



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Scheila Iria Kraus

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS DO  
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia brasiliensis* Lam. EM  
MODELOS DE DOR**

Florianópolis

2024

Scheila Iria Kraus

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS DO  
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia brasiliensis* Lam. EM  
MODELOS DE DOR**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito para a obtenção do título de **Doutora em  
Neurociências**

Orientadora: Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva

Florianópolis

2024

Kraus, Scheila Iria

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS  
DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia  
brasiliensis* Lam. EM MODELOS DE DOR /Scheila Iria Kraus ;  
orientadora, Morgana Duarte da Silva, 2024.

70 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Plantas Medicinais. 3. Eficácia .  
4. Segurança. 5. Dor. I. da Silva, Morgana Duarte. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências. III. Título.

Scheila Iria Kraus

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia brasiliensis* Lam. EM MODELOS DE DOR**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 07 de fevereiro de 2024 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Nara Lins Meira Quintão, Dra.  
Universidade do Vale de Itajaí

Prof. Juliano Ferreira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Patrícia de Souza Brocardo, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Jhenifer Karvat Lorbiéski, Dra.  
Universidade Regional de Blumenau

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Neurociências

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Profa. Morgana Duarte da Silva, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2024.

Este trabalho é dedicado à minha família,  
que jamais mediu esforços para que eu  
conquistasse todos os meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Embora este trabalho seja apresentado como de autoria única, muitas foram as mãos que participaram, direta e indiretamente, de sua construção. Sem essas mãos eu jamais teria chegado até aqui.

Primeiramente, agradeço aos meus pais que me deram a vida e todo apoio necessário para que eu seguisse os meus sonhos. Mãe, você é meu maior exemplo de amor, dedicação e honestidade. Obrigada por não me deixar desistir, mesmo sem entender para quê “estudar tanto”. Pai, obrigada por me ensinar sobre a importância do trabalho, do esforço e da persistência.

Agradeço à minha irmã, Sueli, que me deu o primeiro livro da vida e foi minha inspiração inicial para que eu começasse essa jornada. Agradeço também ao meu cunhado, Johnny, por todas as caronas e ajudas nos mais diversos momentos. Sou infinitamente grata aos dois por me permitirem ser tia e dinda dos meus maiores tesouros, Joaquim, Augusto e Benício (a caminho). Agradeço não só pelo apoio incondicional de vocês, mas também pela compreensão nos momentos em que eu não pude estar presente

Agradeço imensamente à minha orientadora, professora Morgana, que me acolheu com toda a sua generosidade, carinho e atenção. Obrigada por adoçar os nossos dias com paçoca, mas também com palavras de incentivo, amor e novos jeitos de enxergar a Ciência. A sua força, determinação e respeito são nossos combustíveis diários. Prof, saiba que levarei os seus ensinamentos por toda a minha existência e espero ainda te dar muito orgulho!

Agradeço ao professor Adair, que infelizmente nos deixou durante essa jornada. Embora eu saiba que ele não vai ler isso, felizmente tive a oportunidade de agradecê-lo em vida por acreditar em mim desde o começo da minha trajetória científica, quando permitiu que eu desenvolvesse minhas primeiras atividades no laboratório. Espero retribuir levando todo o seu legado, com o brilho nos olhos pela Ciência, o mais longe que eu puder.

Agradeço imensamente aos meus colegas e amigos que o LANDI e o PPGNeuro me proporcionaram. Por traz de cada linha que compõe os gráficos desta tese existem inúmeras histórias. A maioria delas, engraçadas. Mas tantas outras, histórias de apoio, de mãos estendidas, de momentos que só possíveis ultrapassar com a ajuda dessas pessoas. Por isso, Kelly, Vini, Jeane, Marcos, Róli, Jhenifer, Amandinha, Cibele, Thayza, Shelly, Carol, Luiza, Jhonatan, sem vocês, eu não teria conseguido. Obrigada por tanto. Estarei sempre torcendo pelo sucesso de todos.

Dentre essas pessoas, algumas foram especialmente fundamentais, sendo meu alicerce durante a execução deste trabalho. Jeane e Vinícius, a ajuda de vocês foi excepcional do início ao fim. Serei imensamente grata por ter os melhores ICs que poderiam existir. Agradeço também pela nossa amizade, que surgiu junto com o trabalho duro. Que ela perpetue sempre e que eu possa acompanhar, com muito orgulho, todas as conquistas de vocês.

Kelly, você foi uma das pessoas mais importantes de todo esse processo. Desde a ajuda com os experimentos, a leitura de cada parágrafo desta tese, as palavras de apoio diárias, os cafés e livrarias em momentos de surto. Obrigada por ser essa pessoa incrível e não me deixar desistir nunca. Sua amizade é um dos meus maiores presentes da vida!

Marcos, obrigada por percorrer esses 8 anos de laboratório comigo. Sua dedicação, persistência e apoio me inspiram muito. Amandinha, obrigada por me divertir e tornar os (extensivos) dias de experimentos mais leves e agradáveis. Ângela, obrigada por toda a sua ajuda e paciência com os blottings. Ana Merian, obrigada por me ensinar, majestosamente, sobre PCR e me auxiliar com as análises.

Ao longo desse caminho, tive a sorte grande de encontrar e conviver com várias outras pessoas incríveis. Uma delas é o meu amor, Thiago, que surgiu para deixar o processo mais leve e bonito. Obrigada pelo seu apoio, sua ajuda, sua dedicação e por me ensinar muito. Agradeço também à Deia, que esteve presente comigo diariamente, desde o início da graduação. Sua amizade e paciência são de grande valor para mim. Agradeço à Claudia e à Ju, dois grandes achados que a bio me proporcionou e que levarei por toda a vida.

Também agradeço profundamente a todos os professores que participaram da minha trajetória acadêmica. Guardo um imenso carinho, respeito e admiração por cada um (a) deles (as). Agradeço em especial, aos professores do PPGNeuro UFSC, que além de instruir, me inspiraram e encorajaram a seguir nessa jornada. Prof. Eduardo, obrigada por todos os seus ensinamentos, incentivos e oportunidades de colaboração. Também agradeço por participar de (quase) todas as minhas bancas até aqui, suas colocações são sempre muito valiosas. Profa. Patrícia, obrigada por ser exemplo e inspiração desde a graduação. Suas aulas fascinantes fazem parte dos motivos de eu estar aqui hoje. Profa. Nara e Prof. Juliano, obrigada pela participação nas bancas de qualificação e defesa de doutorado. Ter a oportunidade de aprender e crescer com pessoas tão qualificadas é uma grande honra. Profa. Jhenifer (ou Jheni, como quiser), obrigada por me ajudar, me incentivar e aceitar contribuir com o meu trabalho. Te devo algumas pinã coladas! Prof. Rodrigo, obrigada pela sua ajuda e por disponibilizar o seu laboratório para as análises de blotting. Prof. Carlos Soares, obrigada por toda a ajuda e paciência com as (intermináveis) análises bioquímicas.

Por fim, mas não menos importante, agradeço às agências de fomento, CAPES e CNPq, pelo incentivo financeiro para a realização do trabalho. Também ao LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia) pela disponibilidade técnica e de recursos, e ao CIENp (Centro de Inovação e Ensaio Pré-clínicos) pela solicitude nos equipamentos e reagentes. Finalmente, agradeço à UFSC e a todos os seus servidores técnicos e docentes por fazerem acontecer todos os dias. É por conta do trabalho de vocês que a Universidade configura como a quarta melhor do Brasil. Sou cria da UFSC, com muito orgulho!

A todos vocês, a minha eterna gratidão!



"Em algum lugar, alguma coisa incrível  
está esperando para ser descoberta."

Carl Sagan

## RESUMO

**Introdução:** A espécie de planta *Eugenia brasiliensis* Lam., popularmente conhecida como grumixama, ibaporoiti ou cereja brasileira, é amplamente utilizada com propriedades adstringentes, diuréticas, energizantes, antirreumáticas e anti-inflamatórias. No entanto, embora o uso popular da espécie seja bastante estabelecido, poucos são os estudos que exploram sua segurança e eficácia. Diante disso, este trabalho objetiva investigar os potenciais toxicológicos das folhas de *Eugenia brasiliensis*, bem como sua atividade terapêutica em modelos animais de dor nociceptiva, nociplástica e neuropática. **Métodos:** Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas. Os estudos de toxicidade aguda e em doses repetidas foram realizados seguindo os guias 425 e 407 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), respectivamente. Inicialmente, os animais foram tratados por via intragástrica (gavagem) com doses únicas de 1000 e 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *E. brasiliensis* (EHEb) e, em seguida, observados quanto aos sinais tóxicos agudos e mortalidade por 14 dias. A toxicidade em doses repetidas foi avaliada ao longo de 28 dias de tratamento (doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg de EHEb), através de testes comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histológicos. A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória aguda do EHEb (100 e 300 mg/kg) foi avaliada no modelo de dor inflamatória induzido por carragenina, através do teste de von Frey e mensuração do edema de pata. Os níveis de citocinas inflamatórias [fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6)] da pata foram quantificados por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA); e o estresse oxidativo [atividade da mieloperoxidase (MPO), glutathiona peroxidase (GSH), superóxido dismutase (SOD) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)] foi verificado por espectrofotometria. O efeito prolongado do EHEb (300 mg/kg) foi avaliado no modelo de fibromialgia induzido por reserpina (0,25 mg/kg, subcutânea, por três dias consecutivos). Os animais foram tratados por 10 dias com EHEb e duloxetine (controle positivo), sendo que neste tempo foram avaliados parâmetros de nocicepção, coordenação motora, força, comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso. Ao final, os tecidos foram coletados para quantificação de citocinas inflamatórias e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e seu receptor (TrkB total e fosforilado), por ELISA e Western blotting. Adicionalmente, atividade do extrato (100 e 300 mg/kg) também foi avaliada em um modelo de neuropatia induzido pelo esmagamento do nervo isquiático. Durante 13 dias realizaram-se testes de nocicepção, funcionalidade, comportamento tipo-depressivo, além de análises bioquímicas de estruturas como o nervo e a medula espinal. **Resultados:** As doses de EHEb utilizadas nos estudos de toxicidade aguda e em doses repetidas não foram capazes de alterar parâmetros como peso, consumo de água e ração dos animais. Também não foram observadas diferenças comportamentais, bioquímicas e histológicas importantes entre os grupos. Na análise hematológica, somente as fêmeas do grupo tratado com 1000 mg/kg apresentaram um aumento de neutrófilos e redução de leucócitos. No modelo de inflamação por carragenina, observou-se que o EHEb foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica, edema de pata, citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-6) e estresse oxidativo (analisado pelo aumento de SOD e redução de TBARS). No modelo de fibromialgia, o tratamento com EHEb foi capaz de reduzir a nocicepção, bem como os comportamentos tipo-depressivo e ansioso, além de aumentar a força dos animais, sem alterar parâmetros de locomoção e coordenação motora. Também foi observada redução significativa de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) no hipocampo, e um aumento dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal dos animais tratados com EHEb. Por fim, o tratamento com EHEb também demonstrou efeitos antinociceptivos importantes na dor neuropática, além de melhorar a coordenação motora e reduzir o comportamento tipo-depressivo dos animais. Ademais, o tratamento foi capaz de reduzir a inflamação periférica, verificada através da diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$

no nervo isquiático. **Conclusão:** Em conjunto, estes dados fornecem evidências sobre a segurança para o uso de EHEb, além de identificar importantes efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e comportamentais em modelos de dor aguda e prolongada em camundongos. Desta forma, destaca-se que os presentes resultados abrem caminhos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, ao passo que reforçam a importância da conservação da biodiversidade como fonte crucial de novas substâncias benéficas.

**Palavras-chave:** Plantas Medicinais; Segurança; Eficácia; Dor; Comorbidades.

## ABSTRACT

**Introduction:** The plant species *Eugenia brasiliensis* Lam., commonly known as grumixama, ibaporoiti, or Brazilian cherry, is widely used for its astringent, diuretic, energizing, anti-rheumatic, and anti-inflammatory properties. However, despite the established popular use of the species, few studies have explored its safety and efficacy. Therefore, this study aims to investigate the toxicological potential of *Eugenia brasiliensis* leaves, as well as their therapeutic activity in animal models of nociceptive, nociplastic, and neuropathic pain. **Methods:** Male and female Swiss mice were used. Acute and repeated dose toxicity studies were conducted following the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines 425 and 407, respectively. Initially, animals were intragastrically treated with single doses of 1000 and 2000 mg/kg of the hydroalcoholic extract of *E. brasiliensis* (HEEb) and observed for acute toxic signs and mortality for 14 days. Repeated dose toxicity was assessed over 28 days of treatment (doses of 30, 100, 300, and 1000 mg/kg of HEEb) through behavioral, hematological, biochemical, and histological tests. The acute antinociceptive and anti-inflammatory activity of HEEb (100 and 300 mg/kg) was evaluated in the carrageenan-induced inflammatory pain model using the von Frey test and paw edema measurement. Inflammatory cytokines [tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-6 (IL-6)] in the paw were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and oxidative stress [myeloperoxidase (MPO) activity, glutathione peroxidase (GSH), superoxide dismutase (SOD), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)] was determined by spectrophotometry. The prolonged effect of HEEb (300 mg/kg) was assessed in the reserpine-induced fibromyalgia model (0.25 mg/kg, subcutaneous, for three consecutive days). Animals were treated for 10 days with HEEb and duloxetine (positive control), and parameters of nociception, motor coordination, strength, depressive-like, and anxious-like behavior were evaluated. Tissues were collected for the quantification of inflammatory cytokines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor (total and phosphorylated TrkB) by ELISA and Western blotting. Additionally, the extract's activity (100 and 300 mg/kg) was evaluated in a sciatic nerve injury-induced neuropathy model. Nociception, functionality, depressive-like behavior, and biochemical analyses of structures such as the nerve and spinal cord were conducted over 13 days. **Results:** The doses of HEEb used in acute and repeated dose toxicity studies did not alter parameters such as weight, water, and food consumption of the animals. No significant behavioral, biochemical, or histological differences were observed between the groups. In hematological analysis, only females in the 1000 mg/kg-treated group showed an increase in neutrophils and a reduction in leukocytes. In the carrageenan-induced inflammation model, HEEb reduced mechanical hyperalgesia, paw edema, inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-6), and oxidative stress (indicated by increased SOD and decreased TBARS). In the fibromyalgia model, HEEb treatment reduced nociception, depressive-like, and anxious-like behaviors, and increased animal strength, without altering locomotion and motor coordination parameters. A significant reduction in inflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 $\beta$ ) in the hippocampus and an increase in BDNF levels in the prefrontal cortex of HEEb-treated animals were observed. Finally, HEEb treatment demonstrated significant antinociceptive effects in neuropathic pain, improved motor coordination, and reduced depressive-like behavior in animals. Additionally, treatment reduced peripheral inflammation, as evidenced by decreased levels of IL-1 $\beta$  in the sciatic nerve. **Conclusion:** In conclusion, these data provide evidence of the safety of HEEb use and identify significant analgesic, anti-inflammatory, and behavioral effects in acute and prolonged pain models in mice. Thus, these results highlight the potential for the development of new therapeutic approaches while emphasizing the importance of biodiversity conservation as a crucial source of beneficial substances.

