



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Jeane Bachi Ferreira

**Perfil de segurança e atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de
Eugenia brasiliensis Lam. (Myrtaceae) em camundongos**

Florianópolis,
2023

Jeane Bachi Ferreira

**Perfil de segurança e atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de
Eugenia brasiliensis Lam. (Myrtaceae) em camundongos**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em farmácia.

Orientadora: Profª. Dra. Morgana Duarte da Silva
Coorientadora: Msc. Scheila Iria Kraus

Florianópolis,

2023

Ferreira, Jeane

Perfil de segurança e atividade antinociceptiva e anti
inflamatória das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam.
(Myrtaceae) em camundongos / Jeane Ferreira ;
orientadora, Morgana Da Silva, coorientador, Scheila
Kraus, 2023.

26 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Toxicologia. 3. Plantas Medicinais. 4.
Dor . 5. Inflamação. I. Da Silva, Morgana . II. Kraus,
Scheila. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Farmácia. IV. Título.

Jeane Bachi Ferreira

**Efeitos toxicológicos e farmacológicos das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam.
(Myrtaceae) em camundongos**

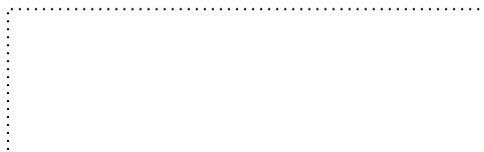
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de bacharel em farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Local UFSC/Campus Florianópolis, 23 de Junho de 2023.



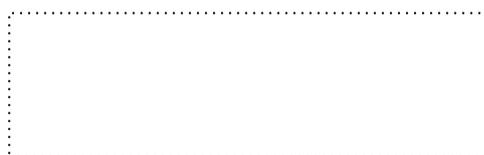
Coordenadora – Profa. Dra. Liliete Canes Souza Cordeiro

Banca examinadora



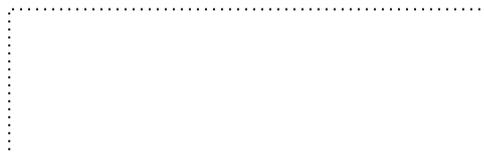
Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva

Orientador(a)



Dra. Róli Rodrigues Simões

Washington University in St. Louis



Dr.(a) Angela Patricia França

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família, especialmente a minha mãe, por todo o suporte nessa jornada, por acompanhar o sonho e sonhar junto na conquista desse título de ensino superior, por todo o incentivo e por sempre estar presente nos momentos mais necessários.

Gostaria de agradecer meus amigos, por esses quase 10 anos de amizade, desde o grupo de teatro, entrando praticamente juntos na universidade, por todos os momentos de companheirismo e comemoração juntos.

Aos colegas do laboratório, muito obrigada, imensamente! À professora Morgana, por ser essa mulher forte, que mantém uma postura firme, mesmo nos momentos mais difíceis, pela ótima orientação nos trabalhos e por sempre trazer ótimas soluções com um bom humor. À Scheila que, desde que entrei no laboratório, me incentivou e me passou todos os seus conhecimentos, sempre estando presente, fazendo o possível para nos ensinar o seu melhor. Ao Marcos, por sempre estar ajudando da melhor forma, incentivando e nos incluindo em seus projetos. Ao Vini, por toda a parceria, bom humor e piadas, sempre disponível e ajudando no que foi preciso.

Em memória ao professor Adair, que nos deixou cedo, mas no pouco tempo que tive contato, mostrou o que é fazer e gostar de ciência com um brilho no olhar e um sorriso.

RESUMO

Relevância etnofarmacológica: *Eugenia brasiliensis* Lam. é popularmente conhecida como “grumixama” ou “cereja brasileira” e é amplamente utilizada na medicina popular com propriedades adstringentes, diuréticas, energizantes, antirreumáticas e anti-inflamatórias. Embora seu uso tradicional seja amplamente propagado, são poucos os estudos que avaliam sua eficácia e, principalmente, seu potencial efeito toxicológico.

