



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

BRUNO OLIVEIRA DE VERAS

**Investigação Etnomedicinal, Fitoquímica e Etnofarmacológica do Óleo Essencial de
Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith**

RECIFE

2022

BRUNO OLIVEIRA DE VERAS

**Investigação Etnomedicinal, Fitoquímica e Etnofarmacológica do Óleo Essencial de
Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical. **Área de concentração:** Medicina Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

RECIFE

2022

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

V476i	Veras, Bruno Oliveira de Investigação Etnomedicinal, Fitoquímica e Etnofarmacológica do Óleo Essencial de <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Smith / Bruno Oliveira de Veras. – 2022. 247 p. : il. Orientadora: Ana Catarina de Souza Lopes. Coorientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2022. Inclui referências e apêndices. 1. Óleos Voláteis. 2. Anti-Infeciosos. 3. Modulador. 4. inflamação. 5. Dor. 6. <i>Amburana cearensis</i>. I. Lopes, Ana Catarina de Souza (orientadora). II. Oliveira, Maria Betânia Melo de (coorientadora). III. Título. 616.9792 CDD (23.ed.)	UFPE (CCS 2022 - 263)
-------	---	-----------------------



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

BRUNO OLIVEIRA DE VERAS

**INVESTIGAÇÃO ETNOMEDICINAL, FITOQUÍMICA E ETNOFARMACOLÓGICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *AMBURANA CEARENSIS* (ALLEMÃO) A.C. SMITH**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical. **Área de concentração:** Medicina Tropical

Aprovado em: 19/08/2022.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Fernanda Granja da Silva Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Krystyna Gorlach-Lira (Examinadora Externa)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua intensa presença em minha vida, e por me permitir mais essa conquista;

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMT), pela oportunidade de realização deste trabalho;

Aos meus pais Helbia e Benedito, pela motivação e força que me deram ao longo destes anos, e acima de tudo agradeço por tornarem possível a minha formação. Obrigado por estarem a meu lado;

A minha companheira Penha Patrícia, pela companhia, incentivo, dedicação e compreensão em momentos difíceis;

Aos meus irmãos, Breno e Raphael, meus companheiros de jornada terrena;

À minha orientadora, professora Ana Catarina, por me receber no PPGMT e por aceitar a orientação deste trabalho, bem como a confiança depositada em meu trabalho;

À minha coorientadora, professora Maria Betânia, pela imensa amizade, confiança e incentivo. Muito obrigado por fazer parte deste momento;

Aos professores e técnicos administrativos do PPGMT pelos ensinamentos repassados e auxílio durante esta jornada;

Aos colegas do Departamento de Bioquímica (Márcia Vanusa, Miron, Edvânia) e do Departamento de Antibióticos (Rafael Ximenes, Jaciana Aguiar e José de Castro) da UFPE pelo auxílio durante esta jornada;

Aos colegas da turma do doutorado pelos prazerosos momentos de diálogo;

Aos meus colegas do LABENZ, Thiago, Ranilson, Riane, Amanda, Angélica, Lara, Mirian, Caio (*in memoriam*) e Kivia, e tantos outros;

Aos amigos da UFRN e UFPB, Yago, Augusto, Geovana, Priscila e Krystyna, e tantos outros, que contribuíram imensamente na minha formação acadêmica;

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram em minhas investidas profissionais, pelo apoio que me fornecem na busca de meus sonhos e na credibilidade em minhas capacidades;

A todos que não foram citados, mas que contribuíram valorosamente na elaboração e execução deste trabalho.

RESUMO

A espécie *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith é uma planta conhecida na etnomedicina para o tratamento de dores, picadas por serpentes, inflamações e infecções. Este trabalho investigou a composição química do óleo essencial das folhas de *A. cearensis*, e sua aplicação medicinal como antioxidante, antimicrobiano, modulador de antibióticos, analgésico e anti-inflamatório. O óleo essencial foi obtido por Hidrodestilação (HD) e Caracterizado por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM) e Detector de Ionização de Chamas (DIC). A atividade antioxidante foi investigada pelos métodos dos radicais ABTS, DPPH, O₂⁻ e OH⁻. A atividade antimicrobiana e moduladora foi realizada pelo teste de microdiluição em microplacas utilizando fungos, e bactérias gram positivas e gram negativas. A toxicidade aguda não clínica do óleo essencial foi determinada pela administração do óleo em quatro doses (5, 50, 300 e 2000 mg/kg/v.o.) em camundongos. O efeito analgésico (antinociceptivo) foi avaliado utilizando três doses do óleo essencial (25, 50 e 100 mg/kg), utilizando os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste de formalina em camundongos, sendo selecionado a dose mais efetiva (100 mg/kg) para avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na anti-nocicepção. O efeito anti-inflamatório agudo foi investigado através dos modelos de edema de pata induzido por carragenina e histamina, peritonite induzida por carragenina e pirexia induzida por leveduras. Vinte e cinco constituintes foram identificados no óleo essencial, estando em maior teor: o germacrone (46,76±0,15%), germacreno B (17,74±0,06%), (E)-cariofileno (5,55±0,04%) e biciclogermacreno (4,13±0,03%). Os ensaios de atividade antioxidante apresentaram valores de Metade da Concentração Inibitória Máxima (IC₅₀) variando de 183,89 a 324,86 µg/mL. Em relação ao efeito antimicrobiano foi identificada uma que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) variou de 64 a 1024 µg/mL. Observou efeito sinérgico do óleo essencial com Fluconazol ou Amoxicilina, sobre fungos e bactérias, respectivamente. No teste de toxicidade aguda, não foi observada alterações de comportamento ou mortalidade dos animais, indicando Dose Letal Mediana (DL₅₀) superior a 2.000 mg/kg. No teste de contorção abdominal o óleo essencial apresentou efeito antinociceptivo estatisticamente igual ao da morfina, reduzindo a nocicepção em 93,87% na dose de 100 mg/kg. No ensaio da formalina, o óleo apresentou efeito nas fases neurogênica e inflamatória, tendo como mecanismos de ação o sistema colinérgico e adenosinérgico, e canais de potássio sensíveis ao ATP (K-ATP). No ensaio de peritonite, foi observado uma redução dos níveis de TNF-α e IL-1β, além da migração de leucócitos nos animais tratados com o óleo essencial, em relação ao controle negativo. O

essencial apresentou efeito antipirético estatisticamente similar à dipirona. Nos modelos de edema de pata induzida por carragenina e histamina, o óleo essencial teve efeito anti-inflamatório com redução do edema de pata, de forma dose-dependente, reduzindo área sob a curva (AUC) em 98,11% e 94,84% na dose de (100 mg/kg) em relação ao grupo veiculo, nos respectivos modelos. Sendo assim, sugere-se que os resultados encontrados corroboram com as propriedades medicinais atribuídas *A. cearensis*, podendo o óleo essencial ser utilizados como agente terapêutico para o tratamento de enfermidades relacionadas ao estresse oxidativo, infecções, inflamações e dor.

Palavras-chave: óleo essencial; antimicrobiano; modulador; inflamação; dor; *Amburana cearensis*; Fabaceae.

ABSTRACT

The species *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith is a plant known in ethnomedicine for the treatment of pain, snakebites, inflammation and infections. This work investigated the chemical composition of the essential oil from the leaves of *A. cearensis*, and its medicinal application as an antioxidant, antimicrobial, antibiotic modulator, analgesic and anti-inflammatory. The essential oil was obtained by Hydrodistillation (HD) and Characterized by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC/MS) and Flame Ionization Detector (FID). Antioxidant activity was investigated by ABTS, DPPH, O₂- and OH- radical methods. The antimicrobial and modulatory activity was performed by microdilution test in microplates using fungi, and gram positive and gram negative bacteria. The non-clinical acute toxicity of the essential oil was determined by administering the oil at four doses (5, 50, 300 and 2000 mg/kg/v.o.) in mice. The analgesic (antinociceptive) effect was evaluated using three doses of the essential oil (25, 50 and 100 mg/kg), using the models of abdominal writhing induced by acetic acid and the formalin test in mice, being selected the most effective dose (100 mg/kg) to evaluate possible mechanisms of action involved in antinociception. The acute anti-inflammatory effect was investigated using models of carrageenan and histamine-induced paw edema, carrageenan-induced peritonitis and yeast-induced pyrexia. Twenty-five constituents were identified in the essential oil, with the highest content being: germacrone (46.76±0.15%), germacrene B (17.74±0.06%), (E)-caryophyllene (5.55 ±0.04%) and bicyclogermacrene (4.13±0.03%). Antioxidant activity assays showed Half Maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀) values ranging from 183.89 to 324.86 µg/mL. Regarding the antimicrobial effect, one that the minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 64 to 1024 µg/mL was identified. It was observed a synergistic effect of the essential oil with Fluconazole or Amoxicillin, on fungi and bacteria, respectively. In the acute toxicity test, no changes in behavior or mortality of the animals were observed, indicating a Median Lethal Dose (LD₅₀) greater than 2,000 mg/kg. In the abdominal writhing test, the essential oil showed an antinociceptive effect statistically equal to that of morphine, reducing nociception by 93.87% at the dose of 100 mg/kg. In the formalin assay, the oil had an effect on the neurogenic and inflammatory phases, having as mechanisms of action the cholinergic and adenosinergic system, and ATP-sensitive potassium channels (K-ATP). In the peritonitis assay, a reduction in the levels of TNF- α and IL-1 β was observed, in addition to the migration of leukocytes in animals treated with the essential oil, in relation to the negative control. The essential oil showed an antipyretic effect statistically similar to dipyrone. In the models of

paw edema induced by carrageenan and histamine, the essential oil had an anti-inflammatory effect with a dose-dependent reduction in paw edema, reducing the area under the curve (AUC) by 98.11% and 94.84% in the dose (100 mg/kg) in relation to the vehicle group, in the respective models. Therefore, it is suggested that the results found corroborate the medicinal properties attributed to *A. cearensis*, and the essential oil can be used as a therapeutic agent for the treatment of diseases related to oxidative stress, infections, inflammation and pain.

Keywords: essential oil; antimicrobial; modulator; inflammation; pain; *Amburana cearensis*; Fabaceae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação do papiro Ebers que revela crenças médico-mágicas e tratamentos benéficos para o tratamento de doenças. 23
- Figura 2** – Registros de Richard Evans Schultes em pesquisas antropológicas e etnobotânicas. Em A é possível verificar uma de suas viagens pela Amazônia para realização dos seus estudos. Em B, observa-se um dos seus livros sobre Etnobotânica..... 24
- Figura 3** – Demonstração dos diversos Biomas encontrados no Brasil e suas riquezas..... 26
- Figura 4** – Linha do tempo que mostra a criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 27
- Figura 5** – Esquema das vias de biossíntese do metabolismo vegetal primário (vermelho) e intermediário (rosa), e suas conexões com detalhe nos produtos finais dos metabólitos primários (verde) e os secundários (azul)..... 30
- Figura 6** – Representação dos efeitos farmacológicos mediados por compostos bioativos em humanos. 31
- Figura 7** – Diferentes constituintes químicos presentes nos óleos essenciais. 33
- Figura 8** – Possíveis mecanismos de atividade antioxidante dos óleos essenciais. (a) Sequestro direto de espécies reativas de oxigênio (ROS); (b) Ativação de enzimas antioxidantes; (c) Ativação da atividade quelante de metal; (d) Aumento dos níveis de radicais α -to α -tocoferil; (e) Inibição das NADPH oxidases; (f) Mitigação do estresse oxidativo causado pelo NO; (g) Aumento dos níveis de ácido úrico; (h) Aumentar as propriedades antioxidantes de antioxidantes de baixo peso molecular..... 38
- Figura 9** – Possíveis modos de ação dos óleos essenciais em bactérias resistentes a antibióticos. 40
- Figura 10** – Mecanismos de percepção da dor pelo cérebro. 43
- Figura 11** – Representação esquemática das principais vias de alterações relacionadas à inflamação. 48

Figura 12 – Mapa do Brasil, com destaque para o Bioma Caatinga.	51
Figura 13 – Imagens de remoção de cascas de espécies de plantas medicinais da Caatinga. A: <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan; B: <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão; C: <i>Maytenus rígida</i> Mart.; D: <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.; E: <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P Queiroz; F: <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C.Sm. ...	54
Figura 14 – Registro da <i>Amburana cearensis</i> (in situ) (A), com destaque em suas diversas partes: cascas (B), sementes (C) e folhas (D).....	56
Figura 15 – Coleta das folhas de <i>A. cearensis</i> (Allemão) A.C. Smith no município de Lagoa Grande – PE.	61
Figura 16 – Esquema explicativo demonstrando o processo de extração do óleo essencial...	62
Figura 17 – Esquema representativo demonstrando a montagem das combinações do óleo essencial com a Amoxicilina pela técnica de Checker board.....	66
Figura 18 – Esquema representativo demonstrando a investigação da toxicidade aguda do óleo essencial.....	67
Figura 19 – Esquema representativo demonstrando a investigação do efeito antinociceptivo do óleo essencial no modelo de nocicepção induzido por formalina (2,5%).	69
Figura 20 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação da via opioide no efeito antinociceptivo do óleo essencial.....	70
Figura 21 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial.	71
Figura 22 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial.....	71
Figura 23 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial.....	72
Figura 24 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação dos canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP) no efeito antinociceptivo do óleo essencial.	73

