungal infections and related ailments in South Africa. **International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 6, p. 395-400, 2017.

MARTÍNEZ, Cesar A.; MOSQUERA, Oscar M.; NIÑO, Jaime. Medicinal plants from the genus *Alchornea* (Euphorbiaceae): A review of their ethnopharmacology uses and phytochemistry. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 16, n. 3, p. 162-205, 2017.

MAXFIELD, Frederick R.; BARBOSA-LORENZI, Valeria C.; SINGH, Rajesh K. Digestive exophagy: phagocyte digestion of objects too large for phagocytosis. **Traffic**, v. 21, n. 1, p. 6-12, 2020.

MAZUTTI DA SILVA, Sandra Márcia et al. Wound healing effect of essential oil extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaves. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 2, 2019.

MCCOOK-RUSSELL, Kayanne P. et al. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1069-1073, 2012.

MCVAUGH, Rogers. The genera of American Myrtaceae: an interim report. **Taxon**, v. 17, n. 4, p. 354-418, 1968.

Ministério do Meio Ambiente - MMA. Caatinga. 2012. Disponível em: Acesso em: 12 de julho de 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Constituição (2006). Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (pnpic) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial, 03 maio 2006a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Constituição (2006). Aprova A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e Dá Outras Providências. Brasil, 22 jun. 2006b.

MOURA, Luiz Francisco Wemmenson Gonçalves et al. Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidoscolus* spp. (Euphorbiaceae): A comprehensive overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1670-1679, 2019.

MOURA, Naiara et al. Ensaios toxicológicos: Um estudo sobre a utilização de testes in vivo e in vitro. **Enciclopédia biosfera**, v. 8, n. 15, 2012.

MOURA, Osvanda Silva et al. Herbário COOE: Importância como ferramenta de estudo e conservação da biodiversidade vegetal de Rondônia. **EDUCamazônia**, v. 26, n. 1, p. 183-199, 2021.

MUÑOZ, Luis E. et al. Missing in action—the meaning of cell death in tissue damage and inflammation. **Immunological reviews**, v. 280, n. 1, p. 26-40, 2017.

NA, Yi Rang et al. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 9, p. 531-543, 2019.

NASCIMENTO, Kamilla Felipe et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 210, p. 351-358, 2018.

NDHLALA, Ashwell R. et al. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 609-621, 2013.

- OKHALE, Samuel Ehiabhi et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of the leaf essential oil of *Syzygium guineense* (Willd.) DC. var. *Guineense* (Myrtaceae) from Nigeria. **Int J Pharmacogn Phytochem Res**, v. 10, n. 11, p. 41-349, 2018.
- OLANIYAN, MATHEW FOLARANMI. Cholesterol lowering effect of guava leaves (*Psidium guajava*) extract on egg yolk induced hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Biology and Nature**, v. 7, n. 1, p. 24-27, 2017.
- OLIVEIRA, Alisson Macário et al. Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *Journal of ethnopharmacology*, v. 234, p. 96-105, 2019.
- OLIVEIRA BERNARDES, Carolina et al. Transferability of *Psidium* microsatellite loci in Myrteae (Myrtaceae): a phylogenetic signal. **Euphytica**, v. 214, n. 7, p. 1-11, 2018.
- OLOGUNDUDU, Foluso; IDRIS, OLADELE. Synergistic Potential of the Leaves of *Aspillia africana* (Compositae) and *Psidium guajava* (Myrtaceae) Against Some Selected Bacterial and Fungal Isolates. *Journal of Biomedicine and Translational Research*, v. 6, n. 2, p. 34-40, 2020.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 2008. OECD. Guideline 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. 2008.
- OSUNSANMI, Foluso O. et al. Antithrombotic, anticoagulant and antiplatelet activity of betulinic acid and 3 β -acetoxymbetulinic acid from *Melaleuca bracteata* 'Revolution Gold'(Myrtaceae) Muell leaf. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 10, p. 1983-1989, 2018.
- PAHWA, Roma et al. Chronic inflammation. 2018.
- PARKER, George A. Cells of the Immune System. In: **Immunopathology in Toxicology and Drug Development**. Humana Press, Cham, 2017. p. 95-201.
- PAULO FARIAS, David et al. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. **Food chemistry**, v. 306, p. 125630, 2020.
- PATHAK, Manish et al. Medicinal Plants Used in Treatment of Bronchitis. In: **Medicinal Plants for Lung Diseases**. Springer, Singapore, 2021. p. 369-389.
- PIKOULIS, Emmanouil A. et al. Trauma management in ancient Greece: value of surgical principles through the years. **World journal of surgery**, v. 28, n. 4, p. 425-430, 2004.
- PROENÇA, Carolyn Elinore Barnes et al. Two new endemic species of Myrtaceae and an anatomical novelty from the Highlands of Brazil. **Kew Bulletin**, v. 65, n. 3, p. 463-468, 2010.