**Keywords:** Medicinal Plants; Safety; Efficacy; Pain; Comorbidities.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam. ....	26
Figura 2 - Compostos isolados das folhas de <i>E. brasiliensis</i> .....	28
Figura 3 - Artigos científicos com o termo “ <i>Eugenia brasiliensis</i> ” no Pubmed.....	29
Figura 4 - Vias da dor da periferia para o encéfalo .....	32
Figura 5 - Classificação da lesão nervosa de acordo com Sunderland (1951).....	37
Figura 6 - Conclusões gerais da tese .....	52



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDNF	Fator neurotrófico derivado de encéfalo (do inglês, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
BU	Biblioteca Universitária
CFA	Adjuvante Completo de Freund (do inglês, <i>Complete Freund's Adjuvant</i> )
CNS	Conselho Nacional de Saúde
EHEb	Extrato hidroacóolico das folhas de <i>Eugenia brasiliensis</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> )
FI	Fator de impacto
FM	Fibromialgia
GPx	Glutathiona peroxidase
GRD	Gânglio da raiz dorsal
GSH	Glutathiona
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, <i>International Association for the Study of Pain</i> )
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1 (do inglês, <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> )
IL-10	Interleucina 10
IL1-β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IN	Instrução Normativa
LNP	Lesão nervosa periférica
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator nuclear kappa B (do inglês, <i>Nuclear factor kappa B</i> )
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 (do inglês, <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> )
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAG	Substância cinzenta periaquedutal (do inglês, <i>periaqueductal gray</i> )
PB	Área parabraquial (do inglês, <i>parabrachial nuclei</i> )



PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PPGNeuro	Programa de Pós-Graduação em Neurociências
p-TrkB	Receptor de tirosina quinase B fosforilado (do inglês, <i>Phospho-Tropomyosin-related kinase B receptor</i> )
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive oxygen species</i> )
RVM	Medula ventromedial rostral (do inglês, <i>rostral ventromedial medulla</i> )
SIPNeuro	Simpósio Integrado em Neurociências
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido dismutase
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (do inglês, <i>signal transducers and activators of transcription 3</i> )
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>Tumor necrosis fator alfa</i> )
TrkB	Receptor de tirosina quinase B (do inglês, <i>Tropomyosin-related kinase B receptor</i> )
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>Vascular endothelial growth fator</i> )
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
5-HT	Serotonina



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>21</b>
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	21
2.1.1	Segurança e eficácia das plantas medicinais .....	23
2.1.2	Considerações sobre <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.....	26
2.2	DOR.....	29
2.2.1	Dor nociceptiva .....	33
2.2.2	Dor nociplástica .....	34
2.2.3	Dor neuropática .....	36
2.2.4	Tratamentos para dor .....	38
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>5.</b>	<b>METODOLOGIA E RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1	CAPÍTULO 1 .....	42
5.2	CAPÍTULO 2 .....	44
5.3	CAPÍTULO 3 .....	46
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>DEMAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORAMENTO...</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>
	<b>ANEXO 1 – COMPROVANTE CEUA</b> .....	<b>66</b>
	<b>ANEXO 2 – COMPROVANTE SISGEN</b> .....	<b>67</b>
	<b>ANEXO 3 – GUIA ARRIVE</b> .....	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A busca incessante por abordagens terapêuticas inovadoras e eficazes para o tratamento da dor tem impulsionado a exploração de recursos naturais como fontes valiosas de compostos medicinais. Entre esses recursos, as plantas medicinais desempenham um papel proeminente, oferecendo uma rica variedade de substâncias bioativas com potencial terapêutico (Hao, Xiao, 2020; Theodoridis *et al.*, 2023). No contexto dessa busca, a espécie *Eugenia brasiliensis*, ou cereja brasileira, surge como uma planta de particular interesse, não apenas pela sua longa tradição de uso na medicina popular, mas também pelo crescente corpo de evidências que sugere sua eficácia para as mais variadas condições relacionadas à dor e inflamação (Petrovski *et al.*, 2008; Lazarini *et al.*, 2018; Simões *et al.*, 2018; Siebert *et al.*, 2021).

De fato, a dor representa um grande desafio clínico, particularmente quando se manifesta de forma crônica. Estima-se que atualmente mais de 600 milhões de pessoas sofram com dor crônica em todo o mundo, levando a uma inestimável crise financeira e social (Rahman *et al.*, 2023). Desta forma, a gestão adequada da dor continua a ser uma demanda não atendida, frequentemente limitada pelos efeitos adversos indesejados e riscos associados a muitos fármacos convencionais. Nesse cenário, a exploração de novos alvos terapêuticos que possam oferecer uma abordagem mais segura e eficaz faz-se primordial nos contextos médicos e científicos (Farrar *et al.*, 2017).

Diante disso, a presente tese apresenta dados de uma análise abrangente sobre o potencial toxicológico e terapêutico da planta *Eugenia brasiliensis* em diferentes modelos de dor, visando compreender sua segurança e eficácia em roedores. Deste modo, além de valorizar a inovação e a biodiversidade nacional, essa abordagem permite fundamentar cientificamente as alegações tradicionais associadas à planta e fornecer dados robustos que possam orientar futuros ensaios clínicos.

Os elementos textuais deste trabalho são apresentados a partir da presente introdução, além do referencial teórico, justificativa e objetivos. Na sequência, as seções de metodologia, resultados e discussão são desenvolvidas em três capítulos, os quais são organizados no formato de manuscritos (em inglês). Subsequentemente, o (a) leitor (a) encontrará a discussão geral da tese, bem como as conclusões e perspectivas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas desempenharam um papel fundamental no desenvolvimento humano, influenciando não apenas a dieta, mas também moldando aspectos culturais, sociais e até mesmo tecnológicos. Desde os primórdios, elas servem de base para a alimentação, medicamentos, materiais para abrigo e vestuário. Nesse sentido, um dos marcos cruciais para o sucesso evolutivo de nossa espécie se deu quando sua domesticação permitiu a estruturação de comunidades agrícolas estáveis, levando à formação de sociedades mais complexas (Angourakis *et al.*, 2022).

Além disso, a constante busca do ser humano por tratar suas doenças também fez com que as plantas se tornassem elementos centrais na medicina tradicional. Nos tempos antigos, a utilização das plantas era guiada instintivamente, de maneira semelhante ao comportamento de outros animais. Dada a ausência de informações abrangentes sobre as causas das doenças e sobre quais plantas poderiam ser empregadas como remédios, toda a prática estava fundamentada apenas na experiência empírica. Com o passar do tempo, as razões para o uso específico de plantas medicinais no tratamento de determinadas condições foram sendo desvendadas. Assim, a abordagem deixou, gradualmente, de se basear inteiramente no conhecimento empírico e passou a ser respaldada por evidências científicas. Essas constatações ganham ainda mais força no mundo contemporâneo, onde os medicamentos sintéticos apresentam eficácia em declínio, ao passo em que as contraindicações para seu uso têm aumentado. Isso destaca, mais uma vez, a relevância do uso de substâncias naturais para a saúde humana (Petrovska, 2012; Karimi *et al.*, 2015).

De fato, a literatura demonstra que a utilização de plantas medicinais experimentou um renascimento notável nos países desenvolvidos, e constitui a principal estratégia terapêutica para 80% dos países em desenvolvimento. Ainda, 87,5% da população global utiliza a fitoterapia tradicional para lidar com questões de saúde (Parveen *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2020). Esse interesse é evidenciado pelo aumento expressivo no número de revisões sistemáticas e pesquisas sobre medicamentos fitoterápicos nas últimas duas décadas (Dutra *et al.*, 2016; McLay *et al.*, 2016). Acredita-se que tal cenário deva ser interpretado à luz das mudanças no estilo de vida, onde há uma valorização crescente do conceito de produtos genuínos e naturais. Essa perspectiva leva os consumidores a considerarem as plantas como uma opção mais suave para lidar com questões de saúde (Sánchez *et al.*, 2020).

Ao analisar a história, observa-se que os produtos naturais cumpriram um papel crucial na descoberta de medicamentos, especialmente porque oferecem características distintas em comparação com moléculas sintéticas convencionais, o que confere vantagens e desafios para o processo de desenvolvimento de novos produtos (Atanasov *et al.*, 2021). Considerando o mercado farmacêutico, estima-se que 30% de todos os medicamentos disponíveis sejam derivados de produtos naturais, notadamente plantas e microrganismos. Em áreas como a oncologia, até 60% dos fármacos comercializados são à base de plantas, representando a fonte mais comum para o desenvolvimento de novos fármacos (Kirkpatrick, 2002; Dutra *et al.*, 2016; Mintah *et al.*, 2019). Efetivamente, as plantas são consideradas por muitos pesquisadores como “fábricas químicas vivas”, uma vez que sintetizam uma enorme variedade de metabólitos secundários, os quais podem apresentar atividades biológicas importantes, tornando-as particularmente atrativas para fins industriais (Li *et al.*, 2020).

Complementarmente, no setor farmacêutico os ativos vegetais podem ser empregados de diversas formas, desde os princípios isolados, em conjunto com outras substâncias ou até mesmo a planta em sua forma mais pura. Deste modo, cabe diferenciar plantas medicinais de fitoterápicos e fitofármacos. De acordo com a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº26, de 13 de maio de 2014 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), as plantas medicinais são definidas como “toda espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos”. Esse conceito pode englobar toda a planta ou apenas parte dela (raiz, folha, flor) que contenha as substâncias ativas. Já o fitoterápico é considerado o medicamento obtido mediante o uso exclusivo de matérias-primas ativas de origem vegetal. Sua caracterização inclui o conhecimento aprofundado da eficácia e dos riscos associados ao seu uso, bem como a garantia da reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É importante salientar que não é considerado um medicamento fitoterápico aquele que contenha, em sua composição, substâncias ativas isoladas de qualquer origem, nem as combinações destas com extratos vegetais. Nesse caso, encontra-se o fitofármaco que por definição “é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais, ou mesmo, a mistura de substâncias ativas de origem vegetal”. Não são considerados fitofármacos aqueles compostos que sofreram qualquer etapa de semi-síntese ou modificação de sua estrutura química (BRASIL, 2014).

Dado esse panorama, é imprescindível ressaltar que, além do interesse global em ativos vegetais, esse cenário é ainda mais relevante no Brasil. O país destaca-se por ser detentor da maior diversidade genética de plantas do mundo, com aproximadamente 55 mil espécies catalogadas, dentre um total estimado entre 350 e 550 mil. Além disso, o país possui uma sólida tradição no uso de plantas medicinais, com conhecimentos transmitidos entre gerações por meio

da sabedoria popular. Esse interesse, tanto a nível institucional quanto tradicional, cresceu significativamente, resultando na implementação de políticas que incentivam e asseguram o uso de plantas com fins terapêuticos. Nesse contexto, o Conselho Nacional de Saúde (CNS) estabeleceu, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que propõe a inclusão de diversas terapias complementares, incluindo o uso de plantas medicinais, no Sistema Único de Saúde (SUS). A política também preconiza a elaboração de uma Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, servindo como guia para a população (BRASIL, 2006a).

Paralelamente, o governo brasileiro desenvolveu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, oficializada pelo Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. O propósito dessa política é assegurar à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo a sustentabilidade da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006b; BRASIL, 2015). Diante desse cenário, a valorização do uso de plantas medicinais no país ressalta a importância de estudos que abordem aspectos relacionados à sua segurança e eficácia, garantindo o acesso à saúde básica para toda a população.

### **2.1.1 Segurança e eficácia das plantas medicinais**

A descoberta e o desenvolvimento de medicamentos é um processo longo, dispendioso e de alto risco. A taxa de insucesso nesse complexo percurso, abrangendo candidatos a medicamentos tanto na fase clínica quanto pré-clínica, ultrapassa os 90%. Entre 2010 e 2017, análises de dados de ensaios clínicos identificaram quatro potenciais razões para as falhas no desenvolvimento de medicamentos, das quais citam-se: falta de eficácia clínica (40% e 50%), toxicidade incontrolável (30%), propriedades semelhantes a medicamentos com baixa eficácia (10% e 15%), além da falta de necessidades comerciais e planejamento estratégico deficiente (10%) (Dowden *et al.*, 2019; Hinkson *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2022).

Sob esse aspecto, a compreensão da segurança e eficácia das plantas medicinais é essencial para garantir a utilização adequada desses recursos, promovendo a saúde humana e garantindo a eficiência em fases subsequentes. Ao avaliar a segurança, busca-se minimizar potenciais riscos associados ao consumo de determinadas plantas, considerando interações medicamentosas, possíveis efeitos adversos e variações na resposta individual. Da mesma forma, a investigação da eficácia assegura que as propriedades terapêuticas alegadas são respaldadas por evidências científicas, conferindo credibilidade ao uso medicinal. A pesquisa

nesse campo não apenas valida e integra saberes tradicionais, mas também orienta a produção de fitoterápicos e fitofármacos, contribuindo para a oferta de opções terapêuticas seguras e eficazes para a população, além da incorporação responsável desses recursos na prática clínica atual (Saad *et al.*, 2017; Kaggwa *et al.*, 2022).

Dentre os principais riscos associados ao uso indevido de produtos naturais encontram-se efeitos indesejáveis desencadeados, principalmente, por (i) seus constituintes, (ii) presença de contaminantes químicos e/ou biológicos, (iii) interação com outros medicamentos e/ou alimentos, bem como (iv) características do próprio indivíduo (idade, sexo, fatores genéticos, estado nutricional e doenças crônicas subjacentes) (Alonso-Castro *et al.*, 2017). Os principais sinais e sintomas de uma intoxicação causada por plantas podem incluir náuseas, vômitos, dermatites, queimaduras na pele, gastrite, hepatotoxicidade, diarreia severa, entorpecimento, tontura, alucinações e até mesmo aborto em mulheres gestantes (Alonso-Castro *et al.*, 2017). Nesse contexto, é imprescindível a implementação de políticas que visem garantir o uso seguro e racional de tais produtos, visando sempre a melhora do bem-estar e qualidade de vida da população.

As legislações relacionadas à regulamentação de produtos naturais para diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doenças é variável de acordo com o país, sendo diretamente influenciadas por aspectos culturais e econômicos. No entanto, abordagens integradas, que busquem alertar para a segurança e eficácia de tais intervenções faz-se primordial em qualquer circunstância (Calixto, 2000).

Nesse sentido, após a identificação dos riscos associados ao uso descontrolado de plantas medicinais em conjunto com outros medicamentos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu, em 2004, o "Guia de monitoramento seguro de plantas medicinais em sistemas de farmacovigilância" (conhecido em inglês como "*Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems*"). Este guia fornece diretrizes para o registro adequado das plantas medicinais em um sistema unificado, facilitando a troca de informações entre os países membros da OMS (OMS, 2004; Mazzari; Prieto, 2014).

