

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

**PERFIL FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE  
ANTINOCICEPTIVA DE EXTRATO DE FOLHAS DE *Psidium guineense* Sw.**

**ÉDIPO LUCAS SOARES BARBOSA**

**RECIFE, 2022**

**ÉDIPO LUCAS SOARES BARBOSA**

**PERFIL FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE  
ANTINOCICEPTIVA DE EXTRATO DE FOLHAS DE *Psidium guineense* Sw.**

Dissertação de mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica e Fisiologia da Universidade  
Federal de Pernambuco como um dos  
requisitos obtenção do título de Mestre em  
Bioquímica e Fisiologia

**ORIENTADOR: PROF. DR. EMANUEL VIANA PONTUAL**

**COORIENTADOR: PROF. DR. ALISSON MACÁRIO DE OLIVEIRA**

**RECIFE, 2022**

**ÉDIPO LUCAS SOARES BARBOSA**

**PERFIL FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE EXTRATO DE FOLHAS DE *Psidium guineense* Sw.**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como um dos requisitos obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

PROF. DR. EMMANUEL VIANA PONTUAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE

---

PROFA. DRA. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE

---

PROF. DR. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE

---

PROFA. DRA. MAGDA RHAYANNY ASSUNÇÃO FERREIRA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, por estar sempre por perto, me dando forças para vencer todos os desafios.

Á minha família, que é minha maior motivação e meus maiores motivadores para todas minhas conquistas.

Aos meus orientadores, Emanuel Viana e Alisson Macário, pela paciência e por todo o aprendizado ao longo desse percurso.

Ao meu irmão e colega de profissão Wêndeo Costa, por todo incentivo e parceria nesses anos.

Á todos os meus amigos, que tornaram essa jornada mais leve, vocês sabem o quanto são importantes pra mim.

Á Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia pela oportunidade e investimento.

Á todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

- EMPg** - Extrato Metanólico de *Psidium guineense*  
**GHS** - Globally Harmonized Classification System  
**IASP** - Associação Internacional de Estudo da Dor  
**MSR** – Metodologias de Superfícies de Resposta  
**OECD**- Organisation for Economic co-operation and Development  
**OSM** – Organização Mundial da Saúde  
**PNPIC** - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares  
**RDC** – Resolução da Diretoria Colegiada  
**SUS** – Sistema Único de Saúde  
**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
**UFPE** – Universidade Federal de Pernambuco  
**LIKA** – Laboratório de Imunologia Keiso Assami  
**CEUA** – Comissão de Ética e Uso Animal  
**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1</b> – Folhas de <i>Psidium guineense</i> .....	17
<b>Figura 2</b> – Planejamento Fatorial.....	20
<b>Figura 3</b> – Administração por gavagem.....	23
<b>Figura 4</b> – Teste de Contorções Abdominais.....	26
<b>Figura 5</b> – Teste de Formalina.....	27
<b>Figura 6</b> – Teste de Imersão de cauda.....	28

### ARTIGO

<b>Figura 1</b> - Gráfico de Pareto e Superfície de resposta para o resíduo seco.....	41
<b>Figura 2</b> - Gráfico de Pareto e Superfície de resposta para o teor de polifenóis totais	42
<b>Figura 3</b> - Gráfico de Pareto e Superfície de resposta para a eficiência de extração...	42
<b>Figura 4</b> - Cromatograma obtido para o extrato otimizado de <i>P. guianeense</i> e espectro de varredura dos picos observados.....	44
<b>Figura 5</b> – Número de contorções dos grupos controle e dos tratados com as concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg do EMPg, 20mg/kg de indometacina e 10mg/kg de morfina.....	47
<b>Figura 6</b> - Tempo de lambadura da pata dos grupos controle e dos tratados com as concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg do EMPg, 20mg/kg de indometacina e 10mg/kg de morfina, 10mg/kg de morfina + naloxona e 100mg/kg do EMPg + naloxona.....	48
<b>Figura 7</b> - Tempo de latência dos grupos controle e dos tratados com as concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg do EMPg, e 10mg/kg de morfina.....	49

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 8

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 1

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 4

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 8

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 8

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 39

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 0

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 3

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 6

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Matriz do desenho experimental para avaliação do método extrativo, quantidade de droga e solvente.....	39	Excluídos[edipo lucas]: 8
<b>Tabela 2</b> – Análise estatística do desenho experimental.....	40	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
<b>Tabela 3</b> – Peso, consumo de água e ração de camundongos fêmeas tratados com doses de 2000mg/kg e 5000mg/kg do EMPg durante o ensaio de toxicidade aguda via oral. Os valores são expressos em média, (n=4) .....	45	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro Excluídos[edipo lucas]: 39
<b>Tabela 4</b> – Parâmetros hematológicos de camundongos do grupo controle e tratados com 2000 mg/kg com extrato otimizado de folhas de <i>P. guineense</i> .....	45	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros bioquímicos de camundongos do grupo controle e tratados com 2000 mg/kg com extrato otimizado de folhas de <i>P. guineense</i> .....	46	Excluídos[edipo lucas]: 4 Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
▲		Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
▲		Excluídos[edipo lucas]: 4 Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
		Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
		Excluídos[edipo lucas]: 5 Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
		Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
		Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

## RESUMO

Espécies do gênero *Psidium* têm sido relatadas como fonte de atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, citotóxica, antipirética e antioxidante. *Psidium guineense* (Myrtaceae), conhecida como “araçá”, é cultivada nas Américas do Norte, Central e do Sul. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o extrato metanólico de folhas de *P. guineense* (EMPg) quanto à composição fitoquímica, toxicidade *in vivo* e potencial antinociceptivo. As folhas secas foram trituradas e o pó foi analisado quanto de metabólitos secundários por cromatografia em camada delgada (CCD). Em seguida, um planejamento fatorial (2<sup>3</sup>) foi realizado para determinar o método mais eficiente de extração dos metabólitos secundários, utilizando como variáveis independentes o método extrativo (maceração ou turbólise), a massa de folhas (5 ou 10 g) e solvente (metanol 50% ou 100%, v/v). A preparação (EMPg) com maior eficiência de extração (razão entre o teor de fenóis e o resíduo seco) foi analisada por cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Em seguida, EMPg (2000mg/kg) foi investigado quanto à toxicidade aguda utilizando camundongos albinos Swiss e quanto à atividade antinociceptiva (25mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg) utilizando o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,1%) via intraperitoneal, o teste de formalina (2,5%) administrado na região subplantar da pata e o teste de imersão de cauda, via oral. O envolvimento do receptor de opioides no mecanismo da ação antinociceptiva de EMPg foi avaliado por pré-tratamento intraperitoneal dos animais com naloxona. A análise do pó de folhas de *P. guineense* por CCD revelou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas, taninos hidrolisáveis, açúcares e terpenos/esteroides. Maior eficiência de extração foi registrada para EMPg, obtido utilizando 5 g de folhas por maceração em metanol 50%. CLAE-DAD de EMPg indicou a presença de monômeros de taninos hidrolisáveis, ácido gálico, ácido elágico e flavonoides. O tratamento com EMPg não resultou em alterações significativas no peso dos animais e no consumo de água e ração, bem como nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. EMPg exibiu atividade analgésica, reduzindo o número de contorções abdominais e o tempo de lambertura da pata nas duas fases do teste de formalina. Adicionalmente, um aumento progressivo do tempo de latência no teste de imersão da cauda foi registrado. O pré-tratamento com naloxona reduziu o efeito antinociceptivo de EMPg, sugerindo o envolvimento do sistema opioide na ação antinociceptiva do extrato. Em conclusão, as folhas de *P. guineense* são fontes de metabólitos com potencial farmacológico por apresentar ação antinociceptiva em modelo *in vivo*, sem acarretar em toxicidade aguda.

Excluídos[Magda Ferreira]: a

Excluídos[Magda Ferreira]: n

Excluídos[Magda Ferreira]: c

Excluídos[Magda Ferreira]: s

Excluídos[Magda Ferreira]: Fo

Excluídos[Magda Ferreira]: ao conteúdo

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[Magda Ferreira]: proporção de

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

**Palavras-chave:** Atividade antinociceptiva; Araçá; Plantas medicinais; Sistema opióide.

### ABSTRACT

Species of the genus *Psidium* have been reported as a source of antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive, cytotoxic, antipyretic and antioxidant activity. *Psidium guineense* (Myrtaceae), known as “araçá”, is cultivated in North, Central and South America. The objective of this work was to characterize the methanolic extract of *P. guineense* leaves (EMPg) in terms of phytochemical composition, in vivo toxicity and antinociceptive potential. The dried leaves were ground and the powder analyzed for secondary metabolites by thin layer chromatography (TLC). Then, a factorial design (23) was carried out to determine the most efficient method of extraction of secondary metabolites, using as independent variables the extractive method (maceration or turbolysis), leaf mass (5 or 10 g) and solvent (methanol 50% or 100%, v/v). The preparation (EMPg) with the highest extraction efficiency (ratio between phenol content and dry residue) was analyzed by high performance chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). Next, EMPg (2000mg/kg) was investigated for acute toxicity using albino Swiss mice and for antinociceptive activity (25mg/kg, 50mg/kg and 100mg/kg) using the acetic acid-induced writhing test (0. 1%) intraperitoneally, the formalin test (2.5%) administered in the subplantar region of the paw and the tail immersion test, orally. The involvement of the opioid receptor in the mechanism of the antinociceptive action of EMPg was evaluated by intraperitoneal pretreatment of the animals with naloxone. Analysis of *P. guineense* leaf powder by TLC revealed the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, saponins, hydrolysable tannins, sugars and terpenes/steroids. Higher extraction efficiency was recorded for EMPg, obtained using 5 g of leaves by maceration in 50% methanol. HPLC-DAD of EMPg indicated the presence of hydrolyzable tannin monomers, gallic acid, ellagic acid and flavonoids. Treatment with EMPg did not result in significant changes in animal weight, water and feed intake, as well as hematological and biochemical parameters. EMPg exhibited analgesic activity, reducing the number of writhings and paw licking time in the two phases of the formalin test. Additionally, a progressive increase in latency time in the tail dipping test was recorded. Pretreatment with naloxone reduced the antinociceptive effect of EMPg, suggesting the involvement of the opioid system in the antinociceptive action of the extract. In conclusion, *P. guineense* leaves are sources of metabolites with pharmacological potential, as they have an antinociceptive action in an in vivo model, without causing acute toxicity.

Excluídos[edipo lucas]: Species of the genus *Psidium* have been reported as source of antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive, cytotoxic, antipyretic and antioxidant activities. *Psidium guineense* (Myrtaceae), known as “araçá”, is cultivated in North, Central and South American Countri ☹

Formatado[edipo lucas]: Justificado

**Key-words:** Antinociceptive activity; Araça; Acute toxicity; Medicinal plants; Opioid system.

Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Times New Roman,  
12 pt, English(Zimbabwe)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
2.1 Objetivo geral.....	13	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
2.2 Objetivos específicos.....	13	Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Calibri, 11 pt, Co ...
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
3.1 Plantas Medicinais.....	14	Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Calibri, 11 pt, Co ...
3.2 Gênero <i>Psidium</i> L.....	15	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
3.3 <i>Psidium guineense</i> Sw.....	16	Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Calibri, 11 pt, Co ...
3.4 <u>Extração de compostos vegetais</u> .....	18	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
3.5 Planejamento Fatorial.....	20	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
3.6 Estudos de Toxicidade.....	22	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
3.7 <u>Dor e Nociceção</u> .....	24	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>	Formatado[edipo lucas]: Fonte: Negrito, Cor da Fonte: Carro
Optimized extraction based on polyphenols from methanolic extract <i>Psidium guineense</i> leaves and evaluation of oral toxicity and antinociceptive effect in mice.....	29	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
<u>Abstract</u> .....	30	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
<u>1. Introdução</u> .....	31	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
<u>2. Materiais e Métodos</u> .....	32	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
3. Resultados.....	40	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
4. Discussão.....	51	Excluídos[edipo lucas]: <u>3.3 <i>Psidium guineense</i> Sw.</u> 17
<u>5. Conclusão</u> .....	54	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Referências.....	56	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Calibri, 11 pt, Co ...

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Calibri, 11 pt, Co ...

Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Calibri, 11 pt, Co ...

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Fonte: Negrito, Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Fonte: Negrito, Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 3.3 *Psidium guineense* Sw. 17

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: Perfil Fitoquímico

Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Calibri, 11 pt, Co ...

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 2.7 Dor e Nociceção 25

## 1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos são bens primordiais à saúde e **apresentam papel fundamental** na evolução da qualidade e expectativa de vida da sociedade. O Brasil é visto como um dos principais consumidores de produtos farmacêuticos, sendo a maioria dos fármacos consumidos nesse território caracterizados como medicamentos de venda livre, considerados “seguros” desde que utilizados com finalidade e forma recomendadas (MARINHO & MEIRELLES, 2021). Estudos têm demonstrado que pacientes utilizando opioides costumam não mais responder ao tratamento, desenvolvendo dependência química, além disso esses analgésicos acarretam vários efeitos adversos. Analgésicos de ação central geralmente não estão dissociados de efeitos adversos importantes, como gastrite, hepatite medicamentosa e hemorragia. Já os analgésicos de ação periférica também apresentam efeitos indesejáveis, tais como lesões do trato gastrointestinal e renal (HARKOUK, 2017; RIBEIRO; SCHMIDT; SCHMIDT, 2019).

A dependência que os analgésicos podem ocasionar, bem como sua alta toxicidade tornam o tratamento da dor muitas vezes limitado e, nesse contexto, as plantas medicinais têm se mostrado alternativas terapêuticas valiosas, uma vez que produzem substâncias capazes de interferir no funcionamento de órgãos e sistemas; adicionalmente, a flora brasileira é altamente diversificada em espécies quem têm sido relatadas como fontes promissoras para a busca de novos agentes com potencial farmacológico (SANTOS, 2017).

**Ao longo da história** o uso das plantas medicinais se deu pelas tribos primitivas. **Com o passar do tempo o homem** aprendeu a conhecê-las e a beneficiar-se das suas propriedades. As plantas representavam a maior e a mais importante fonte de substâncias medicamentosas para aliviar e curar os males, e esse conhecimento acerca dos seus efeitos curativos foi transmitido de geração a geração (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). As resoluções RDC nº 26 de 13/05/2014 (ANVISA, 2004), que tratam sobre o registro de fitoterápicos no Brasil, contribuíram com o aumento do número de publicações em etnofarmacologia, registrando-se as principais espécies popularmente utilizadas, tanto entre populações indígenas quanto urbanas, assim como a utilização de fitoterápicos (**produtos obtidos de plantas medicinais ou de seus derivados**) em farmácias comunitárias e no sistema de saúde.

**Em contraponto**, o uso milenar de plantas medicinais mostrou que determinadas plantas expressam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, algumas pesquisas mostraram que muitas dessas plantas podem ser tóxicas e devem ser

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: possuem

Excluídos[edipo lucas]: um papel importante

Excluídos[edipo lucas]: Historicamente

Excluídos[edipo lucas]: O homem moderno

Excluídos[edipo lucas]: 17

Excluídos[edipo lucas]: 24

Excluídos[edipo lucas]: 2

Excluídos[edipo lucas]: 00

Excluídos[edipo lucas]: e RDC nº 48 de 16/03/2004

Excluídos[Magda Ferreira]: em

Comentário[Magda Ferreira1]: Antigo...