Objetivo: O presente estudo buscou avaliar os efeitos toxicológicos do extrato hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis* (EHEb) e a sua atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

Materiais e métodos: Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas. O estudo da toxicidade aguda foi realizado de acordo com o guia 425 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), e a toxicidade subaguda foi avaliada de acordo com o guia 407 da OECD. Foram observadas as respostas comportamentais em conjunto com as avaliações hematológicas, bioquímicas e histológicas. A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do EHEb foi verificada utilizando o modelo de alodinia mecânica e edema de pata induzidos por Carragenina. A alodinia mecânica foi avaliada com uso de filamentos de von Frey e o edema de pata foi avaliado com uso de micrometro. Além disso, os níveis de citocinas inflamatórias e o dano oxidativo foram avaliados nas patas dos animais.

Resultados: O tratamento com EHEb não foi capaz de gerar alterações toxicológicas relevantes, tanto nos testes agudos como subagudos. Além disso, as doses de 100 e 300 mg/kg do EHEb reduziram a alodinia mecânica ($p < 0,001$) induzida por carragenina. A dose de 100 mg/kg foi capaz de reduzir citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral - TNF- α , e interleucina - IL-1 β), além de aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase na pata. Contudo, a dose de 300 mg/kg foi capaz de reduzir o edema da pata, reduzir as citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , e IL-6) e os níveis de malondialdeído na pata dos animais.

Conclusões: Esse estudo demonstrou que o EHEb não apresenta efeitos tóxicos relevantes. Ademais, também apresenta um importante potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante.

Palavras-chave: Plantas medicinais; *Eugenia brasiliensis*; Toxicologia, Dor, Inflamação.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Eugenia brasiliensis* Lam., popularly known as “grumixama” or “Brazilian cherry”, is widely used in folk medicine with astringent, diuretic, energizing, anti-rheumatic, and anti-inflammatory properties. Despite its traditional use, detailed toxicological studies of *Eugenia brasiliensis* are few.

Aim of the study: Thus, in the current study, we evaluate the toxicological effects of hydroalcoholic extract of *Eugenia brasiliensis* (HEEb) and its antinociceptive and anti-inflammatory activity.

Materials and methods: We used male and female Swiss mice. Acute toxicity study was performed following the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guideline 425, and subacute toxicity was assessed following OECD guideline 407. We observed behavioral responses, in addition to hematological, biochemical, and histological evaluations. The antinociceptive and anti-inflammatory activity of HEEb were assessed using the Carrageenan-induced mechanical allodynia and paw edema model. Mechanical allodynia, levels of inflammatory cytokines, and oxidative damage were evaluated.

Results: The treatment with HEEb was not able to generate important toxicological alterations, both in acute and subacute tests. Moreover, doses of 100 and 300 mg/kg of HEEb were able to reduce mechanical allodynia ($p < 0,001$). The dose of 100 mg/kg was able to reduce inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6), in addition to increasing the activity of the enzyme superoxide dismutase in the paw. However, the dose of 300 mg/kg was able to reduce paw edema, reduce inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) and malondialdehyde levels in the animals' paws.

Conclusions: This study demonstrated that HEEb does not present important toxic effects. Additionally, an important antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant potential were observed.

Keywords: Medicinal plants; *Eugenia brasiliensis*; Toxicology; Pain; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécime de <i>Eugenia brasiliensis</i>	13
Figura 2 - Resumográfico.....	18

ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA analysis of variance
AUC area under the curve
CEUA Ethics Committee on the Use of Animals
CG carrageenan DEXA dexamethasone
DMSO dimethyl sulfoxide;
DTNB 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
EDTA ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GSH glutathione peroxidase GST Grip strength test
HE hematoxylin and eosin
HEEb hydroalcoholic extract of *Eugenia brasiliensis*
H₂O water
H₂O₂ hydrogen peroxide
LAMEB Multiuser Laboratory of Biology Studies
MDA malondialdehyde
MBT Marble Burying Test
NOAEL Non-Observed Adverse Effect Level
OECD Organization for Economic Cooperation and Development
OFT Open Field Test
PBS phosphate buffer
PMSF phenylmethylsulphonyl fluoride
SAL saline
SEM standard error of the mean
SOD superoxide dismutase
TBARS thiobarbituric acid reactive substances
TCA trichloroacetic acid
TEMED tetramethylethylenediamine;
TNF- α tumor necrosis factor alpha
IL interleukin
UFSC Federal University of Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A importância das plantas medicinais.....	12
1.2. O gênero <i>Eugenia</i>	13
1.3. <i>Eugenia brasiliensis</i>	13
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MÉTODOS E RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO.....	15
5.1. EHEb não apresentou efeito toxicológico agudo e subagudo em camundongos.....	15
5.2. EHEB APRESENTOU EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTINOCICEPTIVO E ANTIOXIDANTE NO MODELO DE CARRAGENINA NA PATA.....	16
6. CONCLUSÃO.....	16
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	17
8. REFERÊNCIAS	18
ANEXO I - ARRIVE GUIDELINES.....	20
ANEXO II - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	24
ANEXO III - COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO DO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO.....	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância das plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais acompanha a humanidade, desde as civilizações mais antigas (ARAÚJO, 2017). Alguns dos primeiros registros da utilização de plantas com fins medicinais datam o ano de 2600 a. C., na Mesopotâmia, transcritos em tábuas de argila. O conhecimento sobre as plantas medicinais foi então se desenvolvendo e se estabelecendo através dos séculos, ao redor do globo, nas mais diversas culturas. No entanto, nesse desenvolvimento, se criaram características próprias nas diferentes partes do mundo. Na China, várias práticas de saúde compõem o sistema terapêutico, juntamente com as plantas medicinais. Os primeiros registros da fitoterapia chinesa se encontram no livro *Pen tsao* (2500 A.C.), onde foram desenvolvidas formulações, combinando plantas, de acordo com o entendimento de que mundo é um conjunto no qual tudo se interrelaciona (GURIB-FAKIM, 2006; SAAD, 2009). No Brasil, o uso das plantas medicinais provém do saber popular, que se construiu, em grande parte, a partir da união do conhecimento dos povos indígenas, dos povos africanos trazidos na época da escravatura e da imigração europeia (ARAÚJO, 2017).

Todo esse conhecimento foi construído empiricamente, através de tentativa e erro, considerando que não havia tecnologias para a pesquisa, sejam de propriedades medicinais ou potenciais efeitos tóxicos. Desse modo, as plantas configuraram a base para o sofisticado sistema da medicina tradicional, que se perpetua até os dias de hoje, atualmente sendo uma fonte para a pesquisa de novos fármacos (GURIB-FAKIM, 2006). Na falta de recursos para adquirir medicamentos ou buscar terapias, as plantas medicinais são de fácil acesso e baixo custo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, entre 70% e 95% dos cidadãos da maioria dos países em desenvolvimento fazem o uso da medicina tradicional, o que inclui a utilização de plantas medicinais para a atenção primária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

No sentido de regulamentar a utilização de plantas medicinais, foi desenvolvida e aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto nº 5.813, 2008) sendo possível direcionar novas legislações específicas e delimitar os setores da sociedade envolvidos na cadeia produtiva de produção de fitoterápicos. Em suas

17 diretrizes, a política articula de forma intersetorial a ampliação das opções terapêuticas, o uso sustentável da biodiversidade brasileira, a valorização do conhecimento tradicional, fortalecimento da agricultura familiar, inclusão social e regional, desenvolvimento tecnológico e industrial e participação social (BRASIL, 2008).

1.2. O gênero *Eugenia*

Da família Myrtaceae, o gênero *Eugenia* é um dos maiores, com aproximadamente 5000 espécies, sendo 400 delas presentes no Brasil, distribuídas por todo o território nacional (FIUZA et al., 2008). Compostos fenólicos, flavonoides, esteroides, triterpenos, ácidos graxos, β -pineno, limoneno, cineol, pulegona e cânfora fazem parte do perfil fitoquímico de algumas plantas desse gênero, variando de espécie para espécie. Alguns desses compostos, como os flavonoides, possuem ações farmacológicas bem descritas na literatura, como ação antioxidante e anti-inflamatória, o que desperta um grande interesse para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos ou medicamentos fitoterápicos (LOPES, et al., 2007).