Artigo 2

- Figura 1** – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*), Morfina (10 mg/kg) e Indometacina (20 mg/kg) nas contorções induzidas por ácido acético intraperitoneal em camundongos. 118
- Figura 2** – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*), Indometacina (20 mg/kg) e Morfina (10 mg/kg) na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fase em formalina- nocicepção induzida (2,5% v/v; i.p.l.). 119
- Figura 3** – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) em receptores opióides na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fases na nocicepção induzida por formalina (2,5% v/v; i.p.l.). 120
- Figura 4** – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) sobre o sistema colinérgico na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fases na nocicepção induzida por formalina (2,5% v/v; i.p.l.). 121
- Figura 5** – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) no sistema adenosinérgico na primeira (0-5 min) e na segunda (15-30 min) fases na nocicepção induzida por formalina (2,5% v/v; i.p.l.). 122
- Figura 6** – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) sobre o sistema dopaminérgico na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fases na nocicepção induzida por formalina (2,5% v/v; i.p.l.). 123
- Figura 7** – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) em canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP) na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fase na nocicepção induzida por formalina (2,5 % v/v; i.p.l.). 124
- Figura 8** – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) e Indometacina (20 mg/kg) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. A) Os resultados expressam a diferença entre o volume da pata (mm) ao longo do tratamento e e (B) as respostas totais de edema, medidas como Área sob a curva (AUC) dos grupos tratados. 125

- Figura 9** – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*) e Prometazina (6 mg/kg) no edema de pata induzido por histamina em camundongos. A) Os resultados expressam a diferença entre o volume da pata (mm) ao longo do tratamento e (B) as respostas totais de edema, medidas como Área sob a curva (AUC) dos grupos tratados..... 126
- Figura 10** – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*) e Indometacina (20 mg/kg) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β na peritonite induzida por carragenina em camundongos. 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de medicamentos que contem óleos essenciais na sua composição.	34
Tabela 2 – Atividade antimicrobiana e efeito modulador de óleos essenciais e compostos isolados.....	41
Tabela 3 – Efeitos antinociceptivos de óleos essenciais e possíveis mecanismo de ação.....	45
Tabela 4 – Óleos essenciais com atividade anti-inflamatória, com ênfase em seus constituintes majoritários e mecanismos de ação.....	49
Tabela 5 – Efeito biológico e modos de preparações de extratos utilizando casca, folhas e sementes de <i>Amburana cearensis</i>	57

Artigo 1:

Table 1 – Composição química do óleo essencial de <i>Amburana cearensis</i> (OE <i>A. cearensis</i>) por CG-EM e CG-DIC, destacando em negrito os componentes majoritários. ..	86
Table 2 – Atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Amburana cearensis</i> (OE <i>A. cearensis</i>) expressa em IC ₅₀ (µg/mL).	87
Table 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) em (µg/mL) do óleo essencial de <i>Amburana cearensis</i> (OE <i>A. cearensis</i>). N.T. - Não testado.	88
Table 4 – Efeitos combinados do óleo essencial de <i>Amburana cearensis</i> (OE <i>A. cearensis</i>), fluconazol e amoxicilina.	89

Artigo 2:

Tabela 1 – Efeito do óleo essencial de <i>Amburana cearensis</i> (EO <i>A. cearensis</i>) em teste de toxicidade aguda.....	116
Tabela 2 – Efeito do óleo essencial de <i>Amburana cearensis</i> (OE <i>A. cearensis</i>) e Indometacina (20 mg/kg) na migração de leucócitos totais e neutrófilos quantificados na lavagem peritoneal de camundongos com peritonite induzida por carragenina.	116
Tabela 3 – Atividade antipirética do óleo essencial de <i>Amburana cearensis</i> (OE <i>A. cearensis</i>) e Dipirona (100 mg/kg) sobre pirexia induzida por levedura de cerveja em diferentes tempos (h).	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
As	Arsênico
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção America de Tipos de Culturas)
ATP	Adenosina Trifosfato
CBM	Concentração Bactericida Mínima
Cd	Cádmio
CG-DIC	Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização de Chamas
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
d.C.	Depois de Cristo
DL ₅₀	Dose Letal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Enzima que hidrolisa o DNA
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio Imunoabsorvente de Ligação Enzimática)
Fe	Ferro
h	Horas
Hg	Mercúrio
i.p.	Via Intraperitoneal
i.pl.	Via Intraplantar
IL	Interleucina
IR	Índice de Retenção
IR	Índice de Retenção
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeos
m/v	Massa dividido por volume
mL	Mililitros
mol	Molar

mRNA	RNA mensageiro
NF-kB	Factor Nuclear Kappa B
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
OE	Óleo essencial
Pb	Chumbo
PGE ₂	Prostaglandina E2
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
QS	Quorum Sensing
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minutos
S	Sul geográfico
spp.	Espécies
TNF	Fator de Necrose Tumoral α
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
UFC	Unidade formadora de colônias
v.o.	Via Oral
v/v	Volume dividido por volume
W	Oeste geográfico
μ L	Microlitro por mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
‘	Minutos
“	Segundos
®	Marca registrada
°	Graus
°C	Graus celsius
α	Sigla do alfabeto grego alfa
β	Sigla do alfabeto grego beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	UTILIZAÇÃO DE PLANTAS COMO MEDICAMENTOS	22
2.2	ETNOBOTÂNICA E FITOTERAPIA	23
2.3	ESTUDOS DE PLANTAS MEDICINAIS, ETNOBOTÂNICA E FITOTERAPIA NO BRASIL.....	25
2.4	METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL	29
2.5	COMPOSTOS BIOATIVOS	31
2.5.1	Óleos essenciais.....	32
2.6	EFEITOS TERAPÊUTICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	36
2.6.1	Efeito Antioxidante	36
2.6.2	Efeitos Antimicrobiano e Modulador.....	39
2.6.3	Efeito Analgésico	42
2.6.4	Efeito Anti-inflamatório	47
2.7	A CAATINGA.....	51
2.8	<i>Amburana cearensis</i>	55
3	OBJETIVOS.....	60
3.1	OBJETIVO GERAL	60
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	61
4.1.1	Extração de óleo essencial	61
4.1.2	Análise química do óleo essencial	62
4.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	63
4.2.1	Ensaio de eliminação de radicais ABTS.....	63
4.2.2	Ensaio de eliminação de radicais DPPH	63
4.2.3	Atividade de eliminação de radical hidroxila (OH-)......	64
4.2.4	Ensaio de eliminação de radical superóxido (O ₂ -).....	64
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E MODULADOR.....	64
4.3.1	Cepas microbianas e condições de cultivo	64
4.3.2	Avaliação do efeito antimicrobiano	65
4.3.3	Avaliação do efeito modulador	65

4.4	MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> E PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	66
4.5	INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DOSE LETAL MEDIANA (DL ₅₀).....	67
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO (ANALGÉSICO).....	68
4.6.1	Contorções abdominais induzidas por ácido acético	68
4.6.2	Teste de formalina.....	68
4.6.2.1	Investigação de mecanismos farmacológicos.....	69
4.6.2.1.1	<i>Participação da via opioide</i>	69
4.6.2.1.2	<i>Participação do sistema colinérgico.....</i>	70
4.6.2.1.3	<i>Participação do sistema adenosinérgico</i>	71
4.6.2.1.4	<i>Participação do sistema dopaminérgico</i>	72
4.6.2.1.5	<i>Participação dos Canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP).....</i>	72
4.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO	73
4.7.1	Edema de pata induzida por carragenina	73
4.7.2	Edema de pata induzida por histamina	73
4.7.3	Peritonite induzida por carragenina	74
4.7.4	Pirexia induzida por levedura.....	74
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	75
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
	ARTIGO 1: Atividades antioxidante, antimicrobiana e moduladora do óleo essencial de folhas de <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Smith do nordeste do Brasil.....	76
	ARTIGO 2: Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Smith. em camundongos	90
6	CONCLUSÕES	128
	REFERENCIAS.....	130
	APÊNDICE A– COMPROVANTE DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	156
	APÊNDICE B– PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA.....	157
	APÊNDICE C – ARTIGO 1 EM INGLÊS	158
	APÊNDICE D – ARTIGO 2 EM INGLÊS	176
	APÊNDICE E –PUBLICAÇÕES DESDOBRADAS DA TESE	214
	APÊNDICE F – PRODUÇÃO OBTIDA DURANTE O DOUTORADO	240

1 INTRODUÇÃO

A natureza vegetal faz parte de um processo agregador de múltiplos conhecimentos e potencialidades, sendo considerada uma matriz para desenvolvimento de bioprodutos que poderá auxiliar na estruturação das sociedades e decisão de grupos, diferentes principalmente para o planejamento de ações em escalas de tempo futuro, ligadas às potencialidades do uso dos recursos naturais. Ao longo da história humana, a descoberta, identificação e estudos de compostos biologicamente ativos de plantas medicinais levaram à descoberta de novos meios terapêuticos que levaram a inovação na saúde (CAMARGO, 2014; ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2015; POPOVIĆ et al., 2016; BORTOLUZZI; SCHMITT; MAZUR, 2020; SILVA; ALMEIDA, 2022).

Nos últimos 50 anos, vários medicamentos foram obtidos a partir de plantas, como por exemplo, o agente contraceptivo diosgenina, que deriva de fito-hormônio de *Dioscorea* spp.; a reserpina um alcalóide anti-hipertensivo produzido originalmente por *Rauwolfia* spp.; o alcalóide pilocarpina empregado no tratamento de glaucoma é obtido de *Pilocarpus* spp.; o antimalárico quina originalmente isolado de cascas de *Cinchona officinalis* L.; além do ácido acetilsalicílico (Aspirina) isolado da planta *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., tradicionalmente utilizado desde 400 a.C. para tratamento de dor e febre (GURIB-FAKIM, 2006; MISRA et al., 2008; RAO; KNAUS, 2008; VAN WYK; WINK, 2017; KHUMALO et al., 2022). De fato, compostos naturais derivados de plantas constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e vêm sendo utilizados em muitas partes do mundo ao longo de décadas, incentivando pesquisas com esta temática (ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI, 2015; ALBERGARIA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019; BORTOLUZZI; SCHMITT; MAZUR, 2020).

Na busca de compostos naturais bioativos com potencial de aplicação no desenvolvimento de novos medicamentos, uma maior ênfase tem sido dada aos óleos essenciais produzidos por plantas, tendo em vista sua facilidade de obtenção, baixo custo de extração e facilidade de caracterização. Além disso, estes possuem em sua composição uma mistura de moléculas com propriedades farmacológicas e medicinais que sobrepõem compostos sintéticos ou semissintéticos, como baixo efeito colateral e toxicidade, alta bioatividade e interação entre os compostos que podem potencializar seus efeitos (ANTONIO; TESSER; PIRES, 2014; VAN VUUREN; MUHLARHI, 2017; CHEESEMAN et al., 2018; CAMPOS; ALBUQUERQUE, 2020; SOBRINHO et al., 2021). Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais podemos destacar atividades

analgésica anti-inflamatória, antioxidante, fungicida, antitumoral, antibacteriana, sedativas, relaxantes, antivirais, antidepressivas, digestivas, diuréticas, inseticidas, expectorantes, anticonvulsivante e gastroprotetora (FERNANDES et al., 2007; BAKKALI et al., 2008; BASSOLÉ et al., 2012; COSTA et al., 2009; ALJAAFARI et al., 2021).

Por apresentar uma posição privilegiada do ponto de vista zoo-botânico, e por possuir a maior parcela da biodiversidade mundial (15-20%) dividido em seis domínios fitogeográficos: Mata Atlântica, Cerrado, Floresta Amazônica, Caatinga, Pampa e Pantanal, o Brasil se torna um seleiro de biomoléculas bioativas pouco exploradas. Esse patrimônio genético possui um alto valor econômico inestimável, principalmente no campo do desenvolvimento de novos medicamentos (CARVALHO et al., 2007; MMA 2017; SILVA et al., 2017).

Várias espécies vegetais não possuem validação científica quanto à eficácia e segurança, o que demonstra o pouco conhecimento sobre a biodiversidade, potencial de aplicação e compostos envolvidos nos efeitos biológicos e medicinais obtidos, sendo necessários estudos que vem a prospecção, validação e conhecimento sobre estes (CARTAXO et al. 2010; JÚNIOR et al., 2011; BITU et al., 2015; DE VERAS et al., 2020).