PROENÇA, C.E.B. et al. 2020. *Myrtaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 17 maio 2021

QUEIROZ, Luciano Paganucci; RAPINI, Alessandro; GIULIETTI, Ana Maria. **Towards greater knowledge of the Brazilian Semi-arid Biodiversity**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006.

RAMALHO, M. F. de J. L. A fragilidade ambiental do Nordeste brasileiro: o clima semiárido e as imprevisões das grandes estiagens. **Sociedade e Território**, Natal, v. 25, n. 2, p.104-115, jul/dez. 2013.

RANG, et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 8ª edição. Elsevier Brasil, 2016.

RICARDO, Letícia M. et al. Plants from the Brazilian traditional medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 388-400, 2017.

RODRIGUES, Rodney Alexandre Ferreira et al. Chemical diversity and ethnopharmacological survey of South American medicinal and aromatic plant species. In: **Medicinal and Aromatic Plants of South America**. Springer, Dordrecht, 2018. p. 17-44.

ROMUALDO, Guilherme Ribeiro et al. Beneficial effects of anthocyanin-rich peels of Myrtaceae fruits on chemically-induced liver fibrosis and carcinogenesis in mice. **Food Research International**, v. 139, p. 109964, 2021.

SADIA, Sehrish et al. Ethnopharmacological profile of anti-arthritic plants of Asia-a systematic review. **Journal of herbal medicine**, v. 13, p. 8-25, 2018.

SAGAR, Narashans Alok et al. Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 512-531, 2018.

SAMAHA, Ali A. et al. Antihypertensive indigenous lebanese plants: ethnopharmacology and a clinical trial. **Biomolecules**, v. 9, n. 7, p. 292, 2019.

SALEHI, Bahare et al. Cucurbits plants: A key emphasis to its pharmacological potential. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1854, 2019.

SANTOS, Jean Carlos et al. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v. 4, n. 3, p. 276-286, 2011.

SANTOS, M. O. et al. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the Caatinga area, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], p.2766-2779, 19 jul. 2018. FapUNIFESP (SciELO).

SANTOS, Beatriz Mendes et al. Ethnopharmacology study of plants from Atlantic forest with leishmanicidal activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

SANTOS, Lucinéia et al. Medicinal plants of the Brazilian cerrado: Knowing to preserve. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, 2020a.

SANTOS, Izabelly Bianca da Silva et al. Antioxidant Action and In Vivo Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of *Myrciaria floribunda* Fruit Peels: Possible Involvement of Opioidergic System. **Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences**, v. 2020b.

SERAGLIO, Siluana Katia Tischer et al. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food chemistry**, v. 239, p. 649-656, 2018.

SERRA, Mariana Barreto et al. From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. **International Journal of Inflammation**, v. 2017, 2017.

SERUNJOI, David. Active phytochemicals present in the Guava Tree (*Psidium guajava*) leaf Extracts that grow in Uganda. **Student's Journal of Health Research Africa**, v. 1, n. 12, p. 6-6, 2020.