1.3. *Eugenia brasiliensis*



Fig 1: *Eugenia brasiliensis*, árvore e folhas. Disponível em: <http://www.jardimcor.com/catalogo-de-especies/eugenia-brasiliensis/>; <<https://ciprest.blogspot.com/2017/10/grumichama-ou-grumixama-preta-eugenia.html>>.

A *Eugenia brasiliensis* Lamarck (Lam.) é uma árvore amplamente distribuída do estado da Bahia até o estado do Rio Grande do Sul. Possui folhas e cascas aromáticas e adstringentes, muito utilizadas na medicina popular (QUEIROZ, et al., 2015; REITZ, KLEIN, 1969; REVILLA, 2002). Vários estudos realizados com *E. brasiliensis* demonstraram propriedades antibacterianas sobre o *Staphylococcus aureus*, que pode ocasionar problemas de saúde importantes por ser capaz de colonizar vários órgãos e tecidos (MAGINA et al., 2009). Além disso, também foram observadas propriedades hipolipemiantes e antioxidantes em ratos no modelo de hipertriacilgliceridemia (LIMA et al., 2017), antineoplásicas contra células do câncer de mama (TEIXEIRA et al., 2017), além das atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas em camundongos (PIETROVSKI et al., 2008; SIMÕES et al., 2018).

1.4. Nociceção e dor

A dor é considerada o quinto sinal vital e indica que algo de errado está acontecendo no organismo. Segundo a Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) a dor se trata de “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). Em um processo de dor aguda, que surge quando há lesão tecidual e, conseqüentemente, processos inflamatórios, ocorre a ativação e sensibilização de nociceptores. Os nociceptores são neurônios sensoriais, que respondem a estímulos nocivos e são constituídos de fibras C não mielinizadas e fibras A δ mielinizadas. Seus corpos celulares se encontram nos gânglios da raiz dorsal e nos gânglios do trigêmeo (MATSUDA; HUH; JI, 2019).

Nos terminais nevosos dos nociceptores se encontram receptores ionotrópicos e canais iônicos dependentes de voltagem (como os receptores TRVP1, NAv1.7, NAv1.8, e NAv1.9), receptores acoplados à proteína G e receptores de tirosina quinase que podem ser sensibilizados na presença de mediadores inflamatórios liberados por células inflamatórias (bradicinina, prostaglandinas, citocinas inflamatórias). Nessa denominada sensibilização periférica, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β mantém contínua a ativação de receptores TRPV1 e canais de sódio respectivamente, desse modo, amplificando e conservando o processo doloroso, de modo que as células inflamatórias se mantêm no tecido danificado, continuamente liberando mediadores inflamatórios (BONANNI et al., 2022;

MATSUDA; HUH; JI, 2019). Sabendo que a planta *Eugenia brasiliensis*, têm potencial de atuar em processos inflamatórios e nociceptivos, assim se instiga investigar o seu potencial de atuação na dor nociceptiva e inflamatória.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar das plantas medicinais serem, desde os tempos mais antigos, utilizadas para a cura de enfermidades, existe uma escassez de informações sobre sua capacidade de gerar efeitos danosos para o organismo que as consomem, dito estes efeitos tóxicos. Por isso é de suma importância realizar estudos que comprovem sua segurança para o consumo, para além de suas propriedades medicinais. Desse modo, se favorece a aproximação da pesquisa para população, oferecendo informações em favor do consumo racional e seguro de plantas medicinais, como também, aliando o conhecimento popular à descoberta e seleção de plantas que tenham o potencial de gerar novos tratamentos (VEIGA JR, 2008). Nesse sentido, em 22 de junho de 2006, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos por meio do Decreto nº 5.813, que traz dentre as suas diretrizes fomentar a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, além de garantir e promover a segurança, eficácia e qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2008).