Dentre as inúmeras espécies vegetais encontradas na biodiversidade brasileira, com ampla aplicação medicinal está a *Amburana cearensis* (sinônimo de *Torresea cearensis* Fr. All), que possui distribuição na América do Sul (Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Peru), com maior ocorrência na Caatinga e Cerrado brasileiro. No semiárido nordestino, é popularmente conhecida como "cumaru", "cumaru de cheiro", "imburana", "imburana de cheiro", "amburana" ou "amburana de cheiro", sendo o último termo o mais utilizado (GOUVEIA et al., 2016).

Na literatura, há vários relatos de utilização de infusões, chás, decocções, banhos, tinturas e inalações utilizando as cascas do caule e da raiz, folhas, frutos e suas sementes para o tratamento de doenças como sinusite, gripe, doenças respiratórias, cólica intestinal, dor de estômago, picada de cobra, infecções do trato urinário, desidratação, diarreia, dor de cabeça e articulações, vertigem, febre e infecções do trato urinário. Embora alguns estudos tenham demonstrado e validado as atividades biológicas, efeitos farmacológicos e medicinais da espécie vegetal, em sua maioria estas análises são realizadas utilizando a casca do tronco e suas sementes (MARINHO, 2004; SILVA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014; BAPTISTEL et al., 2014; BITU et al., 2015; ALBERGARIA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

É inexistente estudos que demonstrem essas potencialidades a partir dos compostos voláteis (óleo essencial) de suas folhas, bem como sua composição química (PEREIRA et al., 2017; MACEDO et al., 2018; VASCONCELOS et al., 2019). Sendo assim, necessários estudos que evidenciem as propriedades pouco conhecidas dos compostos voláteis (óleo essencial) presentes nas folhas desta espécie, uma vez que o extrativismo para fins terapêuticos das folhas tem sido relatado como medicamento alternativo natural.

O presente trabalho investigou a composição química dos compostos voláteis (óleo essencial) das folhas de *A. cearensis*, bem como sua capacidade antioxidante, efeitos antimicrobiano, modulador, anti-inflamatório, analgésico ou possíveis efeitos tóxicos, relatadas na medicina tradicional popular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS COMO MEDICAMENTOS

Desde o início da humanidade, as plantas têm sido utilizadas como um importante recurso para sociedade, como fontes de nutrientes e no tratamento de patologias. Seu uso para o tratamento de enfermidades é datado em 4000 a.C, estando intimamente relacionado a evolução humana. Pode-se afirmar que o hábito de recorrer às plantas devido suas propriedades curativas trata-se de uma das primeiras manifestações de esforço do homem para compreender e utilizar a natureza a seu benefício, com objetivo de sanar uma das mais antigas preocupações na antiguidade, as doenças e as agonias causadas por elas (ELFAND; COWEN, 1990; SÁ-FILHO et al., 2021).

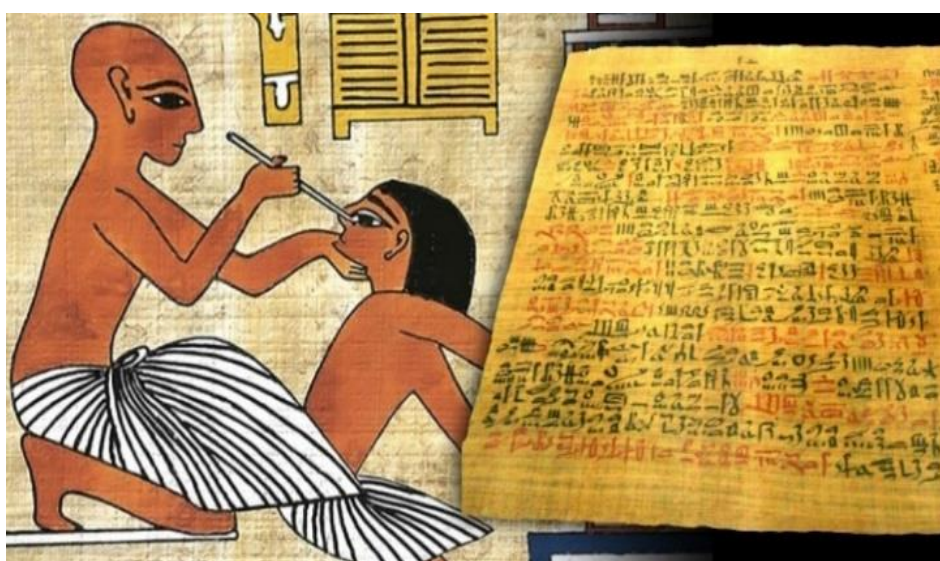
Os experimentos com ervas aos longos dos séculos resultaram em sucessos e fracassos, levando em muitos casos a cura de doenças, e em outros a morte das pessoas. A descoberta das propriedades úteis ou nocivas das plantas ocorreu por meio empírico ao observar o comportamento dos animais após a ingestão destas ervas. Além disso, existe uma associação do conhecimento das plantas com experiências religiosas, tendo em vista que muitas plantas eram e são utilizadas em rituais religiosos, sendo muitas vezes seus poderes curativos atribuídos a poderes divinos (OLIVEIRA et al., 2020; SRIVASTAVA; SINGH, 2020; ALMEIDA, 2022).

Essas valiosas informações foram sendo inicialmente transmitidas oralmente às gerações seguintes por meio da fala, sendo modificada após o surgimento da escrita. O conhecimento adquirido sobre a utilização das plantas para fins medicinais foi documentado de forma sistemática, a fim de facilitar a passagem do conhecimento, com a menor interferência possível. Um dos principais documentos que relatam e evidenciam estas experiências são os antigos papiros Egípcios, dentre eles o papiro de Ebers (Figura 1) que é considerado um dos mais antigos e importantes tratados médicos conhecidos (RAHMAN et al., 2019 SRIVASTAVA; SINGH, 2020).

O manuscrito é datado de aproximadamente 1550 a.C. e apresenta cerca de 100 doenças e descreve um grande número de produtos naturais com aplicações terapêuticas, como a sene (*Cassia angustifolia* Vahl.), timo (*Thymus vulgare* L.), losna (*Artemisia absinthium* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), funcho (*Foeniculum vulgare* Miller), genciana (*Genciana lutea* L.) e zimbro (*Juniperus communis* L.) (SRIVASTAVA; SINGH,

2020). No papiro, ainda é possível encontrar mais de 800 fórmulas mágicas de composições consideradas como remédios populares, incluindo extratos de plantas, metais, como chumbo e cobre, e venenos de animais de várias procedências. Além disso, prescreve o uso terapêutico de óleos vegetais (alho, girassol, açafrão) e o uso de mel ou de cera de abelhas como veículo ou ligamento para os óleos usados, visando à melhoria da absorção do medicamento (ELFAND; COWEN, 1990; SRIVASTAVA; SINGH, 2020; OLIVEIRA et al., 2020).

Figura 1 – Representação do papiro Ebers que revela crenças médico-mágicas e tratamentos benéficos para o tratamento de doenças.



Fonte: <https://mysteriesunsolved.com/pt/2021/08/the-ebers-papyrus-ancient-egypt.html>

Os papiros de Ebers incentivaram ao longo da história a necessidade de descrever e relatar os potenciais curativos ou seus possíveis efeitos tóxicos, como o tratado médico "De Matéria Médica" escrito entre 50-70 D.C. pelo médico grego Dioscórides, que descreveu e enumerou em seu tratado mais de 500 plantas e seus usos, apresentando a obra uma grande importância para a sua época, sendo considerado como o segundo livro mais copiado durante a idade média, o qual foi utilizado como base para o desenvolvimento das farmacopeias modernas (SUROOWAN; PYNEE; MAOMOODLY, 2019; SRIVASTAVA; SINGH, 2020).

2.2 ETNOBOTÂNICA E FITOTERAPIA

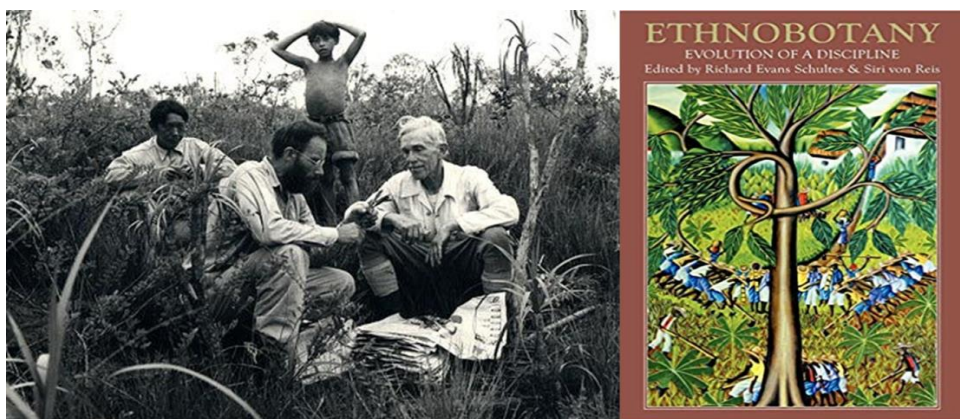
O estudo das plantas e seu potencial econômico de aplicação foi inicialmente mal compreendida pela sociedade moderna, sendo associado a utilização de plantas para fins

terapêuticos como praticas realizadas por aborígenes, comunidades tradicionais, curandeiros, religiosos, dentre outros. No entanto, estudos envolvendo registros de plantas, seus usos e formas terapêuticas (plantas medicinais) por grupos humanos têm servido de base para diversos estudos básicos e aplicados, principalmente na área de fitoquímica e farmacologia, sendo utilizados também como ferramenta para a descoberta de novos fármacos (SCHULTES; REIS, 1995; RAHMAN et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; SILVA; ALMEIDA, 2020).

Com o objetivo de desmistificar a utilização de plantas como algo que muitas vezes era associado ao sobrenatural, em 1962, Richard Evans Schultes (Figura 2), definiu a etnobotânica como “o estudo das relações que existem entre as pessoas da sociedade primitiva e seu ambiente vegetal”, hoje sendo considerado como um campo de estudo multidisciplinar, que envolve áreas como antropologia, arqueologia, botânica, ecologia, economia, medicina, religião e cultura (BRUHN; HOLMSTEDT, 1982; SOEJARTO et al., 2009; SHARMA; KUMAR, 2013; POPOVIĆ et al., 2016), atuando principalmente no resgate, registro e valorização do conhecimento popular (RIBEIRO, 2018; SILVA; ALMEIDA, 2022).

Figura 2 – Registros de Richard Evans Schultes em pesquisas antropológicas e etnobotânicas.

Em A é possível verificar uma de suas viagens pela Amazônia para realização dos seus estudos. Em B, observa-se um dos seus livros sobre Etnobotânica.



Fonte: br.pinterest.com/pin/397161260871381124/

Além disso, a etnobotânica promove uma aproximação do conhecimento empírico, com as pesquisas científicas, estimulando a conservação, uso e manejo da biodiversidade local de forma consistente e sustentável (DAVID; PASA, 2015; SUROOWAN; PYNEE; MAOMOODLY, 2019). A documentação dessas práticas tradicionais facilita o acesso e divulgação de informações, que são a base para descoberta de novas moléculas bioativas,

assim como a perpetuação do conhecimento para as futuras gerações (RIBEIRO, 2018; MAOMOODLY, 2019).

Um dos principais tópicos de pesquisas etnobotânicas, são os métodos e critérios utilizados para a seleção das plantas com propriedades medicinais. Os critérios podem ser influenciados por fatores socioculturais, ambientais, epidemiológicos e cognitivos. Assim, o conhecimento de uma determinada sociedade sobre plantas medicinais reflete condições particulares do local e do tempo, devido à interação e complexidade desses fatores (ALMEIDA et al., 2005; BERLIN; BERLIM, 2005; JOHNSON, 2006; ALBUQUERQUE, 2010; JÚNIOR; LADIO; ALBUQUERQUE, 2011).

Em países subdesenvolvidos, as plantas são utilizadas como única alternativa terapêutica em algumas populações mais vulneráveis (ALJAAFARI et al., 2021), tendo a América Latina grande destaque nas pesquisas etnobotânicas (ALBUQUERQUE et al., 2013). Como principais descobertas, tem-se a investigação de substâncias vegetais com potencial farmacêutico e industrial, que podem promover a preservação de espécies e seus ecossistemas, além de programas para a conservação de recursos naturais e conhecimentos tradicionais (ALBUQUERQUE, 2005; JUNIOR et al., 2021).