Excluídos[edipo lucas]: O rico arsenal de produtos sintetizados pelas plantas é muitas vezes utilizado como terapia complementar a tratamentos instituídos, por influência de práticas milenares ou por relatos ao longo de gerações (MACHADO et al., 2014; JÜTTE et al., 2017; SZERWIESKI et al., 2017; WEGENER, 2017; DIAS et al., 2018). Contudo, um dos principais problemas da utilização destes produtos é a crença de que ingredientes de origem vegetal são isentos de reações adversas e efeitos tóxicos (GALLO & KOREN, 2001; CLARKE, 2007).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

utilizadas com cuidado, respeitando certas recomendações quanto à quantidade de material ingerido e forma de preparo (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

*Psidium guineense* Sw., conhecida popularmente como araçá, é um arbusto decíduo, com folhas cartáceas, apresentando inflorescência com duas ou cinco flores e fruto globoso com polpa suculenta, aromática e ácida. Sua ocorrência é descrita nas Américas do norte, central e do sul. Um estudo demonstrou a ação sinérgica do extrato [metanólico](#) de folhas de *P. guineense* que potencializou a ação de antimicrobianos comerciais contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes, acarretando uma redução de cerca de oito vezes no valor de concentração mínima inibitória (MIC) (FERNANDES et al., 2012). Outra investigação recente relata a atividade antimicrobiana do extrato de folhas *P. guineense* frente a *Klebsiella pneumoniae* (MACAÚBAS et al., 2021). A literatura relata ainda que o extrato [metanólico](#) de folhas de *P. guineense* pode conter compostos fenólicos, flavonoides, chalconas, fitoesteroides, derivados de tirosol e compostos de feoforbídeo, contudo é importante lembrar que a composição de metabólitos secundários pode ser alterada em função de condições climáticas, bem como relativas ao solo e à disponibilidade de água e nutrientes, e comumente obedece a uma sazonalidade (LIMA et al., 2020). Nesse sentido, este trabalho avaliou o extrato metanólico de folhas de *P. guineense* quanto à composição de metabólitos secundários, bem como quanto à toxicidade aguda para camundongos Swiss e potencial antinociceptivo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

▲ Determinar o perfil fitoquímico do extrato metanólico de folhas de *P. guineense*, bem como avaliar a sua toxicidade e potencial antinociceptivo em camundongos. ▼

| Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

| Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

| Excluídos[edipo lucas]: Caracterizar quimicamente

### 2.2 Objetivos específicos

- ▲
- Determinar o conteúdo de metabólitos secundários das folhas de *P. guineense*.
  - Desenvolver um planejamento fatorial para obtenção de extrato otimizado de folhas de *P. guineense*.
  - Acompanhar a eficiência da extração através do teor de fenóis e do resíduo seco.
  - Escolher o extrato de folhas de *P. guineense* que apresenta melhor rendimento e avalia-lo quanto:
    - Ao perfil fitoquímico.
    - À toxicidade aguda oral em camundongos Swiss;
    - À atividade antinociceptiva.
    - Ao mecanismo de ação antinociceptivo.

| Excluídos[Magda Ferreira]:

| Formatado[Magda Ferreira]: Recuo: Primeira Linha: 12.5 mm

| Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

| Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

| Excluídos[edipo lucas]: com maior eficiência de extração

| Excluídos[edipo lucas]:

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

#### 3.1 Plantas Medicinais

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

A riqueza de espécies medicinais brasileiras tem contribuído consideravelmente para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas por meio da identificação de metabólitos secundários, que apresentam atividade para várias doenças que afetam a saúde humana. (ZIVARPOUR et al., 2021). A natureza fornece ao homem uma enorme variedade de plantas com importante valor medicinal, e este conhecimento, antes baseado apenas em crenças, já apresenta bases científicas que o comprovam (YADAV, 2011). A dificuldade de assistência médica pela população, aliado ao alto custo dos medicamentos industrializados, estimulam uma tendência à utilização de produtos de origem natural, incluindo metabólitos de plantas, como recurso terapêutico (BADKE et al., 2012). Além disso, o uso de plantas medicinais é conhecido e aplicado em diversas culturas de todo o mundo de diversas formas. Isso mostra sua importância, principalmente, em lugares que o serviço de saúde não é acessível (PATRÍCIO et al., 2022). A identificação dos componentes vegetais ativos, bem como de seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a indústria farmacêutica, a bioquímica e a farmacologia. ↓

Excluídos[edipo lucas]: oferece

Excluídos[edipo lucas]: valores medicinais

Excluídos[edipo lucas]: hoje

Excluídos[edipo lucas]: tem

Excluídos[edipo lucas]: e em variadas formas

Excluídos[edipo lucas]: química

Comentário[Magda Ferreira2]: Ingredientes?

A fitoterapia ou os tratamentos de doenças desenvolvidos à base de plantas era uma prática natural desde os tempos mais remotos, sendo substituída em detrimento dos medicamentos obtidos sinteticamente. Atualmente, têm-se verificado o ressurgimento da medicina natural, tendo nas plantas medicinais uma opção para restabelecimento da saúde humana, possibilitando, assim, a valorização do saber popular e incentivando investigações científicas para verificar a sua veracidade (COLALTO et al., 2018; GOVERNA et al., 2018; AJEBLI et al., 2020).

Excluídos[edipo lucas]: Estes metabolitos dão base ao novo grupo de aditivos fitogênicos, provenientes principalmente de ervas e outras plantas de uso comum entre os seres humanos na substituição de antibióticos e ingredientes para manjeo nutricional e sanitário (FEITOZA et al, 2021).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

No Brasil, a Portaria nº 971/2006 que descreve a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) regulamenta o uso de matérias-primas vegetais. Essa portaria tem como objetivo a ampliação das opções terapêuticas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) com garantia de acesso a plantas medicinais, medicamentos fitoterápicos, sempre voltados à segurança, eficácia, qualidade e integralidade da atenção à saúde de todos os brasileiros.

A validação da utilização de preparações obtidas de espécies vegetais com potencial farmacológico envolve estudos multidisciplinares que promovam

investigações científicas para testar as propriedades terapêuticas empiricamente atribuídas às plantas através do uso popular. Esses estudos podem servir de base para a formulação de novas drogas fitoterápicas (SIMÕES et al., 2017; AMARAL et al., 2021).

### 3.2 Gênero *Psidium* L.

No Brasil, estão presentes os biomas mais ricos em diversidade vegetal do planeta, contando com mais de 55.000 espécies. Dentre essas espécies, destaca-se a família Myrtaceae, uma família pantropical com aproximadamente 132 gêneros e 5.970 espécies catalogados (WILSON et al., 2005; BFG et al., 2015; FLORA DO BRASIL, 2022) e distribuição preferencial nas zonas tropicais e subtropicais. É uma das famílias mais importantes nos neotrópicos que ocupa a terceira posição com maior riqueza de espécies arbóreas (BEECH et al., 2017).

A família Myrtaceae representa uma fonte potencial em metabólitos secundários, pois muitos de seus representantes possuem frutos fortemente apreciados, aplicações medicinais validadas por pesquisas científicas e as espécies são grandes produtoras de óleos essenciais (SUÁREZ; ULATE; CICCIO, 2000; FERNÁNDEZ et al., 2001; GARCÍA et al., 2004; PAULA et al., 2012). No que tange o uso na medicina tradicional, mirtáceas são empregadas principalmente em casos de distúrbios gastrointestinais, hemorrágicos, diabetes e doenças infecciosas. As partes mais usadas são as folhas, cascas e os frutos (SILVA e MAZINE, 2016).

Um estudo realizado por Cruz e Kaplan (2004) listou diversas espécies utilizadas na medicina popular no Brasil, e dentre elas 37 pertenciam à família Myrtaceae, das quais 45% foram relatadas pela população com efeito no tratamento de diarreia ou disenteria. Dentre os gêneros de Myrtaceae atualmente conhecidos, quatro destacam-se economicamente: *Eugenia*, *Acca*, *Myrciaria* e *Psidium*. Este último ocorre em áreas sob condições de estresse abióticos constantes, incluindo escassez de água e condições de temperaturas extremas (COELHO et al., 2004). *Psidium* apresenta diversos efeitos farmacológicos como atividades antimicrobianas, anti-inflamatória, antinociceptiva, citotóxicas, antipirética e antioxidantes (SOARES-SILVA; PROENÇA, 2008; SOUSA ET AL., 2017; FIGUEIREDO ET AL., 2018).

O gênero *Psidium* está bem distribuído mundialmente, com cerca de 112 espécies ocorrendo do sul do México até a província de Buenos Aires, na Argentina, incluindo ainda o Oeste das Índias, Ilhas do Caribe, e dois arquipélagos no Pacífico: o

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

de Galápagos e as Ilhas Revillagigedo (FRANZON et al., 2009; VIEIRA et al., 2006; THE PLANT LIST, 2022b). No Brasil, ocupa todos os domínios fitogeográficos, exibindo uma riqueza de cerca de 60 espécies, das quais mais de 65% (38 espécies) são consideradas endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2022).

*Psidium* inclui as goiabeiras (*P. guajava* L.) e os araçazeiros (*Psidium* spp.), as espécies são apreciadas por seus frutos e, cujas folhas, ricas em compostos fenólicos e óleos essenciais, são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreia, dentre outras enfermidades (CAMPOS, 2010). Esse gênero apresenta características como: folhas simples e opostas com típica venação broquidódroma e flores solitárias, axilares ou em pequenos racemos, dicásio ou botrioides; adicionalmente, os frutos normalmente se desenvolvem com muitas sementes, as quais apresentam testa óssea e embrião coclear com cotilédones apicais (FRANZON et al., 2009; SOARES-SILVA, PROENÇA, 2008).

Abriga árvores de grande a pequeno porte, chegando a 32 m, arvoretas e arbustos que podem ser xilopodíferos, com folhas simples, opostas, raramente ternadas. Possuem venação broquidódroma á eucamptódroma podendo formar nervura submarginal coletora. Apresentam flores axilares isoladas ou dicásios trifloros simples com flores centrais sésseis e laterais pediceladas e às vezes racêmulos geralmente auxotélicos, subterminais axilares ou caulinares com pares de flores opostas. Dispõem de botões florais maduros, bractéolas livres, caducas no botão floral jovem ou persistentes até a frutificação, com flores pentâmeras, sépalas livres e parcialmente fundidas (globo petalífero visível apicalmente por um poro arredondado, tetragonal ou pentagonal) ou sépalas totalmente fundidas até o ápice com botão totalmente fechado e globo petalífero oculto (PROENÇA, 2020).

Excluídos[Magda Ferreira]:

Em termos de compostos químicos, os seguintes terpenos foram identificados em diferentes espécies do gênero *Psidium*:  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ pineno, (E)- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -pineno, 1,8-cineol, mirceno, limoneno, terpinen-4-ol,  $\beta$ -pineno,  $\rho$ -cimeno,  $\alpha$ -humuleno, linalol e  $\beta$ -eudesmol. Esses compostos são responsáveis pela atividade biológica e farmacológica atribuída às espécies do gênero (PEREIRA, 2010). Estudos anteriores demonstraram atividades antimicrobianas e antitumorais, através do isolamento de compostos do gênero *Psidium*, como benzofenonas, terpenóides e meroterpenóides (QIN et al. 2017; VENDITTI e UKWUEZE 2017).

Excluídos[Magda Ferreira]:

### 3.3 *Psidium guineense* Sw.

*Psidium guineense*, conhecida popularmente como araçá, é uma espécie cujos frutos se caracterizam por bagas ovoides ou oblongas, apresentando polpa de carácter succulento e rica em propriedades nutricionais (FRANZON et al., 2009). Também conhecida como araçá-mirim e araçá-da-praia no estado da Bahia e como goiabinha no estado do Tocantins (PROENÇA, 2020). Essa planta varia de 70 cm a 10 m de altura e apresenta caule com casca lisa, folhas simples (Figura 1) com enervações salientes e margens levemente onduladas. Sua distribuição abrange quase todo o território brasileiro e em outros países, como Paraguai, Argentina, México, Bolívia, Peru e Venezuela (CALDEIRA et al., 2004; HAMINIUK, 2005; BEZERRA et al., 2006). A espécie apresenta potencial para exploração econômica devido à boa aceitação de seus frutos para consumo *in natura*, pelo elevado teor de vitamina C, além da alta capacidade de frutificação, resistência a doenças e pragas e capacidade de dispersão, fatores que podem indicar sua possível adaptação a diferentes ambientes (CISNEIROS, et al, 2003).

**Figura 1:** Folhas de *Psidium guineense*.



Fonte: Édipo Lucas (2022)

Desde o século XX, o araçá tem despertado o interesse dos diferentes setores da economia, sobretudo pela aceitação do público em geral para o sabor do seu fruto, presente nos mais variados produtos comerciais. Na indústria madeireira, por exemplo, é bastante utilizado na construção de vigas, cercas, cabos de ferramentas e instrumentos agrícolas. Na indústria alimentícia, em razão de seu potencial na indústria de sorvete,

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

seu fruto é utilizado na produção de polpas e geleias, bem como outros produtos (BEZERRA et al., 2018). Além disso, esse fruto também é uma fonte de pesquisa na área da saúde, pois apresenta propriedades antioxidantes, diuréticas e antidiarreicas (ANDRADE et al., 2012); portanto, tem sido alvo de pesquisa para o melhor entendimento das suas propriedades.

Estudos da atividade desta planta têm demonstrado propriedades biológicas dos extratos obtidos das folhas (FERNANDES et al., 2012; NEIRA GONZÁLEZ et al., 2005; VIEIRA et al. al., 2012) e o potencial antioxidante dos frutos (DAMIANI et al., 2012; de ARAÚJO et al. al., 2016; GORDON et al., 2011). Triagem química do extrato metanólico das folhas desta espécie identificaram compostos bioativos como fenólicos, licopeno, vitamina C e flavonóides (RIVERO-MALDONADO et al., 2013).

#### **3.4 Extração de compostos vegetais**

As plantas produzem no seu metabolismo dois tipos de metabólitos denominados primários ou secundários. Os primeiros são formados principalmente pelas proteínas, carboidratos e lipídeos que são responsáveis pelo crescimento, reprodução e formação das estruturas de sustentação das plantas. Já os metabólitos secundários constituem as formas de comunicação das plantas com o meio ambiente, no processo de proteção contra a radiação do sol (antioxidantes), contra organismos predadores, incluindo fungos, bactérias e insetos, e na produção de feromônios para polinização e garantir a sobrevivência das espécies (MORAIS, 2007).

Substâncias com ação bioativa de importância na farmacologia são produzidas pela biossíntese dos metabólitos secundários. Esses constituintes apresentam-se de diversas formas estruturais, cada família, gênero e espécie produtor de categorias químicas características ou mistura, as quais podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação diversas espécies (COSTA et al., 2011; SIMÕES et al., 2010).

Para determinar a composição de metabólitos secundários em um vegetal, realiza-se a pesquisa fitoquímica (SIMÕES et al., 2017). Existem três importantes grupos de metabólitos secundários: os compostos fenólicos, os terpenos e os alcalóides, que são usados na defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos. Os fenólicos, como flavonóides, taninos e ligninas são derivados do ácido chiquímico e mevalônico, enquanto os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico, no citoplasma, ou

Excluídos[edipo lucas]: Estudos da atividade desta planta têm demonstrado propriedades biológicas dos extratos obtidos das folhas (FERNANDES et al., 2012; NEIRA GONZÁLEZ et al., 2005; VIEIRA et al. al., 2012) e o potencial antioxidante dos frutos (DAMIANI et al., 2012; de ARAÚJO et al. al., 2016; GORDON et al., 2011). Triagem química do extrato das folhas desta espécie identificaram compostos bioativos como fenólicos, licopeno, vitamina C e flavonóides (RIVERO-MALDONADO et al., 2013).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: **Perfil Fitoquímico**

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

do piruvato-3-fosfoglicerato, no cloroplasto. Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos, triptofano e tirosina, os quais derivam do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos como ornitina e lisina; a nicotina, a cafeína e a vincristina são alguns exemplos de substâncias fabricadas nesse processo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Extratos de **compostos** vegetais são manipulações concentradas que podem estar na forma líquida, viscosa ou em pó e que são produzidos a partir das partes do vegetal, secas ou *in natura*, através de alguns métodos que já estão predefinidos na literatura científica (GOVERNA et al., 2018; PATRICIO et al., 2020). A extração ocorre através de processo físico-químico de transferência de massas, em que os sólidos solúveis e voláteis são extraídos por meio do contato com um solvente (LIMA, et al 2021). As condições em que o processo de extração é realizado e a qualidade da matéria-prima vegetal estão relacionadas com o rendimento da extração (WONGKITTIPONG et al., 2004; SCHULZ et al., 2002). Ferro (2008) descreve os processos de maceração, infusão, decocção, digestão, percolação e destilação como sendo os principais métodos extrativos de ingredientes medicinais e que são amplamente utilizados pela população.