Na literatura, encontram-se estudos pontuando as propriedades e alguns potenciais efeitos terapêuticos da *Eugenia brasiliensis*, porém são escassos os trabalhos que pesquisam sua toxicidade e sua capacidade antinociceptiva e anti-inflamatória. Visto o potencial de produzir novos medicamentos usando como base a *E. brasiliensis*, é imprescindível realizar a investigação mais aprofundada de seus efeitos terapêuticos, assim como de seu potencial tóxico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os potenciais efeitos tóxicos agudos e prolongados do extrato hidroalcolóico de *Eugenia brasiliensis* (EHEb), bem como sua atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar os efeitos tóxicos agudos de EHEb de acordo com o guia 424 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE);
- Investigar os efeitos subagudos (28 dias) de EHEb seguindo o guia 407 da OCDE;
- Identificar o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante de EHEb no modelo de nocicepção induzido por Carragenina injetada na pata.

4. MÉTODOS E RESULTADOS

As secções de métodos e resultados estão apresentadas em formato de artigo, em inglês, publicado em fevereiro de 2023 na revista *Journal of Ethnopharmacology*.

Journal of Ethnopharmacology 309 (2023) 116309



Toxicological and pharmacological effects of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves in mice

Scheila Iria Kraus^{a,b}, Jeane Bachi Ferreira^a, Jhonatan Augusto Ribeiro^a, Kelly Cattelan Bonorino^a, Vinícius Alexandre Wippel^a, Michele Debiasi Alberton^c, Andréia Caroline Fernandes Salgueiro^d, Carlos Henrique Lemos Soares^e, Morgana Duarte da Silva^{a,b,*}

^a Laboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

^b Program of Post-Graduation in Neurosciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Campus III, Regional University of Blumenau- Rua São Paulo 2171, Itoupava Seca, 89030-003, Brazil

^d Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Brazil

^e Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

Artigo na íntegra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874123001770?via%3Dihub>

5. DISCUSSÃO

5.1. EHEb não apresentou efeito toxicológico agudo e subagudo em camundongos

Como visto no presente artigo, no que se refere a toxicologia oral aguda e subaguda, não ocorreu nenhum óbito nos grupos testados, não houve mudanças comportamentais e, também, não ocorreram mudanças a respeito de parâmetros hematológicos e histopatológicos. Esses dados corroboram com o que foi apresentado por Sardi e colaboradores (2017), onde foi analisada a toxicidade *in vitro* com macrófagos RAW 264.7 de roedores, pelo método MTT ((3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e a toxicidade *in vivo* em um modelo usando larvas *G. mellonella*. Foram comparados os extratos de *Eugenia brasiliensis* (folhas e sementes) e de outras espécies do gênero *Eugenia* (*Eugenia leitonii*). Nenhum dos extratos da *E. brasiliensis* foi capaz de afetar a viabilidade das células quando comparados ao veículo em concentrações superiores a 400 µg/mL. Em relação as larvas *G. mellonella*, onde foi avaliada a toxicidade aguda dos extratos, a dose letal média (LD50) encontrada para o extrato das folhas foi de 1250 mg/Kg, menor do que o valor encontrado na toxicidade subaguda em camundongos (>2000 mg/Kg).

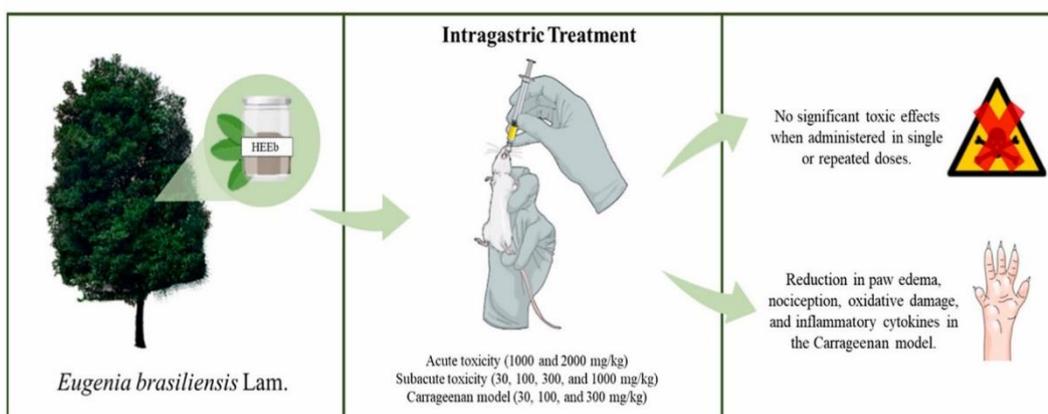
5.2. EHEB apresentou efeito anti-inflamatório, antinociceptivo e antioxidante no modelo de carragenina na pata