2.3 ESTUDOS DE PLANTAS MEDICINAIS, ETNOBOTÂNICA E FITOTERAPIA NO BRASIL

Nas últimas décadas, a utilização de vegetais pela população vem se intensificando, principalmente em regiões onde o acesso ao cuidado de saúde formal é limitado ou escasso. A seleção de plantas para o tratamento das enfermidades depende dos sintomas, da disponibilidade de espécies na região, de aspectos culturais e educacionais (AMOROZO, 2002; OLIVEIRA et al., 2007).

No Brasil, a grande miscigenação de raças e culturas, permitiu o acúmulo de conhecimento dos povos indígenas locais, africanos e europeus. Muitas vezes, ocorre uma atribuição aos povos indígenas a origem de grande parte do conhecimento fitoterápico (ROCHA; MARISCO, 2016), entretanto, é evidente a participação de crenças e religiões na formação do conhecimento, como as contribuições das religiões de matriz africana, que utilizam plantas (casca, folhas e raízes) durante seus rituais (PIRES et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2018) mesmo sem conhecimento científico por trás dos mecanismos de ação da planta utilizada. Todo este “saber popular” permitiu identificar, por exemplo, quais plantas, ou suas

partes podem ser mais eficazes no tratamento de enfermidades, e quais suas doses terapêuticas (NAJEM; IBIJBIJEN; NASSIRI, 2021).

Dentre os diversos países do mundo, o Brasil tem posição privilegiada do ponto de vista zoo-botânico, por possuir a maior parcela da biodiversidade mundial (15-20%), dividido em seis domínios fitogeográficos: Mata Atlântica, Cerrado, Floresta Amazônica, Caatinga, Pampa e Pantanal (Figura 3). Se tratando de um país de proporções continentais, existe grande interesse econômico pelos recursos naturais. Mesmo com cerca de 55 mil espécies descritas, grande porcentagem da biodiversidade brasileira permanece ainda inexplorada, existindo uma escassez de conhecimento, apresentando um vasto campo para pesquisas de bioprospecção de compostos bioativos, bem como sua base para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (CARVALHO et al., 2007; MMA 2017; SILVA et al., 2017).

Figura 3 – Demonstração dos diversos Biomas encontrados no Brasil e suas riquezas.



Fonte: <https://fundacaoverde.org.br/proteger-biomas-e-defender-a-vida-e-o-tema-da-campanha-da-fraternidade-2017/>

As plantas por ser uma fonte excepcional de produtos naturais bioativos, são cruciais para o desenvolvimento de diversos fármacos comercializados no mundo inteiro, devido a sua elevada diversidade molecular, sendo maior que os compostos derivados dos processos de síntese química. A complexidade e variedade desses metabólitos são resultados da carga genética, e influencias física, química, biológica e ambiental (SHER, 2009; SILVA et al., 2017; NAJEM; IBIJBIJEN; NASSIRI, 2021).

Neste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a importância das plantas medicinais como recursos terapêuticos. Há um crescente incentivo no resgate do

conhecimento das plantas tradicionalmente utilizadas por comunidades ou populações tradicionais que fazem a utilização dos recursos vegetais para o tratamento de enfermidades, conhecimentos estes que podem e são utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos, como os fitoterápicos (RICARDO; GOULART; BRANDÃO, 2015; LEITE; CAMARGOS; CASTILHO, 2021).

No Brasil, políticas públicas elaboradas a partir da criação do Sistema Único de Saúde (SUS), permitiram a associação entre as práticas da medicina tradicional e medicina alternativa (CASTRO; FIGUEIREDO, 2019). Em 2006, o Ministério da Saúde (MS) criou o programa de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia (PNPMF), incluindo a fitoterapia como um serviço prestado no SUS. Avanços importantes foram dados em 2008, como a criação da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO), e no ano seguinte com a criação da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS) (Figura 4) (BRASIL, 2006; CAMPOS; ALBUQUERQUE, 2020; SOBRINHO et al., 2021).

Os programas visavam estabelecer diretrizes de segurança e eficácia de produtos naturais, e aliados a isso, implementar o desenvolvimento socioeconômico e conservação ambiental (BRUNING et al., 2012; ARAUJO et al., 2018). Em 2010, ocorreu a expansão do projeto “Farmácias Vivas”, criado na Universidade Federal do Ceará (UFC) a mais de 30 anos. A expansão permitiu a institucionalização dos serviços relacionados ao cultivo, processamento, manuseio e dispensação de fitoterápicos, considerando o acesso limitado da população nordestina aos serviços de saúde (MISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Figura 4 – Linha do tempo que mostra a criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.



Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2016.

Mediante o crescente aumento de problemas associados aos medicamentos alopáticos, houve nas últimas décadas um movimento de expansão em investigações de atividades e potenciais de aplicações terapêuticas de compostos bioativos proveniente de plantas, visando sua utilização em novos medicamentos. Dentre os principais motivadores e norteadores das investigações, estão os altos custo de produção e venda dos medicamentos industrializados; inúmeros efeitos colaterais muitas vezes tóxicos, que em muitos casos sobrepõe sua eficácia farmacológica; ou perda de eficácia (VAN VUUREN; MUHLARHI, 2017; CHEESEMAM et al., 2018),

Com a área da fitoterapia ganhando destaque, houve aumento das atividades de pesquisa na área de descoberta, isolamento, implementação e estudos da eficácia de medicamentos fitoterápicos (POPOVIĆ et al., 2016). Com isso, o projeto “Farmácia Viva” tornou-se referência para todo o país, visando a ampliação da oferta de fitoterápicos e plantas medicinais (ONG et al., 2007; RAO; KNAUS, 2008; SÁ-FILHO et al., 2021). Durante o projeto, foram constatadas substituições de medicamentos sintéticos por fitoterápicos, a exemplo do Salbutamol (tosse e bronquite) pelo xarope de *Mikania glomerata*, Diazepam por *Melissa officinalis* (hipnótico e sedativo); entre outros. Em 2018, o projeto passou a produzir alimentos funcionais para prevenção e cura de quadros clínicos acompanhados por nutricionistas, incluindo diabetes, hipercolesterolemia, hiperlipemia e obesidade. Também em 2018, um repelente fitoterápico composto por óleos essenciais foi desenvolvido e distribuído entre as gestantes para a prevenção contra dengue, Zika e Chikungunya (ANTONIO; TESSER; PIRES, 2014; LEITE; CAMARGOS; CASTILHO, 2021).

Os estudos consideravam o uso sustentável de recursos naturais, os efeitos de misturas de produtos naturais em doenças específicas, sua segurança e a ligação entre usos alimentares e medicinais (HEINRICH; CASSELMAN, 2018; YEUNG et al., 2018; YEUNG et al., 2020). No entanto, a maioria das investigações concentrava-se na Amazônia brasileira e Cerrado (JUNIOR et al., 2022).

As áreas de Mata Atlântica e Caatinga eram pouco estudadas antes dos anos 2000, e dentre os domínios fitogeográficos, a Caatinga é um dos domínios mais ameaçados do país. Enquanto a Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal foram reconhecidos como “Patrimônio Nacional” pela Constituição Federal de 1988, a Caatinga perdeu metade de sua cobertura vegetal original (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; SANTOS et al. 2011; MORO et al. 2015; ANTONGIOVANNI et al. 2018; TEIXEIRA et al., 2020) e com esta perda, uma ampla potencialidade foi perdida.

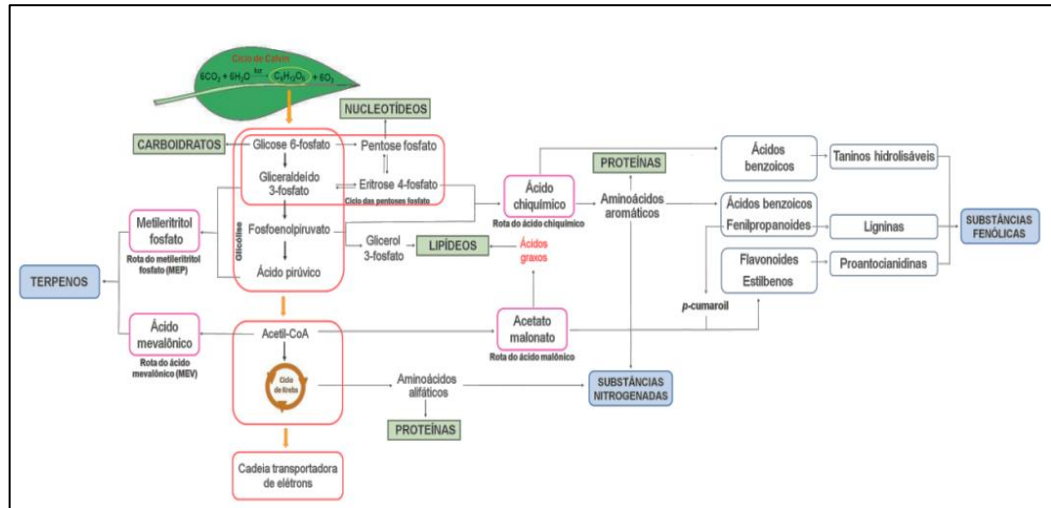
2.4 METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL

Pequenas moléculas orgânicas ou metabolitos são compostos produzidos pelos organismos que tem como principal função a manutenção de funções vitais, sendo estes metabolitos classificados como primários e secundários. Os metabólitos primários são moléculas como aminoácidos, açúcares, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que participam de vias metabólicas básicas como fotossíntese ou biossínteses (SIMÕES et al., 2017). O metabolismo primário está envolvido na produção de compostos semelhantes para animais, humanos, microrganismos e plantas, ou seja, têm propósitos biológicos compartilhados em todas as espécies. No entanto, sob certas condições de estresse, o metabolismo primário serve de precursor para o metabolismo secundário sintetizar e acumular diferentes tipos de pequenas moléculas orgânicas (BHATTACHARYA, 2019; LOU; PICHERSKY; LAST, 2022).

A partir do metabolismo primário, as vias da glicólise e o Ciclo do Ácido Tricarboxílico (ciclo TCA) conectam o metabolismo dos carboidratos, gorduras e das proteínas, que produzem substâncias para o crescimento e desenvolvimento da planta (MAHAJANA; KUIRYA; PAL, 2020). Partindo dessas vias-chave, os metabólitos primários são modificados por oxidações, reduções e introdução de grupos funcionais (como carboxila, aldeído, hidroxila e grupos SH), gerando os metabólitos secundários. Esses compostos podem ser classificados em três grupos principais: fenólicos, terpenos e compostos contendo nitrogênio (WINK, 2016; RIESEBERG et al., 2020).

Os terpenóides são derivados do difosfato de isopentenila, sintetizado pela via mevalônica e da 1-desoxixilulose. A acetil-CoA é o precursor universal dos terpenóides, e atuam na produção de flavonoides, estilbenos, ácidos graxos, ceras, policetídeos (DAVIES et al., 2018; YADAV et al., 2021). No caso dos compostos fenólicos, a formação ocorre pela via do ácido chiquímico, a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Os metabólitos nitrogenados têm os aminoácidos lisina, arginina, ornitina, fenilalanina, tirosina e triptofano como precursores, derivados da via do ácido tricarboxílico ou da via do ácido chiquímico (Figura 5) (ZAYNAB et al., 2018).

Figura 5 – Esquema das vias de biossíntese do metabolismo vegetal primário (vermelho) e intermediário (rosa), e suas conexões com detalhe nos produtos finais dos metabólitos primários (verde) e os secundários (azul).



Fonte: Moreira, 2015.

A biossíntese, concentração e transporte desses compostos dependem fortemente das condições do habitat, pois as plantas evoluíram coletivamente para produzir essas substâncias em resposta às adversidades bióticas e abióticas do ambiente (BALLHORN et al., 2011; MAHAJANA; KUIRYA; PAL, 2020). Dentre as funções dos metabólitos secundários estão a atração de polinizadores, proteção contra herbivoria e fitopatógenos (SWABHA; TAKSHAK; AGRAWAL, 2019), atuando também na comunicação com outras plantas e microrganismos benéficos (LOU; PICHERSKY; LAST, 2022).

Devido à variedade de funções, alterações na fisiologia metabólica da planta não podem ser associadas a um fator de estresse específico. E neste contexto, as plantas apresentam sistemas específicos de reconhecimento e sinalização com várias interconexões (THOMMA et al., 1998; KUSNIERCZYK et al., 2007). Por isso, os metabólitos secundários por muitas vezes são taxonomicamente restritos, com cada indivíduo produzindo um pequeno subconjunto do número total de tais compostos (PICHERSKY; LAST, 2022). Os metabólitos secundários desempenham um papel fundamental nas plantas, tendo em vista que as plantas precisaram adaptar-se ao longo de sua evolução, influenciando na sua diversidade química, e os metabólitos secundários deram a capacidade das plantas a se adaptarem e adquirirem resistência nos mais diversos *habitats* (THOMAS; LACHER, 2020).