Excluídos[edipo lucas]: derivados

A **eficiência** da extração dos metabólitos secundários é influenciada diretamente por diversos fatores, dentre eles o tipo de solvente utilizado (FERRO, 2008; NCUBE, AFOLAYAN E OKAN, 2011). O etanol apresenta caráter anfifílico, permitindo a extração tanto de substâncias com características apolares quanto polares (OLIVEIRA, 2016); já o metanol tem a capacidade de extrair uma maior quantidade de componentes (TIWARI, 2011). A temperatura de extração e a ação mecânica (agitação e pressão) são também fatores importantes que **influenciam** na eficiência da extração (VEGGI, 2009). Além disso, a matriz vegetal apresenta uma microestrutura complexa formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros. Dessa forma, a extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, tamanho, localização e ligação com outros componentes.

Excluídos[edipo lucas]: qualidade

É importante salientar que a interação entre os principais fatores descritos aqui (características químicas do solvente e estrutura ou composição diversificada do produto natural) não pode ser prevista facilmente e, nesse sentido, o melhor método de extração deve ser determinado sempre experimentalmente (PINELO et al., 2004).

[Metabólitos secundários isolados de \*P. guineense\* possuem grande potencial biológico e farmacológico devido suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas \(HO et al., 2012; NAPOLITANO et al., 2012\), espasmolítica \(PEREIRA,2021\), antiulcerogênica \(SOUSA et al, 2016\), antiproliferativa e](#)

antimicrobacteriana (NASCIMENTO, 2017). Podemos destacar os metabólicos mais recorrentes a partir das extrações de folhas da espécie, como os flavonóides, taninos, saponinas e cumarinas (ARAÚJO et al., 2010, LIMA et al 2018).

Os estudos químicos ou fitoquímicos para padronização compreendem etapas de avaliação qualitativa e quantitativa de constituintes do metabolismo secundário seguida de identificação, isolamento e elucidação estrutural dos ingredientes ativos responsáveis pela ação biológica. Para isso, são combinadas técnicas de caracterização, métodos cromatográficos, espectrometria de massas, espectroscopia no ultravioleta no espectro visível e no infravermelho, dentre outros mais sofisticados como a ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono (LAZZAROTTO-FIGUEIRÓA et al., 2021)

### 3.5 Planejamento Fatorial

Nos estudos de validação de espécies vegetais devemos destacar ainda a necessidade de direcionar esforços e recursos nos estudos de padronização, principalmente dos extratos vegetais, os quais representam as preparações mais frequentemente empregadas nas formulações fitoterápicas, envolvendo várias etapas operacionais com diferentes variáveis, que podem alterar a estabilidade dos constituintes químicos e, conseqüentemente, a atividade terapêutica desejada (SONAGLIO et al., 2016; LAZZAROTTO-FIGUEIRÓA et al., 2021).

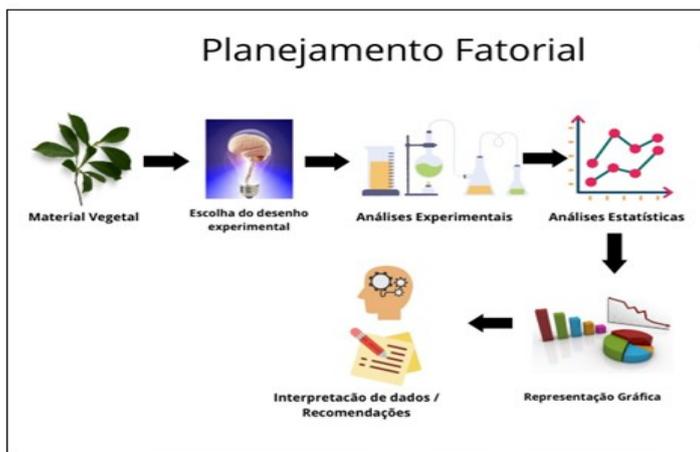
Um planejamento fatorial (Figura 2) está baseado em um conjunto de experimentos definidos por uma matriz composta por diferentes combinações de níveis das variáveis estudadas e deve atender certos critérios desejáveis como: fornecer estimativas satisfatórias para os coeficientes da função que será ajustada aos dados experimentais exigindo o menor número de experimentos possíveis e, fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo matemático usado (BEZERRA et. al. 2008).

#### Figura 2. Planejamento Fatorial

Excluídos[edipo lucas]: Metabólitos secundários isolados de *P. guineense* possuem grande potencial biológico e farmacológico devido suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas (HO et al., 2012; NAPOLITANO et al., 2012), espasmolítica (PEREIRA,2021), antiulcerogênica (SOUSA et al, 2016), antiproliferativa e antimicrobacteriana (NASCIMENTO, 2017). Podemos destacar os metabólicos mais recorrentes a partir das extrações de folhas da espécie, como os flavonóides, taninos, saponinas e cumarinas (ARAÚJO et al., 2010, LIMA et al 2018).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro



Fonte: Édipo Lucas (2022)

Devido à extração ser uma das principais formas de obtenção de compostos ativos a partir de materiais vegetais, e poder sofrer influência de diversos fatores, se torna o principal alvo de planejamentos fatoriais, com o objetivo de avaliar quais as combinações de variáveis e seus níveis mais significativos para a extração do grupo de metabólitos desejados (WONG et al., 2015). De acordo com Migliato et al. (2011) os estudos de padronização devem priorizar a avaliação de planejamento fatorial, levando-se em conta as variáveis que influenciam na extração, para garantir a recuperação e biodisponibilidade de substâncias de interesse provenientes da matriz complexa que é o tecido vegetal (SCHAFRANSKI et al., 2019).

O planejamento fatorial é uma ferramenta utilizada na otimização de sistemas e processos (MIGLIATO et al., 2011), é o método mais indicado quando se deseja avaliar a influência de duas ou mais variáveis. São normalmente representados com  $b^k$ , onde "b" é o número de níveis e "k" o de fatores. O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, onde as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta, são avaliadas ao mesmo tempo. (SILVA, 2008). Em geral, os estudos  $2^k$  são os mais comuns (CUNICO et al., 2008).

O planejamento fatorial é um método de estudo que apresenta inúmeras vantagens e torna a obtenção de resultados mais rápida, pois consegue reduzir o número de ensaios sem perder a qualidade nas informações obtidas, além de poder avaliar as

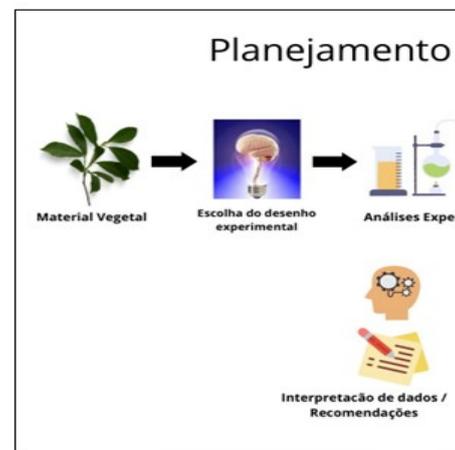
Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Comentário[Magda Ferreira3]: Muito extensa.

Excluídos[edipo lucas]:

Figura 2. Planejamento Fatorial, iniciado pela seleção do vegetal, o tipo de estudo aplicado, os testes a serem realizados, análise dos resultados, em seguida interpretação e representação gráfica.



Fonte: Édipo Lucas (2022)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

variáveis de forma simultânea, e determinar a confiabilidade dos resultados (CUNICO et al., 2008; GHOSH; FLORES, 2013).

A **elucidação**, dos extratos vegetais fundamentada na análise química de constituintes ou metabólitos secundários representa parâmetro de avaliação de integridade indispensável no controle de qualidade, considerando que as matérias primas vegetais podem apresentar variabilidade na composição química, dependendo de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, como sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento do vegetal, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude entre outros; influenciando assim, na concentração de constituintes químicos no material vegetal e, conseqüentemente, no valor terapêutico das preparações derivadas ou fitoterápicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; BAJES et al., 2020).

Excluídos[edipo lucas]: padronização

## 2.6 Estudos de Toxicidade

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

As plantas medicinais são importantes ferramentas terapêuticas no tratamento de várias doenças, pois são dotadas de atividades farmacológicas que, se administradas de forma consciente, podem amenizar e curar diversas enfermidades (PEREIRA et al., 2019; RIBEIRO, 2021). Quando administradas corretamente, algumas plantas medicinais e fitoterápicos apresentam vantagens sobre os medicamentos convencionais, tais como menor custo, menor possibilidade de efeitos adversos e menor toxicidade, entretanto estes produtos naturais também são capazes de gerar efeitos adversos ao organismo (RIBEIRO, 2021). Na última avaliação do Sistema Nacional de Informações Toxicológicas, no ano de 2016, no Brasil foram registrados 958 casos de intoxicação humana por usos de plantas medicinais, sendo que destes, 64 foram registrados na região Centro-Oeste. Neste contexto, é possível determinar que cada planta medicinal tem sua individualidade e é imperativo reconhecer que os produtos naturais têm componentes químicos farmacologicamente ativos e não podem ser considerados como não-tóxicos (RIBEIRO et al., 2021).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

A facilidade de obtenção de espécies vegetais para finalidade terapêutica tem tornado o uso irracional, somado a este fato, as propriedades tóxicas podem acarretar sérias conseqüências a curto ou a longo prazo. Espécies consideradas tóxicas produzem metabólitos secundários que por inalação, ingestão ou contato podem causar alterações patológicas e em alguns casos pode levar a sérios distúrbios no organismo e até mesmo o óbito (VASCONCELOS et al., 2009; JESUS & SUCHARA, 2013). A interação com

alimentos ou medicamentos também pode ser um fator de risco (CAMPOS et al., 2016; FROTA et al, 2019).

Apesar de intoxicações humanas fatais causadas por plantas serem raras e o número total de ocorrências registradas ser baixo, os dados estatísticos devem ser analisados com cautela, pois muitos casos não são registrados ou são notificados como exposição a agente tóxico desconhecido (MONSENY et al., 2015). Os estudos pré-clínicos são realizados para avaliar potenciais efeitos adversos e riscos para o ser humano, podendo ser agrupados em 3 categorias: os farmacológicos, os farmacocinéticos e os toxicológicos.

Os testes de toxicidade são utilizados para classificar e rotular corretamente substâncias mediante seu potencial de letalidade ou nocividade de acordo com a legislação (WANG, et al 2019). Os modelos toxicológicos pré-clínicos são realizados utilizando testes *in vitro* e *in vivo*, contudo, há um maior estímulo aos testes *in vitro* devido à pressão exercida pela sociedade para reduzir o número de animais usados na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Contudo, vale ressaltar que os testes *in vivo* sustentam a maior fonte de informação para avaliar a segurança e eficácia de novos fármacos (TIMBREL, 2009).

O teste de toxicidade oral aguda é descrito pelo [Guia 423 da OECD \(2001\)](#) e tem como objetivo avaliar a capacidade da substância em produzir efeitos adverso em um breve período após a administração oral de uma única dose ou após múltiplas doses fornecidas durante 24 horas, proporcionando informações referentes aos riscos à saúde após exposição de curta duração e sendo possível determinar a Dose Letal 50 (DL<sub>50</sub>), ou seja, a dose do fármaco capaz de causar a morte de 50% da população num determinado período. A figura 3 demonstra o processo de administração de substância por via oral.

Excluídos[edipo lucas]: Guideline

Excluídos[edipo lucas]: (

Excluídos[edipo lucas]: 42

Excluídos[edipo lucas]: 3;

Excluídos[edipo lucas]: )

**Figura 3.** Administração por gavagem durante teste de toxicidade aguda



Fonte: iStock (2021)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

O protocolo experimental para toxicidade aguda recomenda que se inicie o tratamento de três animais (roedores) com a dose de 300 mg/kg quando se desconhece os efeitos da droga. Caso se observe um ou nenhum caso de morte, deve-se repetir a dose e com a confirmação do resultado anterior, o composto deve ser testado na dose de 2000 mg/kg para então, de acordo com o resultado, ser classificado na sua respectiva categoria segundo o Globally Harmonized Classification System (GHS). Os animais devem ser privados da alimentação por duas horas antes do início do experimento e por mais duas horas após a administração, por via oral (gavagem), das substâncias teste. A água deve ser oferecida *ad libitum* até o término do experimento.

Com relação à toxicidade de espécies do gênero *Psidium*, estudo realizado por Silva et al., (2020), relata-se que o efeito genotóxico do extrato metanólico de *P. guineense* da família Myrtaceae. induz baixa toxicidade sobre as células da mucosa oral. Também foram descritas a análise de toxicidade *in vivo* do extrato aquoso de *P. guineense*, onde através de administração oral em ratos não apresentou nenhum sinal de toxicidade.

Excluídos[edipo lucas]: estudos demonstram que o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* não apresenta nem citotoxicidade nem genotoxicidade para leucócitos humanos (CUNHA, et al 2015). Em outro

Excluídos[edipo lucas]: ,

## 2.7 Dor e Nociceção

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Os termos nociceção e dor diferem, uma vez que o primeiro se refere ao processo sensorial desencadeado devido às manifestações neurofisiológicas geradas por um estímulo nocivo, enquanto o segundo envolve a percepção de um estímulo aversivo, o que requer a capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais, processo

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

este designado como dor, que pode ser irritativa, dolorosa, pungente, persistente, pulsátil ou intolerável (ALMEIDA, ROIZENBLATT e TUFIK, 2004).

A dor pode ser provocada por um estímulo nocivo, lesão ou até mesmo por doenças (AYDEDE, 2017). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for the Study of Pain – IASP), a dor está definida como uma experiência sensorial e/ou emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial (COHEN; QUINTNER; VAN RYSEWYK, 2018). Essa definição permaneceu adotada por décadas, porém recentemente o avanço dos estudos, com compreensão mais ampla do fenômeno da dor e seus mecanismos, tem ocasionado mobilização dos especialistas e entidades na revisão conceitual da dor (DE SANTANA & PERISSINOTTI, 2020). O processo doloroso tem como propósito alertar o organismo sobre estímulos nocivos que podem provocar lesão tecidual, permitindo que mecanismos de defesa e fuga sejam adotados. Esses estímulos dolorosos são detectados por receptores fisiológicos tais como os nociceptores, que respondem aos diferentes estímulos, podendo ser estímulos químicos e físicos (HANNA; SENDEROVICH, 2020).

A dor pode ser classificada de acordo com diversos critérios. Em relação ao tempo de sua ação, pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é causada por uma lesão recente ou de curta duração, que desaparece com cicatrização ou até mesmo antes da cura tecidual. Este tipo de dor possui um valor biológico adaptativo, já que a lesão ativa nociceptores (receptores da dor) para o local, gerando uma resposta que atua como sinalizadora da não integridade tecidual, promovendo resposta protetora do organismo (OLIVEIRA, 2014). Já a dor crônica é caracterizada por uma persistência, podendo durar meses ou até anos. Geralmente não é bem localizada e diferente da dor aguda, sua ação não está necessariamente relacionada a uma lesão no organismo, além de não possuir resposta adaptativa, uma vez que estados dolorosos prolongados estimulam receptores nociceptivos aferentes, que induzem alterações que levam ao aumento dos efeitos deletérios da dor crônica, introduzindo então o conceito de dor patológica (SCHOLZ et al., 2019; RAJA et al., 2020).

Após a lesão tecidual e inflamação, os nociceptores são sensibilizados de tal maneira que estímulos previamente leves ou ineficazes se tornam dolorosos. Geralmente, esta sensibilização sensorial primária é referida como hiperalgesia, caracterizada por resposta dolorosa acentuada por um estímulo previamente doloroso, ou alodinia que envolve dor associada a um estímulo que normalmente não provocaria dor (VERRI-JR et al., 2006). Os nociceptores são classificados em quatro tipos:

mecânicos que correspondem a pressão interna; térmicos, que são em respostas às temperaturas extremas, como aumento de temperatura ou diminuição da temperatura; os polimodais que podem ser ativados com estímulos mecânicos, térmicos ou químicos; e por fim os nociceptores silenciosos, que são ativados por estímulos químicos e mediadores inflamatórios, respondendo a estímulos mecânicos e térmicos somente depois de serem ativados (LATINA et al., 2019).