SHABAB, Sadegh; GHOLAMNEZHAD, Zahra; MAHMOUDABADY, Maryam. Protective effects of medicinal plant against diabetes induced cardiac disorder: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 113328, 2020.

SHEDOEVA, Aleksandra et al. Wound healing and the use of medicinal plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

SHENKIN, Alexander et al. The world's tallest tropical tree in three dimensions. **Frontiers in Forests and Global Change**, v. 2, p. 32, 2019.

SHETTY, Prerana et al. Wound Healing Potential of *Psidium guajava* var. *Pyrifera*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 12, n. 12, p. 6067-6070, 2019.

SHIH, Meng-Ling; MORGAN, John A. Metabolic flux analysis of secondary metabolism in plants. **Metabolic engineering communications**, v. 10, p. e00123, 2020.

SILVA, M. Rocha. A brief survey of the history of inflammation. **Agents and actions**, v. 8, n. 1, p. 45-49, 1978.

SILVA, Natália Cristina Sousa et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **Únicas cadernos acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017.

SILVA, José Maria Cardoso; LEAL, Inara R.; TABARELLI, Marcelo (Ed.). **Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America**. Springer, 2018.

SILVA, Adalberto José Araújo. POTENCIALIDADES MEDICINAIS DE *Jatropha gossypifolia* E *Cnidocolus phyllacanthus*. **Cadernos Macambira**, v. 5, n. 1, p. 17-18, 2020.

SILVA IGNACIO, Luís Henrique; DE ALMEIDA SANTOS, Pedro Eduardo; DUARTE, Carlos Antonio Ribeiro. An experimental assessment of *Eucalyptus urosemante*

energy potential for biomass production in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 103, p. 361-369, 2019.

SILVA PEREIRA, Maria das Graças; COELHO-FERREIRA, Márlia. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental, Abaetetuba, Pará. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 57-68, 2017.

SINGH, Shailendra; YOUNG, Alistair; MCNAUGHT, Clare-Ellen. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 35, n. 9, p. 473-477, 2017.

SOBEH, Mansour et al. Phenolic compounds from *Syzygium jambos* (Myrtaceae) exhibit distinct antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 41, p. 223-231, 2018.

SOEHNLEIN, Oliver et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 248-261, 2017.

SOMMER, Claudia; LEINDERS, Mathias; ÜÇEYLER, Nurcan. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. **Pain**, v. 159, n. 3, p. 595-602, 2018.

SOUSA, Rodrigo Francisco; OLIVEIRA, Ykaro Richard; CALOU, Iana Bantim Felício. Ansiedade: aspectos gerais e tratamento com enfoque nas plantas com potencial ansiolítico. 2018.

SOUZA SAMPAIO, Renata et al. Antinociceptive activity of the *Psidium brownianum* Mart ex DC. leaf essential oil in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 111053, 2020.

STEWART, Darryl; NICHOL, Alistair. Inflammation, immunity and allergy. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 19, n. 10, p. 534-539, 2018.

SUGIMOTO, Michelle A. et al. Mediators of the resolution of the inflammatory response. *Trends in Immunology*, v. 40, n. 3, p. 212-227, 2019.

SUNDARAM, S. Sarguna; SURESH, K. Medicinal plants used for the treatment of respiratory diseases in Alagar Hills of Madurai district, Tamil Nadu, India. **The Pharma Innovation Journal**, v. 8, n. 3, p. 35-37, 2019.

SYARIF, LELIMISKA IRMADANI et al. A mini review: Medicinal plants for typhoid fever in Indonesia. **Syst. Rev. Pharm**, v. 11, n. 6, p. 1171-80, 2020.

TAÏBI, Khaled et al. Ethnopharmacological study of natural products used for traditional cancer therapy in Algeria. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 11, p. 1451-1465, 2020.

TANWAR, Beenu; ANDALLU, B.; CHANDEL, Sanjeev. Influence of processing on physicochemical and nutritional composition of *Psidium guajava* L. (Guava) products. **International Journal of Agriculture and Food Science Technology**, v. 5, n. 2, p. 47-54, 2014.