Cada metabólito secundário representa um composto biologicamente ativo único que pode interferir em alvos moleculares em herbívoros, micróbios e até mesmo em outras plantas

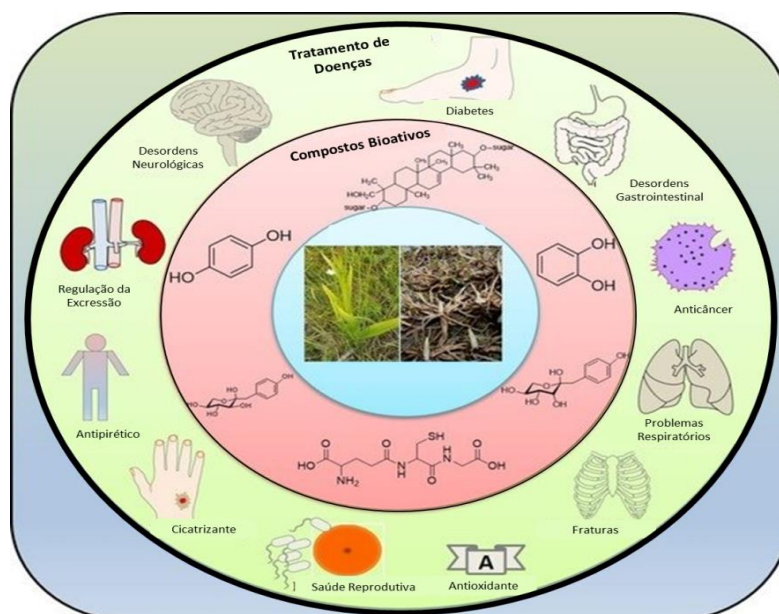
(WINK, 2016). Com isso, as plantas servem com verdadeiras fábricas para a biossíntese de metabólitos secundários com atividades biológicas, que podem melhorar a saúde humana. Esses compostos bioativos são a base de medicamentos comerciais e fitoterápicos, alguns alcalóides, terpenóides e fenilpropanóides são alvos de pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias (SANCHITA; SHARMA, 2018).

2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os metabólitos secundários que provocam efeitos farmacológicos ou toxicológicos no homem e nos animais são definidos como compostos bioativos (ZAYNAB et al., 2018). Estes, podem atuar ativamente contra doenças com altos efeitos terapêuticos, com menor toxicidade e efeitos colaterais (Figura 6) (HUYSSTEEN, 2007; KUMAR et al., 2021).

Mais de 100.000 metabólitos são conhecidos por estarem envolvidos no sistema de defesa da planta e que possuem propriedades farmacológicas. Os diferentes compostos são tipicamente sintetizados, acumulados e distribuídos em órgãos (raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes), tecidos e em estágios de desenvolvimento específicos (PICHERSKY; LAST, 2022). As raízes, caules e folhas são os principais órgãos responsáveis pelo acúmulo de compostos bioativos com valor medicinal (SWABHA; TAKSHAK; AGRAWAL, 2019).

Figura 6 – Representação dos efeitos farmacológicos mediados por compostos bioativos em humanos.



Fonte: Adaptado de Wani et al., 2020.

Com mais de 80.000 moléculas conhecidas, os terpenos são a maior classe química, estrutural e funcional de produtos químicos em plantas. São amplamente utilizados em indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e agrícola (PICHERSKY; RAGUSO, 2018; ZHOU; ERAN; PICHERSKY, 2020). Nos vegetais, estas moléculas fornecem proteção às plantas contra estresses térmicos e oxidativos, além de exercer diferentes papéis em sua manutenção (MAHAJANA; KUIRYA; PAL, 2020).

Os fenólicos são outra categoria importante de metabólitos secundários, produzidos em resposta a estresses abióticos. São representados pelos ácidos fenólicos, lignina, cumarinas, estilbenos, lignanas, flavonóides e taninos. Possuem diferentes propriedades biológicas e farmacológicas, como anti-inflamatórias, anticancerígenas, antimicrobianas, antialérgicas, antivirais, antitrombóticas e antimutagênicas (GUPTA et al., 2014; KUMAR; GOEL, 2019; GOMEZ-CASATI; BUSI, 2020; KUMAR et al., 2021).

Os taxóis os demais metabólitos secundários nitrogenados, possuem propriedades farmacológicas muito específicas e variadas (MAHAJANA; KUIRYA; PAL, 2020). Os alcaloides, por exemplo, estão presentes em algumas plantas, mas podem ser tóxicos para os humanos e animais. No entanto, alguns alcaloides isolados ou seus derivados são amplamente utilizados em diversos medicamentos com atividades anticolinérgicas, inibidores da acetilcolinesterase, em estimulantes adrenérgicos, além de possuírem efeito vasoconstritor e analgésico (SANTOS, 2020).

Chen et al. (2011), explicam que o princípio ativo que proporciona a ação farmacológica atribuída as plantas são resultado da mistura dessas substâncias. Nos óleos essenciais, existem grandes concentrações de terpenos, terpenóides, fenilpropanóides, aldeídos, ésteres, álcoois e cetonas, onde a bioatividade varia dependendo em a estrutural configuração de a molécula (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; TOHIDI; RAHIMMALEK; TRINDADE, 2019; SILVA et al., 2021).

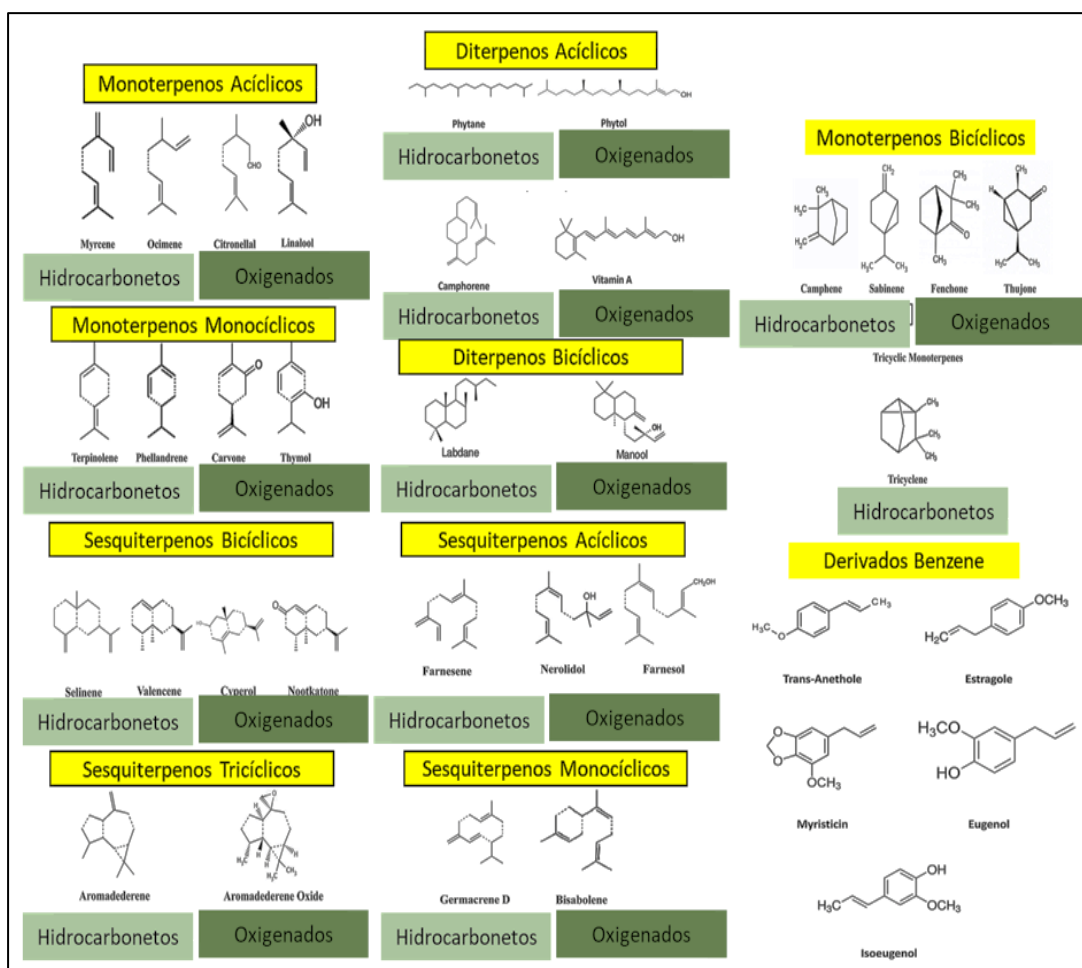
2.5.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são definidos como misturas complexas de baixo peso molecular, tendo como principais características serem lipossolúveis, apresentarem alta volatilidade, coloração amarelada ou incolor (raramente coloridos) e por serem insolúveis em água, podendo ser sintetizados por todos os órgãos vegetativos das plantas (flores, raízes, caules, folhas, frutos e sementes) e armazenados em estruturas anatômicas especializadas. Estes compostos exercem diferentes funções nas plantas, sendo uma das principais à atração de

polinizadores. No entanto, além dessa, existem outras funções ecológicas, como a inibição da germinação, a proteção contra predadores e a proteção contra a perda de água e o aumento de temperatura (SIMÕES et al., 2017; SANA et al., 2021).

São constituídos quimicamente de terpenos (cerca de 90%), incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, sintetizados a partir do ácido mevalônico e de fenilpropanoides, originados do ácido chiquímico. Estes compostos podem incluir aldeídos (citrал, citronelal, cinamaldeído, benzaldeído, vanilina), álcoois (geraniol, citronelol, mentol, linalol, terpineol, borneol), ésteres (benzoatos, acetatos, salicilatos, cinamatos), cetonas (cânfora, carvona, mentona, pulegona, tujona), óxidos (cineol), éteres de fenol (anetol, safrol), fenóis (eugenol, timol, carvacrol), hidrocarbonetos (cimeno, mirceno, sabineno, estoreno), terpenos (limoneno, fleandreno, pineno, canfeno, cedeno) e ácidos (benzóico, cinâmico, mirístico, isovalérico), ver figura 7 (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; SIMÕES et al., 2017; MORSY, 2017).

Figura 7 – Diferentes constituintes químicos presentes nos óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de Morsy, 2017.

As moléculas destas misturas complexas podem apresentar atividade individualmente ou em associações, que pode culminar na soma dos efeitos individuais, classificados, então, como efeito aditivo (NYCHAS, 1995; BURT, 2004; DELGADO et al., 2004; PEI et al., 2009; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

As diferentes interações dos compostos que compõem os óleos essenciais provavelmente é uma estratégia adaptativa de defesa das plantas (reprodução, inibição de predação por herbívoros, atração de polinizadores, dentre outros). A planta pode utilizar várias combinações de compostos químicos com uma maior eficiência e em concentrações mais baixas, ou através do acúmulo de um composto defensivo em altas concentrações. Efeitos sinérgicos podem surgir pela conversão de compostos inativos em ativos após sua interação com um determinado alvo, por uma maior disponibilidade de alvos, por transporte facilitado, etc. (NELSON.; KURSAR, 1999; RYABUSHKINA, 2005).

Diante da extensa aplicação na culinária, perfumaria e cosméticas, seu uso na medicina tradicional é de grande importância para a saúde humana (RÍOS, 2016; FERRAZ et al., 2022). Muitas vezes, os óleos essenciais servem como alternativa complementar ou direta no tratamento de diversas enfermidades, não restringindo o uso apenas para a promoção de bem-estar mental, físico e emocional (BAKKALI et al., 2008; GIACOMETTI et al., 2018; SOUZA et al., 2020), sendo frequente encontrarmos na composição de alguns medicamentos (Tabela 1).

Tabela 1 – Exemplos de medicamentos que contem óleos essenciais na sua composição.

Medicamento	Indicação Terapêutica	Óleo Essencial	Forma Farmacêutica	Referencias
Vaporil®	Antisséptico e descongestionante nasal	Tomilho	Solução para inalação ou vaporização	MEDIKAMIO, 2022
Strepsils Menta fresca	Infeções da boca e garganta	Eucalipto	Pastilhas	MEDIKAMIO, 2022
Grintuss® Adulto	Tosse seca e inflamações respiratórias	Eucalipto, Anis e Limão	Xarope	GRINTTUS, 2022

Bucagel®	Analgésico e anti-inflamatório local da cavidade bucal e nasal	Anis	Gel oral	MEDIKAMIO, 2022
Diclospray®	Alívio da dor aguda e inchaço	Hortelã-pimenta	Solução para pulverização cutânea	MEDIKAMIO, 2022
Kompensan®	Azia, empachamento e flatulência	Hortelã-pimenta	Pastilhas	MEDIKAMIO, 2022
Acheflan®	Inflamações e dor local	<i>Cordia verbenácea</i>	Creme tópico	FERNANDES et al., 2007

Um dos métodos mais conhecidos para obtenção destes compostos em laboratório é a técnica de hidrodestilação acoplada ao sistema Clevenger modificado, que consiste em colocar o material vegetal em contato com água fervente, do qual, entrará em ebulição e possibilitará o arraste dos compostos voláteis (óleo essencial) (SADEH et al., 2019). Em escala comercial, a destilação a vapor e a extração por solventes são mais comuns, no entanto, o uso de solventes pode limitar o uso do óleo essencial devido as altas quantidades de solventes necessárias e à toxicidade do solvente orgânico utilizado no processo (PAVLIĆ et al., 2015). Algumas técnicas alternativas também são aplicadas como micro-ondas, extração assistida por ultra-som e hidrodestilação ôhmica (BAMPOULI et al., 2014; MEGAWATI et al., 2019; SILVA et al., 2021).