No modelo executado de injeção de Carragenina na pata, a dose de 300 mg/Kg do extrato foi capaz de reverter o quadro inflamatório, reduzindo significativamente o edema e as concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-6, além de reduzir a alodinia mecânica. Esses dados favorecem o que foi apresentado por Simões e colaboradores (2018), onde foram realizados o teste da injeção de formalina na pata e o teste de dor inflamatória prolongada produzida por adjuvante completo de Freund (CFA). Na fase neurogênica do teste da formalina, o extrato não foi capaz de diminuir o tempo de lambida e mordida da pata. Já na fase inflamatória, onde atuam os mediadores inflamatórios endógenos (bradicinina, histamina, óxido nítrico e citocinas, além de outros) foi obtida uma redução significativa da resposta nociceptiva, quando comparada ao grupo controle. No modelo de CFA, executado ao longo de 7 dias, a dose de 100 mg/Kg do EHEb foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e, também, as concentrações de TNF- α e IL-1 β na pata traseira direita, onde foi injetado o CFA.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento com o extrato das folhas *Eugenia brasiliensis* não foi capaz de gerar efeitos tóxicos relevantes nos animais, não causando nenhum óbito nos animais testados, além de não alterar parâmetros bioquímicos e histológicos. Ademais, o tratamento com EHEb demonstrou propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas, corroborando com outros dados da literatura. Esses resultados estão apresentados no resumo gráfico (Figura 6). Isto demonstra que o tratamento com EHEb é seguro e produz resultados muito interessantes, o que nos incentiva a realizar maiores pesquisas com a planta para, no futuro, desenvolver novos medicamentos.

Toxicological and pharmacological effects of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves in mice



Kraus et al., 2023. *Journal of Ethnopharmacology*

Fig 6: Resumo gráfico. O extrato das folhas de *Eugenia brasiliensis* foi administrado via i.g. nos testes de toxicidade aguda e subaguda e no modelo de nocicepção induzida por Carragenina. Não gerou nenhum efeito tóxico relevante nos testes de toxicidade e reduziu o edema de pata, a nocicepção, o dano oxidativo e as citocinas inflamatórias no modelo de Carragenina.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho identificou, de forma inicial, a segurança e eficácia de uma planta medicinal utilizada amplamente pela população. Deste modo, como perspectivas futuras, objetiva-se avaliar o potencial da planta em outros modelos de dor, principalmente crônica, visando o desenvolvimento de um tratamento com os custos e efeitos adversos reduzidos, ao passo que aumente a adesão por parte do paciente.

Nesse sentido, o nosso grupo de pesquisa já avaliou efeitos de EHEb no modelo de fibromialgia induzida por reserpina (dor nociplástica) e neuropatia induzida pelo esmagamento do nervo isquiático (dor neuropática). Os resultados, ainda não publicados, são promissores e nos levam a novas perguntas de pesquisa. Assim sendo, algumas de nossas perspectivas incluem avaliar o efeito da planta em um modelo de osteoartrite de joelho (dor nociceptiva), bem como identificar seus possíveis mecanismos de ação através do uso de agentes farmacológicos (agonistas e antagonistas).

7. REFERÊNCIAS

ARAUJO, Juarez Silva. Medicina Tradicional: as plantas medicinais no contexto de vida e trabalho dos Agentes Comunitários de Saúde do município de Juiz de Fora / Juarez Silva Araujo. -- 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Portaria nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 dez 2008.

BONANNI, R. et al. Chronic Pain in Musculoskeletal Diseases: Do You Know Your Enemy? **Journal of Clinical Medicine** 2022, Vol. 11, Page 2609, v. 11, n. 9, p. 2609, 6 maio 2022.

FIUZA. T. S. et al. Pharmacognostic characterization of the leaves of *Eugenia uniflora* L. **Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia**, v. 2, p. 21-31, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 1 fev. 2006.