Os receptores nociceptivos são ativados por diversos neuromediadores inflamatórios quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia, sendo chamados de algioênicos. Dentre estes, se destacam a acetilcolina, a histamina, bradicinina, o leucotrieno, a substância P, o PAF, os radicais ácidos, os íons potássio, as prostaglandinas, os tromboxanos, as interleucinas e o fator de crescimento nervoso (NGF) (KRAYCHETE, CALASANS, VALENTE, 2006; MA; QUIRION, 2008). Para o tratamento da dor é necessária intervenção farmacológica, as principais classes de substâncias antinociceptiva são os opioides, que agem tanto no sistema nervoso central, como a nível periférico. Outro grupo de medicamentos são os inibidores da COX, que são responsáveis pela produção de prostaglandinas, que estimulam a sensação dolorosa (NISBET; SEHGAL, 2019).

Modelos de dor podem ser utilizados por exemplo para verificar a ação antinociceptiva de determinado composto. Entre eles, o teste de contorções abdominais (Figura 4), induzido pelo ácido acético, é um modelo clássico de nociceção anti-inflamatória, visceral que provoca uma irritação no peritônio, caracterizada pela contração abdominal e pelo alongamento das patas traseiras. Esses parâmetros observados ocorrem devido a ação de canais de cátions não seletivos em neurônios nociceptivos periféricos, havendo também a liberação de vários mediadores inflamatórios (MING-TATT, et al 2012).

**Figura 4.** Modelo de Contorções Abdominais induzidas por ácido acético, provocando estiramentos no animal em estudo.



Fonte: Otávio Soares (2019)

Também temos o teste de formalina (Figura 5), que consiste em administrar 20 $\mu$ L de uma solução de formalina 2,5% na região subplantar da pata posterior direita do animal. Após a administração do estímulo nocivo, os camundongos são observados para verificar o indicativo de resposta nociceptiva do teste que é o tempo de lambida da pata, durante duas fases. A primeira (0-5 min) ocorre imediatamente, após a injeção da formalina, provocando uma resposta nociceptiva decorrente da estimulação química direta dos nociceptores e liberação de substância *P* e glutamato. A segunda fase (15-30 min) é caracterizada por um processo inflamatório, levando a liberação de mediadores como a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas (PARADA et al., 2001).

**Figura 5.** Modelo da Formalina, induzindo a lambedura da pata.



Fonte: Otávio Soares (2019)

Para verificação dos estímulos térmicos, existe o modelo de imersão de cauda (Figura 6), onde um estímulo térmico acima de 40° C aplicado à cauda de ratos ou camundongos desencadeia o reflexo da retirada da mesma por flexão predominantemente em direção rostral. A avaliação das respostas é feita por meio da medida do lapso de tempo entre a aplicação do estímulo térmico e o momento de afastamento da cauda da fonte de calor (CARTENS, et al 2007).

**Figura 6.** Modelo de Imersão de cauda



Fonte: Rebeca Pontes (2009)

Calcula-se o índice do limiar nociceptivo por meio do tempo de latência do reflexo de retirada da cauda. Esse modelo permite obter informações sobre o mecanismo e o local da atividade antinociceptiva detectada, uma vez que o parâmetro avaliado, ou seja, o reflexo de retirada da cauda, é de integração medular (CARTENS, et al 2007).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Normal, Esquerda

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

##### **Optimized extraction based on polyphenols from *Psidium guineense* leaves and investigation of oral toxicity and antinociceptive effect in mice**

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Édipo Lucas Soares Barbosa<sup>a</sup>, Wêndeo Kennedy Costa<sup>a</sup>, Janaína Carla Barbosa Machado<sup>b</sup>, Valquíria Bruna Guimaraes Silva<sup>a</sup>, Magda Rhayanny Assunção Ferreira<sup>b</sup>, Luiz Alberto Lira Soares<sup>b</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>a</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>a</sup>, Alisson Macário de Oliveira<sup>a</sup>, Emmanuel Viana Pontual<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>c</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

\*Autor correspondente: Emmanuel Viana Pontual. E-mail:

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

## Abstract

Este trabalho caracterizou o extrato metanólico de folhas de *P. guineense* (EMPg) quanto à composição fitoquímica, toxicidade *in vivo* e potencial antinociceptivo. A análise do pó de folhas de *P. guineense* por cromatografia em camada delgada revelou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas, taninos hidrolisáveis, açúcares e terpenos/esteroides. A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos de EMPg indicou a presença de monômeros de taninos hidrolisáveis, ácido gálico, ácido elágico e flavonoides. O tratamento com EMPg na dose de (2000 mg/kg) não resultou em alterações significativas no peso dos animais e no consumo de água e ração, bem como nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. EMPg nas concentrações de (25mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg) exibiu atividade analgésica, reduzindo o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o tempo de lambadura da pata nas duas fases do teste de formalina. Adicionalmente, um aumento progressivo do tempo de latência no teste de imersão da cauda foi registrado. O pré-tratamento com naloxona reduziu o efeito antinociceptivo de EMPg, sugerindo o envolvimento do sistema opioide na ação antinociceptiva do extrato. Em conclusão, as folhas de *P. guineense* são fontes de metabólitos com potencial farmacológico por apresentar ação antinociceptiva em modelo *in vivo*, sem acarretar toxicidade aguda.

**Keywords:** *Psidium*; Extrato; Plantas medicinais; fitoterápicos

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Fonte: (Padrão)Times New Roman, 12 pt, Negrito

## 1. Introdução

Os fármacos atualmente utilizados para tratamento da dor apresentam ação limitada pela sua alta toxicidade e pela capacidade de causar dependência. Nesse contexto, as plantas medicinais surgem como alternativas terapêuticas valiosas, pois produzem substâncias que são capazes de alterar o funcionamento de órgãos e sistemas. Uma vez que a flora brasileira é altamente diversificada em espécies, e que essa diversidade se reflete no arsenal bioquímico expresso por elas, seus metabólitos podem representar interessantes materiais de partida para a elaboração e síntese de novos agentes terapêuticos (Santos, 2017).

Dentre as plantas com importância medicinal destacamos aquelas pertencentes à família Myrtaceae, considerada mundialmente como uma das maiores famílias botânicas. De acordo com Proença et al. (2020), agrupa cerca de 6.000 espécies distribuídas em 145 gêneros, em todo o mundo, não tendo sido encontrado um relato mais recente. Na flora brasileira, também representa uma das maiores famílias, a qual engloba 29 gêneros e aproximadamente 1200 espécies. Myrtaceae compreende grandes produtores de óleos essenciais e outros produtos do metabolismo secundário, com frutos geralmente muito apreciados e com aplicações medicinais validadas por pesquisas científicas (Flora do Brasil, 2022).

Pertencente a Myrtaceae, o gênero *Psidium* L. possui ampla distribuição em áreas tropicais, principalmente nas Américas e ocorre em áreas sob constantes condições de estresse abióticos, incluindo escassez de água e temperaturas extremas (PROENÇA et al 2020). Há relatos que preparações de folhas de plantas deste gênero apresentam atividades biológicas que incluem atividade antimicrobiana e anti-HIV-1 (RODRIGUES et al., 2014; ORTEGA et al., 2017); adicionalmente, o extrato metanólico de folhas de *Psidium guineense* apresentou baixo potencial genotóxico para células humanas da cavidade oral (SILVA et al., 2020). Esses efeitos têm sido associados à presença de ingredientes ativos, incluindo compostos fenólicos,

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: .

Excluídos[edipo lucas]: N

Excluídos[edipo lucas]: ; The plant list, 2022

flavonóides, chalconas, fitoesteróides, derivados de tirosol e feoforbide (LIMA et al., 2020; MACAÚBAS-SILVA et al., 2019; ORTEGA et al., 2017)

*Psidium guineense* Sw., conhecida popularmente como araçá, é um arbusto decíduo, com folhas cartáceas, apresentando inflorescência com duas ou cinco flores e seu fruto é globoso com polpa suculenta, aromática e ácida. A espécie tem ampla distribuição no Brasil e toda a América do Sul. Seus frutos são suculentos, doces e utilizados pela população para fazer sucos e geleias (Padilha et al. 2016). O desenho experimental apresentado neste trabalho testa a hipótese que as folhas de *P. guineense* apresentam metabólitos secundários com potencial antinociceptivo e baixa ou nenhuma toxicidade. Nesse sentido, o extrato metanólico de folhas de *P. guineense* foi investigado quanto à composição fitoquímica, toxicidade aguda *in vivo* e potencial antinociceptivo. Em adição, o papel de receptores opioides na atividade antinociceptiva é também relatado.

## 2. Materiais e Métodos

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

### 2.1 Material vegetal

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Folhas de *P. guineense* Sw. foram coletadas no Campus Recife da Universidade Federal de Pernambuco (08°03'07"S 34°56'59"O) do mês de setembro de 2020. A identificação botânica foi realizada no Herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) sob voucher de número 56155. O acesso ao material vegetal foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen sob o protocolo AAA84BD. Após a coleta, as folhas foram destacadas dos seus pecíolos e imediatamente lavadas com água destilada. Em seguida foram secas em estufa (50° C) e moídas em um pó fino utilizando um triturador industrial.

Excluídos[Magda Ferreira]: o

Excluídos[Magda Ferreira]: .

Excluídos[edipo lucas]: 60

## 2.2 Avaliação da composição de metabólitos secundários das folhas de *P. guineense* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Folhas de *P. guineense* (1 g) foram adicionadas a metanol (20 mL) e a mistura foi submetida a decocção durante 15 min a 100 °C. Ao final, a amostra foi resfriada, filtrada e transferida para *eppendorf*. As amostras e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F<sub>254</sub> (Macherey-Nagel®, Alemanha). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (15 min à temperatura ambiente). Em seguida, as placas foram secas e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível e digitalizadas. Na sequência, foram reveladas com reagentes específicos para cada classe de metabólito, de acordo com metodologias de Wagner e Bladt (1996) com modificações.

Excluídos[Magda Ferreira]:

## 2.3 Avaliação das condições extrativas de folhas de *P. guineense*

As condições de extração foram avaliadas por planejamento fatorial de triagem 2<sup>3</sup>, utilizando como variáveis independentes o método extrativo (maceração ou turbólise), a **quantidade** de folhas (5 ou 10 g / 100 mL de solução de extração) e **solvente** (metanol 50% ou 100%, v/v). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados com auxílio do software Statistica 6.0 (Statsoft®). A eficiência da extração foi acompanhada calculando-se a razão entre o teor de polifenóis totais e a massa do resíduo seco.

Excluídos[edipo lucas]: 3

Excluídos[edipo lucas]: massa

Excluídos[Magda Ferreira]: composição de

Para determinar o teor de polifenóis totais, foram transferidos 10 µL de cada um dos extratos para balão volumétrico de 25 mL, em seguida adicionados 1 mL de Folin-Ciocalteu, 10 mL de água destilada e, por fim o volume foi ajustado com solução de carbonato de sódio a 10,75%. O teor de polifenóis totais foi expresso em gramas de pirogalol por 1 g de extrato. O resíduo seco foi determinado em balança de infravermelho (Série ID – V.18, Marte®), à 130 ± 2 °C, sendo expresso em percentual pela média das análises realizadas em triplicata. A

eficiência de extração foi expressa pela razão entre o teor de polifenóis totais e o resíduo seco, de acordo Galvão et al. (2018).

#### **2.4 Caracterização do extrato de folhas de *P. guineense* por CLAE-DAD**

Formatado[edipo lucas]: Fonte: Itálico, Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

A preparação com maior eficiência de extração (EMPg) foi analisada por CLAE-DAD. A análise por CLAE foi realizada em sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex<sup>®</sup> equipada com pré-coluna (C<sub>18</sub> de 4 mm x 3,9 mm; Phenomenex<sup>®</sup>). As separações foram efetuadas a temperatura de 25 ± 1 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,7 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-5 min, 20-25% de B; 5-10 min, 25-40% de B; 10-20 min, 40-80% de B; 20-25 min, 80-85% de B; 25-30 min, 85-40% de B; 30-33 min, 40-20% de B; 33-35 min, 20% de B. Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA).

#### **2.5 Experimentos *in vivo***

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas albinos Swiss (*Mus musculus*), com cerca de 50 dias de nascidos, pesando entre 30 e 40 g. Os animais foram obtidos do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (Lika) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades

de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos num ambiente com temperatura de  $22 \pm 2$  °C e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais foram submetidos a jejum de 4 horas antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos experimentais que foram realizados estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais e foram submetidos à Comissão de Ética e Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco e aprovados sob número 001/2021.

## **2.6 Toxicidade aguda**

### *2.6.1 Procedimento experimental*

O ensaio de toxicidade aguda oral foi realizado de acordo com o protocolo 421 da Organization for Economic Cooperation and Development (2001). Grupos de animais ( $n = 5$ ) foram separados e submetidos a um período de jejum de 4 horas, mas com livre acesso à água, antes da administração oral de 2000 mg/kg do EMPg ou NaCl 0,9% (Controle).

### *2.6.2 Avaliação comportamental e parâmetros fisiológicos*

Parâmetros comportamentais foram avaliadas durante as 4 primeiras horas, como: piloereção, aparência das fezes, sensibilidade ao som e ao toque, mobilidade e comportamento agressivo. Posteriormente os animais foram acompanhados diariamente durante 14 dias, quanto ao consumo de água e ração e ganho de peso corporal.

### *2.6.3 Análises de parâmetros hematológicos e bioquímicos*

No 15º dia os animais foram anestesiados com solução de quetamina e xilazina, e realizada punção cardíaca e o sangue coletado para análises dos parâmetros hematológicos (tubo contendo anticoagulante – EDTA) e bioquímicos (tubo contendo gel separador). O

sangue foi coletado com uma seringa descartável de 1 mL e uma parte foi imediatamente transferida para um tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) para exame hematológico por analisador hematológico automatizado e microscopia óptica. Os parâmetros avaliados foram: hemácias (RBC), hemoglobina (HB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (MCH) e concentração média de hemoglobina (MCHC). Bem como glóbulos brancos (WBC), leucócitos segmentados (SEG), linfócitos (LYM) e monócitos (MON).

Para as análises bioquímicas, outra porção do sangue foi transferida para um tubo contendo gel separador sem anticoagulantes e submetida à centrifugação a 3.000 rpm por 10 min para obtenção do soro e armazenada a -20 °C até a realização da análise. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: nitrogênio ureico sanguíneo (BUN), albumina (ALB), creatinina (CRE), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total (CT), triglicérides (TG), proteína total (TP), fosfatase alcalina (ALP), gama-glutamil transferase (GGT) e bilirrubina (BIL).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

## **2.6 Atividade antinociceptiva**

### **2.6.1 Tratamentos**

Para todos os testes, camundongos machos foram separados em seis grupos (n = 6) e receberam os seguintes tratamentos: extrato de *P. guineense* (25, 50 ou 100 mg/kg v.o.), solução salina (0,9% v.o.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou indometacina (20 mg/kg i.p.). A solução salina ou extrato foram administrados 1 hora antes do início dos testes, enquanto as drogas padrão morfina e indometacina foram administradas 30 minutos antes. No teste de imersão de cauda, não houve o grupo indometacina.

### **2.6.2 Teste de contorção abdominal**

Após o intervalo de tempo de cada tratamento, uma solução de ácido acético 0,85% foi injetada (0,1 mL/10 g do peso do animal) na cavidade peritoneal dos animais para induzir contrações da musculatura abdominal e/ou alongamento dos membros posteriores. Após a aplicação do ácido acético os animais foram colocados em gaiolas de polietileno transparentes, onde foram observados e registrados os números de contorções abdominais no intervalo correspondente de 5 a 15 minutos após a injeção. A porcentagem de inibição das contorções abdominais foi calculada comparando a média de contorções dos grupos (Oliveira et al., 2018).