As análises fitoquímicas dos óleos essenciais visam obter a caracterização e identificação dos seus principais componentes (VENDITTI, 2020). Para isto, são empregadas algumas técnicas de elucidação estrutural de compostos orgânicos, como a Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia de Ultravioleta (UV), que geralmente estão acopladas a Cromatografia Líquida Clássica (CLC) com sílica gel, Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM) e a Cromatografia em Camada delgada (CCD). Todas estas técnicas empregadas servem para traçar o perfil químico de óleos essenciais, auxiliando na descoberta de novos compostos bioativos, possibilitando novos potenciais de

aplicações de interesses econômicos no uso de compostos naturais (BANDEIRA et al., 2002; QUEIROZ; HOSTETTMANN, 2006; SULEIMAN, 2015).

Em 2020, o mercado global de óleos essenciais estava avaliado em 18,6 bilhões de dólares, com previsão de crescimento de 7,4% para os próximos anos, sendo em partes, impulsionado pelas indústrias alimentícias e cosméticas, que veem os óleos essenciais como fortes candidatos para aplicações em seus processos, em detrimento às moléculas convencionais obtidas na síntese ou semi-síntese química, que além do custo elevado, podem apresentar efeitos danosos ao organismo ou ambiente (FERRAZ et al., 2022; NONATO et al., 2022).

2.6 EFEITOS TERAPÊUTICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

2.6.1 Efeito Antioxidante

A molécula do oxigênio é um dos principais limitantes para a manutenção da vida devido ao seu potencial redox. Esta capacidade permite que ela funcione como um agente oxidante recebendo elétrons de substratos reduzidos, como por exemplo, na geração energética da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (DAIBER et al., 2021; FERRAZ et al., 2021; COOK-MILLS et al., 2011). Entretanto, as moléculas de oxigênio podem servir de base para produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que são moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem, podendo causar diversos danos a níveis celular, progredindo a níveis teciduais e sistêmicos (BARTEKOVÁ et al., 2021).

Em níveis basais, as EROs atuam como mediadores celulares, induzindo respostas imunes, diferenciação e divisão celular e apoptose. Entretanto, seu excesso desencadeia uma série de eventos que podem levar, por exemplo, ativação das células da glia, desdobramento/compactação de proteínas, disfunção mitocondrial e apoptose, além de oxidação de moléculas de DNA, RNA, lipídios e proteínas, levando a danos celulares e ao desenvolvimento de doenças, como: as doenças cardiovasculares, neurológicas, distúrbios, câncer, entre outros (BARTEKOVÁ et al., 2021; DAIBER et al., 2021).

Dentre os diversos ROS formados a partir do oxigênio estão o Radical Hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), e Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), dentre outros, que podem ser tóxicos para as células em formas de radicais livres (por exemplo, H_2O_2 , O_2 e O_3). Apesar destes

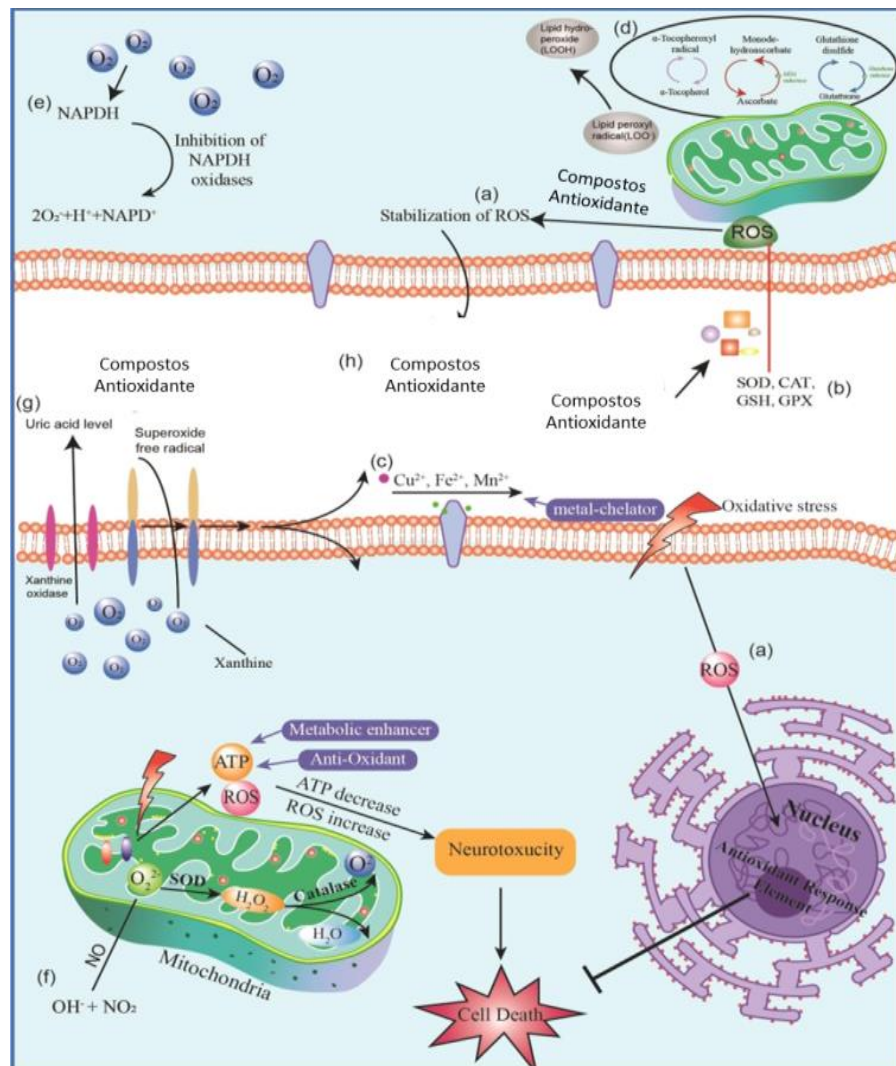
radicais livres causarem efeitos danosos nos organismos, eles desempenham papéis críticos nas vias de sinalização de eventos, como: desenvolvimento da memória, plasticidade sináptica, interações célula-célula, crescimento e proliferação celular, autofagia, mecanismos apoptóticos, dentre outros (TOUYZ et al., 2020; SHEN, 2022).

Estes EROs podem ser formados por vias endógenas ou exógenas. As endógenas são produzidas como subprodutos em organelas celulares, como os peroxissomos e mitocôndrias, e também da atividade em citocromo P-450. Enquanto que as fontes exógenas incluem fumaça de cigarro, álcool e metais pesados (Cd, Hg, Pb, Fe, As) no ar e na água, algumas drogas químicas (bleomicina, gentamicina, ciclosporina), radiação e assim por diante (ARANTES et al., 2019; DAIBER et al., 2021; SHEN, 2022).

Desta forma, a demanda por compostos que tem capacidade antioxidante, tem sido crescente nas últimas décadas, sendo obtidos e utilizados compostos como o Hidroxitolueno Butilado (BHT), que possuem a capacidade de neutralizar os efeitos nocivos dos EROs no organismo. No entanto, apresentam efeitos nocivos à saúde, podendo ser tóxicos ou cancerígenos (KSOUDA et al., 2018). Os óleos essenciais vêm sendo explorados com vista na sua aplicação como agentes antioxidantes naturais, substituindo os sintéticos, devido à sua natureza química complexa, que possui inúmeros constituintes químicos que podem, isoladamente ou em combinação, ter o efeito de neutralizar os radicais livres (Figura 8) (ARANTES et al., 2019).

Estudos vem sendo realizados neste sentido demonstrando a efetividade e o potencial destes óleos no combate dos malefícios do estresse oxidativo. A exemplo do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) que em vesículas fosfolipídicas (glicerossomos e lipossomas) possuem a capacidade de neutralizar o estresse oxidativo, propiciando o reparo de feridas em cultura de células como em queratinócitos (MANCONI et al. 2018). O óleo essencial de Hera-de-canteiro (*Glechoma hederacea* L.) possui a capacidade de suprimir respostas inflamatórias que incluem a produção de Óxido Nítrico (NO), que podem culminar em danos no DNA (CHOU et al., 2019). O óleo essencial de cominho (*Cuminum cyminum* L.) em dispositivos transdermal apresentou uma alta atividade antioxidante e hepatoprotetora sistêmica de forma eficiente e prolongada, podendo ser protetor eficaz no tratamento de várias doenças crônicas através de uma única aplicação (MOSTAFA et al., 2018).

Figura 8 – Possíveis mecanismos de atividade antioxidante dos óleos essenciais. (a) Sequestro direto de espécies reativas de oxigênio (ROS); (b) Ativação de enzimas antioxidantes; (c) Ativação da atividade quelante de metal; (d) Aumento dos níveis de radicais α -to α -tocoferil; (e) Inibição das NADPH oxidases; (f) Mitigação do estresse oxidativo causado pelo NO; (g) Aumento dos níveis de ácido úrico; (h) Aumentar as propriedades antioxidantes de antioxidantes de baixo peso molecular.



Fonte: Adaptado de Shen, 2022.

De fato, diversos estudos demonstram que os óleos essenciais apresentam um enorme potencial como potenciais antioxidantes naturais, com baixo custo e alta efetividade, no controle dos malefícios oxidativos, podendo espécies vegetais nunca anteriormente estudadas apresentar em sua composição, moléculas com alta capacidade antioxidante (SILVA, 2015).

2.6.2 Efeitos Antimicrobiano e Modulador

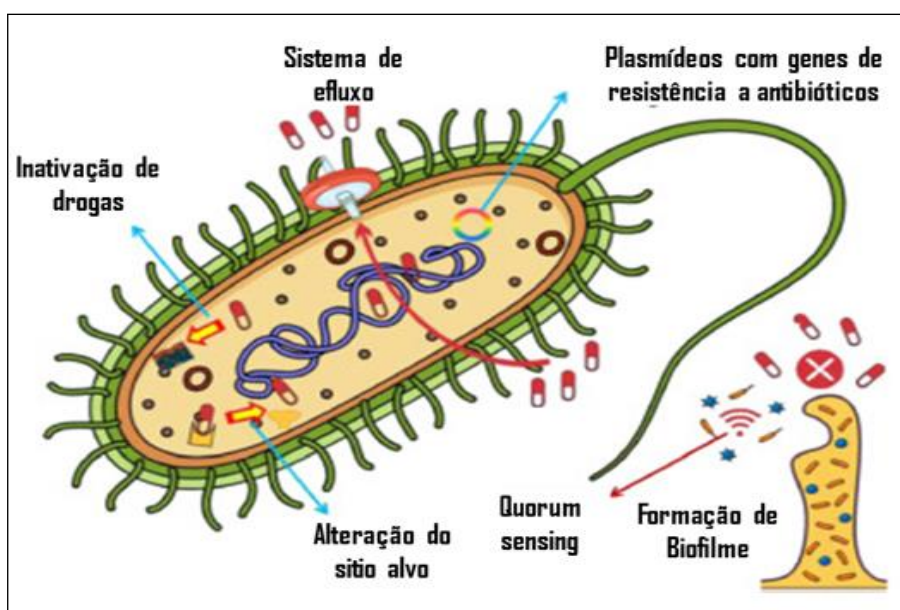
Os óleos essenciais vêm sendo considerados como fontes de novos antimicrobianos por apresentar inúmeros constituintes fitoquímicos que podem apresentar atividade isoladamente ou combinados. Além disso, estes compostos quando combinados com antibióticos já utilizados na prática clínica, podem reverter os mecanismos de resistência bacteriana tornando possível o efeito terapêutico desejado (EZE, 2016; RAI et al., 2017; TARIQ et al., 2019).

Devido sua composição química complexa, os óleos essenciais e seus constituintes apresentam baixo risco ao desenvolvimento de resistência microbiana, visto que, sua ação não é atribuída apenas a um único composto específico, mas pode estar relacionada ao sinergismo entre eles, conferindo assim diferentes mecanismos de inativação das células dificultando as adaptações microbianas (BECERRIL; NERÍN; GÓMEZ-LUS, 2012).