Além disso, a OMS elaborou um guia estratégico para políticas públicas, visando o uso racional e integrado da medicina tradicional e da medicina complementar/alternativa. Esse guia, intitulado "Estratégia da OMS para Medicina Tradicional 2014–2023", é uma continuação do documento anterior, "Estratégia da OMS para Medicina Tradicional 2002–2005". Essas estratégias têm como objetivo principal estabelecer uma base de conhecimento para a formulação de políticas nacionais e legislações que assegurem a segurança, qualidade e eficácia



dos medicamentos tradicionais, bem como a integração adequada da medicina tradicional aos sistemas de saúde (Ministério da Saúde, 2022).

No âmbito nacional, a ANVISA também publicou e atualizou uma série de resoluções que discorrem sobre a avaliação da segurança e controle de qualidade das plantas comercializadas no Brasil. Além da RDC nº 26/2014, diversas normas complementam as diretrizes para o registro de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos. Entre elas estão a RDC nº 66/2014, que altera o Anexo IV da RDC nº 26/2014; a Instrução Normativa (IN) nº 02/2014, que estabelece a "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado", atualizada pela IN 10/14; a IN nº 04/2014, que exige a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico; a IN nº 05/2014 e RDC nº 38/2014, que abordam o “Histórico de Mudanças do Produto” e o prazo de análise das petições pós-registro de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos; e a RDC nº 708/2022 que dispõe sobre as mudanças pós-registro de medicamentos fitoterápicos e de produtos tradicionais fitoterápicos. (BRASIL, 2014). Essas resoluções têm como objetivo facilitar a entrada de medicamentos fitoterápicos ou drogas vegetais no mercado brasileiro, buscando garantir sua segurança, eficácia e qualidade.

No que tange a pesquisa básica, diversas ferramentas podem ser empregadas para compreender os possíveis efeitos tóxicos das plantas, indicando potenciais respostas danosas e representando economia de tempo e recursos financeiros em uma série de etapas posteriores no processo de produção de produtos comerciais, especialmente fármacos. Um exemplo são as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), as quais são reconhecidas como instrumentos fundamentais para avaliar os potenciais efeitos de produtos químicos na saúde humana e meio ambiente. Essas diretrizes são elaboradas com o apoio de especialistas de diversos âmbitos, como agências reguladoras, academia, indústria, organizações ambientais e de bem-estar animal. Deste modo, são aceitas internacionalmente como métodos padrão para testes de segurança de vários produtos químicos, como pesticidas, produtos de beleza e higiene, medicamentos, dentre outros (Andrade *et al.*, 2016; OCDE, 2023). Considerando os testes de substâncias em roedores, destaca-se o guia 425 da OCDE, que avalia a toxicidade aguda pelo método *Up-and-Down*, e o guia 407 que busca identificar possíveis alterações comportamentais, anatômicas, bioquímicas e histológicas associadas à efeitos tóxicos.

### 2.1.2 Considerações sobre *Eugenia brasiliensis* Lam.

Dentre os inúmeros grupos de plantas que são conhecidos por seu potencial terapêutico, destaca-se a família Myrtaceae, uma das maiores e mais importantes famílias de plantas do Brasil, compreendendo cerca de 130 gêneros e mais de 5650 espécies (Grattapaglia *et al.*, 2012). Dentro dessa família, o gênero *Eugenia* é o mais abrangente, apresentando cerca de 600 espécies as quais são conhecidas por seus constituintes bioativos, como terpenos, flavonoides e taninos, sendo amplamente utilizadas na medicina popular com propriedades hipotensivas, antigota, diurética, antimicrobiana, hipoglicemiante e anti-inflamatória (Schapoval *et al.*, 1994; Araújo *et al.*, 2019). Alguns exemplos deste gênero são a pitanga (*Eugenia uniflora*), o jambolão (*Eugenia jambolana*), o cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) e a cereja-brasileira (*Eugenia brasiliensis*).

Esta última espécie, *Eugenia brasiliensis* (Figura 1), é também conhecida popularmente como grumixama ou ibaporoiti, e trata-se de uma árvore amplamente distribuída desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Sobral *et al.*, 2012). As folhas, frutos e casca são utilizados na medicina popular para o tratamento de artrite reumatoide, enquanto a infusão das folhas é usada como diurético e os frutos maduros são consumidos na alimentação como fonte para diversos nutrientes (Revilla, 2002; Queiroz *et al.*, 2015; Nehring *et al.*, 2022).

**Figura 1 - *Eugenia brasiliensis* Lam.**

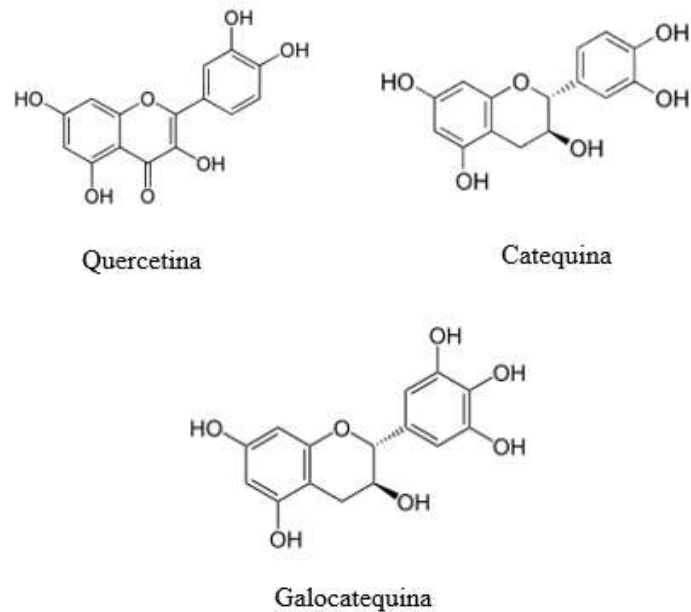


**Legenda:** A) Folhas e frutos B) arbusto da espécie *E. brasiliensis*. Fonte: Extraído de: <https://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Eugenia+brasiliensis>

Embora ainda pouco explorada, estudos fitoquímicos utilizando as folhas de *E. brasiliensis* demonstraram a presença de compostos fenólicos, como os flavonoides catequina, miricetina, isoquercetina, rutina, quercetina, apigenina e galangina (Simões *et al.*, 2018; Siebert *et al.*, 2021). Tais compostos podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelos efeitos observados em estudos na literatura, como a ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Magina *et al.*, 2009), atividades hipolipemiantes e antioxidantes (Lima *et al.*, 2017), além de efeitos tipo-antidepressivos mediados pelos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico em roedores (Colla *et al.*, 2012).

O potencial anti-inflamatório das folhas de *E. brasiliensis* foi explorado em um modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos, onde o extrato e compostos isolados da planta (quercetina, catequina e galocatequina – Figura 2), aplicados topicamente, foram capazes de inibir o influxo de células polimorfonucleares, além de reduzir o edema e atividade da enzima mieloperoxidase (Pietrovski *et al.*, 2008). Siebert e colaboradores (2021) também demonstraram que os compostos catequina e galocatequina possuem ações relevantes, reduzindo a produção de óxido nítrico em um modelo de pleurisia em camundongos. Reforçando esses achados, Simões e colaboradores (2018) também observaram efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em modelos de nocicepção visceral induzida por ácido acético, e nocicepção periférica induzida pela injeção intraplantar de histamina, composto 48/80 e formalina (apenas na fase inflamatória). Ademais, o extrato também foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica, edema e temperatura da pata induzidos pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA, do inglês *Complete Freund's Adjuvant*), além de reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6), indicando que os efeitos anti-inflamatórios de *E. brasiliensis* podem estar associados a esses mediadores (Simões *et al.*, 2018).

**Figura 2 - Compostos isolados das folhas de *E. brasiliensis***



**Legenda:** Extraído de: <https://www.fishersci.es/es/en/search/chemical/substructure.html>

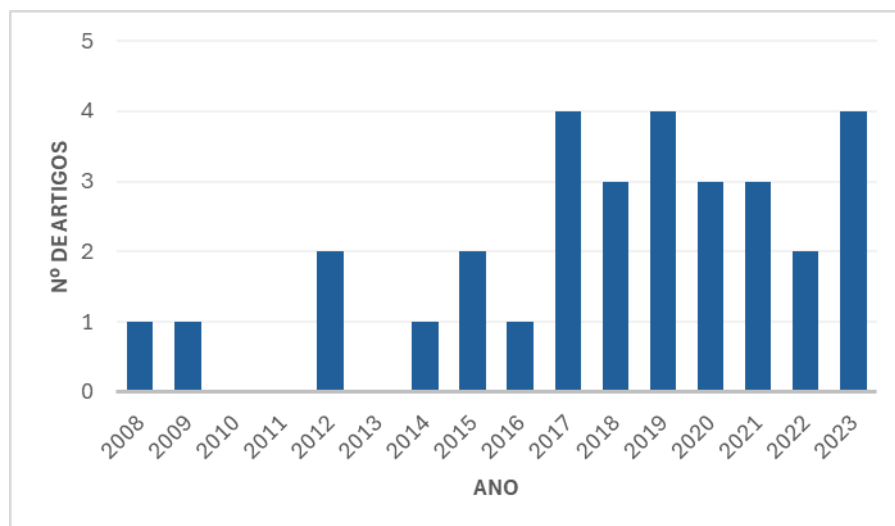
Com base nesses resultados promissores, acredita-se que o tratamento prolongado com a planta poderia apresentar efeitos ainda mais relevantes em condições complexas, como a dor crônica. No entanto, para propor tais estratégias, é imperativo compreender os potenciais desfechos tóxicos e adversos da espécie. Nesse sentido, até o momento, apenas os estudos de Sardi e colaboradores (2017) e Lazarini e colaboradores (2018) tinham explorado os efeitos toxicológicos agudos de *E. brasiliensis* (frutos, folhas e sementes) em um modelo de larvas (*Galleria mellonella*), não encontrando indícios de sua nocividade. No entanto, para fortalecer tais achados, garantir a segurança de seu uso e embasar o potencial para a indústria farmacêutica, é primordial o aprofundamento de suas propriedades e potenciais efeitos em mamíferos.

Cabe acrescentar ainda que o entendimento sobre essa espécie representa uma grande oportunidade para o contexto inovativo do país. Com relação ao registro de patentes, uma busca realizada em novembro de 2023, na base de dados *Derwent Innovations Index*, gerou apenas 4 resultados para o termo “*Eugenia brasiliensis*”. Dentre eles, somente um é relacionado às propriedades farmacológicas da planta, enquanto os demais utilizam-na com fins de pigmentação, fermentação e aromatização de produtos como o café e o chocolate. A patente depositada para o uso farmacológico diz respeito à uma composição envolvendo os gêneros *Eugenia*, *Neomithranthes* ou *Manilkara* para o tratamento de condições responsivas ao antagonismo do purinoceptor-7, como dor, dor neuropática, inflamação, distúrbios

neurológicos ou neurodegenerativos, distúrbios neuropsiquiátricos, cardiovasculares ou oftálmicos. Além disso, a busca por artigos científicos na base de dados Pubmed, utilizando o descritor citado anteriormente, também demonstra que o interesse pela planta vem aumentando consideravelmente ao longo dos últimos anos, especialmente depois de 2014 (Figura 3). Em 2023 foram publicados 4 artigos sobre a planta, enquanto em 2013 esse número era zero. Os novos dados envolvendo seu potencial terapêutico representam uma interessante possibilidade para a inovação e prospecção tecnológica do país.

De fato, salienta-se ainda que grandes classes de analgésicos e anti-inflamatórios utilizados atualmente, como a morfina e o salicilato, são derivados de produtos naturais, reforçando que o entendimento da biodiversidade pode ser um caminho promissor no tratamento da dor e condições associadas (Calixto *et al.*, 2000).

**Figura 3 - Artigos científicos com o termo “Eugenia brasiliensis” no Pubmed**



**Legenda:** extraído de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%22Eugenia+brasiliensis%22&timeline=expanded>. Acesso em 15 de dezembro de 2023.

## 2.2 DOR

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês) define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com, ou semelhante àquela associada com, dano real ou potencial ao tecido (Raja *et al.*, 2020). Seu papel fisiológico é de extrema relevância, sendo essencial para detectar e minimizar o contato com estímulos prejudiciais ou nocivos ao organismo (Woolf, 2011). No entanto, quando adquire um caráter

crônico, persistindo por um período superior a 3 meses, a dor torna-se patológica, com implicações sociais e emocionais evidentes (Treede *et al.*, 2019), sendo frequentemente acompanhada de comorbidades como comprometimento cognitivo (Moriarty *et al.*, 2011), alterações no sono (Haack *et al.*, 2019), depressão (Sheng *et al.*, 2017) e ansiedade (Zhuo *et al.*, 2016).

A prevalência de dor crônica é bastante expressiva, atingindo aproximadamente 30% da população mundial e 37% da população brasileira (Cohen *et al.*, 2021; Santiago *et al.*, 2023). Entre os inúmeros prejuízos sociais gerados por essa condição destacam-se os gastos excessivos com cuidados médicos, baixa produtividade e afastamento do trabalho. De fato, dentre as quatro principais causas de anos perdidos por incapacidade, três destas (dor nas costas, distúrbios musculoesqueléticos e dor no pescoço) são condições de dor crônica (Cohen *et al.*, 2021).