TARIQ, A. et al. Ethnopharmacology and toxicology of Pakistani medicinal plants used to treat gynecological complaints and sexually transmitted infections. **South African Journal of Botany**, v. 114, p. 132-149, 2018.

TAUBEN, David. Nonopioid medications for pain. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics**, v. 26, n. 2, p. 219-248, 2015.

TONKENS, Ross. An overview of the drug development process. **Physician executive**, v. 31, n. 3, p. 48, 2005.

TROUVIN, Anne-Priscille; PERROT, Serge. Novos conceitos de dor. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 3, pág. 101415, 2019.

TULER, Amélia C. et al. Flora of Espírito Santo: Psidium (Myrtaceae). **Rodriguésia**, v. 68, p. 1791-1805, 2017.

TULER, A.C.; Proença, C.E.B.; Costa, I.R. 2020. *Psidium in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10853>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

TUNG MUNNITHUM, Duangjai et al. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.

UGWAH-OGUEJIOFOR, Chinenye Jane et al. Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* NE Brown in mice and rats. **Heliyon**, v. 5, n. 1, p. e01179, 2019.

URITU, Cristina M. et al. Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. **Pain Research and Management**, v. 2018, 2018.

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VANDERAH, Todd W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2007.

VIEIRA, Rita Marcia DSP et al. Desertification risk assessment in Northeast Brazil: Current trends and future scenarios. **Land Degradation & Development**, v. 32, n. 1, p. 224-240, 2021.

VILLARROEL, Daniel; GOMES-BEZERRA, Kadja M. New botanical discoveries of Myrtaceae from Bolivia and notes on *Psidium hians*. **Phytotaxa**, v. 195, n. 2, p. 163-170, 2015.

VINHOLES, Juliana et al. In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. **Food bioscience**, v. 19, p. 92-100, 2017.

VON WETTBERG, Eric; DAVIS, Thomas M.; SMÝKAL, Petr. Wild Plants as Source of New Crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1426, 2020.

WALFORD, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 10, p. 2112-2118, 2003.

WANG, Yiwei et al. Burn injury: challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Advanced drug delivery reviews*, v. 123, p. 3-17, 2018.

WATSON, L.; DALLWITZ, Michael J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. New Orleans, LA: University of New Orleans, 1999.

WEI, Lianbo; LI, Zhijun; CHEN, Baotian. Clinical study on treatment of infantile rotaviral enteritis with *Psidium guajava* L. **Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi= Chinese journal of integrated traditional and Western medicine**, v. 20, n. 12, p. 893-895, 2000.

WERTLI, Maria Monika; STEURER, J. Pain medications for acute and chronic low back pain. **Der Internist**, v. 59, n. 11, p. 1214-1223, 2018.

WIART, Christophe. **Medicinal Plants in Asia and Pacific for Parasitic Infections: Botany, Ethnopharmacology, Molecular Basis, and Future Prospect**. Academic Press, 2020.

WILSON, Peter G. et al. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

WILSON, P. G. The families and genera of vascular plants flowering plants. **Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae**, v. 10, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Quality control methods for medicinal plant materials. World Health Organization, Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva, 2011. 12p.

XU, Jiao et al. Acute and subacute toxicity study of 1, 8-cineole in mice. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 4, p. 1495, 2014.

YATOO, Mohd et al. Anti-inflammatory drugs and herbs with special emphasis on herbal medicines for countering inflammatory diseases and disorders-a review. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 12, n. 1, p. 39-58, 2018.

YOUSOUFOU, Ouedraogo et al. Vasorelaxant effects of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) aqueous leaf extract on rat aorta. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 6, p. 53-57, 2020.

ZHOU, Xingli et al. Nano-formulations for transdermal drug delivery: a review. **Chinese Chemical Letters**, v. 29, n. 12, p. 1713-1724, 2018.