Seus modos de ação e constituintes nas bactérias podem variar de acordo com as interações que estes podem realizar com as estruturas celulares destes microrganismos, podendo envolver: ruptura das membranas celulares (levando ao vazamento do conteúdo celular); redução do potencial de membrana via aumento da permeabilidade das membranas; redução de ATP intracelular via diminuição da síntese de ATP e hidrólise aumentada; inibição de bombas de efluxo; supressão de desenvolvimento de biofilme bacteriano; além da inibição de alguns fatores de virulência que incluem enzimas e toxinas (Figura 9) (MAHIZAN et al., 2019).

O não surgimento de fenótipos adaptativos resistentes aos óleos essenciais e terpenos e/ou outros constituintes químicos destes óleos tem sido observado em alguns estudos, como por exemplo, o de Luz et al. (2012) que observaram a não aquisição de resistência por *Salmonella enteritidis* exposta ao óleo essencial obtido de *Origanum vulgare* e um dos seus constituintes químicos (carvacrol). Nostro et al. (2017) observaram o efeito da exposição por dez dias sob *S. aureus* com concentrações inibitórias sub-mínimas de carvacrol, cinamaldeído e eugenol isoladamente, e combinados com antibióticos eritromicina, linezolida, mupirocina, netilmicina, norfloxacin, cefazolina e rifampicina. Observando cepas bacterianas os autores perceberam que estas não possuíam a capacidade de adaptação e resistências aos compostos carvacrol, cinamaldeído e eugenol (Tabela 2).

Figura 9 – Possíveis modos de ação dos óleos essenciais em bactérias resistentes a antibióticos.



Fonte: Adaptado de Ruddaraju et al. 2019.

Ademais, a combinação destes compostos com antibióticos atenua a capacidade de *Staphylococcus aureus* de adquirir resistência aos antimicrobianos, inibindo o surgimento de fenótipos adaptativos. Song et al. (2019) também observaram resultados similares sob cepas de *S. aureus* expostas ao óleo essencial de Cinnamon, não observando fenótipos adaptativos pela exposição habitual deste óleo.

Além de apresentar atividade antibacteriana isoladamente e serem ausentes do surgimento de fenótipos adaptativos resistentes, os óleos essenciais são considerados seguros toxicologicamente, por apresentarem pouca ou nenhuma toxicidade quando administrados *in vivo*. Dahham et al. (2016) avaliaram a toxicidade aguda e crônica do óleo essencial, com atividade antitumoral obtido de *Aquilaria crassna* em ratos machos e fêmeas, não havendo mortalidade relacionada ao tratamento da toxicidade aguda e crônica pela administração diária da dose de 2.000 mg/kg durante o tratamento de 14 dias. Além disso, não foram observados sintomas como apatia, hiperatividade, tontura, vômito, diarreia, salivagem excessiva, sendo considerado, portanto, o óleo como seguro até a concentração de 2.000 mg/ kg de animal.

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana e efeito modulador de óleos essenciais e compostos isolados.

Fonte de Obtenção/ Compostos Isolados	Antibióticos	Microrganismos	Modo de Ação	Referência
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	–	<i>S. aureus</i> resistente a tetraciclina	Inibição de crescimento e bomba de efluxo	ZANG et al., 2015
<i>Thymus vulgaris</i>	–	<i>S. aureus</i> resistente a ciprofloxacino	Inibição de crescimento e bomba de efluxo	SALEHZADEH et al., 2018
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Norfloxacino	<i>S. aureus</i> resistente a norfloxacino	Inibição de bomba de efluxo	DE MORAIS et al., 2018
<i>Croton grewoides</i>	Norfloxacino Tetraciclina	<i>S. aureus</i> resistente a norfloxacino <i>S. aureus</i> resistente a tetraciclina	Inibição de bomba de efluxo	DE MEDEIROS et al., 2017
Farnesol Nerolidol Plaunotol	–	<i>S. aureus</i> MDR	Danos as membranas, redução no influxo de íons intracelular	INOUE et al., 2004
α -Pineno β -Pinene Limonene	–	<i>S. aureus</i> resistente a metaciclina (MRSA)	Não determinado	YANG et al., 2014

Apesar de existirem informações sobre as potenciais aplicações dos óleos essenciais e constituintes isoladamente ou em associação com antibióticos já utilizados na prática clínica para combater microrganismos multirresistentes, inúmeros óleos essenciais e seus constituintes químicos não foram investigados quanto ao seu potencial de aplicação no combate as bactérias multidrogas resistentes, potencial de combinação com antibióticos já existentes, seus mecanismos de ação, e os efeitos da suas exposições sobre o surgimento de fenótipos adaptativos resistentes. Estas informações são importantes e podem ser obtidas através de estudos, que possam resultar além da elucidação, na descoberta de novos antibacterianos (CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019; TYERS; WRIGHT, 2019; MAHIZAN et al., 2019; VYAS et al., 2019; TARIQ et al., 2019; SONG et al. 2019; JANG et al., 2020).

2.6.3 Efeito Analgésico

O termo “dor” é apropriado para seres humanos, devido a sua forma de apresentação, envolvendo não só o componente sensorial nociceptivo, mas também um componente emocional. É definido como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada o potencial dano tecidual, sendo uma experiência multidimensional, com vários fatores envolvidos. Esta sensação normalmente acompanha a maioria das doenças que acometem os seres humanos, indicando ao organismo a presença de estímulos danosos, com base em experiências prévias (SALIBA; HUBER; PENTER, 2011; AYDEDE et al., 2018; KUNNUMPURATH et al., 2018). A nociceção é o principal componente fisiológico da dor, e consiste em várias etapas que compreende os processos de transdução, transmissão e modulação do estímulo nociceptivo. Uma vez instalado o estímulo nociceptivo, diversas alterações neuroendócrinas acontecem, promovendo hiperexcitabilidade do sistema nervoso periférico e central (SAWYNOK et al., 1995; SCHNAKERS et al., 2012; BARAL et al., 2019).

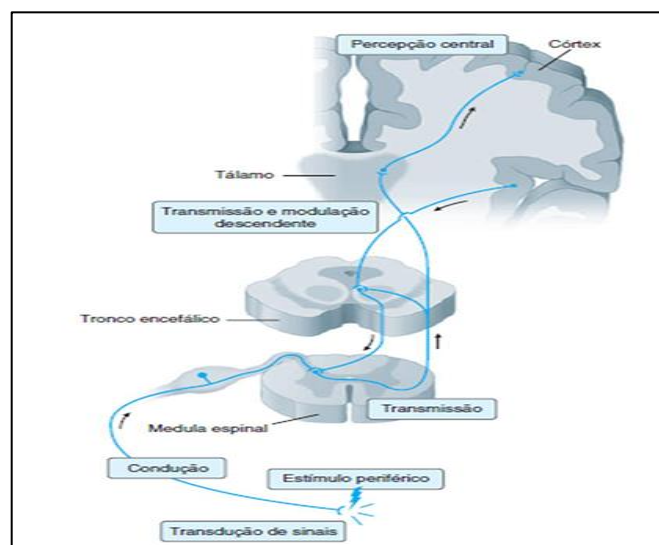
A dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é produzida após um estímulo nocivo que desencadeia na ativação de nociceptores presentes no local lesionado sendo, geralmente, limitada à área afetada. Enquanto que a dor crônica é definida como aquela que persiste por um longo prazo, até que haja a cura da lesão, sendo também descrita, como aquela associada a processos patológicos crônicos, que causam dor contínua ou recorrente em intervalos de anos ou meses. De modo geral, o que diferencia ambas, além do lapso temporal, é a incapacidade do sistema nervoso em restabelecer a atividade neuronal para

os níveis homeostáticos normais (GRICHNIK; FERRANTE, 1991; GOLD; GEBHART, 2010; PINHO-RIBEIRO et al., 2017).

Após um evento de estimulação da dor ocorre a transdução deste sinal, que se dar pela liberação de neurotransmissores e neuromoduladores, como: histaminas, Peptídeo Relacionado ao Gene Calcitonina (CGRP), bradicininas, glutamato, serotoninas, prostaglandinas, substância P, Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-18 (IL-18) que são liberadas pelas células lesadas. Estas substâncias irão estimular uma excitação elétrica dos neurônios a partir de um potencial de ação. Posteriormente, irá ocorrer a propagação destes estímulos pelas fibras nervosas até o sistema nervoso central, para que ele responda adequadamente a injúria, sendo as fibras A β , A δ e C as responsáveis pelo processo de transmissão dos estímulos (GOLD; GEBHART, 2010; RHUDY et al., 2011; AICH et al., 2015; GOUIN et al., 2017).

Na sequência ocorre a percepção, que nada mais é do que é uma interpretação dos estímulos mandados pelas células afetadas, onde o cérebro traduz os sinais enviados e emite uma resposta. Por fim, há uma modulação dos estímulos, sendo possível amenizar a percepção dolorosa através da liberação de opioides endógenos (encefalinas, endorfinas), serotonina (5HT) e norepinefrina pela medula espinhal, no entanto, estes mediadores só possuem efeitos se os estímulos forem de pequeno porte. No caso de injúrias de grandes magnitudes é indicada a administração de produtos exógenos que diminua a sensação de dor (Figura 10) (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; GOUIN et al., 2017; SHIELDS et al., 2018).

Figura 10 – Mecanismos de percepção da dor pelo cérebro.



Fonte: Golan, 2014.

Alguns estudos demonstram o papel dos óleos essenciais para o tratamento em diversas doenças que possuem a dor como um dos principais agravantes, incluindo fibromialgia, osteoartrite e artrite reumatoide (MYUNG-JÁ et al., 2005; RUTLEDGE; JONES, 2007; DEMIRBAĞ; ERCI, 2012).

Vários estudos tem demonstrado o potencial de aplicação dos óleos essenciais, como o estudo realizado por Najaphi et al. (2013), do qual conduziram um estudo clínico com crianças submetidas a colonoscopia, sendo investigado o efeito analgésico do óleo essencial de *Mentha spicata* L. Neste estudo, os autores observaram que o óleo essencial reduziu significativamente a intensidade da dor abdominal durante o procedimento de colonoscopia em comparação com o grupo placebo, sendo portanto considerado como agente analgésico alternativo natural na colonoscopia de crianças. Olapour et al. (2013), verificaram em estudos clínicos que a inalação do óleo essencial de lavandula (*Lavandula Angustifolia* L.) promoveu alívio da dor pós cesariana. Em outro estudo, realizado por Marzouk et al. (2015), utilizando este mesmo óleo, os autores demonstraram que este em associação com o terpeno Timol, promoveram efeito cicatrizante em feridas de episiotomia com pouco ou nenhum efeito colateral esperado em comparação com o uso de placebo, com redução da sensação da dor. Por outro lado, Abbasijahromi et al. (2019) analisaram os efeitos dos óleos essenciais de rosa damascena e lavandula na aromoterapia por inalação em mulheres que passaram por cesariana, onde observaram uma melhora na sensação da dor em ambos os tratamentos com os óleos, evidenciando que o de rosa damascena apresentou efeito superior ao de lavanda. Possivelmente, este efeito esteja associado aos diferentes constituintes químicos que estes óleos apresentam. De fato, o efeito analgésico dos óleos essenciais pode estar relacionado a diversos fatores, incluindo a via de administração, compostos presentes em sua composição, dentre outros.

Com base nos efeitos analgésicos que os óleos essenciais vêm apresentando, diversos estudos vêm sendo realizados em modelos animais experimentais, buscando possíveis agentes terapêuticos, com boa eficácia, não toxicidade, e diversos mecanismos de ação (Tabela 3) (BAKKALI et al., 2008; CAMPÊLO et al., 2011; DAHHAM et al., 2016; DE VERAS et al., 2020; ALJAAFARI et al., 2021).

Tabela 3 – Efeitos antinociceptivos de óleos essenciais e possíveis mecanismo de ação.