#### *2.6.3 Teste da formalina*

Após os respectivos tratamentos, os animais receberam injeção de 20 µL de formalina (2,5%, v/v) na região subplantar da pata direita. Imediatamente após a injeção, o tempo em que o animal passou lambendo ou mordendo a pata injetada foi registrado. A resposta nociceptiva foi registrada nos intervalos de 0-5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e de 15-30 minutos (segunda fase, dor inflamatória) após injeção de formalina (Hunskar; Hole 1987).

#### *2.6.4 Imersão de cauda*

Os animais utilizados no estudo foram pré-selecionados 24 horas antes das experiências imergindo suas caudas em água morna ( $55 \pm 1$  ° C), aqueles que mantiveram suas caudas imersa por mais que 5 s foram excluídos. Após o intervalo de 24 horas os animais foram tratados conforme citado anteriormente e tiveram suas caudas imergidas na água morna nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 após o tratamento e o tempo de latência para uma reação de desconforto foi registrado, não ultrapassando 20 s [para evitar danos ao animal](#) (Khatun et al., 2015).

### 2.6.5 Investigação de mecanismos de atividade antinociceptiva

Para investigação do mecanismo antinociceptivo, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com naloxona 2 mg/kg (antagonista não-seletivo do receptor de opioides). Posteriormente os animais receberam o extrato obtido das folhas de *P. guineense* (100 mg/kg) e em seguida, os animais receberam injeção de 20 µL de formalina (2,5%, v/v) na região subplantar da pata direita. Imediatamente após a injeção, o tempo em que o animal passou lambendo ou mordendo a pata injetada foi registrado. A resposta nociceptiva foi registrada nos intervalos de 0-5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e de 15-30 minutos (segunda fase, dor inflamatória) após injeção de formalina. A possível via de ação foi determinada no grupo que apresentou resultado semelhante ao grupo controle negativo, demonstrando que houve reversão da atividade antinociceptiva do extrato de *P. guineense*.

### 2.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism® versão 8.0 e expressos em valores médios com desvio padrão ( $\pm$  DP). As diferenças estatisticamente significantes foram calculadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou Dunnett's (quando necessário). Os valores foram considerados significativamente diferentes em  $p < 0,05$  para avaliação da toxicidade e  $p < 0,001$  para os testes antinociceptivos e anti-inflamatórios.

### 3. Resultados

#### 3.1 Avaliação da composição de metabólitos secundários das folhas de *P. guineense*

A análise dos metabólitos secundários de *P. guineense* evidenciou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas, taninos hidrolisáveis, açúcares e terpenos/esteroides.

#### 3.2 Avaliação das condições extrativas

As condições de extração, avaliadas através da aplicação do planejamento fatorial <sup>23</sup> a partir da influência das variáveis independentes (quantidade de droga vegetal, solvente e método extrativo) sob o teor de polifenóis totais, resíduo seco e eficiência de extração estão sumarizadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Matriz do desenho experimental para avaliação das condições de extração a partir de folhas de *P. guineense*.

Variáveis Naturais			DR (%)	TPC (g%)	EE (TPC/DR)
Solvente	Droga Vegetal (g)	Método			
MeOH 50	5	M	3,30 ± 0,1222	10,18 ± 0,1123	3,09 ± 0,0341
MeOH 100	5	M	1,23 ± 0,0115	4,82 ± 0,0849	3,91 ± 0,0688
MeOH 50	10	M	2,99 ± 0,0115	4,28 ± 0,0656	1,43 ± 0,0220
MeOH 100	10	M	2,93 ± 0,0252	4,65 ± 0,0773	1,59 ± 0,0264
MeOH 50	5	T	1,18 ± 0,0252	4,17 ± 0,0833	3,52 ± 0,0704

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: 3

Excluídos[edipo lucas]: 2

Excluídos[edipo lucas]: folhas

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: Folhas

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

MeOH 100	5	T	0,0306			
			1,97	±		
MeOH 50	10	T	0,0513	7,81 ± 0,0833	3,97 ± 0,0424	
			2,72	±		
MeOH 100	10	T	0,1039	7,46 ± 0,0367	2,74 ± 0,0135	
			2,98	±		
			0,0252	3,59 ± 0,0561	1,20 ± 0,0188	

M: Maceração; T: Turbólise; MeOH 50 - Solução metanol/água (1:1); MeOH 100 - Metanol;

TPC – teor de polifenóis totais; DR – resíduo seco; EE – eficiência de extração. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão (DP).

Quando os dados mostrados acima (Tabela 1) foram avaliados com auxílio do software Statistica 6.0 (Statsoft®) através da análise de variância (Anova), foi verificada a significância dos efeitos a 95% de nível de confiança (Tabela 2).

**Tabela 2** – Análise estatística do desenho experimental para avaliação das condições de extração a partir de folhas de *P. guineense*.

FATOR	DR%		TPC (g%)		EE	
	F	t-test	F	t-test	F	t-test
(1)MeOH (%)	112,788*	190,3411*	1681,53*	-41,007*	2,57	-1,603
(2)Folhas (g)	1507,850*	-10,6202*	3024,01*	-54,991*	11808,36*	-108,666*
(3)Método	245,977*	38,8310*	51,99*	-7,211*	416,91*	20,418*
1 by 2	214,081*	-15,6837*	197,61*	-14,057*	1472,97*	-38,379*
1 by 3	977,731*	14,6315*	1396,12*	37,365*	896,66*	-29,944*
2 by 3	133,190*	31,2687*	1634,08*	40,424*	38,46*	6,202*

<b>1*2*3</b>	619,512*	11,5408*	10833,11*	-104,082*	362,98*	-19,052*
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99582		0,99915		0,99893	

\* - **▲** - significativo para  $\alpha = 0,05\%$ ; T TPC – teor de polifenóis totais; DR – resíduo seco; EE – eficiência de extração; R<sup>2</sup> – estimativa dos efeitos.

Para cada uma das respostas analisadas, foram gerados os gráficos de Pareto e superfícies de respostas. A quantidade de folhas foi a variável mais significativa sob o resíduo seco (38,83), seguido da interação entre o solvente e o método extrativo (31,26) (Figura 1A). A influência positiva observada no [gráfico de Pareto](#) é também demonstrada na superfície de resposta, onde a quantidade de folhas no maior nível apresentou maior valor de resíduo seco (Figura 1B).

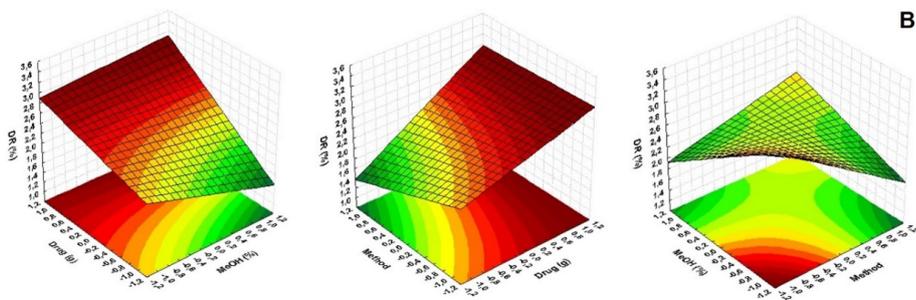
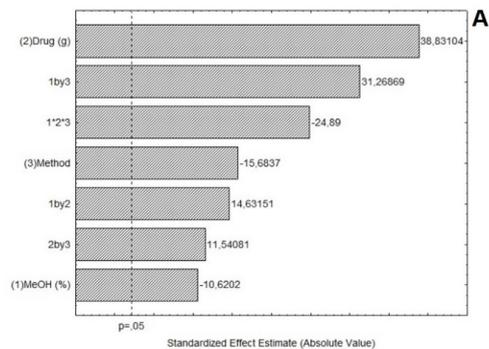
**Figura 1** – Gráfico de Pareto (A) e Superfície de resposta (B) para o resíduo seco.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

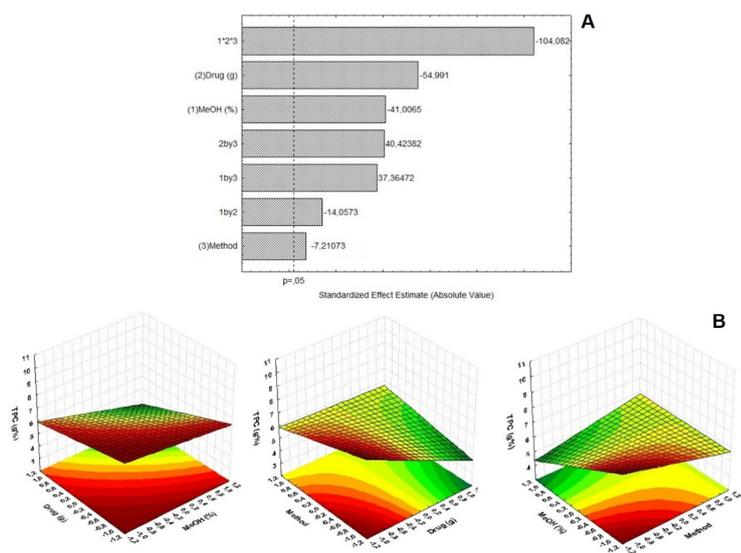
Excluídos[Magda Ferreira]: as



MeOH – metanol; TPC – teor de polifenóis totais; DR – resíduo seco; EE – eficiência de extração.

Sob a resposta de teor de polifenóis totais, a interação entre o método extrativo, solvente e quantidade de folhas foi a variável mais significativa (-104,082), apresentando influência negativa e indicando que quando os três fatores se encontram no nível superior, a resposta diminui (Figura 2A). As superfícies de resposta evidenciam que maior teor de polifenóis totais é obtido utilizando maceração, metanol 50% e 5 g de folhas (Figura 2B).

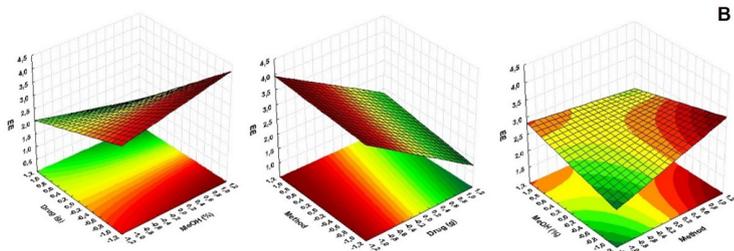
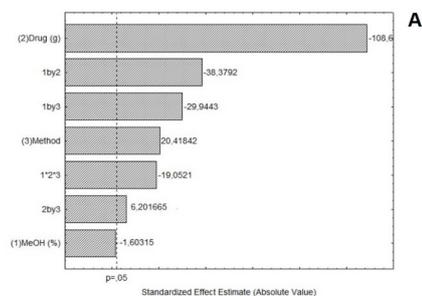
**Figura 2** – Gráfico de Pareto (A) e Superfície de resposta (B) para o teor de polifenóis totais.



MeOH – metanol; TPC – teor de polifenóis totais; DR – resíduo seco; EE – eficiência de extração.

A quantidade de folhas apresentou significância negativa sob a eficiência de extração (-108,6) (Figura 3A), enquanto que o método apresentou influência positiva (20,41) e o solvente não apresentou influência de modo isolado sob essa resposta. O menor nível de quantidade de folhas e de solvente demonstraram maior eficiência de extração (Figura 3B).

**Figura 3** – Gráfico de Pareto (A) e Superfície de resposta (B) para a eficiência de extração.



MeOH – metanol; TPC – teor de polifenóis totais; DR – resíduo seco; EE – eficiência de extração.

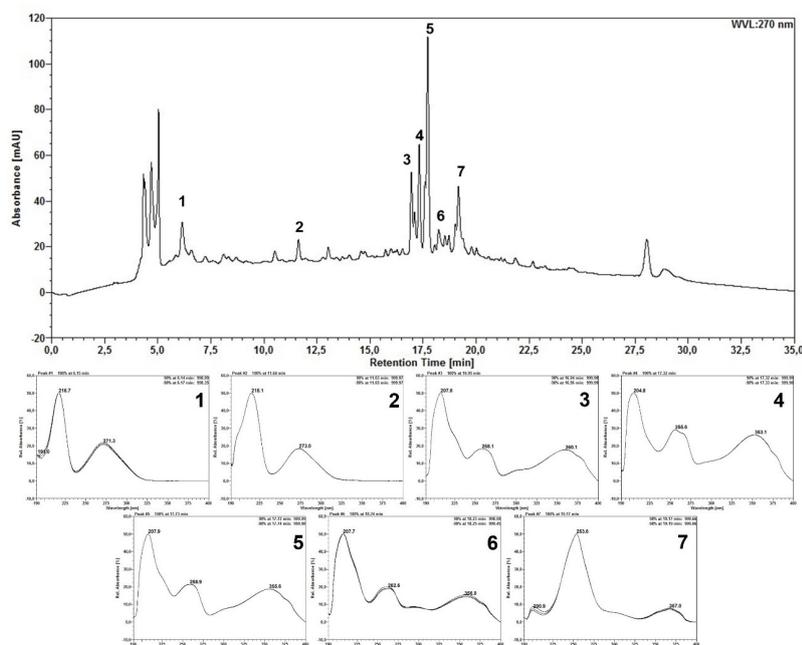
Diante do exposto, considerando as respostas obtidas, novo extrato (EMPg) foi produzido com 5 g de folhas, por maceração e utilizando 100 mL de metanol 50% como solvente, sendo este utilizado para as demais investigações descritas aqui.

### 3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de

A análise de EMPg por CLAE-DAD (Figura 4) revelou a presença de 7 picos com 98% de pureza a 270 nm. Os espectros de absorção e os tempos de retenção de 6.15 min (pico 1) e 19.17 min (pico 7) indicaram a presença dos monômeros de taninos hidrolisáveis ácido gálico e ácido elágico, respectivamente. O espectro de absorção do pico 2 revelou também a presença de monômero de taninos hidrolisáveis, contudo, o conjunto de padrões utilizados aqui não permitiu a identificação deste composto. Com o uso do detector DAD foi possível

verificar que os espectros de varredura UV dos picos 3 (máximos de absorção em 258.1 a 360.1 nm; 16.95 min), 4 (máximos de absorção em 255.6 a 353.1 nm; 17.32 min), 5 (máximos de absorção em 258.9 a 355.6 nm; 17.73 min) e 6 (máximos de absorção em 262.6 a 356 nm; 18.24 min) são característicos da presença de flavonoides.

**Figura 4** – Análise do extrato de folhas de *P. guineense* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).



Excluídos[edipo lucas]: O perfil cromatográfico do extrato (A) foi monitorado a 270 nm, revelando a presença de sete picos com 98% de pureza. Os espectros de absorção e os tempos de retenção indicaram a presença de ácido gálico (pico 1) e ácido elágico (pico 7). O espectro de absorção do pico 2 revelou a presença de monômero de taninos hidrolisáveis, enquanto os dos picos 3, 4, 5 e 6 foram característicos de flavonoides.

O perfil cromatográfico do extrato (A) foi monitorado a 270 nm, revelando a presença de sete picos com 98% de pureza. Os espectros de absorção e os tempos de retenção indicaram a presença de ácido gálico (pico 1) e ácido elágico (pico 7). O espectro de absorção do pico 2 revelou a presença de monômero de taninos hidrolisáveis, enquanto os dos picos 3, 4, 5 e 6 foram característicos de flavonoides.

Excluídos[edipo lucas]:

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

### 3.4 Toxicidade aguda

Os resultados, mostrados na tabela 3, demonstram aumento significativo no peso, no consumo de água e ração pelas fêmeas tratadas com EMPg na dose de 2000mg/kg, acompanhados, durante 14 dias.

Excluídos[edipo lucas]:

**Tabela 3.** Peso, consumo de água e ração de camundongos fêmeas tratados com EMPg na dose de 2000 mg/kg durante o ensaio de toxicidade aguda via oral. Os valores são expressos em média (n=4).