INST OSWALDO CRUZ, M. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. **A Review Mem Inst Oswaldo Cruz**. [s.l.: s.n.].

SAAD, G.; LEDA, P. C. Fitoterapia Contemporanea: tradição e ciência na prática clínica. Rio de Janeiro; Elsevier, 2009, p. 274

LOPES, T. J. et al. Antocianinas: Uma Breve Revisão das Características Estruturais e da Estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, p. 291-297. Jul/Set.,2007.

MAGINA, M. D. A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of Eugenia species. **Journal of Natural Medicines**. v. 63, p. 345–350. 2009.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**. Springer Tokyo, , 20 fev. 2019.

QUEIROZ, J. M. G. et al. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de Eugenia como fitoterápico. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 9(2). p. 73-159, 2015.

REITZ, R. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas: Flora Ilustrada Catarinense [Myrtaceae: illustratedcatarinense's flora]. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. Revilla, J., 2002.

RAJA, S. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020;23. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001939. Online ahead of print. » <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>

The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 464-471, 2008.

ANEXO I – ARRIVE GUIDELINES

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Study design	1	For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. Available on items 2.5, 2.6 and 2.7 The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). Described at items 2.5, 2.6 and 2.7
Sample size	2	<ol style="list-style-type: none"> Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. Described in items 2.5, 2.6, and 2.7; and also in figures and tables legends. Total n of animals: 115. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. Decided according to OECD guidelines and previous studies by the research group.
Inclusion and exclusion criteria	3	<ol style="list-style-type: none"> Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i>. If no criteria were set, state this explicitly. Not applied. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. Not applied. All experimental units were included. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. Described at items 2.5, 2.6 and 2.7
Randomisation	4	<ol style="list-style-type: none"> State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. Described at item 2.4 Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly. Not applied.
Blinding	5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis). Described at item 2.4
Outcome measures	6	<ol style="list-style-type: none"> Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. Not applied.
Statistical methods	7	<ol style="list-style-type: none"> Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. Described on item 2.8 Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met. Described on item 2.8
Experimental animals	8	<ol style="list-style-type: none"> Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. Described on item 2.4 Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures. Described on item 2.4
Experimental procedures	9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: <ol style="list-style-type: none"> What was done, how it was done and what was used. Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7. When and how often. Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7. Where (including detail of any acclimatisation periods). Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7. Why (provide rationale for procedures). Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7.
Results	10	For each experiment conducted, including independent replications, report: <ol style="list-style-type: none"> Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). Described on tables and graphs legends. If applicable, the effect size with a confidence interval. P<0.05. Described in item 2.8.

**ANEXO III - COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO DO SISTEMA
NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO
TRADICIONAL ASSOCIADO**



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE *Eugenia brasiliensis* NO CONTROLE DA DOR CRÔNICA.", protocolada sob o CEUA nº 4484200921 (ID 001948), sob a responsabilidade de **Morgana Duarte da Silva e equipe; Scheila Iria Kraus; Jeane Bachi Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 06/12/2021.

We certify that the proposal "THERAPEUTIC POTENTIAL OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT FROM *Eugenia brasiliensis*: CONTROL OF CHRONIC PAIN.", utilizing 297 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 4484200921 (ID 001948), under the responsibility of **Morgana Duarte da Silva and team; Scheila Iria Kraus; Jeane Bachi Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 12/06/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2021** a **10/2024**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **45 a 60 dias**