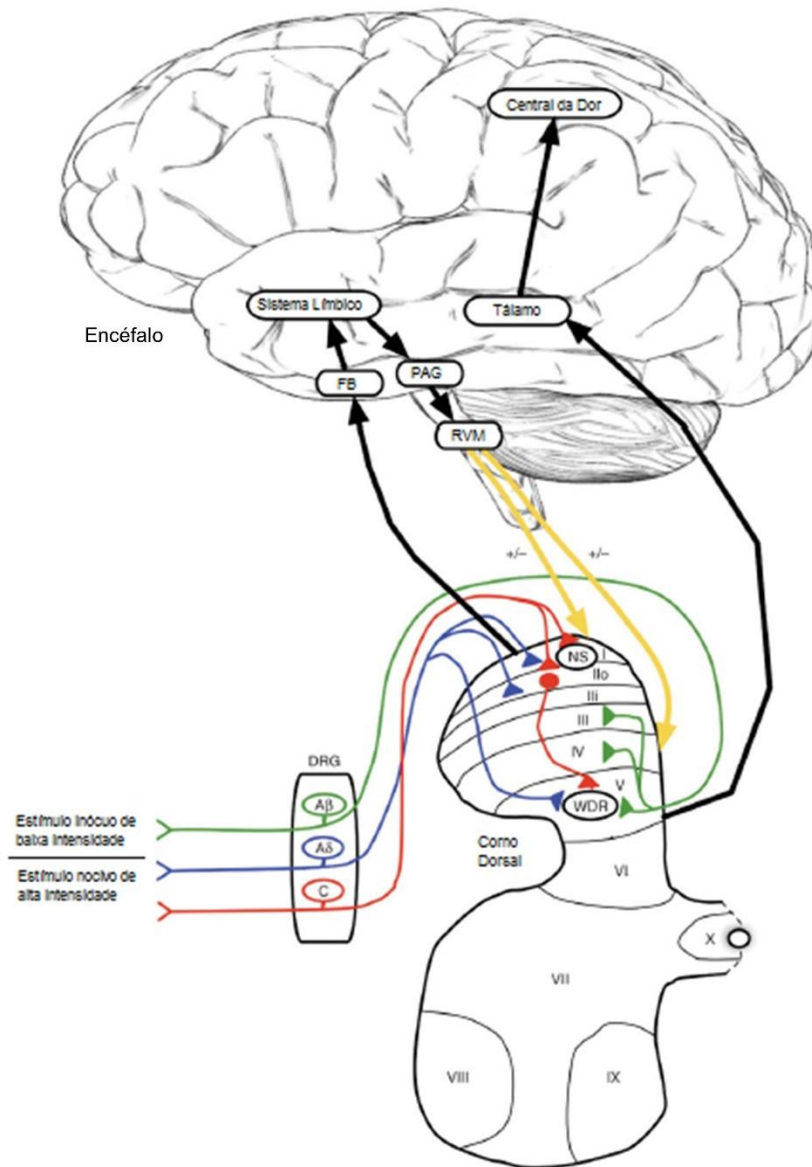
Por se tratar de uma etiologia diversa e imensamente complexa, os mecanismos neurobiológicos envolvidos em tais situações ainda não são completamente elucidados. Sabe-se que os processos inflamatórios, lesões nervosas, tumores, infecções, doenças autoimunes, distúrbios vasculares e metabólicos, bem como alterações estruturais e funcionais no sistema nervoso central (SNC) desempenham papel importante na manutenção e duração dos quadros dolorosos (Baliki; Apkarian, 2015; Courtney *et al.*, 2017). A fisiopatologia da dor crônica está associada com anormalidades no processamento da informação nociceptiva, tanto em nível periférico quanto central (Garland, 2012). Em muitos casos, a sensibilização periférica é um dos primeiros indícios observados em um processo de dor crônica e, consiste na ativação ou sensibilização dos nociceptores por meio de mediadores inflamatórios, como glutamato, bradicinina, histamina, substância P e outros. Nesse processo são observados a redução no limiar de ativação e o aumento da excitabilidade da membrana na célula sensorial. A sensibilização central, por sua vez, refere-se a um estado de hiperexcitabilidade que é estabelecido no SNC, conduzindo a um aumento nos sinais nociceptivos (Woolf, 2011; Nielsen, 2015). Nesse processo há o envolvimento de vários moduladores sinápticos, como aminoácidos excitatórios e mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e a IL-6, juntamente com alterações na densidade cinética e propriedades dos canais iônicos e receptores metabotrópicos (Costigan *et al.*, 2009). Essas alterações ocorrem em níveis celulares e moleculares e são responsáveis por alguns dos sintomas observados em pessoas com dor crônica, como a hiperalgesia (dor aumentada frente a um estímulo nocivo) e a alodinia (dor em resposta a um estímulo inócuo) (Millan, 1999; Latremoliere; Woolf, 2011).

A reorganização sináptica observada no SNC de pacientes com dor crônica é conhecida como plasticidade mal adaptativa, e tem sido relacionada à fisiopatologia de

comorbidades já citadas anteriormente, como a depressão (Sheng *et al.*, 2017). Dentre os mediadores importantes nesse processo, destaca-se o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que tem papel fundamental na neuroplasticidade, sendo crucial para manutenção e reparo neuronal. Diversos estudos na literatura já demonstraram que o BDNF possui um caráter neuroprotetor, sendo que sua redução em áreas encefálicas está associada à sintomas depressivos e aumento de atividades inflamatórias, tornando-o, assim, um potencial alvo terapêutico para essas condições (Porter; O'Connor, 2022). No entanto, cabe acrescentar que, no contexto da dor, o BDNF também pode ter um papel dual, contribuindo para a instauração e manutenção dos processos algícos. De fato, estudos sugerem que a estimulação dessa neurotrofina em neurônios sensoriais está intimamente ligada ao processo de cronificação dolorosa (Sikandar *et al.*, 2018).

A Figura 4 representa o processamento da dor a partir de um estímulo periférico. Observa-se que as fibras aferentes primárias ( $A\beta$ ,  $A\delta$  e C) transmitem os impulsos da periferia ao encéfalo através do gânglio da raiz dorsal (GRD) e do corno dorsal da medula espinal. O corno dorsal é organizado em estruturas denominadas lâminas de Rexed. Os neurônios de projeção da lâmina I inervam regiões como a área parabraquial (PB) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG), as quais são afetadas por áreas do sistema límbico. Os neurônios da lâmina V se projetam para o tálamo (trato espinotalâmico) e se dirigem a diversas regiões corticais, ativando a “central da dor” (córtex somatossensorial primário e secundário, córtex insular, cíngulo anterior e pré-frontal). As vias descendentes (setas amarelas) partem de núcleos do tronco encefálico, como a medula ventromedial rostral (RVM), são ativados e modulam o processamento espinal da dor. Todas essas áreas podem ser afetadas distintamente nas mais diversas condições de dor, levando a impactos significativos na cronificação e recuperação do quadro, além das alterações cognitivas e emocionais já citadas, observadas majoritariamente em pacientes com dor crônica (D’Mello; Dickenson, 2008; Bushnell *et al.*, 2013).

**Figura 4 - Vias da dor da periferia para o encéfalo**



Legenda: Adaptado de D'Mello; Dickenson, 2008.

Como mencionado anteriormente, a etiologia da dor, principalmente crônica, é bastante complexa e pode variar de acordo com a sua origem. Nesse sentido, Chimenti e colaboradores (2018) classificam a dor em três tipos: nociceptiva, nociplástica e neuropática. Na sequência, serão discutidos aspectos de cada um deles.



### 2.2.1 Dor nociceptiva

A dor nociceptiva é definida como aquela que ocorre em resposta a estímulos nocivos ou lesivos, como agentes físicos ou químicos, traumas, cirurgias ou queimaduras, gerando algum dano aos tecidos (Armstrong; Herr, 2023). Sua resposta se dá pela ativação direta dos nociceptores primários, resultando tipicamente em dor local (Chimenti *et al.*, 2018)

Esse tipo de dor é frequentemente descrito como agudo e localizado, sendo um componente fisiológico de defesa importante para o organismo. No entanto, embora essencial para a sobrevivência, a persistência ou intensificação da dor nociceptiva pode indicar um processo patológico subjacente, exigindo atenção médica e intervenções terapêuticas para alívio e tratamento adequados (Armstrong; Herr, 2023).

A dor inflamatória é um tipo de dor nociceptiva que ocorre como resultado da ativação e sensibilização de nociceptores por mediadores inflamatórios. Esse sinal é então transmitido ao SNC, levando a quadros de sensibilização periférica e central (Kosek *et al.*, 2016; Vardeh *et al.*, 2016). Como exemplos, citam-se a osteoartrite, a artrite reumatoide e as contusões.

No contexto de pesquisa, vários modelos animais podem ser utilizados para mimetizar a dor inflamatória, empregando agentes irritantes que são administrados em locais como pele, pata, músculos, articulações e órgãos viscerais. Esses irritantes podem incluir aqueles que produzem dor inflamatória aguda associada ao recrutamento de neutrófilos, bem como respostas de dor mais sustentadas associadas à infiltração de macrófagos. Desta forma, são usados para modelar condições com inflamação aguda e crônica, sendo validados preditivamente pelo uso de opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (Gregory *et al.*, 2013).

A carragenina é uma substância comumente usada para induzir inflamação aguda inicial, que pode se converter em um processo inflamatório crônico depois de duas semanas (Hargreaves *et al.*, 1988). A injeção de carragenina está associada ao aumento da sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos no local da lesão (hiperalgesia primária), bem como em outros locais (hiperalgesia secundária). Concomitante ao processo inflamatório, é possível observar neste modelo o dano oxidativo causado pelo agente. Estudos prévios demonstraram a infiltração de neutrófilos ativados e a alta atividade da enzima mieloperoxidase no local da lesão (Dallazen *et al.*, 2020). Ainda, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros radicais podem levar a peroxidação lipídica e ao dano celular. Nesse sentido, os principais mecanismos antioxidantes envolvem a atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e superóxido

dismutase (SOD), sendo que a SOD é responsável por converter o radical superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), enquanto a GPx converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O (água) (Costa *et al.*, 2018).

Todos esses processos contribuem para os comportamentos de proteção do membro, dor espontânea e redução da atividade na roda de corrida observados no modelo. Dessa forma, a carregenina provou ser útil na compreensão da dor inflamatória aguda e do dano oxidativo, sendo que provavelmente mimetiza condições associadas a lesões teciduais, como entorses, distensões e miosite (Gregory *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Dor nociplástica

O termo “dor nociplástica” foi proposto em 2016 para descrever estados de dor crônica que não são caracterizados por sintomas óbvios, como a ativação de nociceptores ou danos nervosos, mas que em achados clínicos e psicofísicos sugerem alteração da função nociceptiva (Kosek *et al.*, 2016). Desta forma, a dor nociplástica é definida como uma dor decorrente da alteração da plasticidade das vias sensoriais relacionadas à dor, tanto na periferia quanto no SNC, levando a um aumento da sensibilidade (Fitzcharles *et al.*, 2021).

Ela pode ocorrer isoladamente ou como comorbidade em indivíduos com dor crônica, como a dor nociceptiva e neuropática. Além disso, é comum a presença de outros sintomas, como fadiga, distúrbios do sono, comprometimento cognitivo, aumento de sensibilidade a estímulos externos e distúrbios de humor (Fitzcharles *et al.*, 2021).

Dentre as categorias de dor nociplástica enquadram-se dores generalizadas, como a fibromialgia (FM), a síndrome da dor complexa regional do tipo I, dores de cabeça primárias crônicas, dor orofacial, síndromes de dor visceral crônica e dor musculoesquelética (Fitzcharles *et al.*, 2021).

A FM é descrita como uma síndrome caracterizada por dores articulares e musculares generalizadas, fadiga, alterações do humor, do sono e da cognição. Estima-se que ela afeta em torno de 3% da população mundial, sendo mais comum em mulheres de idade entre 35 e 65 anos (Sarzi-Puttini *et al.*, 2020).

O diagnóstico da fibromialgia ainda permanece um desafio no âmbito clínico, uma vez que há a falta de biomarcadores específicos e critérios de classificação adequados (Häuser *et al.*, 2015). Nesse sentido, o emprego de modelos animais que possam aprofundar os conhecimentos a respeito de sua fisiopatologia torna-se de essencial importância. Existem diversos modelos experimentais que mimetizam a FM em roedores. Os modelos atuais incluem a depleção sistêmica de aminas biogênicas induzida por reserpina, aplicação muscular de

solução salina ácida e abordagens baseadas em estresse (frio, som ou natação), entre outros emergentes (Brum *et al.*, 2022).

O modelo de FM induzido por reserpina é o mais utilizado na atualidade, ele foi desenvolvido por Nagakura e colaboradores (2009), e baseia-se na depleção das aminas biogênicas através da utilização do alcaloide extraído da planta *Rauwolfia serpentina*. Este atua inibindo o transportador vesicular de monoaminas (VMAT) 1 na periferia e VMAT 2 nos tecidos periféricos e no encéfalo. A reserpina bloqueia os transportadores impossibilitando, assim, a estocagem dos neurotransmissores nas vesículas sinápticas e impedindo a sua liberação na fenda sináptica. Como resultado deste processo, as monoaminas ficam no citosol onde são degradadas (Nagakura *et al.*, 2009).

Ainda, cabe ressaltar que o sistema monoaminérgico está intrinsecamente relacionado com os fatores de crescimento ou fatores neurotróficos. O BDNF, reconhecido como a neurotrofina mais predominante no encéfalo, desempenha um papel crucial na preservação da neurogênese, sobrevivência neuronal e plasticidade. Além disso, a sinalização do BDNF é essencial para o adequado funcionamento dos receptores de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>. Dessa forma, variações na conversão de proBDNF em BDNF, aliadas à diminuição da imunorreatividade do receptor de tirosina quinase B (TrkB), como evidenciado em roedores submetidos à reserpina, podem explicar os comportamentos tipo-depressivos observados nesses animais (Martinowich; Lu, 2008; Kim *et al.*, 2021)

Por fim, salienta-se que o modelo de FM induzido por reserpina preenche as validades preestabelecidas para modelos experimentais, onde na validade de face apresenta sintomas como nocicepção espontânea e evocada, hiperalgesia mecânica e térmica, além de comorbidades como o comportamento tipo-depressivo. Além disso, a validade preditiva foi testada a partir de fármacos utilizados clinicamente, como a pregabalina e a gabapentina; enquanto a validade de constructo é demonstrada a partir da redução de neurotransmissores, da sensibilização central e da neuroinflamação (Brum *et al.*, 2022). Sendo assim, este é considerado um modelo experimental adequado pois, além de induzir mudanças comportamentais consistentes com diversos sintomas de FM, ele também mantém essas alterações ao longo do tempo (Oe *et al.*, 2010; Tamano *et al.*, 2016).

### 2.2.3 Dor neuropática

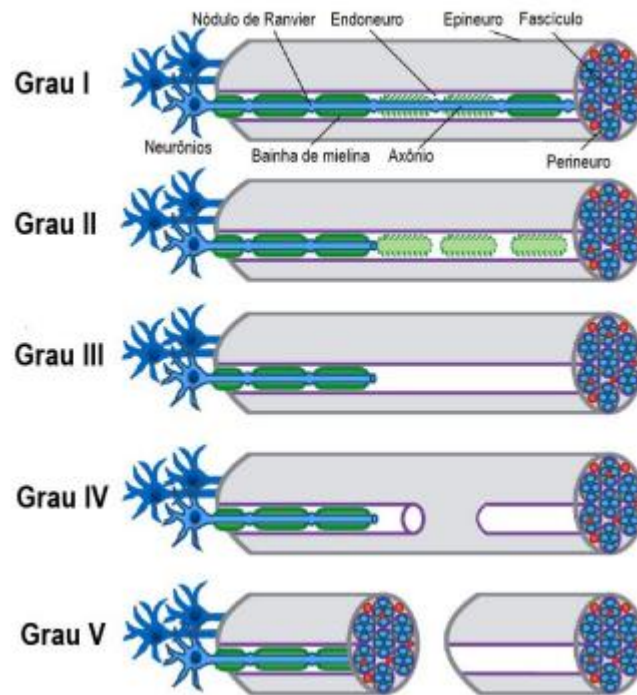
A dor neuropática, por sua vez, é desencadeada por lesões no sistema nervoso somatossensorial que alteram sua estrutura e função, de modo que a dor ocorre espontaneamente e as respostas a estímulos nocivos e inócuos são amplificadas patologicamente (Costigam *et al.*, 2009).