Grupos	Consumo de Água (mL)	Consumo de Ração (g)	Peso (g)
Controle	137,75	56,25	119,75
2000 mg/kg	156,5*	68,25*	122,75*

Formatado[edipo lucas]: Fonte: Negrito, Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Fonte: Negrito, Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Fonte: Negrito, Cor da Fonte: Carro

Os camundongos tratados com EMPg na dose de 2000 mg/kg (i.p) apresentaram todos os parâmetros hematológicos semelhante ao grupo controle, sem alterações significativas ou importância clínica ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Excluídos[edipo lucas]: dentro da faixa de referência

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com o extrato de folhas de *P. guineense* (EMPg) a 2000 mg/kg

Parâmetro	Controle	EMPg
Red blood cells ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8.17±1.21	8.26±0.37
Hematocrit (%)	42.22±1.79	43.19±1.33
Hemoglobin (g/dL)	15.78±0.98	15.55±0.56
MCV (%)	44.32±1.91	43.23±1.21
MCH (%)	16.21±1.02	16.91±0.45
MCHC (%)	32.33±1.21	33.78±0.82
White blood cells ( $10^3/\text{mm}^3$ )	8.12±1.44	8.75±0.96

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Segmented (%)	48.73±1.12	49.21±1.96	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Lymphocytes (%)	37.89±1.63	38.32±1.42	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Monocytes (%)	8.97±0.75	9.46±0.93	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Os valores representam a média ± SEM (n = 5/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas (p > 0,05) em comparação com o controle.

A Tabela 5 mostra os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos aos ensaios toxicológicos pré-clínicos. Não foram registradas alterações significativas (p > 0,05) ou com importância clínica.

**Tabela 5.** Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com o extrato de folhas de *P. guineense* (EMPg) a 2000 mg/kg

Parâmetro	Controle	EMPg	Excluídos[edipo lucas]: com.
Albumin (g/dL)	4.33±0.50	4.55±0.69	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Alanine aminotransferase (U/L)	83.9±1.91	84.1±3.85	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Aspartate aminotransferase (U/L)	145.3±3.45	147.5±2.25	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Alkaline phosphatase (U/L)	11.1±0.67	11.6±1.02	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Gamma-glutamyl transferase	10.8±1.09	11.1±1.33	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Total protein (g/dL)	4.43±0.65	4.69±0.75	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Blood urea nitrogen (mg/dL)	32.2±0.82	31.8±0.56	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Creatinine (mg/dL)	0.26±0.04	0.26±0.07	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Bilirubin (mg/dL)	0.17±0.01	0.18±0.21	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Cholesterol total (mg/dL)	131.4±2.33	134.7±4.65	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro
Triglycerides (mg/dL)	127.1±3.35	124.81±3.11	Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

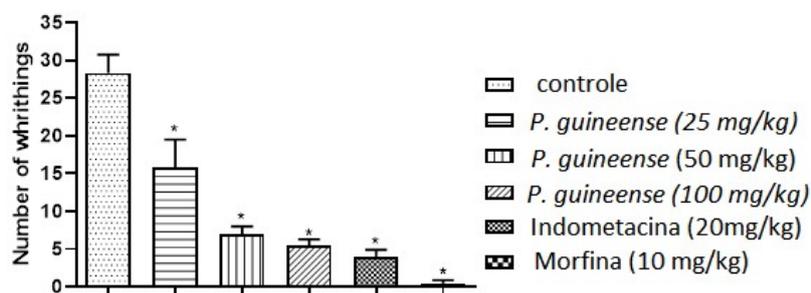
Os valores representam a média ± SEM (n = 5/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas (p > 0,05) em comparação com o controle.

### 3.5 Atividade antinociceptiva

#### 3.5.1 Modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético

Os números de contorções abdominais foram reduzidos pelo tratamento prévio utilizando EMPg (Figura 6). Nos grupos tratados com EMPg nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg, a redução foi de 89,41, 78,25 e 69,43%, respectivamente. O grupo tratado com morfina mostrou uma redução de 98,83%, enquanto o grupo tratado com Indometacina demonstrou redução de 85,88%, em relação ao grupo controle.

**Figura 5** – Número de contorções abdominais induzidas por ácido acético nos camundongos tratados com EMPg nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg.



Os valores representam a média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,001$  comparado com o controle, análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Duração de 10 minutos.

#### 3.4.2 Modelo da formalina

Na primeira fase o tratamento com EMPg (25, 50 e 100 mg/kg) por via oral, o tempo de lambertura da pata injetada com formalina foi significativamente reduzido, quando comparado ao controle, em 53,04, 53,71 e 58,66%, respectivamente (Figura 7). A morfina (10

Excluídos[edipo lucas]: 100

Excluídos[edipo lucas]: 20

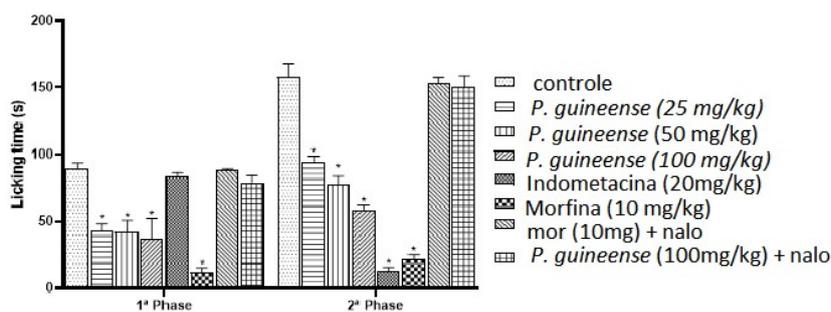
Excluídos[edipo lucas]: 4

mg/kg) reduziu significativamente em 86,16%, enquanto o grupo tratado com indometacina não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle.

Na segunda fase do teste, EMPg (25, 50 e 100 mg/kg) produziu uma redução no tempo de lambertura da pata de 40,7, 49,3 e 63,21%, respectivamente, sugerindo uma relação dose-dependente. Os controles positivos indometacina (20 mg/kg) e morfina (10 mg/kg) foram capazes de diminuir de maneira em 86,31 e 92,00% o tempo de lambertura da pata quando comparado ao controle.

Quando os animais foram previamente tratados com naloxona (antagonista opióide), ocorreu reversão total do efeito antinociceptivo do extrato de *P. guineense* na primeira e na segunda fases; esses resultados sugerem que a ação antinociceptiva de EMPg envolve o sistema opióide.

**Figura 6** – Tempo de lambertura da pata dos camundongos tratados com EMPg a 25, 50 e 100mg/kg e avaliação do envolvimento do sistema opióide do efeito antinociceptivo do extrato.

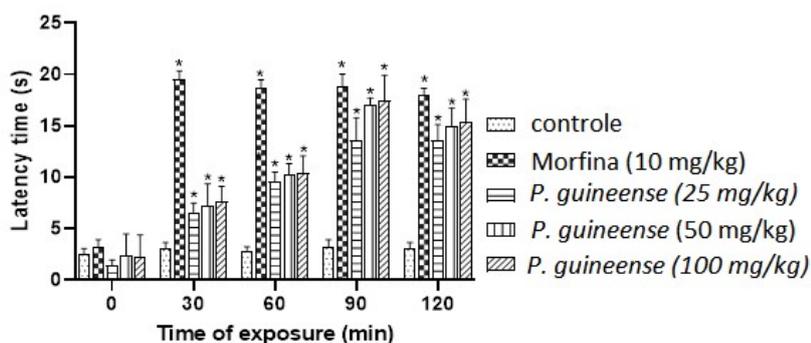


Os valores representam a média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,001$  comparado com o controle, análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett.

### 3.4.3 Modelo de imersão de cauda

O tempo de latência dos animais tratados com EMPg e morfina aumentaram significativamente ( $p < 0.001$ ) em comparação ao grupo controle após 30 minutos de tratamento (Figura 8). Os resultados mais expressivos foram registrados 90 minutos após a administração de EMPg, com aumento da latência de 68, 85 e 87% nas doses de 25, 50, 100 mg/kg, respectivamente, em comparação com o grupo controle.

Figura 7 – Tempo de latência dos camundongos tratados com EMPg a 25, 50 e 100 mg/kg.



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

#### 4. Discussão

Este trabalho foi estimulado pelos relatos prévios do potencial farmacológico de *P. guineense* e pela necessidade de novas alternativas para tratamento da dor que acarretem menos efeitos colaterais e possam aumentar o painel de estratégias terapêuticas, evitando o desenvolvimento de tolerância medicamentosa. Tendo em vista que a composição de metabólitos secundários nos vegetais pode variar de acordo com a sazonalidade ou devido a condições de estresse ambiental (Lima et al., 2021), o primeiro passo deste estudo foi a caracterização fitoquímica das folhas de *P. guineense*.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Os resultados da caracterização fitoquímica das folhas por CCD revelaram a presença de metabólitos secundários (flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas, taninos hidrolisáveis, açúcares e terpenos/esteroides) que têm sido relatados na literatura internacional como potenciais agentes antinociceptivos (Giorno et al., 2019; Freitas et al., 2020; Rodriguez et al., 2022). Esse dado estimulou a obtenção de EMPg para investigação do seu potencial como agente antinociceptivo.

Um planejamento fatorial foi desenhado em nosso trabalho para determinar as melhores condições de extração, cuja eficiência foi acompanhada através da análise comparativa do teor de polifenóis e resíduo seco dos extratos obtidos. Diferentes solventes, métodos e massa de tecido vegetal foram as variáveis escolhidas por serem normalmente avaliadas em outros estudos que buscam estabelecer melhores condições de extração (Tenório, et al 2022).

É bem relatado que os solventes mais adequados para extração de metabólitos secundários são misturas aquosas contendo etanol, metanol, acetona e acetato de etila. Uma vez que este trabalho decidiu acompanhar a eficiência de extração através do conteúdo de polifenóis e que essa classe de compostos é normalmente solúvel em solventes orgânicos de menor polaridade, o metanol foi o solvente utilizado aqui (Haminiuk, et al. 2012).

De fato, a turbólise é reconhecidamente um método exaustivo, mas isso pode ter ocasionado a saturação do sistema, extraindo um maior conteúdo de interferentes e sobrecarregando o processo de extração. Por outro lado, a maceração, apesar de ser um método estático e não exaustivo, apresentou melhores resultados, acarretando maior teor de polifenóis (Bezerra, et al, 2020). Ainda, uma maior quantidade de folhas (10 g/100 mL de solvente) pode ter dificultado a interação do solvente com o material vegetal, dificultando o processo de extração. Como consequência, EMPg, obtido utilizando 5 g de folhas por

Excluídos[edipo lucas]: atrapalhando

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

maceração e utilizando metanol 50%, foi escolhido para seguir com a investigação do potencial farmacológico.

A ausência de alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem como de sinais clínicos incluindo alterações na locomoção, sonolência, piloereção, diarreia, hiperexcitabilidade, convulsões e morte, e do consumo médio de ração e variação do peso dos animais durante a investigação da toxicidade *in vivo*, ratificaram EMPg como candidato interessante para as investigações relatadas aqui. Nosso resultado corrobora com aquele publicado por Nascimento (2021) que também relatou ausência de toxicidade em preparação de folhas de *P. guineense*.

A ingestão de água e de alimento são parâmetros importantes em estudo da segurança de novos agentes terapêuticos, visto que contribuem para o bom funcionamento do sistema fisiológico dos animais e, conseqüentemente, para uma adequada resposta à droga que está sendo avaliada; por outro lado, condições nutricionais impróprias podem acarretar funcionamento deficiente do organismo (Ramalho et al, 2019). A ausência de inapetência e a ingestão adequada de água pelos animais tratados com EMPg estão de acordo com a ausência de toxicidade aguda da amostra.

Outro parâmetro importante em avaliações toxicológicas é o sistema hematopoiético, responsável pela distribuição de oxigênio, de nutrientes e dos próprios medicamentos dentro do organismo. Nesse sentido, a integridade desse sistema também está ligada ao funcionamento adequado do sistema imune (Bloom; Brandt, 2012). A ausência de alterações significativas dos parâmetros hematológicos de camundongos tratados com EMPg sugere que esse extrato não induz uma resposta inflamatória nos animais.

Um último conjunto de parâmetros com importância toxicológica compreende os parâmetros bioquímicos, e dentre eles, os testes de função hepática, que podem fornecer informações importantes na triagem sobre o estado e integridade do fígado, órgão responsável

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

pelo metabolismo e detoxificação de todas as toxinas que entram no corpo (Brandt et al., 2009). Em nosso estudo, os marcadores ALT, AST, GGT e bilirrubina não foram significativamente alterados nos animais tratados com EMPg e, nesse sentido, o extrato pode ser classificado como atóxico ou com baixa toxicidade, conforme o Globally Harmonized System of classification and Labelling of Chemicals (GHS).

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Uma vez que a avaliação da toxicidade aguda apontou para a segurança do uso EMPg, o estudo prosseguiu com a investigação de suas propriedades antinociceptivas. Essa abordagem foi estimulada porque as drogas existentes para tratamento da dor exibem reações adversas indesejáveis. Sobre essa ótica, é interessante dizer que a ausência de toxicidade aguda pela ingestão de EMPg relatada aqui pode ser um indicativo de que medicamentos a base de folhas de *P. guineense* podem acarretar poucos ou nenhum efeito adverso.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

A síntese de compostos análogos aos produtos extraídos de plantas representa uma interessante perspectiva para novos fármacos, pois, em geral, estes podem apresentar uma atividade farmacológica melhorada, menor toxicidade e maior potencial terapêutico quando comparados aos fármacos convencionais (Lim et al., 2021).

Excluídos[edipo lucas]: ,

Excluídos[edipo lucas]: contudo mais estudos são necessários para avaliar os efeitos crônicos do extrato.

Para dar maior confiabilidade aos resultados apresentados aqui e conseguir extrair informações distintas sobre a eficiência do composto, essa pesquisa utilizou três diferentes modelos preconizados para investigação de atividade antinociceptiva. O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo de dor visceral amplamente empregado para avaliar a atividade antinociceptiva periférica (Morucci et al., 2012). A presença de flavonoides, saponinas, triterpenos e/ou esteroides pode estar diretamente relacionada à analgesia periférica induzida por EMPg (Mutalik et al, 2003; Owoyele et al, 2008). Flavonoides podem reduzir dores neuropáticas e esse efeito está ligado à estimulação das defesas antioxidantes, redução do estresse oxidativo, inibição da hiperativação de PARP, da

Excluídos[edipo lucas]: ,

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

lesão celular e dos processos de disfunção mitocondrial, bem como da ativação das células gliais e neuroinflamação (Uddin et al., 2020).

Interessantemente, no teste de formalina, EMPg apresentou ação antinociceptiva em ambas as fases do ensaio, indicando tanto a sua ação contra a dor neurogênica, quanto sua capacidade de interferir na liberação dos mediadores pró inflamatórios relacionados com a fase 2, incluindo bradicinina, prostaglandinas, serotonina, entre outros. Adicionalmente, a ação registrada para a morfina nas duas fases do teste e para a indometacina apenas na segunda fase estão de acordo com o esperado e indicam que as condições empregadas aqui foram próprias para a investigação de atividade antinociceptiva, visto que anti-inflamatórios não esteroidais, incluindo a indometacina, reduzem o comportamento nociceptivo na fase 2 do teste da formalina (dor inflamatória), mas não são igualmente eficazes na primeira fase; em contrapartida, analgésicos de ação central como a morfina e provavelmente EMPg são efetivos em ambas as fases (Barrot, 2012).

No modelo de retirada da cauda, os neurônios espinhais respondem ao estímulo térmico nocivo, possibilitando a avaliação de mecanismos espinhais envolvidas na antinocicepção (Oliveira et al., 2009). O aumento do tempo de latência dos animais tratados com EMPg revela que o extrato apresenta atividade antinociceptiva por via central.