N: **297**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: Este projeto será desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da dor e inflamação (LANDI), no Departamento de Ciências Biológicas da UFSC. 4.14 Métodos adotados para minimização de estresse ou sofrimento do animal Nota-se que a utilização de animais na pesquisa ou ensino sempre irá impactar negativamente no bem-estar do animal. Isso porque o animal será exposto a diversas manipulações e/ou será mantido em ambientes padronizados, que podem não preencher totalmente suas necessidades e adaptações. Portanto, a elaboração do atual projeto de pesquisa considerou os seguintes aspectos: - Estamos cientes de que a dor e o sofrimento dos animais devem ser o mínimo necessário para a realização da pesquisa; - Seguiremos os Princípios Éticos da utilização de animais em pesquisa científica e os conceitos dos 3Rs; - Conhecemos a biologia e a etiologia da espécie que será utilizada, considerando os componentes físico e comportamental; - Vamos documentar as atividades por meio de filmagens, gravações ou fotografias sempre que possível, para assim permitir sua reprodução futura; - Proveremos alojamento, ambiente, alimentação e controle ambiental adequados para a espécie; - Realizaremos o manejo adequado para o animal, com trocas periódicas da maravalha e reposição de ração e água, sendo este realizado por equipe de pesquisadores com curso de manejo animal, treinados e capacitados para esse fim; - O médico veterinário será requisitado assim que observarmos qualquer alteração comportamental, de acordo com os endpoints e as orientações do [Rat Grimace Scale], que exacerbam o quadro algico tipicamente induzido pelos modelos da presente pesquisa. Serão considerados os seguintes comportamentos para estabelecimentos dos endpoints para o estudo: perda de peso de 25% ou mais, quando o animal em 72 horas ingerir menos de 40% de seu consumo normal de água e comida, piloereção marcante com sinais de desidratação, quando não houver interação (olhar), vocalização não provocada caracterizando angústia, secreção óculo-nasal intensa, dispnéia, tremor e convulsões persistentes, prostração prolongada (por mais de 1 hora) e automutilação. Além de comportamentos, também serão avaliados parâmetros posturais dos animais. Esses parâmetros foram adaptados para camundongos seguindo as orientações do [Rat Grimace Scale] que demonstra através de fotos o score de dor em ratos. Segundo o [Rat Grimace Scale], a taxa de intensidade para dor pronunciada pode ser percebida: A) na órbita ocular: Os animais com dor exibem um estreitamento da área orbital (pálpebras bem fechadas ou aperto dos olhos). O aperto dos olhos é definido como contração dos músculos orbitais. A membrana nictitante pode ser visível e se torna mais pronunciada à medida que a dor se intensifica. Como regra, qualquer fechamento palpebral que reduza o tamanho do olho por mais da metade deve ser codificado como dor severa; B) Nariz: Animais com dor exibem falta de protuberância em cima do nariz, isto é, um achatamento da ponte nasal; C) Orelhas: As orelhas de ratos com dor podem ser curvadas e pontudas. Na condição de "nenhuma dor", as orelhas são perpendiculares à cabeça, voltadas para frente e com as pinas ligeiramente inclinadas para trás. Importaneamente, as orelhas também apresentam uma forma arredondada. Na dor,



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



as orelhas tendem a se enrolar para dentro e aumentam o ângulo de inclinação. A orelha, ao se enrolar, resulta em uma forma "aguçada". Em estados de dor pronunciada, as orelhas são inclinadas para o trás e são mantidas perto de 45 ° em relação ao eixo perpendicular ao nariz. Como resultado, o espaço entre as orelhas pode aparecer mais amplo em relação à linha de base. D) Vibrissas: Os ratos com dor têm vibrissas que mudam de posição em relação à linha de base. As vibrissas se inclinam ligeiramente para baixo e, com a progressão da dor, as almofadas se tensionam e aumenta o ângulo das vibrissas em relação à cabeça. Isto dá a aparência de vibrissas "em pé".

Florianópolis, 17 de fevereiro de 2022

Luciana A. Honorato

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

**ANEXO III - COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO DO SISTEMA
NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO
TRADICIONAL ASSOCIADO**



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A67DFD4

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A67DFD4**
Usuário: **Morgana D Silva**
CPF/CNPJ: **008.394.119-36**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Eugenia Eugenia brasiliensis Lamarck (Lam.)

Eugenia brasiliensis

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Potencial terapêutico do extrato hidroalcoólico de Eugenia brasiliensis no controle da dor crônica**

Equipe

Morgana Duarte da Silva	UFSC
Scheila Iria Kraus	UFSC
Jeane Bachi Ferreira	UFSC
Michele Debiasi Alberton Magina	Universidade Regional de Blumenau

Parceiras Nacionais

Data do Cadastro: **09/09/2021 19:28:40**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **19:28** de **09/09/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**