A dor neuropática central geralmente surge como resultado de lesões medulares, acidente vascular encefálico ou esclerose múltipla (Ducieux *et al.*, 2006). Quanto às lesões no SNP, estas podem ser causadas por trauma mecânico, doenças metabólicas, produtos químicos neurotóxicos, infecção ou invasão tumoral, envolvendo múltiplas alterações fisiopatológicas tanto no SNP quanto no SNC (Woolf e Mannion 1999; Dworkin *et al.*, 2003).

De fato, sabe-se que os nervos são estruturas altamente delicadas e suscetíveis a qualquer tipo de lesão (Hussain *et al.*, 2020). Alguns dados apontam que cerca de 3% de todos os indivíduos que sofrem alguma espécie de trauma apresentam lesões nervosas, e que mais de 50.000 procedimentos relacionados a esse tipo de complicação são realizados anualmente nos Estados Unidos (Modrak *et al.*, 2020).

De acordo com Sunderland (1951), as lesões nervosas periféricas podem ser classificadas em 5 categorias, de acordo com seu grau de severidade. A lesão de grau um corresponde à compressão do nervo causada por pressão direta no tronco nervoso ou compressão da raiz nervosa. Alguns exemplos são a síndrome do túnel do carpo (nervo mediano) (Wahab *et al.*, 2017) e a síndrome do túnel do tarso (nervo tibial) (Doneddu *et al.*, 2017). Já a lesão de grau dois é um tipo de axonotmese (lesão axonal), a qual pode ser subdividida em mais dois graus; no grau 3, além de lesão no axônio há também lesão no endoneuro, e o grau 4 apresenta lesão no axônio, endoneuro e perineuro. Esses tipos de lesão são normalmente ocasionados por traumas que levam ao esmagamento do nervo periférico, como em um acidente automobilístico (Chui *et al.*, 2018; Caillaud *et al.*, 2019). Por fim, o grau 5 está relacionado a uma secção completa do nervo (neurotmese), separando-o em coto proximal e distal, sendo este o tipo mais grave da condição (Caillaud *et al.*, 2019) (Figura 5).

**Figura 5 - Classificação da lesão nervosa de acordo com Sunderland (1951)**



**Legenda:** Representação esquemática dos diferentes graus de lesão, conforme a classificação de Sunderland. Fonte: adaptado de Caillaud et al. (2019).

Dada a complexidade da lesão nervosa periférica (LNP) e a dificuldade no tratamento dos pacientes acometidos, a busca por estratégias que favoreçam a regeneração nervosa e aliviem os sintomas de dor têm sido de fundamental importância dentro da neurociência e da farmacologia. Nesse cenário, o uso de modelos animais que abordem aspectos relacionados não somente à dor, mas também a funcionalidade, regeneração e bem-estar de uma maneira geral, são um caminho promissor (Menorca *et al.*, 2013).

Considerando o exposto, o modelo de esmagamento do nervo isquiático em camundongos apresenta algumas vantagens, uma vez que é possível observar as manifestações clínicas apontadas anteriormente, além da axonotmese ser o segundo tipo de lesão mais encontrado entre os pacientes acometidos com a LNP, o que permite uma translação do modelo animal para a clínica (Alvites *et al.*, 2018; Castillo-Galván *et al.*, 2014). No entanto, cabe ressaltar que a principal desvantagem é que roedores possuem uma taxa de regeneração mais rápida se comparado aos humanos, fazendo com que a resolução da lesão se dê em poucas semanas (Alvites *et al.*, 2018). Ainda assim, a literatura aponta que o modelo é uma importante

ferramenta no entendimento da fisiopatologia de neuropatias periféricas, bem como de potenciais formas de tratamento.

#### **2.2.4 Tratamentos para dor**

O tratamento para a dor, principalmente crônica, envolve uma associação complexa de fármacos e outras terapias que visam melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Analgésicos comuns, como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), são frequentemente prescritos para controlar a dor leve a moderada, enquanto opioides podem ser considerados em casos mais graves. No entanto, a crescente preocupação com o potencial de dependência e efeitos colaterais adversos dos opioides tem levado a uma abordagem mais cautelosa na prescrição desses medicamentos (Ballantyne; LaForge, 2007). Além disso, antidepressivos e anticonvulsivantes têm mostrado eficácia na modulação da dor crônica, muitas vezes atuando em mecanismos neuroquímicos que vão além do simples bloqueio da transmissão de sinais de dor. A terapia combinada, envolvendo diferentes classes de medicamentos, juntamente com abordagens não farmacológicas, como fisioterapia, exercício físico e técnicas de gestão de estresse, é frequentemente recomendada para otimizar os resultados e melhorar a qualidade de vida dos pacientes que enfrentam essa condição desafiadora (Hylands-White *et al.*, 2017; Cohen *et al.*, 2021).

Nesse sentido, as pesquisas para o desenvolvimento de novas estratégias para a dor crônica tornam-se cruciais, não apenas para oferecer alternativas mais eficazes e seguras, mas também visando compreender os mecanismos subjacentes à essa condição, favorecendo avanços significativos em diversos âmbitos (Cohen *et al.*, 2021).

### **3. JUSTIFICATIVA**

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta, sendo hábitat para cerca de 20 a 22% da fauna e flora mundial. Além dos aspectos ambientais, culturais e sociais, essa riqueza de espécies também apresenta grande valor econômico. A diversidade genética de plantas, ainda muito negligenciada, pode ser berço para inúmeros constituintes bioativos, os quais impactam positivamente a saúde humana e geram interesse aos mais diversos setores industriais (Dutra *et al.*, 2016; Neergheen-Bhujun *et al.*, 2017).

De fato, cabe ressaltar que os principais fármacos analgésicos comercializados atualmente são derivados ou sintetizados a partir de compostos naturais, como é o caso da

morfina e do salicinato. Estas substâncias foram extraídas das plantas *Papaver somniferum* e *Salix alba*, respectivamente, e permitiram o desenvolvimento de grandes classes de medicamentos, nomeadamente, os opióides e anti-inflamatórios não esteroidais (Calixto, 2000).

Apesar do grande benefício para o tratamento da dor e condições associadas que esses fármacos fornecem, a emergência por novas terapias analgésicas advém do fato de que eles estão, frequentemente, relacionados a efeitos adversos importantes, além do risco de tolerância e dependência (Kosten, George, 2002). Somado a isso, sabe-se que as condições dolorosas apresentam um alto impacto clínico, interferindo em diversos aspectos na vida dos indivíduos acometidos, como nas esferas pessoais, sociais e econômicas. Com efeito, a dor é tida como o motivo mais comum para busca por atendimentos no pronto-socorro, sendo responsável por 70% das consultas de emergência (Cordell *et al.*, 2002; Todd, 2017).

Diante desse cenário, a busca por novas terapias à base de constituintes naturais para o tratamento da dor, principalmente crônica, é fundamental, uma vez que nossa flora abriga uma vasta gama de compostos bioativos com propriedades analgésicas promissoras, frequentemente associados ao baixo custo e menores efeitos indesejados. Além disso, a exploração sustentável da biodiversidade para a descoberta de novos alvos farmacológicos não apenas diversifica as opções terapêuticas, mas também contribui para a conservação do meio ambiente como um todo (Neergheen-Bhujun *et al.*, 2017).

Desta forma, o presente estudo concentrou-se em identificar os potenciais tóxicos das folhas da planta medicinal *Eugenia brasiliensis*, bem como investigar seu possível efeito terapêutico em modelos de dor nociceptiva, nociplástica e neuropática em camundongos. Assim, é possível fornecer dados acerca da segurança e eficácia para o uso popular da espécie, além de fortalecer as evidências científicas para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos toxicológicos e terapêuticos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* (EHEb) em modelos de dor nociceptiva, nociplástica e neuropática.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os possíveis efeitos toxicológicos agudos e em doses repetidas do tratamento com EHEb em camundongos.
- b) Investigar os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de EHEb em um modelo de dor nociceptiva induzido por carragenina.
- c) Identificar o potencial do tratamento com EHEb nos aspectos sensoriais, emocionais, inflamatórios e neurotróficos um modelo de dor nociplástica (fibromialgia).
- d) Compreender os efeitos analgésicos, emocionais e anti-inflamatórios do EHEb em um modelo de dor neuropática induzida pelo esmagamento do nervo isquiático.



## 5. METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados deste trabalho são apresentados em 3 manuscritos, os quais buscam responder os objetivos estabelecidos anteriormente. Por questões relacionadas aos direitos autorais dos periódicos científicos, apenas a capa e o resumo gráfico de cada manuscrito estão disponibilizados neste arquivo. Os documentos originais e completos podem ser acessados no site de cada revista.

### CAPÍTULO 1

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

*Manuscrito referente aos objetivos a e b publicado na revista Journal of Ethnopharmacology.*

### CAPÍTULO 2

**Pharmacological evidence of *Eugenia brasiliensis* leaves in a reserpine-induced fibromyalgia model: antinociceptive, emotional, anti-inflammatory, and neurotrophic effects.**

*Manuscrito referente ao objetivo c aceito para a publicação na revista Molecular Neurobiology.*

### CAPÍTULO 3

***Eugenia brasiliensis* leaves reduce pain and inflammation, besides enhancing functionality and depressive-like behavior after sciatic nerve injury in mice.**

*Manuscrito referente ao objetivo d, ainda não submetido.*

## 5.1 CAPÍTULO 1

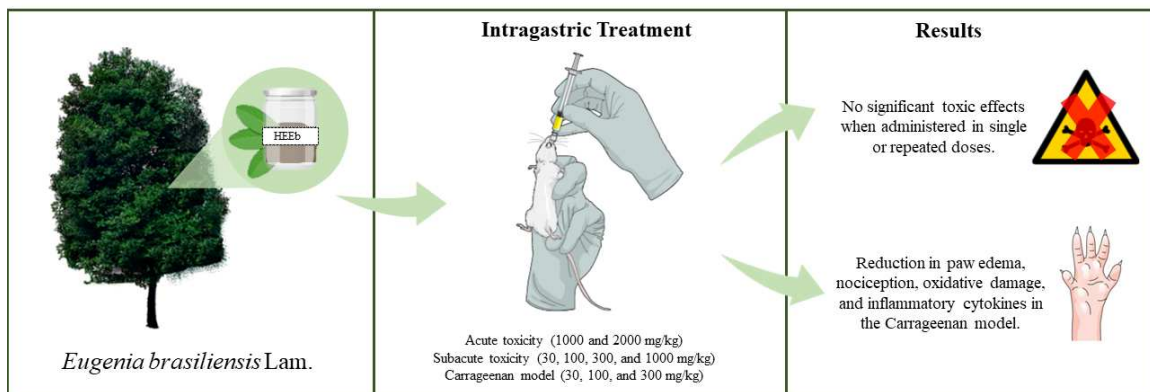
## Efeitos toxicológicos e farmacológicos das folhas de *Eugenia brasiliensis* (Myrtaceae) em camundongos

Artigo publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology* (FI: 5.4)

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36841377/>

### Resumo gráfico

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



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

**Legenda:** Elaborado pela autora, com auxílio da plataforma *Mind the Graph*.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)



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

Scheila Iria Kraus<sup>a,b</sup>, Jeane Bachi Ferreira<sup>a</sup>, Jhonatan Augusto Ribeiro<sup>a</sup>, Kelly Cattelan Bonorino<sup>a</sup>, Vinicius Alexandre Wippel<sup>a</sup>, Michele Debiasi Alberton<sup>c</sup>, Andréia Caroline Fernandes Salgueiro<sup>d</sup>, Carlos Henrique Lemos Soares<sup>e</sup>, Morgana Duarte da Silva<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> 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

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

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

<sup>d</sup> Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Brazil

<sup>e</sup> Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Medicinal plants  
*Eugenia brasiliensis*  
 Toxicology  
 Pain  
 Inflammation

### 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.

**Aim of the study:** Despite its traditional use, detailed toxicological studies of *Eugenia brasiliensis* are few. 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. Moreover, doses of 100 and 300 mg/kg of HEEb were able to reduce mechanical allodynia, paw edema, and inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6), decrease malondialdehyde and increase superoxide dismutase enzyme activity in the paw.

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

### 1. Introduction

The application of plants for medicinal purposes in treating, curing, and preventing diseases is one of the oldest medicinal practices of humanity (Petrovska, 2012). About 30% of the available drugs are derived

from microorganisms and plants. In some areas, such as oncology, this percentage reaches 60% (Dutra et al., 2016). This scenario is significant in Brazil, known for its vast biodiversity, comprising over 43,000 species of higher plants (20–22% of the total existing on the planet) (Convention On Biological Diversity, 2022).

The Myrtaceae plant family is widely distributed worldwide, with

\* Corresponding author. Postgraduate Program in Neurosciences, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, 88049-900, SC, Brazil.

E-mail addresses: [scheilaks@gmail.com](mailto:scheilaks@gmail.com) (S.I. Kraus), [bachijeane@gmail.com](mailto:bachijeane@gmail.com) (J.B. Ferreira), [jhonatanribeiro.ufsc@gmail.com](mailto:jhonatanribeiro.ufsc@gmail.com) (J.A. Ribeiro), [fisioctatlan@gmail.com](mailto:fisioctatlan@gmail.com) (K.C. Bonorino), [vini\\_wippel@hotmail.com](mailto:vini_wippel@hotmail.com) (V.A. Wippel), [michele@furb.br](mailto:michele@furb.br) (M.D. Alberton), [acfsalgueiro@gmail.com](mailto:acfsalgueiro@gmail.com) (A.C.F. Salgueiro), [chlssoares21@gmail.com](mailto:chlssoares21@gmail.com) (C.H.L. Soares), [morgana.silva@ufsc.br](mailto:morgana.silva@ufsc.br), [dasilvamdbrazil@gmail.com](mailto:dasilvamdbrazil@gmail.com) (M.D. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116309>

Received 1 October 2022; Received in revised form 18 February 2023; Accepted 20 February 2023

Available online 23 February 2023

0378-8741/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

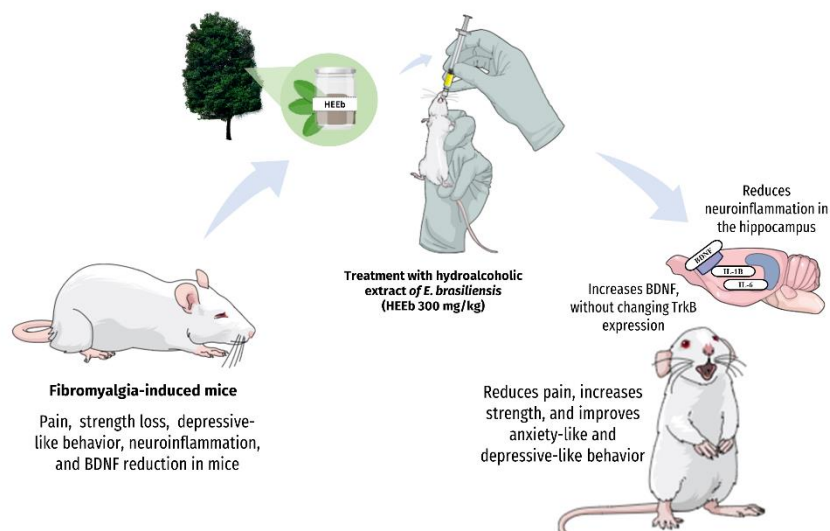
## 5.2 CAPÍTULO 2

**Evidências farmacológicas das folhas de *Eugenia brasiliensis* em modelo de fibromialgia induzido por reserpina: efeitos antinociceptivos, emocionais, anti-inflamatórios e neurotróficos**

*Artigo aceito para a publicação na revista Molecular Neurobiology (FI: 5.1)*

**Resumo gráfico**

**Pharmacological evidence of *Eugenia brasiliensis* leaves in a reserpine-induced fibromyalgia model: antinociceptive, emotional, anti-inflammatory, and neurotrophic effects.**



**Legenda:** Elaborado pela autora, com auxílio da plataforma *Mind the Graph*.

**Pharmacological evidence of *Eugenia brasiliensis* leaves in a reserpine-induced fibromyalgia model: antinociceptive, emotional, anti-inflammatory, and neurotrophic effects**

Scheila Iria Kraus<sup>1,3</sup>, Jeane Bachi Ferreira<sup>1</sup>, Angela Patricia França<sup>2,4</sup>, Vinícius Alexandre Wippel<sup>1</sup>, Rodrigo Bairy Leal<sup>2,3</sup>, Raquel Oppermann<sup>5</sup>, Michele Debiasi Alberton<sup>5</sup>, Morgana Duarte da Silva<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.