Com relação ao provável mecanismo de ação do extrato, quando os animais foram previamente tratados com o antagonista opióide naloxona, ocorreu reversão do efeito antinociceptivo de EMPg, sugerindo que a ação antinociceptiva envolve o sistema opióide. Neste modelo, a dor é gerada indiretamente através de mediadores endógenos, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8) (Cook et al., 2018; Sikandar, Sommer, 2018; Vanderwall, Milligan, 2019; Cao, Fan, Yin 2020). Além disso, esses mediadores são capazes de aumentar a permeabilidade vascular, reduzir o limiar de nocicepção e estimular os terminais nervosos das fibras nociceptivas

Excluídos[edipo lucas]: . O efeito anti-inflamatório de EPMg aqui relatado pode estar ligado ao seu conteúdo de derivados cinâmicos, classe de metabólitos cuja atividade anti-inflamatória foi previamente relatada (Monteiro et al., 2021; OLAJIDE et al., 2020)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

(Campbell et al., 2021). Os resultados relatados neste manuscrito corroboram a hipótese que as folhas de *P. guianeense* apresentam metabólitos secundários com potencial antinociceptivo e baixa ou nenhuma toxicidade.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

## 5. Conclusão

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

As folhas de *P. guianeense* são fontes de metabólitos com potencial farmacológico por apresentar ação antinociceptiva em modelo *in vivo*, sem acarretar toxicidade aguda. Nesse sentido, o extrato das folhas se mostrou seguro nas condições avaliadas aqui. Em adição, seu efeito antinociceptivo envolve a via central e o sistema opioide.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

## 6. Referências

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50.

Bezerra, I. C. F., de Moraes Ramos, R. T., Assunção Ferreira, M. R., & Lira Soares, L. A. (2020). Optimization strategy for extraction of active polyphenols from leaves of *Eugenia uniflora* Linn. *Food Analytical Methods*, 13(3), 735-750.

Bloom, J., & JT, B. (2012). Respostas Tóxicas do sangue. *Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull*. São Paulo: Artmed, 149-160.

Brandt, A. P., Oliveira, L. F. S. D., Fernandes, F. B., & Alba, J. (2009). Evaluation of prospective hypocholesterolemic effect and preliminary toxicology of crude extract and decoction from *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.) *in vivo*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 388-393.

Brazil Flora Group, Gomes-da-Silva, J., Filardi, F. L., Barbosa, M. R. V., Baumgratz, J. F. A., Bicudo, C. E., ... & Cabral, T. S. (2022). Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. *Taxon*, 71(1), 178-198.

- Campbell, J. N., Stevens, R., Hanson, P., Connolly, J., Meske, D. S., Chung, M. K., & Lascelles, B. D. X. (2021). Injectable capsaicin for the management of pain due to osteoarthritis. *Molecules*, 26(4), 778.
- Cao, Y., Fan, D., & Yin, Y. (2020). Pain mechanism in rheumatoid arthritis: from cytokines to central sensitization. *Mediators of Inflammation*, 2020.
- Cook, A. D., Christensen, A. D., Tewari, D., McMahon, S. B., & Hamilton, J. A. (2018). Immune cytokines and their receptors in inflammatory pain. *Trends in immunology*, 39(3), 240-255.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition*, 88(6), 587-605.
- Freitas, A.F.S., Costa, W.K., Machado, J.C.B., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., Medeiros, P.L., Soares, L.A.L., Oliveira, A.M., & Napoleão, T.H. (2020) Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. *South African Journal of Botany*, 133, 30-39.
- Galvão, M. A. M., Arruda, A. O. D., Bezerra, I. C. F., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2018). Evaluation of the Folin-Ciocalteu method and quantification of total tannins in stem barks and pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) LP Queiroz. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61.
- Giorno, T. B. S., Santos, C. H. C., Carvalho, M. G., Silva, V. C., Sousa Jr., P. T., Fernandes, & P. D., Boylan, F. (2019) Study on the Antinociceptive Activity and Mechanism of Action of Isolated Saponins from *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Baill. *Molecules*, 24(24), 4584.
- Haminiuk, C. W. I., Plata-Oviedo, M. S. V., de Mattos, G., Carpes, S. T., & Branco, I. G. (2014). Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia*

- pyriformis* using different solvents. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2862-2866.
- Hunnskaar, S., & Hole, K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30(1), 103-114.
- Khatun, A., Imam, M. Z., & Rana, M. S. (2015). Antinociceptive effect of methanol extract of leaves of *Persicaria hydropiper* in mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1-8.
- Lim, K. J., Lim, Y. P., Hartono, Y. D., Go, M. K., Fan, H., & Yew, W. S. (2021). Biosynthesis of Nature-Inspired Unnatural Cannabinoids. *Molecules*, 26(10), 2914.
- Lima, R. K., Cardoso, M. D. G., Santos, C. D. D., Moraes, J. C., Néri, D. K. P., & Nascimento, E. A. D. (2009). Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 1777-1781.
- Lima, E. M.; Carneiro, A. N.; Fernando, L.M.; Felix, L.P.; Oliveira, A. F.; Moura, R. T. Jr.; Teles, Y. C. F. (2020). First complete NMR data and theoretical study of an antimicrobial formylated dihydrochalcone from *Psidium guineense* Sw. *Natural Product Research*, 36 (1), 419-423.
- Monteiro, Á. B., de Andrade, H. H. N., Felipe, C. F. B., & de Almeida, R. N. (2021). Pharmacological studies on cinnamic alcohol and its derivatives. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31(1), 16-23.
- Morucci, F., Lopez, P., Miño, J., Ferraro, G., & Gorzalczany, S. (2012). Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds of *Lithrea molleoides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(2), 401-406.

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.

OECD, T. O. (2001). Organization for Economic Cooperation and Development: Paris (2001). URL: <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264189867-en>.

Oliveira Silva, R. C. M., da Cunha, S. M. D., Medeiros, C. I. S., dos Anjos, R. M., de Oliveira, H. M. B. F., de Sousa, A. P., ... & de Oliveira Filho, A. A. (2020). Potencial Genotóxico do Extrato Metanólico de *Psidium guineense* Sw (Araçá verdadeiro) em Células da Mucosa Oral. *Research, Society and Development*, 9(7), e214973814-e214973814.

Excluídos[edipo lucas]: Olajide, O. A., Akande, I. S., da Silva Maia Bezerra Filho, C., Lepiarz-Raba, I., & de Sousa, D. P. (2020). Methyl 3, 4, 5-trimethoxycinnamate suppresses inflammation in RAW264. 7 macrophages and blocks macrophage-adipocyte interaction. *Inflammopharmacology*, 28(5), 1315-1326.

Oliveira, A. M., de Luna Freire, M. O., da Silva, W. A. V., Ferreira, M. R. A., Paiva, P. M. G., Soares, L. A. L., ... & Napoleão, T. H. (2018). Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95, 289-297.

Oliveira, R. R., Góis, R. M., Siqueira, R. S., Almeida, J. R., Lima, J. T., Nunes, X. P., ... & Quintans-Júnior, L. J. (2009). Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) AC Sm., Fabaceae, in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 672-676.

Ortega, J. T., Suárez, A. I., Serrano, M. L., Baptista, J., Pujol, F. H., & Rangel, H. R. (2017). The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro. *AIDS research and therapy*, 14(1), 1-6.

Padilha, M. D. R. F., Shinohara, N. K. S., Pereira, E. D. P. R., Pimentel, R. M. M., Andrade, S. A. C., Portela, F. H., & Bernardino, A. V. S. (2016). Physical, physicochemical and

taxonomic characterization of *Psidium* araçá Raddi. Journal of Environmental Analysis and Progress, 106-110.

- Proença, C. E. B., Amorim, B. S., Antonicelli, M. C., Bünge, M., Burton, G. P., Caldas, D. K. D., ... & Sobral, M. (2020). Myrtaceae em Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171> (acesso em 14-I-2021).
- Ramalho, L. D. S. N. (2019). Avaliação da toxicidade não clínica do extrato etanólico bruto e frações de *Sida rhombifolia* L. em roedores.
- Reis, F. C. D. (2018). Projeto de implementação do uso adequado da fitoterapia na unidade de saúde de águas férreas do município de São Pedro dos Ferros, Minas Gerais.
- Rodrigues, C. G., Ferreira, P. R. B., Mendes, C. S. O., Junior, R. R., Valerio, H. M., Brandi, I. V., & de Oliveira, D. A. (2014). Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw.(Myrtaceae). Journal of Medicinal Plants Research, 8(35), 1095-1100.
- Rodriguez, C. E. B., Ouyang, L., & Kandasamy, R. (2022). Antinociceptive effects of minor cannabinoids, terpenes and flavonoids in Cannabis. Behavioural Pharmacology, 33(2-3), 130-157.
- Rosa, C. D., Câmara, S. G., & Béria, J. U. (2011). Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. Ciência & saúde coletiva, 16, 311-318.
- Santos, M. O., Almeida, B. V., Ribeiro, D. A., Macêdo, D. G., Macedo, M. J., Macedo, J. G., ... & Souza, M. (2017). The conservation of native priority medicinal plants in a Caatinga area in Ceará, northeastern Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 89, 2675-2685.
- Sikandar S, Sommer C. (2018) Neurotrophins, Cytokines, and Pain. In: Wood JN, editor. The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain. Oxford University Press.

Tenório, C. J. L., Silva, S. L., Raimundo e Silva, J. P., Tavares, J. F., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2022). HPLC-ESI-MSn Analysis and Validation of UV-Vis and RP-HPLC-PDA Methods for Polyphenols Quantification from *Hymenaea eriogyne*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1-10.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, Chinese(Simplified)

Uddin, M. S., Mamun, A. A., Sumsuzzman, D. M., Ashraf, G. M., Perveen, A., Bungau, S. G., ... & Abdel-Daim, M. M. (2020). Emerging promise of cannabinoids for the management of pain and associated neuropathological alterations in Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 11, 1097.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Vanderwall, A. G., & Milligan, E. D. (2019). Cytokines in pain: harnessing endogenous anti-inflammatory signaling for improved pain management. *Frontiers in immunology*, 10, 3009.

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.

## REFERÊNCIAS

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

AGRA, M.F., SILVA, K.N, Basílio, I.J.L.D, FREITAS, P., BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18:472-508, 2008.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

AJEBLI, Mo.; EDDOUKS, M. Phytotherapy of hypertension: An updated overview. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, v. 20, n. 6, p. 812-839, 2020.

ALMEIDA, T. F. ROIZENBLATT, S. E TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, v.1000, n.1-2, p. 40-56, 2004.

ALVARENDA, F. Q. et al. Atividade antinociceptiva e antimicrobiana da casca do caule de *Psidium cattleianum* Sabine. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, p. 1125-1133, 2015.

AMARAL, F. M. M., OLIVEIRA, M. A., COUTINHO, D. F., GODINHO, J. W. L. S., CARTÁGENES, M. S. S., NEIVA, V. A., NEIVA NETO, R. R., & BASTOS, W. M. Estudo de validação de espécies vegetais: o elo entre o saber popular e o fitoterápico. In: Trajetória e pesquisa nas ciências farmacêuticas. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 1, 33 – 54, 2021.

ANDRADE, D.R.M.; HELM, C.V.; MAZZA, C.A. da S.; MAZZA, M.C.M. Avaliação da composição química do araçá em duas localidades do Sul do Brasil. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Bento Gonçalves: SBF, 2012

ANVISA, RESOLUÇÃO-RDC Nº 48, DE 16 DE MARÇO DE 2004.

ARAÚJO, E.R.S. Avaliação da biocompatibilidade e determinação da atividade antimicrobiana de *Psidium guineense* swarts. Dissertação (Mestrado em Patologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

ARAÚJO, L.C.A., RIOS, N.L., BOLETI, A.P.A., DOS SANTOS, E.L., 2016. 196 - Profile of Antioxidant Activity of Fruits of the Savana Brazilian. Free Radical Bio. Med. 100, Supplement, S95, 2016.

AYDEDE, M. Defending the IASP definition of pain. The Monist, v. 100, n. 4, p. 439-464, 2017.

BADKE, M. R., BUDÓ, M. L. D., ALVIM, N. A. T., ZANETTI, G. D. & HEISLER, E. E. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. Texto & contexto enfermagem, 21: 363-370, 2012.

BAJES, H. R.; ALMASRI, I.; BUSTANJI, Y. Plant Products and Their Inhibitory Activity Against Pancreatic Lipase. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2020.

BEECH, E.; RIVERS, M.; OLDFIELD, S.; SMITH, P.P. Global Tree Search: The first complete global database of tree species and country distributions. Journal of Sustainable Forestry, v.36, n. 5, p. 454–489, 2017.

BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E.; SILVA JUNIOR, J.F.; PROENÇA, C.E.B. Araçá. In: VIEIRA, R.F.; COSTA, T. S.A.; SILVA, D.B. da; SANO, S.M. (Ed.). Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Cap.3, p.42-62, 2006.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, English(Zimbabwe)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

BEZERRA, J.E.F.; SILVA-JUNIOR, J.F. da; LIRA JUNIOR, J.S. de. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Nordeste. Biodiversidade, 51. Brasília, p.270-278, 2018.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76, 965, 2008.

BORBA A. M, MACEDO M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. Acta Bot. Bras.;20(4):771-782, 2006.

CALDEIRA, S.D.; HIANE, P.A.; RAMOS, M.I.L.; RAMOS FILHO, M.M. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* Sw.) e do tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do estado de Mato Grosso do Sul. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v.22, p.145-154, 2004.

CAMPOS L.Z.O. Etnobotânica do gênero *Psidium* L. (Myrtaceae) no cerrado brasileiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

CAMPOS, S. C, SILVA, C. G, CAMPANA, P. R. V. & ALMEIDA, V.L. Toxicidade de espécies vegetais. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Revista APS. 18(4), 470 – 482, 2016.

CARTENS E, WILSON C. Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, supression by morphine and habituation. Journal of Neuropharmacology; 70:630-639, 2007.

CISNEIROS, R. A. et al. Qualidade fisiológica de sementes de araçazeiro durante o armazenamento. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande – Paraíba, v.7, n.3, p.513-518, 2003

COELHO, S. G.; HASS, A. P. S.; POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in South of Brazil. Journal of Ethnopharmacology, v. 90, p. 135-143, 2004.

Excluídos[edipo lucas]: CLARKE, J.H.R.; RATES, S.M.K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. Infarma, v.19, n.1/2, p.41-8, 2007.

COHEN, M.; QUINTNER, J.; VAN RYSEWYK, S. Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. *Pain Rep*, v.3, 2018.

COLALTO, Cristiano. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytotherapy research*, v. 32, n. 3, p. 413-425, 2018.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* Species. *Journal Brazil Chemical Society*, São Paulo, v. 22, n. 6, jun. 2011.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. “Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil”. *Floresta e Ambiente*, v. 11, n.1, p.47-52, 2004.

CUNHA, F. A. B. et al. Toxicidade de *Eugenia uniflora* L.(myrtaceae) em modelos de *Drosophila melanogaster* e células sanguíneas humanas. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento Fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica*. v. 9, n.1, p. 23-32, 2009.

DAMIANI, C., SILVA, F.A.D., ASQUIERI, E.R., LAGE, M.E., VILAS BOAS, E.V.d.B. Antioxidant potential of *Psidium guineense* Sw. jam during storage. *Pesqui. Agropecu. Trop.* 42, 90-98, 2012.

DIAS, E.C.M. et al. Uso de fitoterápicos e potenciais riscos de interações medicamentosas: reflexões para prática segura. *Revista Baiana de Saúde Pública*, Salvador, v. 41, n.2, p. a2306, 2018.

FANTONI DT, MASTROCINQUE S. Fisiopatologia e Controle da Dor. In: Fantoni DT, Cortopassi SRG. *Anestesia em Cães e Gatos*. São Paulo: Rocca. p.323-34, 2002.

FEITOZA, L. Q.; DE SOUZA TERRA, F.; GRASSELLI, C. S. M. Plantas Medicinais e seus Compostos com Potencial Terapêutico no Tratamento do Câncer: Revisão Integrativa. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 67, n. 1, 2021.

FERNANDES, T. G. et al. In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *The Scientific World Journal*, v. 2, 2012.

FERNÁNDEZ, A. Alvarez, A., Garcia, M. D., Saenz, M. T. Anti-inflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. ozua and isolation of the triterpene lupeol. *Il Fármaco*, v.56, p.335-338, 2001.