<sup>2</sup> Signal Transduction Laboratory, Department of Biochemistry, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.

<sup>3</sup> Graduate Program in Neurosciences, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.

<sup>4</sup> Graduate Program in Medical Sciences, University Hospital (HU), Health Sciences Center (CCS), Federal University of Santa Catarina, Trindade Florianópolis, SC, 88040-970, Brazil.

<sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Campus III, Regional University of Blumenau- Rua São Paulo 2171, Itoupava Seca, 89030-003, Brazil.

\*Corresponding author: Morgana Duarte da Silva, Postgraduate Program in Neurosciences, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, 88049-900, SC, Brazil. Fax: +55 (48) 3721-9672; Tel: +55 (48) 3721-9352 (Extension 206). E-mail: [morgana.silva@ufsc.br](mailto:morgana.silva@ufsc.br)

E-mail addresses and ORCID: [scheilaks@gmail.com](mailto:scheilaks@gmail.com), ORCID:0000-0001-6037-4184 (Kraus SI); [bachijeane@gmail.com](mailto:bachijeane@gmail.com), ORCID: 0000-0003-0559-9043 (Ferreira JB); [angels\\_franca@hotmail.com](mailto:angels_franca@hotmail.com), ORCID: 0000-0002-6425-4099 (França AP); [vini\\_wippel@hotmail.com](mailto:vini_wippel@hotmail.com), ORCID: 0009-0002-0851-5060 (Wippel VA); [rbleal@gmail.com](mailto:rbleal@gmail.com), ORCID: 0000-0003-2536-6888 (Leal RB); [roppermann@furb.br](mailto:roppermann@furb.br), ORCID: 0000-0002-3722-3000 (Oppermann R); [michele@furb.br](mailto:michele@furb.br), ORCID: 0000-0003-3490-9936 (Alberton MD); [morgana.silva@ufsc.br](mailto:morgana.silva@ufsc.br), ORCID: 0000-0002-2487-236X (da Silva MD).

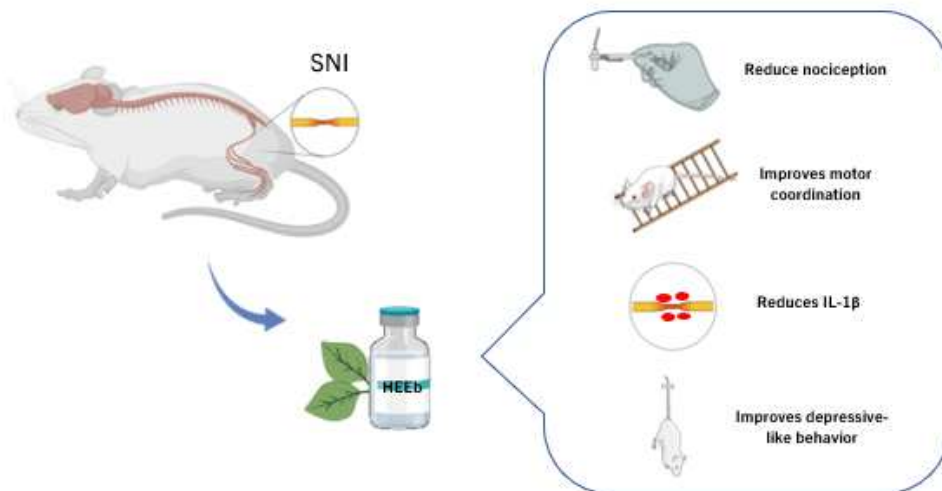
## 5.3 CAPÍTULO 3

**Folhas de *Eugenia brasiliensis* reduzem dor e inflamação, além de melhorar funcionalidade e comportamento tipo-depressivo após lesão do nervo isquiático em camundongos**

*Manuscrito em fase de finalização.*

**Resumo gráfico**

***Eugenia brasiliensis* leaves reduce pain and inflammation, besides enhancing functionality and depressive-like behavior after sciatic nerve injury in mice**



**Legenda:** Elaborado pela autora, com auxílio das plataformas Mind the Graph e Biorender.

SNI: Sciatic nerve injury.

***Eugenia brasiliensis* leaves reduce pain and inflammation, besides enhancing functionality and depressive-like behavior after sciatic nerve injury in mice**

Scheila Iria Kraus<sup>1,2</sup>, Jeane Bachi Ferreira<sup>1,2</sup>, Vinícius Alexandre Wippel<sup>1,2</sup>, Amanda Vasconcelos<sup>1,2</sup>, Kelly Cattelan Bonorino<sup>1,2</sup>, Raquel Oppermann<sup>3</sup>, Michele Debiasi Alberton<sup>3</sup>, Morgana Duarte da Silva<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.

<sup>2</sup> Graduate Program in Neurosciences, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Campus III, Regional University of Blumenau- Rua São Paulo 2171, Itoupava Seca, 89030-003, Brazil.

\*Corresponding author: Morgana Duarte da Silva, Postgraduate Program in Neurosciences, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, 88049-900, SC, Brazil. Fax: +55 (48) 3721-9672; Tel: +55 (48) 3721-9352 (Extension 206). E-mail: [morgana.silva@ufsc.br](mailto:morgana.silva@ufsc.br)

E-mail addresses and ORCID: [scheilaks@gmail.com](mailto:scheilaks@gmail.com), ORCID:0000-0001-6037-4184 (Kraus SI). [bachijeane@gmail.com](mailto:bachijeane@gmail.com), ORCID: 0000-0003-0559-9043 (Ferreira JB). [vini\\_wippel@hotmail.com](mailto:vini_wippel@hotmail.com), ORCID: 0009-0002-0851-5060 (Wippel VA). [amandavas96@gmail.com](mailto:amandavas96@gmail.com); ORCID:0000-0002-3781-3211 (Vasconcelos, A). [fisiocattelan@gmail.com](mailto:fisiocattelan@gmail.com); ORCID: 0000-0003-0797-5778 (Bonorino, KC) [roppermann@furb.br](mailto:roppermann@furb.br), ORCID: 0000-0002-3722-3000 (Oppermann R). [michele@furb.br](mailto:michele@furb.br), ORCID: 0000-0003-3490-9936 (Alberton MD). [morgana.silva@ufsc.br](mailto:morgana.silva@ufsc.br), ORCID: 0000-0002-2487-236X (da Silva MD).

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Com o crescente aumento do interesse mundial no desenvolvimento de fármacos de origem natural, a compreensão da segurança e eficácia de tais elementos faz-se primordial. Por essa razão, a presente tese buscou avaliar os efeitos toxicológicos e terapêuticos da planta medicinal *Eugenia brasiliensis* em modelos de dor com diferentes origens. Os resultados apontam que o uso agudo e/ou prolongado da planta não está associado a efeitos tóxicos importantes. Adicionalmente, seu potencial analgésico e anti-inflamatório foi observado em condições de dor nociceptiva, nociplástica e neuropática. Nos modelos de dor prolongada também foi possível verificar que o tratamento com o extrato esteve associado com uma melhora nos comportamentos tipo-depressivo, ansioso, de força e locomoção dos animais, indicando ser uma importante estratégia para o tratamento da dor crônica.

Embora muitas vezes a dor seja tratada como uma condição única, ela é variável de acordo com sua etiologia, tempo de duração e diversos fatores individuais, como sexo, idade, genética e doenças subjacentes. Dessa perspectiva, os tratamentos para a dor também devem respeitar sua complexidade, buscando abordagens que possam ser mais individualizadas, seguras e eficazes. Considerando isso, estudos que levantem aspectos mais amplos da dor, principalmente crônica, fazem-se de grande relevância no campo científico (Sokol *et al.*, 2021).

As abordagens farmacológicas atuais para o manejo da dor são pautadas no tratamento dos sintomas, visando a melhora do bem-estar dos pacientes (Alorfí, 2023). Face a isso, o presente trabalho empregou, como controle positivo, medicamentos que são comumente utilizados na clínica para cada uma das condições. Interessantemente, o tratamento com a planta apresentou efeitos analgésicos e anti-inflamatórios similares aos fármacos já comercializados. A hipótese para esse achado concentra-se no fato de que os ativos vegetais presentes na espécie podem atuar em múltiplos alvos. Os flavonóides, por exemplo, são conhecidos na literatura por seus importantes efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e analgésicos. Estes estão relacionados à inibição de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF- $\kappa$ B (Borghi *et al.*, 2018), VEGF, ICAM-1, STAT3 (Verri *et al.*, 2012) e ativação do fator de transcrição antioxidante Nrf2 (Borghi *et al.*, 2018; Ferraz *et al.*, 2020). Além disso, a planta *Eugenia brasiliensis* apresenta compostos como o ácido gálico e o ácido salicílico, os quais são amplamente conhecidos na literatura por seus inúmeros alvos e atividades biológicas.

Outro achado interessante é o efeito da planta nos demais parâmetros avaliados relacionados à dor. Tanto no modelo de fibromialgia quanto no modelo de neuropatia o extrato esteve associado a uma redução significativa do comportamento tipo-depressivo dos animais.



De fato, Colla e colaboradores (2012) já haviam demonstrado que a espécie atua no sistema monoaminérgico, levando a uma redução dos sintomas depressivos em roedores. No entanto, cabe acrescentar ainda que estudos recentes apontam a inflamação como um possível mecanismo relacionado à fisiopatologia da depressão (Beurel *et al.*, 2020). Deste modo, o potencial anti-inflamatório abordado anteriormente também pode ser uma via interessante para a redução desses sintomas.

Vislumbrando uma translação clínica de tais resultados, acredita-se que a utilização da planta poderia representar uma ferramenta valiosa para pacientes com dor e comorbidades associadas ao problema. É crucial ressaltar, no entanto, que a transição dos resultados não-clínicos para aplicações clínicas requer investigações mais aprofundadas. Nesse sentido, a realização de ensaios clínicos é imperativa para avaliar a eficácia e segurança do EHEb em seres humanos, bem como para determinar as doses terapêuticas adequadas. Além disso, esses ensaios podem fornecer informações adicionais sobre possíveis efeitos colaterais e interações medicamentosas, contribuindo para uma compreensão mais completa do perfil de segurança do composto.

Além dos ensaios clínicos, investigações mais detalhadas sobre os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos do EHEb também são necessárias para uma validação mais minuciosa de sua ação terapêutica. Estudos adicionais podem aprofundar os caminhos de sinalização celular, a influência nas vias inflamatórias e a interação com receptores específicos. Isso não apenas aprimora a compreensão científica do composto, mas também fornece alvos terapêuticos mais precisos para o desenvolvimento de futuros medicamentos.

Por fim, cabe acrescentar que, considerando fins comerciais, é imprescindível que seja realizada a padronização dos constituintes do produto vegetal, visando garantir a constância de seus efeitos. De fato, sabe-se que a composição química das plantas pode ser afetada por inúmeros fatores, tais como sazonalidade, local de crescimento, disponibilidade de predadores, temperatura do solo, período de coleta, dentre vários outros. E, em última instância, isso pode afetar significativamente a eficácia e a segurança do fitoterápico que se pretende desenvolver (Qaderi *et al.*, 2023). Neste trabalho, observamos diferenças notáveis na composição do primeiro extrato, coletado em março de 2012, para o segundo, o qual foi obtido em outra localidade, em maio de 2021. Enquanto um apresentou compostos majoritários como a catequina, mirecetina, isoquercetina e rutina, o outro mostrou-se rico em ácido gálico, pinocembrina e ácido salicílico. Embora ambos tenham apresentado efeitos importantes nos modelos utilizados, isso reforça a necessidade de uma abordagem sistemática na produção

destes insumos, assegurando a replicabilidade dos resultados e a confiabilidade do produto a longo prazo.

Em suma, os resultados encontrados neste trabalho proporcionam uma compreensão ampla sobre o potencial toxicológico e terapêutico do extrato hidroalcolico das folhas de *E. brasiliensis*. No entanto, há ainda um longo caminho a ser percorrido para validar sua segurança e eficácia no contexto clínico, buscando identificar mecanismos moleculares subjacentes, além de otimizar os constituintes, a dose e a forma de tratamento adequada para cada condição. Dessa maneira, essa pesquisa não apenas valida o uso tradicional da grumixama, mas também destaca a importância de abordagens individualizadas na pesquisa de novos tratamentos para condições dolorosas e inflamatórias. Ainda, abre portas para futuras investigações e desenvolvimentos terapêuticos na interface entre a medicina tradicional e a ciência contemporânea.

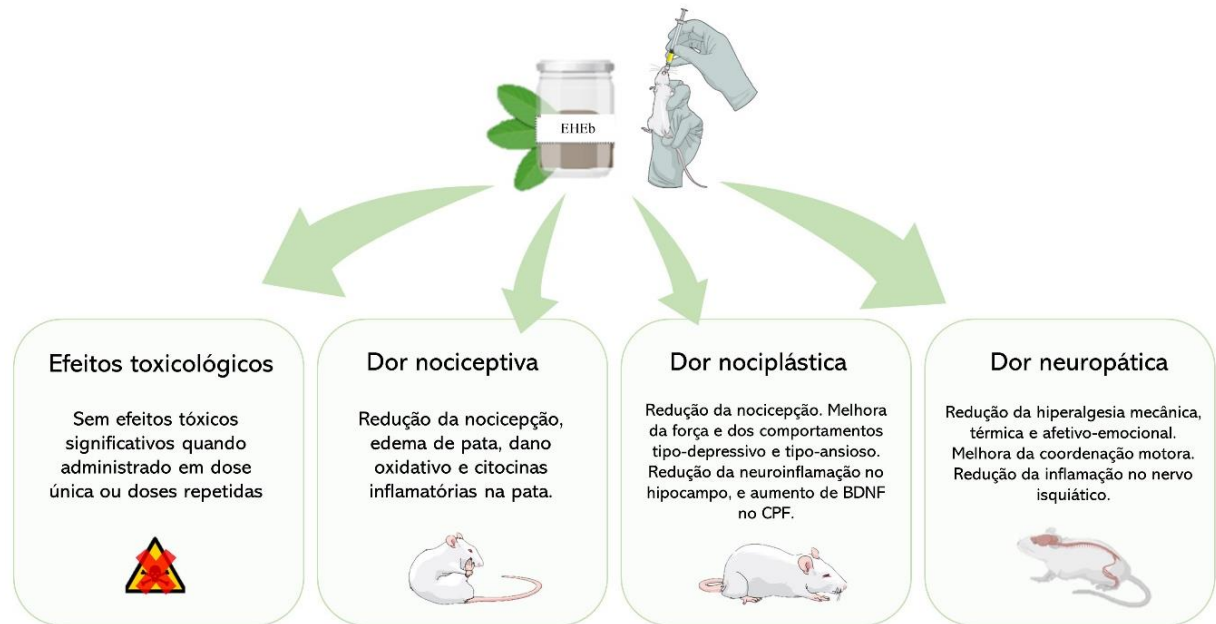
## 7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados nesta tese, conclui-se que:

1. O tratamento agudo com doses altas de EHEb (1000 e 2000 mg/kg) não foi capaz de causar mudanças comportamentais, de consumo de água e ração, bem como de peso corporal e dos tecidos em 14 dias de avaliação.
2. O tratamento repetido (28 dias) com diferentes doses de EHEb não esteve associado a mudanças de consumo de água e ração, comportamentais, bioquímicas e histológicas. Na análise hematológica observou-se um aumento de neutrófilos e uma redução de leucócitos em fêmeas tratadas com 1000 mg/kg. Estes dados indicam a baixa toxicidade e alta segurança do extrato de *E. brasiliensis*.
3. Uma única dose de EHEb (100 e 300 mg/kg) foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica, o edema de pata, as citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), o malondialdeído, além de aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no modelo de dor nociceptiva induzido por carragenina na pata em camundongos.
4. No modelo de dor nociplástica (mimetizando a fibromialgia), o tratamento com EHEb esteve associado com uma melhora na hiperalgesia mecânica e térmica, um aumento da força, bem como uma redução nos comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso. Ainda, observou-se uma redução da neuroinflamação no hipocampo (IL-1 $\beta$  e IL-6), além de um aumento de BDNF no córtex pré-frontal. No entanto, não foram encontradas alterações no imunoconteúdo do receptor TrkB total e fosforilado.
5. No modelo de dor neuropática induzida pelo esmagamento do nervo isquiático observou-se o efeito significativo do extrato na melhora da nocicepção térmica, mecânica e afetivo-emocional dos animais. Além disso, o tratamento também melhorou a coordenação motora e o comportamento tipo-depressivo, reduzindo citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ ) no nervo isquiático.

A figura 6 resume as principais conclusões deste trabalho.

**Figura 6 - Conclusões gerais da tese**



**Legenda:** elaborado pela autora, com auxílio da plataforma Mind the Graph.

## 8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho, propõe-se finalizar as seguintes etapas do manuscrito de neuropatia:

- Investigar os efeitos regenerativos da planta, através da análise histológica, morfológica e morfométrica, do nervo isquiático.
- Verificar se o tratamento com a planta é capaz de alterar os níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4 envolvidas na neuropatia.
- Compreender os mecanismos farmacológicos da planta através do uso de antagonistas e agonistas para o sistema monoaminérgico.
- Avaliar a interação da planta na expressão gênica de fatores antioxidantes, como o Nrf2.

Além disso, também pretende-se finalizar o manuscrito de revisão sistemática com meta-análise, o qual já está registrado na plataforma PROSPERO sob identificação CRD42022354269, com o seguinte título: "Therapeutic potential of the plant genus *Eugenia* (Myrtaceae) in animal models of pain: a protocol for systematic review and meta-analysis." O mesmo busca elucidar o potencial terapêutico do gênero *Eugenia* em modelos de dor.

## 9. DEMAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORAMENTO

Durante o período de doutoramento (2019 – 2024), tive a oportunidade de participar de diversas atividades desenvolvidas no âmbito do laboratório, do PPGNeuro, bem como em outras universidades.

Dentre as participações mais relevantes, destacam-se:

- 1) Representação discente nos Colegiados Delegado e Pleno do PPGNeuro UFSC (2019 – 2022)
- 2) Organização de 9 eventos científicos, dos quais: 3 edições do SIPNeuro UFSC e 6 edições do Curso de Verão em Neurociências UFSC.
- 3) Coorientação de dois alunos de iniciação científica.
- 4) Participação em bancas de avaliação.
- 5) Publicação de artigos científicos do laboratório e em colaboração.

**KRAUS, S.I.**; FERREIRA, J.B.; RIBEIRO, J.; BONORINO, K.C.; WIPPEL, V.A.; ALBERTON, M.D.; SALGUEIRO, A.F.; SOARES, C.H.L.; DA SILVA, M.D. Toxicological and pharmacological effects of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves in mice. **J ethnopharmacol**, 2023.

DEL GAUDIO, M.P.; **KRAUS, S.I.**; MELZER, T.M.; BUSTOS, P.S.; ORTEGA, M.G. Oral treatment with Berberine reduces peripheral nociception: Possible interaction with different nociceptive pathways activated by different allogeneic substances. **J Ethnopharmacol**, 2023.

DEL GAUDIO, M.P.; **KRAUS, S.I.**; MELZER, T.M.; BUSTOS, P.S.; ORTEGA, M.G. Antinociceptive effect and identification of berberine alkaloid in *Berberis ruscifolia* extracts. **J ethnopharmacol** v. 305, p. 116066, 2023.

NEVES, M.L.; FERREIRA, J.B.; **KRAUS, S.I.**; SPERETTA, G.; AMARAL, P.; WIPPEL, V.A.; GENTIL, L., RODRIGUES, I.; DA SILVA, M.D. Simulation of the auricular branch of the vagus nerve by acupuncture in women with fibromyalgia with severe pain and other functional and emotional problems: study protocol for a randomized, controlled, double-blind clinical trial. **Longhua Chinese Medicine**, 2023.

KARVAT, J.; ANDRADE, T.E.S.; **KRAUS, S.I.**; BEPLER, L.M.; DE JESUS, G.C.; FERREIRA, J.B.; DA SILVA, M.D. Drug repositioning: diacerein as a new therapeutic approach in a mice model of sciatic nerve injury. **Pharmacological Reports**, 2023.

COELHO, I.A.; CERUTTI, M.L.; ARRUDA, G.; **KRAUS, S.I.**; LORBIÉSKI, J.K.; DE SOUZA, R.C.; PANSINI, M.; VALENTE, C. Acupuncture and laserpuncture as a therapeutic approach for nociception and inflammation: An experimental study in mice. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 2023.

FAQUETI, L.G.; DA SILVA, L.A.L; MOREIRA, G.S.G.; **KRAUS, S.I.**; DE JESUS, G.S.C.; HONORATO, L.A.; DE ARAUJO, B.V.; DOS SANTOS, A.R.S.; COSTA, T.D.; BIAVATTI, M.W. Preclinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Investigation of 5?-Methoxynobiletin from *Ageratum conyzoides*: In vivo and In silico Approaches. **Pharm. Res.**, 2022.

DELANOGARE, E.; BULLICH, S.; BARBOSA, L.A.S.; BARROS, W.M.; BRAGA, S.P.; **KRAUS, S.I.**; KASPROWICZ, J.N.; DOS SANTOS, G.J.; GUIARD, B.P.; MOREIRA, E.L.G. Metformin improves neurobehavioral impairments of streptozotocin-treated and western diet-fed mice: Beyond glucose-lowering effects. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 2022.

MALHEIROS, R.T.; DELGADO, H.O.; FELBER, D.T.; **KRAUS, S.I.**; DOS SANTOS, A.R.S.; MANFREDINI, V.; DA SILVA, M.D. Mood disorders are associated with the reduction of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus in rats submitted to the hipercaloric diet. **Metab. Brain Dis.**, 2020.

## REFERÊNCIAS

ALONSO-CASTRO, A. J. *et al.* Medicinal Plants from North and Central America and the Caribbean Considered Toxic for Humans: The Other Side of the Coin. **Evid Based Complement Alternat Med**, vol.1 2017.

ALORFI, N. M. Pharmacological Methods of Pain Management: Narrative Review of Medication Used. *Int J Gen Med*, v. 16, p. 3247-3256, jul. 2023.

ALVITES, R. *et al.* Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. **Cogent Med**, v. 5, n. 1, p. 1–45, 1 jan. 2018.

ANDRADE, E. L. *et al.* Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 12, e5646, 2016.

ANGOURAKIS, A.; ALCAINA-MATEOS, J.; MADELLA, M.; ZURRO, D. Human-Plant Coevolution: A modelling framework for theory-building on the origins of agriculture. **PLoS One**, v. 17, n. 9, e0260904, 2022.

ARAÚJO, F. F. *et al.* Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Res Int**, v. 121, p. 57-72, 2019.

ARMSTRONG, S. A.; HERR, M. J. Physiology, Nociception. 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 20, p. 200–216, 2021.

BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 474-491, 2015.

BALLANTYNE, J. C.; LAFORGE, S. K. Opioid dependence and addiction during opioid treatment of chronic pain. **Pain**, v. 129, n. 3, p. 235-255, 2007.

BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **Neuron**, v. 107, n. 2, p. 234-256, 2020.

BORGHI, S. M. *et al.* The flavonoid quercetin inhibits titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis in mice. **J. Nutr. Biochem.**, v. 53, p. 81–95, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. **Conselho Nacional de Saúde**. Brasília, DF, 2006a.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Oficializa a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos**. Brasília, DF, 2015.

BRUM, E. S. *et al.* Animal models of fibromyalgia: What is the best choice? *Pharmacol Ther*, v. 230, 107959, 2022.

BUSHNELL, M. C., ČEKO, M., & LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, 502–511. 2013.

CAILLAUD, M. *et al.* Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. *Neural Regeneration Research*, v. 14, n. 1, p. 24–33, jan. 2019.

CALIXTO, J. B. *et al.* Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother Res**, v. 14, n. 6, p. 401-418, 2000.



CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CASTILLO-GALVÁN, M. L. *et al.* Study of peripheral nerve injury in trauma patients. **Gac. Med. Mex**, v. 150, n. 6, p. 527–532, 2014.

CHIMENTI, R. L.; FREY-LAW, L. A.; SLUKA, K. A. A Mechanism-Based Approach to Physical Therapist Management of Pain. **Phys Ther**, v. 98, n. 5, p. 302-314, 2018.

CHUI, J. *et al.* Perioperative peripheral nerve injury after general anesthesia: A qualitative systematic review. **Anesth. Analg.** v. 127, n. 1, p. 134–143, 2018.

COHEN, S. P.; VASE, L.; HOOTEN, W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. **Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2082-2097, 2021.

COLLA, G. *et al.* Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 143, p. 720–731, 2012.

CORDELL, W. H. *et al.* The high prevalence of pain in emergency medical care. **Am J Emerg Med**, v. 20, n. 3, p. 165–169, 2002.

COSTA, N. T. *et al.* Influence of disease-modifying antirheumatic drugs on oxidative and nitrosative stress in patients with rheumatoid arthritis. **Inflammopharmacol**, v. 26, p. 1151–1164, 2018.

COSTIGAN, M. *et al.* Neuropathic Pain: A Maladaptive Response Of The Nervous System To Damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, S.N., p. 1–32, 2009.

COURTNEY, C. A.; FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; BOND, S. Mechanisms of chronic pain - key considerations for appropriate physical therapy management. **J Man Manip Ther**, v. 25, n. 3, p. 118-127, 2017.

- DALLAZEN, J. L. *et al.* Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain. **Inflammopharmacol.**, v. 28, n. 1, p. 175-186, 2020.
- DONEDDU, P. E. *et al.* Tarsal tunnel syndrome: still more opinions than evidence. **Neurological Sciences**, v. 38, n. 10, p. 1735–1739, 2009.
- DOWDEN, H.; MUNRO, J. Trends in clinical success rates and therapeutic focus. **Nat Rev Drug Discov**, v. 18, p. 495-496, 2019.
- D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesthv.** 101, n. 1, p. 8-16, jul. 2008.
- DUCREUX, D. *et al.* Mechanisms of central neuropathic pain: a combined psychophysical and fMRI study in syringomyelia. **Brain**, v. 129, Pt 4, p. 963-976, 2006.
- DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- DWORKIN, R. H. *et al.* Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.
- FARRAR, F. C.; WHITE, D.; DARNELL, L. Pharmacologic Interventions for Pain Management. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 29, n. 4, p. 427-447, 2017.
- FERRAZ, C. R. *et al.* Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 762, 2020.
- FITZCHARLES, M. A. *et al.* Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. **Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2098-2110, 2021.
- GARLAND, E. L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Prim Care**, v. 39, n. 3, p. 561-571, 2012.

GRATTAPAGLIA, D. *et al.* Progress in Myrtaceae genetics and genomics: Eucalyptus as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 463–508, 2012.

GREGORY, N. S. *et al.* An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **J Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255-1269, 2013.

HAACK, M. *et al.* Sleep deficiency and chronic pain: potential underlying mechanisms and clinical implications. **Neuropsychopharmacology**, v. 45, n. 1, p. 205-216, 2019.

HAO, D. C.; XIAO, P. G. Pharmaceutical resource discovery from traditional medicinal plants: Pharmacophylogeny and pharmacophylogenomics. **Chin Herb Med**, v. 12, n. 2, p. 104-117, 2020.

HARGREAVES, K. *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77–88, 1988.

HÄUSER, W. *et al.* Fibromyalgia. **Nature Reviews | Disease Primers**, v. 1, p. 1–16, 2015.

HINKSON IV, M. *et al.* Accelerating therapeutics for opportunities in medicine: a paradigm shift in drug discovery. **Front Pharmacol**, v. 11, p. 770, 2020.

HUSSAIN, G. *et al.* Current status of therapeutic approaches against peripheral nerve injuries: A detailed story from injury to recovery. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 16, n. 1, p. 116–134, 2020.

HYLANDS-WHITE, N.; DUARTE, R. V.; RAPHAEL, J. H. An overview of treatment approaches for chronic pain management. **Rheumatol. Int.**, v. 37, n. 1, p. 29-42, 2017.