FERRO, D. *Fitoterapia: conceitos clínicos*. Atheneu, ed. 1, 2008.

FIGUEIREDO, P. L. B. et al. Chemical variability in the essential oil of leaves of Araçá (*Psidium guineense* Sw.), with occurrence in the Amazon. *Chemistry Central Journal*, s.l, v. 12, n. 1, p.1-11, 2018.

FLORA DO BRASIL. *Psidium* in Flora do Brasil 2022. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10853>>. Acesso em: 08 setembro. 2022

FLORA DO BRASIL. Myrtaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB171>>. Acesso em: 08 setembro. 2022

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, Russian(Moldova)

FLORES, G., WU, S., NEGRIN, A., Kennelly, E. J. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry*. v. 170, p. 327–335, 2013.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

FRANZON, R. C., CAMPOS, L. Z. O., PROENÇA, C. E. B., SOUSA-SILVA, J. C. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. *Embrapa Cerrados*, Brasília 1–48, 2009.

FROTA, R. G, AMORIM, A. S, CARNEIRO, J. K. R. & OLIVEIRA, M. A. S. Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da infusão de *Plectranthus barbatus*–Lamiaceae (malva-santa) avaliada pelo sistema teste *Allium cepa*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 18(1), 67-72, 2019.

GARCÍA, M. D., Fernández, A. Alvarez, A., Saenz, M. T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. ozua (Mirtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. v. 91, p. 69-73, 2004

Excluídos[edipo lucas]: GALLO, M.; KOREN, G. Can herbal products be used safely during pregnancy? Focus on *Echinacea* *Canadian Family Physician*, v.47, p.1727-8, 2001

GHOSH, S.; FLORES, A. Common variance fractional factorial designs and their optimality to identify a class of models. *Journal of Statistical Planning and Inference*. v. 143, n. 10, p. 1807-1815, 2013.

GOBBO- NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v.30, p. 374- 381, 2007.

GORDON, A., JUNGFER, E., DA SILVA, B.A., MAIA, J.G., MARX, F. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. *J. Ag. Food Chem.* 59, 7688-7699, 2011.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON P.G. & LUCAS, E. World Checklist of Myrtaceae. Royal Botanic Gardens: Kew, 2015.

GOVERNA, Paolo et al. Phytotherapy in the management of diabetes: a review. *Molecules*, v. 23, n. 1, p. 105, 2018.

HAMINIUK, C.W.I. Comportamento reológico e fracionamento péctico das polpas integrais de araçá (*Psidium cattleianum* sabine) e amora-preta (*Rubus* spp). 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HANNA, V., SENDEROVICH, H. Methadone in Pain Management: A Systematic Review. *The Journal of Pain*, 2020.

HARKOUK, H. et al. Farmacología de los opioides. *EMC-Anestesia-Reanimación*, v. 44, n. 2, p. 1-24, 2018.

HASHEMI S.R., DAVOODI H. (2011) Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Vet Res Commun* 35: 169–180, 2011.

HELLEBREKERS LJ. Dor em Animais. São Paulo:Manole. p.69-79, 2002.

HO, R.; VIOLETTE, A.; CRESSEND, D.; RAHARIVELOMANANA, P.; CARRUPT, P.A.; HOSTETTMANN, K. Antioxidant potential and radical-scavenging effects of flavonoids from the leaves of *Psidium cattleianum* grown in French Polynesia. *Natural Products Research*, v.26(3), p.274–277, 2012.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, Chinese(Simplified)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

JESUS, N.A.; SUCHARA, E.A. Cultivo de plantas tóxicas e a ocorrência de intoxicações em domicílios no município de Barra do Graças. Revista Eletrônica da UNIVAR, v.2; n.10, p.89-95, 2013.

JÜTTE, R. et al. Herbal medicinal products-Evidence and tradition from a historical perspective. Journal of Ethnopharmacology, Limerick, v. 207, p. 220-225, 2017.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.

LATINA, R. et al. Epidemiology of chronic pain in the Latium region, Italy: A cross-sectional study on the clinical characteristics of patients attending pain clinics. Pain Management Nursing, v. 20, n. 4, p. 373-381, 2019.

LAZZAROTTO-FIGUEIRÓA, J.; CAPELEZZOA, A. P.; SCHINDLERA, M. S. Z.; FOSSÁA, J. F. C.; ALBENYSIMÔESA, D., ZANATTAA, L.; OLIVEIRA, J. V.; DAL MAGRO, J. Antioxidant activity, antibacterial and inhibitory effect of intestinal disaccharidases of extracts obtained from *Eugenia uniflora* L. Seeds. Brazilian Journal of Biology, v. 81, n. 2, p. 291-300, 2021.

LIMA, E. M.; CARNEIRO, A. N.; FERNANDO, L.M.; FELIX, L.P.; OLIVEIRA, A. F.; MOURA, R. T. Jr.; TELES, Y. C. F. First complete NMR data and theoretical study of an antimicrobial formylated dihydrochalcone from *Psidium guineense* Sw. Natural Product Research, 2020.

LIMA, E.M. et al. Fitoesteroides isolados de *Psidium araca raddi* (myrtaceae). III Conapesc. Paraíba, 2018.

LIMA, P. J. P. et al. Extração da piperina a partir da pimenta-do-reino: comparação de processos extrativos. Revista Saúde em Foco. Indaiatuba – São Paulo. V. 13, 2021.

MA, W.; QUIRION, R. Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? Neuroscience Letters, v. 437, n. 3, p. 165–169, 2008

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, Russian(Moldova)

MACAUBAS, C. S.; FÉLIX, M.D.G.; AQUINO, A.K.S.; PEREIRA, P.G.; BRITO, E.V.O.; OLIVEIRA, A.A.; IGOLI, J.O.; WATSON, D.G.; TELES, Y. C. F. Araçain, a tyrosol derivative and other phytochemicals from *Psidium guineense* Sw. Natural Products Research,

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

v. 33, p. 1-5, 2021.

MACHADO, H. L. et al. Research and extension activities in herbal medicine developed by Rede FitoCerrado: rational use of medicinal plants by the elderly in Uberlândia-MG. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 16, v. 3, p. 527-533, 2014.

MARINHO, L. N. S., & MEIRELLES, L. M. A. Os riscos associados ao uso de medicamentos isentos de prescrição. Revista saúde multidisciplinar, 9(1), 2021.

MEDINA, A. L. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. V.128, P.916-922. Issue 4, 15 October, 2011.

Formatado[edipo lucas]: English(Zimbabwe)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

MIGLIATO, K. F. et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. Química Nova. v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

MING-TATT, et al. Antinociceptive activity of a Syntethic Curcuminoid Analogue, 2, 6-bis(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene) cyclohexanone, on nociception induced models in mice. Basic & Clinical pharmacology & toxicology, v. 110, n. 3, p. 275-282, 2012.

MONSENY, A.M. et al. Poisonous plants: an ongoing problem. Anales de Pediatria, v.85, n.2, p.347-353, 2015.

MONTEIRO, S. C.; COSTA, C. L. Farmacobotânica: aspecto teórico e aplicação. Porto Alegre: Artmed, 2017

MORAIS, S. M.; BRAZ FILHO, R.; Produtos Naturais: Estudos Químicos e Biológicos, 1a ed. EdUECE: Fortaleza, 2007

NAPOLITANO, J.G.; LANKIN, D.C.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F. Complete <sup>1</sup>H NMR spectral analysis of ten chemical markers of Ginkgo biloba. Magn Reson Chem, v.50(8), p.569-575, 2012.

NASCIMENTO, K. F. et al. Composição química e avaliação biológica de óleo essencial e composto isolado das folhas de *Psidium guineense* Swartz (Myrtaceae). 2017.

NCUBE, N.S.; AFOLAYAN, A.J.; OKOH, A.I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natura compounds of plant origin: current methods and future trends. African Journal of Biotechnology, v.7, n.12, p.1797-1806, 2008.

NEIRA GONZÁLEZ, A.M., NEIRA GONZÁLEZ, M.B., PINTO, N.L.S. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. Rev. Cub. Plan. Med. 10, 0-0, 2005.

NISBET, G., SEHGAL, A. Pharmacology in the management of chronic pain. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, v. 20, n. 10, p. 555-558, 2019.

OECD- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: OECD, 2001.

OLIVEIRA, A.M., de LUNA FREIRE, M.O., da Silva, W.A.V., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., Soares, L.A.L., de Medeiros, P.L., de Melo Carvalho, B., Napoleão, T.H. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. Regul. Toxicol. Pharmacol. 95, p. 289–297, 2018.

OLIVEIRA, M. A. S. Impacto do exercício na dor crônica, Ver. Bras. Med. Esporte. São Paulo, V. 20, N. 3, 2014.

OLIVEIRA, V.B, ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. Revista Brasileira de Plantas Medicinai, v.18, n.1, p. 230-239, 2016.

PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin induced nociception. Neuroscience, v.102, p.937-944, 2001.

PATRÍCIO, Karina Pavão et al. O uso de plantas medicinais na atenção primária à saúde: revisão integrativa. Ciência & Saúde Coletiva, v. 27, p. 677-686, 2022.

PAULA, J.A.M.; Silva, M.R.R.; Costa, M.P.; Diniz, D.G.A.; SÁ, F.A.S.; Alves, S.F.; Costa, E.A.; Lino, R.C.; Paula, J.R. Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of two chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, p. 1-15, 2012

PEREIRA, C.K.B. Estudo químico e atividades microbiológicas de espécies do gênero *Psidium* (Myrtaceae). Dissertação (Mestrado em Bioprospeção Molecular) Universidade Regional do Cariri, Crato, Brazil, 2010.

PEREIRA, M.C.L. et al. Use of medicinal plants in care of women with gynecological diseases: integrative review. International Journal of Development Research, v. 09, n. 03, p. 26373-26380, 2019

PEREIRA, M. A. M. Investigação da atividade espasmolítica das folhas de *Psidium guineense* Swartz. 2021.

PINELO, M., RUBILAR, M., SINEIRO, J. & NÚÑEZ, J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). Food Chemistry 85: 267-273, 2004.

PROENÇA, C.E.B.; COSTA, I. R.; TULER, A.C. *Psidium* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020.

Qin, X.J, YU Q., YAN H., KHAN A., FENG, M.Y, LI, P.P, HAO, X.J, AN, L.K, LIU, H.Y. 2017. Meroterpenoids with antitumor activities from guava (*Psidium guajava*). J Agric Food Chem. 5(24):4993–4999.

RAJA, S. N. et al. The revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. Pain, v. 161, n. 9, p. 1976, 2020.

RIBEIRO, J.C. Qualidade de plantas medicinais de uso popular no Brasil: uma visão experimental: roteiro de práticas. São João da Boa Vista: Editora Universitária UNIFAE, 45p, 2021.

RIBEIRO, S; SCHMIDT, A.P.; SCHMIDT, S.R.G. O uso de opióides no tratamento da dor crônica não oncológica: o papel da metadona. Brazilian Journal of Anesthesiology, v. 52, n. 5, p. 644-651, 2019.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, Chinese(Simplified)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, Russian(Moldova)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

RIVERO-MALDONADO, G., PACHECO, D., MARTÍN, L.M., SÁNCHEZ-URDANETA, A., QUIRÓS, M., ORTEGA, J., COLMENARES, C., BRACHO, B. Flavonoids extracted from *Psidium* species (MYRTACEAE) in Venezuela. *Rev. Fac. Agr.* 30, 217-241, 2013.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. *Ciências & Saúde Coletiva*, v, 16, n. 1, p. 311 - 318, 2011.

SANTANA, J. M.; PERISSINOTTI, D. M. N. Definição de dor revisada após quatro décadas. *Brazilian Journal of Pain*, 3(3), 197 – 198, 2020.

SANTOS, M. O. et al. The conservation of native priority medicinal plants in a Caatinga area in Ceará, northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, [s.l.], p. 1-11, 2017.

SCHAFRANSKIA, K.; POSTIGO, M. P.; VITALIB, L.; MICKEB, G. A., RICHTER, W. E.; CHAVES, E. S. Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) utilizando planejamento experimental. *Química Nova*, v. 42, n. 7, p. 736- 744, 2019.

SCHOLZ, Joachim et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*, v. 160, n. 1, p. 53, 2019.

SCHULZ, V., HANSEL, R. & TYLER, V. (2002). *Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. São Paulo: Manole. 386 p, 2002.

SILVA, A. S. Avaliação da secagem do bagaço de cajá usando planejamento fatorial composto. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SILVA, A.T.; MAZINE, F.F. A família Myrtaceae na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, São Paulo, Brasil. *Rodriguésia*, v. 67, n.1, p. 203-224, 2016.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, p. 848, 2017.

SIMÕES, C. O. M., SCHENKEL, E. P., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., & PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 486, 2017.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, Chinese(Simplified)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC. 1102p, 2010.

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

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 7.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2016.

SOUSA, A. K. A. et al. Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso das folhas de *Psidium guineense* Swartz. 2016.

SOUSA, A. D. et al. Penetration, development, and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on *Psidium* species and induced cellular responses in the roots. Revista Brasileira de Fruticultura, [s.l.], v. 39, n. 2, p.1-10, 2017.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Ed. Nova Odessa. Instituto Plantarum. 640 p, 2005.

SUÁREZ, A.; ULATE, G., CICCIO, J. F. Hypotensive action of an aqueous extract of *Pimenta dioica* (Myrtaceae) in rats. Rev. biol. Trop. v.48, n.1, p. 53-58, 2000.

SZERWIESKI, L.L.D. et al. Uso de plantas medicinais por idosos da atenção primária. Revista Eletrônica de Enfermagem, Goiânia, v. 19, p. a04, 2017.

TAIZ, L. ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4 Edition, Artmed, Porto Alegre, 848 p, 2009.

TIMBRELL, John A. Principles of biochemical toxicology. CRC press, 2009.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical screening and extraction: a review. Intern Pharm Science, v.1, n.1, p. 98-106, 2011.

VASCONCELOS, J. et al. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. Revista Científica da UFPA, v.7, n.1, p.1-10, 2009.

VEGGI, P. C. Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos. 2009. 165 f. UNICAMP, 2009.

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro, Chinese(Simplified)

Formatado[edipo lucas]: Cor da Fonte: Carro

- VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova, v.28, n.3, p.519-28, 2005.
- VENDITTI, A, UKWUEZE, S.E. A possible glycosidic benzophenone with full substitution on B-ring from *Psidium guajava* leaves. Nat Prod Res. 31(7):739–741, 2017.
- VERRI, F. R. Avaliação do nível de inserção óssea do dente suporte em prótese parcial removível mandibular classe I associada a implante osseointegrado. Análise pelo método dos elementos finitos. Dissertação (Doutorado em Odontologia). Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.
- WANG, Jin et al. Antioxidant activity of leaf extracts from different *Hibiscus sabdariffa* accessions and simultaneous determination five major antioxidant compounds by LC-Q-TOF-MS. Molecules, v. 19, n. 12, p. 21226-21238, 2019.
- WEGENER, T. Patterns and Trends in the Use of Herbal Products, Herbal Medicine and Herbal Medicinal Products. International Journal of Complementary and Alternative Medicine, Edmond, v. 9, n. 6, p. 00317, 2017.
- WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae *Lato sensu* based on a matK phylogeny. Plant Systematics and Evolution, v. 251, p. 3-19. 2005.
- WONG, W. H. et al. Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. Industrial Crops and Products. v. 63, p. 238-248, 2015.
- WONGKITTIPONG, R., PRAT, L., DAMRONGLERD, S. & GOURDON, C. Solid-liquid extraction of andrographolid from plants-experimental study, kinetic reaction and model. Separation and Purification Technology 40: 147-154, 2004.
- YADAV, R., & AGARWALA, M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. Journal of phytology 3:10-4, 2011.
- ZIVARPOUR, P., NIKKHAH, E., MALEKI DANA, P., ASEMI, Z., HALLAJZADEH, J. Molecular and biological functions of gingerol as a natural effective therapeutic drug for cervical cancer. J. Ovarian Res. 14, 2021.