KAGGWA, B. *et al.* Safety and Efficacy of Medicinal Plants Used to Manufacture Herbal Products with Regulatory Approval in Uganda: A Cross-Sectional Study. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 2022.

KARIMI, A.; MAJLESI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. **J. Nephroarmacol.**, v. 4, n. 1, p. 27-30. 2015.

KIM, Y. R. *et al.* Antidepressant and Anxiolytic-Like Effects of the Stem Bark Extract of *Fraxinus rhynchophylla* Hance and Its Components in a Mouse Model of Depressive-Like Disorder Induced by Reserpine Administration. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 15, p. 650833, 2021.

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 1, p. 748, 2002.

KOSEK, E. *et al.* Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? **Pain**, v. 157, p. 1382–1386, 2016.

KOSTEN, T. R.; GEORGE, T. P. The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. **Sci Pract Perspect.**, v. 1, n. 1, p. 13-20, jul. 2002.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

LAZARINI, J. G. *et al.* Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. **Biomed. Pharmacother.**, v. 102, p. 132-139, 2018.

LI, Y. *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 148, p. 80-89, 2020.

LIMA, A. B. *et al.* Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. **Biomed. Pharmacother.**, v. 96, p. 642–649, 2017.

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

MARTINOWICH, K.; LU, B. Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacol.**, v. 33, p. 73–83, 2008.

MAZZARI, A. L., & PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Front Pharmacol**, 5, 162. 2014.

MCLAY, J. S. *et al.* 'Asking the Right Question'. A Comparison of Two Approaches to Gathering Data on 'Herbals' Use in Survey Based Studies. **PLoS One**, v. 11, n. 2, e0150140, 2016.

MENORCA, R. M.; FUSSELL, T. S.; ELFAR, J. C. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. **Hand Clin.**, v. 29, n. 3, p. 317–330, 2013.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/publicacoes/estrategia-da-oms-sobre-medicina-tradicional-2014-2023/view>. Acesso em novembro de 2023.

MINTAH, S. O. *et al.* Medicinal Plants for Treatment of Prevalent Diseases. **Pharmacognosy - Medicinal Plants**, 2019.

MODRAK, M. *et al.* Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. **J. Neurosci. Res.**, v. 98, n. 5, p. 780–795, 2020.

MORIARTY, O.; MCGUIRE, B. E.; FINN, D. P. The effect of pain on cognitive function: a review of clinical and preclinical research. **Prog. Neurobiol.**, v. 93, n. 3, p. 385–404, 2011.

NAGAKURA, Y. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. **Pain**, v. 146(1-2), p. 26–33, 2009.

NEERGHEEN-BHUNJUN, V. *et al.* Biodiversity, drug discovery, and the future of global health: Introducing the biodiversity to biomedicine consortium, a call to action. **J. Glob. Health**, v. 7, n. 2, 020304, dez. 2017.

NEHRING, P. Grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lamarck) functional phytochemicals: Effect of environmental conditions and ripening process. **Food Res. Int.**, v. 157, p. 111460, 2022.

NIELSEN, L. A. Central sensitization in humans: assessment and pharmacology. **Handb Exp Pharmacol**, v. 227, p. 79-102, 2015.

OE, T.; TSUKAMOTO, M.; NAGAKURA, Y. Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. **Neuroscience**, v. 169(4), p. 1860–1871, 2010.

OCDE. OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals. 2023. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>. Acesso em 10 de novembro de 2023.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva, 2004.

PARVEEN, A.; PARVEEN, B.; PARVEEN, R.; AHMAD, S. Challenges and guidelines for clinical trial of herbal drugs. **J Pharm Bioallied Sci.**, v. 7, p. 329–333, 2015.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev.**, v. 6, n. 11, p. 1–5, 2012.

PIETROVSKI, E. F. *et al.* Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **J Pharm Pharmacol.**, v. 60, n. 4, p. 479–487, 2008.

PORTER, G. A.; O'CONNOR, J. C. "Brain-derived neurotrophic factor and inflammation in depression: Pathogenic partners in crime?". **World J. Psychiatry**, v. 12, p. 77–97, 2022.

QADERI, M. M.; MARTEL, A. B.; STRUGNELL, C. A. Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. **Plants (Basel)**, 12(3), 447. 2023

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

RAHMAN, S. *et al.* Clinical Diagnosis and Treatment of Chronic Pain. **Diagnostics (Basel)**, v. 13, n. 24, p. 3689, 2023.

RAJA, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161(9), p. 1976-1982, 2020.

REVILLA, J. Plantas úteis da bacia amazônica. **Inpa**, Rio de Janeiro, 2002.

SAAD, B. *et al.* Introduction to Medicinal Plant Safety and Efficacy. In: Anti-diabetes and Anti-obesity Medicinal Plants and Phytochemicals. **Springer, Cham**, 2017.

SÁNCHEZ, M. *et al.* Current uses and knowledge of medicinal plants in the Autonomous Community of Madrid (Spain): a descriptive cross-sectional study. **BMC Complement Med Ther**, v. 20, p. 306, 2020.

SANTIAGO, B. V. M. *et al.* Prevalence of chronic pain in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 78, 100209, 2023.

SARDI, J. C. O. *et al.* Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia spp.* **Microbial Pathogenesis**, São Paulo, v. 105, p. 280-287, 2017.

SARZI-PUTTINI, P. *et al.* Fibromyalgia: an update on clinical characteristics, aetiopathogenesis and treatment. **Nat Rev Rheumatol**, v. 16(11), p. 645-660, 2020.

SCHAPOVAL, E. E. S. *et al.* Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora L.* **J Ethnopharmacol**, v. 44, p. 137-142, 1994.

SHENG, J. *et al.* The Link between Depression and Chronic Pain: Neural Mechanisms in the Brain. **Neural Plast**, 9724371, 2017.

SIEBERT, D. A. *et al.* Anti-inflammatory activity of the epicuticular wax and its isolated compounds catechin and galocatechin from *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Nat Prod Res**, v. 35, n. 22, p. 4720-4723, 2021.

SIKANDAR, S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor derived from sensory neurons plays a critical role in chronic pain. **Brain**, v. 141, p. 1028-1039, 2018.

SIMÕES, R. R. *et al.* *Eugenia brasiliensis* leaves extract attenuates visceral and somatic inflammatory pain in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 217, p. 178-186, 2018.

SOBRAL, M. *et al.* Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2012.

SOKOL, R. G. *et al.* Multidisciplinary Approach for Managing Complex Pain and Addiction in Primary Care: A Qualitative Study. **Ann Fam Med**, v. 19, n. 3, p. 224-231, 2021.

SUN, D. *et al.* Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? **Acta Pharm Sin B**, v. 12, n. 7, p. 3049-3062, 2022.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**, v. 74, n. 4, p. 491-516, 1951.

TAMANO, R. *et al.* Effect of spinal monoaminergic neuronal system dysfunction on pain threshold in rats, and the analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. **Neuroscience Letters**, v. 615, p. 78-82, 2016.

THEODORIDIS, S. *et al.* Evaluating natural medicinal resources and their exposure to global change. **Lancet Planet Health**, v. 7, n. 2, p. e155-e163, 2023.

TODD, K. H. A Review of Current and Emerging Approaches to Pain Management in the Emergency Department. **Pain and Therapy**, v. 6, p. 193-202, 2017.

TREEDE, R. D. *et al.* Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain**, v. 160, p. 19–27, 2019.

VARDEH, D. *et al.* Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis. **J Pain**, v. 17, n. 9 Suppl, p. T50-69, 2016.



VERRI JÚNIOR, W.A. *et al.* Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. In: Rahman A.U., editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. 1st ed. Volume 36. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands. pp. 297–330. 2012.

WAHAB, K. W. *et al.* Carpal tunnel syndrome and other entrapment neuropathies. **Oman Medical Journal**, v. 32, n. 6, p. 449 – 454, nov. 2017.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**. 5;353(9168):1959-64. 1999.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. 152(3 Suppl):S2-S15. 2011.

ZHUO, M. Neural Mechanisms Underlying Anxiety-Chronic Pain Interactions. **Trends Neurosci**. v.39(3), p.136-145. 2016.

## ANEXO 1 – COMPROVANTE CEUA



Universidade Federal  
de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



### 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, dispneia, 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,

## ANEXO 2 – COMPROVANTE SISGEN



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

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

### Parceiras Nacionais



## ANEXO 3 – GUIA ARRIVE

### Referente ao manuscrito 1:

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.	
<b>Study design</b>	<p>1 For each experiment, provide brief details of study design including:</p> <p>a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. <b>Available on items 2.5, 2.6 and 2.7</b></p> <p>b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). <b>Described at items 2.5, 2.6 and 2.7</b></p>
<b>Sample size</b>	<p>2 a. 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. <b>Described in items 2.5, 2.6, and 2.7; and also in figures and tables legends. Total n of animals: 115.</b></p> <p>b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. <b>Decided according to OECD guidelines and previous studies by the research group.</b></p>
<b>Inclusion and exclusion criteria</b>	<p>3 a. 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. <b>Not applied.</b></p> <p>b. 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. <b>Not applied. All experimental units were included.</b></p> <p>c. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. <b>Described at items 2.5, 2.6 and 2.7</b></p>
<b>Randomisation</b>	<p>4 a. 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. <b>Described at item 2.4</b></p> <p>b. 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. <b>Not applied.</b></p>
<b>Blinding</b>	<p>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). <b>Described at item 2.4</b></p>
<b>Outcome measures</b>	<p>6 a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). <b>Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7.</b></p> <p>b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. <b>Not applied.</b></p>
<b>Statistical methods</b>	<p>7 a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. <b>Described on item 2.8</b></p> <p>b. 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. <b>Described on item 2.8</b></p>
<b>Experimental animals</b>	<p>8 a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. <b>Described on item 2.4</b></p> <p>b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures. <b>Described on item 2.4</b></p>
<b>Experimental procedures</b>	<p>9 For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:</p> <p>a. What was done, how it was done and what was used. <b>Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7.</b></p> <p>b. When and how often. <b>Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7.</b></p> <p>c. Where (including detail of any acclimatisation periods). <b>Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7.</b></p> <p>d. Why (provide rationale for procedures). <b>Items 2.4, 2.5, 2.6, and 2.7.</b></p>
<b>Results</b>	<p>10 For each experiment conducted, including independent replications, report:</p> <p>a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). <b>Described on tables and graphs legends.</b></p> <p>b. If applicable, the effect size with a confidence interval. <b>P&lt;0,05. Described in item 2.8.</b></p>

## Referente ao manuscrito 2:

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.	
<b>Study design</b>	1 For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> <li>The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. <b>Available on item 2.6</b></li> <li>The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). <b>Described at item 2.6.</b></li> </ol>
<b>Sample size</b>	2 <ol style="list-style-type: none"> <li>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. <b>Described in items 2.6, and in figures legends. Total n of animals: 70</b></li> <li>Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. <b>Decided according to previous studies by our research group.</b></li> </ol>
<b>Inclusion and exclusion criteria</b>	3 <ol style="list-style-type: none"> <li>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. <b>Not applied.</b></li> <li>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. <b>Not applied. All experimental units were included.</b></li> <li>For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. <b>Described at item 2.6.</b></li> </ol>
<b>Randomisation</b>	4 <ol style="list-style-type: none"> <li>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. <b>Described at item 2.6</b></li> <li>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. <b>Not applied.</b></li> </ol>
<b>Blinding</b>	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). <b>Described at item 2.6.</b>
<b>Outcome measures</b>	6 <ol style="list-style-type: none"> <li>Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). <b>Items 2.7 and 2.8.</b></li> <li>For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. <b>Not applied.</b></li> </ol>
<b>Statistical methods</b>	7 <ol style="list-style-type: none"> <li>Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. <b>Described on item 2.9.</b></li> <li>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. <b>Described on item 2.9 and on the figure's legends.</b></li> </ol>
<b>Experimental animals</b>	8 <ol style="list-style-type: none"> <li>Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. <b>Described on item 2.4</b></li> <li>Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures. <b>Described on item 2.4</b></li> </ol>
<b>Experimental procedures</b>	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"> <li>What was done, how it was done and what was used. <b>Items 2.6, 2.7, and 2.8.</b></li> <li>When and how often. <b>Items 2.6, 2.7, and 2.8.</b></li> <li>Where (including detail of any acclimatisation periods). <b>Items 2.6 and 2.7.</b></li> <li>Why (provide rationale for procedures). <b>Items 2.6, 2.7, and 2.8.</b></li> </ol>
<b>Results</b>	10 For each experiment conducted, including independent replications, report: <ol style="list-style-type: none"> <li>Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). <b>Described on graphs legends.</b></li> <li>If applicable, the effect size with a confidence interval. <b>P&lt;0,05. Described in item 2.9.</b></li> </ol>



## Referente ao manuscrito 3:

## 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.

<b>Study design</b>	1	For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> <li>The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. <b>Available on item 2.6</b></li> <li>The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). <b>Described at item 2.6.</b></li> </ol>
<b>Sample size</b>	2	<ol style="list-style-type: none"> <li>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. <b>Described in items 2.6, and in figures legends. Total n of animals: 70</b></li> <li>Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. <b>Decided according to previous studies by our research group.</b></li> </ol>
<b>Inclusion and exclusion criteria</b>	3	<ol style="list-style-type: none"> <li>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. <b>Not applied.</b></li> <li>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. <b>Not applied. All experimental units were included.</b></li> <li>For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. <b>Described at item 2.6. and in figure legends.</b></li> </ol>
<b>Randomisation</b>	4	<ol style="list-style-type: none"> <li>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. <b>Described at item 2.6</b></li> <li>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. <b>Not applied.</b></li> </ol>
<b>Blinding</b>	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). <b>Described at item 2.6.</b>
<b>Outcome measures</b>	6	<ol style="list-style-type: none"> <li>Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). <b>Items 2.7 and 2.8.</b></li> <li>For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. <b>Not applied.</b></li> </ol>
<b>Statistical methods</b>	7	<ol style="list-style-type: none"> <li>Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. <b>Described on item 2.9.</b></li> <li>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. <b>Described on item 2.9 and on the figure's legends.</b></li> </ol>
<b>Experimental animals</b>	8	<ol style="list-style-type: none"> <li>Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. <b>Described on item 2.4</b></li> <li>Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures. <b>Described on item 2.4</b></li> </ol>
<b>Experimental procedures</b>	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"> <li>What was done, how it was done and what was used. <b>Items 2.6, 2.7, and 2.8.</b></li> <li>When and how often. <b>Items 2.6, 2.7, and 2.8.</b></li> <li>Where (including detail of any acclimatisation periods). <b>Items 2.6 and 2.7.</b></li> <li>Why (provide rationale for procedures). <b>Items 2.6, 2.7, and 2.8.</b></li> </ol>
<b>Results</b>	10	For each experiment conducted, including independent replications, report: <ol style="list-style-type: none"> <li>Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). <b>Described on graphs legends.</b></li> <li>If applicable, the effect size with a confidence interval. <math>P &lt; 0,05</math>. <b>Described in item 2.9.</b></li> </ol>