Espécies	Modelo Experimental	Compostos Majoritários	Modo de Ação	Referência
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Camundongos (Placa Quente)	Eugenol e Mirceno	Sistema opioide	VENÂNCIO et al., 2011
<i>Hyptis pectinata</i> L.	Ratos (Contorção abdominal e formalina)	β -cariofileno e Óxido de cariofileno	Sistema colinérgico	RAYMUNDO, et al., 2010
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	Camundongos (Contorção abdominal e formalina)	Geraniol e Citroanelal	Ação periférica	LEITE et al., 2010
<i>Senecio rufinervis</i> D.C	Camundongos (Contorção abdominal)	Germacreno D e β -pineno	Ação no sistema nervoso central	MISHRA et al., 2010
<i>Vanillosmopsis arborea</i> Baker	Camundongos (formalina)	α -bisabolol	Sistema colinérgico	LEITE et al., 2011
<i>Croton adamantinus</i> Müll. Arg.	Camundongos (Contorção abdominal e formalina)	Metil-eugenol e 1,8-cineol	Ação no sistema nervoso central	XIMENES et al., 2011
<i>Hymenaea cangaceira</i> Pinto, Mansano & Azevedo	Camundongos (Contorção abdominal e formalina)	β -cariofileno, α -humuleno, α -guaieno e germacrene D	Sistema opioide	DE VERAS et al., 2020
<i>Artemisia dracunculus</i> linn.	Camundongos (Contorção abdominal e formalina)	Z-ligustilida e Z-3butilideneftalida	-	JUÁREZ-REYES et al., 2011
<i>Citrus limon</i> L.	Camundongos	limoneno	Sistema	CAMPÊLO et

	(Contorção abdominal e formalina)		opioide	al., 2011
<i>Valeriana wallichii</i> L.	Camundongos (Contorção abdominal)	patchoulol	Ação periférica	SAH et al., 2010

Embora haja um vasto conhecimento sobre os mecanismos que causam a dor, pouco se evoluiu em estratégias terapêuticas eficazes. Os medicamentos hoje utilizados na prática clínica são principalmente limitados ao controle dos sintomas, sendo os mesmos há décadas. Entre os disponíveis para o tratamento da dor estão os Anti-inflamatórios Não Esteroides (AINEs), opioides, antidepressivos e antiepilépticos, que embora sejam eficazes para a maior parte das condições dolorosas, apresentam efeitos adversos como: dermatites, distúrbios gastrointestinais e endócrinos, danos neurológicos, hepáticos, renais, cardiovascular, oftálmico, psiquiátrico e respiratório, e em alguns casos, dependência química, o que vem tornando o tratamento clínico limitado (HEFTI et al., 2006; BERGER; WHISTLER, 2010; CARTER et al., 2014).

Dessa forma, observa-se a necessidade de buscar outras medidas para o desenvolvimento de medicamentos no combate à dor. O conhecimento popular das propriedades terapêuticas das plantas com propriedades analgésicas, há séculos, é transmitido de geração em geração e constitui forte indicador do potencial terapêutico de várias espécies, servindo como instrumento para criação de novos fármacos. Nessa perspectiva, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica (VENÂNCIO et al., 2011; CAMARGO et al., 2014; KHUMALO et al., 2022; LOU et al., 2022).

Embora haja vários estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaios clínicos que comprovem a eficiência dos óleos essenciais e seus princípios ativos utilizados como remédios para o tratamento da dor, com níveis de segurança e mecanismos estabelecidos, estudos futuros são necessários para desvendar fontes vegetais nunca anteriormente inexploradas com efeitos analgésicos, pois podem apresentar compostos ainda mais promissores (BITU et al., 2015; FERNANDES et al., 2007; FONSECA et al., 2017; DE VERAS et al., 2020; FERNANDES et al., 2020).

2.6.4 Efeito Anti-inflamatório

Os distúrbios crônicos são considerados a principal causa de morte em todo o mundo, sendo 60% dessas mortes devido a doenças inflamatórias crônicas (PAHWA et al., 2018; 2005; FULLERTON; GILROY, 2016). A inflamação é um processo fisiológico de defesa protetora do sistema imunológico do corpo contra lesões nos tecidos, patógenos ou substâncias estranhas indesejadas, além de certas patologias (MEDZHITOV et al., 2010; RIBALDONE et al., 2018). Envolvem interações complexas de mediadores solúveis, células residentes, como células infiltrantes e moléculas pertencentes à matriz extracelular, podendo este processo ser segregado em dois estágios: o agudo e o crônico (FULLERTON; GILROY, 2016; CHEN et al., 2018).

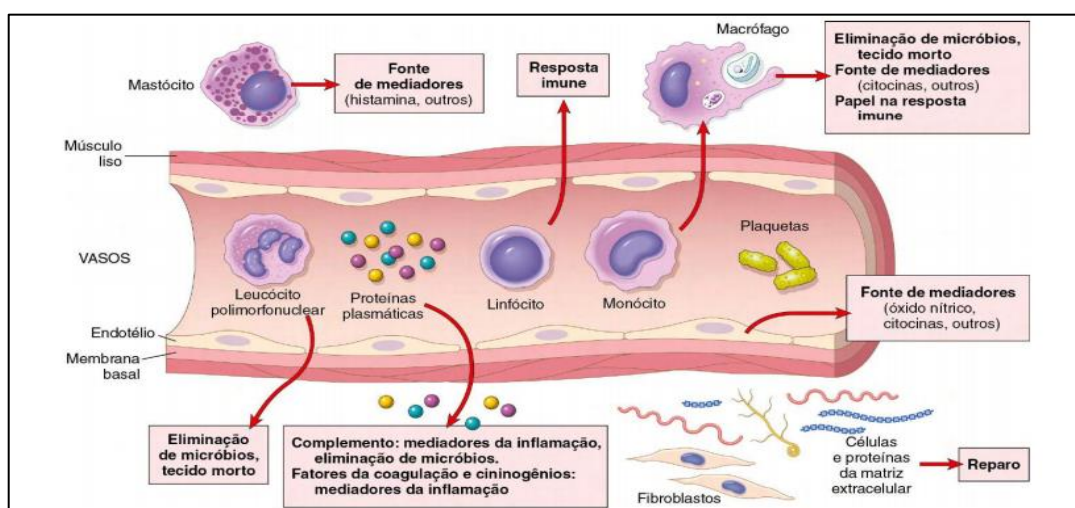
Durante a fase aguda da inflamação, ocorrem alterações na microvasculatura, infiltração de neutrófilos, seguida por monócitos e diferenciação em macrófagos, e finalmente os fibroblastos que se proliferam podendo restabelecer a estrutura do tecido lesado, durando este evento um curto período de tempo, que é capaz de erradicar o estímulo inicial. O processo crônico está associado a um evento de longa duração, sendo intenso e presente linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (CHEN et al., 2018; RIBALDONE et al., 2018).

Normalmente, as respostas inflamatórias são caracterizadas por uma sequência de eventos complexos, mas altamente coordenadas, envolvendo alterações moleculares, celulares e fisiológicas, iniciando com mediadores solúveis (quimiocinas, sistema complemento, citocinas, aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, radicais livres e mediadores lipídicos), células residentes, como macrófagos teciduais, Células Dendríticas (DCs), linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos, nos tecidos infectados ou lesionados (Figura 11) (MEDZHITOV et al., 2010; PAHWA et al., 2018).

Além disso, as moléculas de adesão celular são reguladas positivamente em leucócitos circulantes e células endoteliais, promovendo a exsudação de proteínas e influxo de granulócitos do sangue. Associado a isto, os monócitos, quando ativados iniciam várias cascatas e vias de sinalização pró-inflamatórias, que culminam na regulação de fatores como Fator Regulador de Interferon 1 (IRF-1) e Fator Nuclear kappa B (NF- κ B). Esses fatores induzirão a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas (IL), incluindo IL-1, IL-1 β , IL-6. Esses mediadores inflamatórios estão envolvidos na patogênese de várias doenças incluindo doença de Alzheimer (DA), Artrite Reumatoide (AR), Colite Ulcerativa (CU), doenças cardiovasculares, infecções

bacterianas, depressão, obesidade, diabetes tipo 2, Doença de Parkinson (DP), síndrome nefrótica, câncer e diabetes (PAHWA et al., 2018; RIBALDONE et al., 2018).

Figura 11 – Representação esquemática das principais vias de alterações relacionadas à inflamação.



Fonte: Robbins, 2013.

Várias abordagens terapêuticas foram desenvolvidas para o tratamento de patologias relacionadas as inflamações, terapias estas que incluem os Anti-Inflamatórios Não Esteroides (AINEs), glicocorticóides, agentes modificadores da doença e biológicos. Entretanto, sua utilização a longo prazo é frequentemente acompanhada de efeitos colaterais prejudiciais e tóxicos (WALLACE et al., 2008; NEMMANI et al., 2009; GULYAS et al., 2018), sendo necessário medicamentos ou compostos anti-inflamatórios eficazes que possam superar os efeitos colaterais debilitantes dos medicamentos atualmente disponíveis (BYUN et al., 2018; ZHU et al., 2018).

Estima-se que cerca de 80% dos povos de países em desenvolvimento dependem das drogas de origem natural para o tratamento de doenças como as inflamatórias, sendo relatado um grande número de compostos de origem vegetal como os OEs para o tratamento destas enfermidades, demonstrando o potencial de aplicação destas misturas (WALLACE et al., 2008; ZHU et al., 2018; PAHWA et al., 2018). Estudos com óleos essenciais com potencial anti-inflamatório desempenha um papel fundamental para a identificação de compostos fitoquímicos e sua análise farmacológica que pode levar a descoberta de compostos bioativos promissores. Na literatura, vários são os relatos de óleos essenciais ou compostos isolados a

partir deles, que demonstram seu papel na supressão da inflamação, *in vitro* ou *in vivo* (LI et al., 2011; PERINI et al., 2015; SALDANHA et al., 2019).

O óleo essencial da *Houttuynia cordata* possui efeito anti-inflamatório, com inibição da síntese de PGE₂ induzida por LPS de macrófagos peritoneais de camundongos, além de causar uma inibição de COX-2 de maneira dose-dependente, sem comprometer a produção de COX-1 (LI et al., 2011). O terpeno α -Cyperone isolado do óleo essencial de rizomas de *Cyperus rotundus* não apresentou efeitos tóxicos para células normais, e possui efeito anti-inflamatório com supressão da produção de PGE₂ induzida por LPS. Este, regula a expressão de COX-2 a níveis de proteína e mRNA, reduz a expressão da citocina IL-6 e inibiu a ativação de NF- κ B em cultura de células (JUNG et al., 2013). O composto siringato de metila isolado do óleo essencial de *Betula alba* mostrou supressão significativa da proteína COX-2 induzida por hipóxia, bem como a invasão e secreção do fator de crescimento endotelial vascular pela via TRPA1 (Jermnak et al., 2013). Makabe et al., (2006) relataram que o composto germacrone isolado de *Curcuma zedoaria* apresenta atividade anti-inflamatória *in vivo*, no modelo de inflamação induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) nas orelhas de camundongos. O sesquiterpeno bicíclico (E)-cariofileno é um dos principais constituintes do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, e possui efeito anti-inflamatório, sendo já explorado na fitomedicina conhecido como o medicamento tópico Acheflan® utilizado para tratar traumas, tendinopatias e dores miofasciais (FERNANDES et al., 2007; GISELLE et al., 2007; PERINI et al., 2015). Saldanha et al. (2018) descobriram que o óleo essencial de *Duquetia furfuracea* tem efeito anti-inflamatório *in vivo*, apresentando dose-dependência em modelo animal edema de pata. Este efeito se dá pela inibição da produção do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Recrutamento de Leucócitos Polimorfonucleares (PMN) e Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS). Além destes estudos, diversos outros vem demonstrando o potencial anti-inflamatório de espécies até então nunca anteriormente investigadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Óleos essenciais com atividade anti-inflamatória, com ênfase em seus constituintes majoritários e mecanismos de ação.

Espécies	Compostos Responsáveis	Mecanismos de Ação	Referência
<i>Glechoma hederacea</i>	Trans-3-pinanone	Redução do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias	CHOU et al., 2018

<i>Citrus medica</i> L.	Limonene	Supressão das vias NF- κ B, JNK e ERK.	KIM et al., 2013
<i>Verbesina macrophylla</i> (Cass.) S.F. Blake	Germacrene D, Germacrene D-4-ol, Bicyclogermacrene, (E)-Caryophyllene	Redução de citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β	De Veras et al., 2021
<i>Nigella damascena</i> L.	Damascenine e β -Elemene	Inibiu a liberação de IL-1 β e IL-8, redução da produção de MMP-9	SIENIAWSKA et al., 2019
<i>Copaifera cearensis</i> Huber ex Ducke	β -Cariofileno e Acido Caurenóico	Inibição da produção de NO e reduz TNF- α e IL-1 β e IL-6	VEIGA JUNIOR et al. 2007
<i>Vanillosmopsis arborea</i> (Gardner) Baker	Bisabolol, α -Cadinol, Elemicin, β -Bisabolene, Guaiene, Cubebene e Estragole	-	SANTOS et al. 2015
<i>Psidium guineense</i> Sw	Spathulenol	Atividade de eliminação de EROS	NASCIMENTO et al. 2018
<i>Artemisia princeps</i> Pamp.	Eucaliptol e α -Terpineol	Inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), COX-2, iNOS, e a ativação de NF- κ B e aumento de IL-10.	TRINH et al., 2011
<i>Cinnamomum camphora</i> L.	Borneol, β -Cariofileno, Camphor e Limoneno	Redução de citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β	XIAO et al., 2021
<i>Artemisia argyi</i>	Borneol	Reduziu significativamente a produção de mediadores inflamatórios induzidos por LPS (TNF- α , IL-6,	CHEN et al., 2017

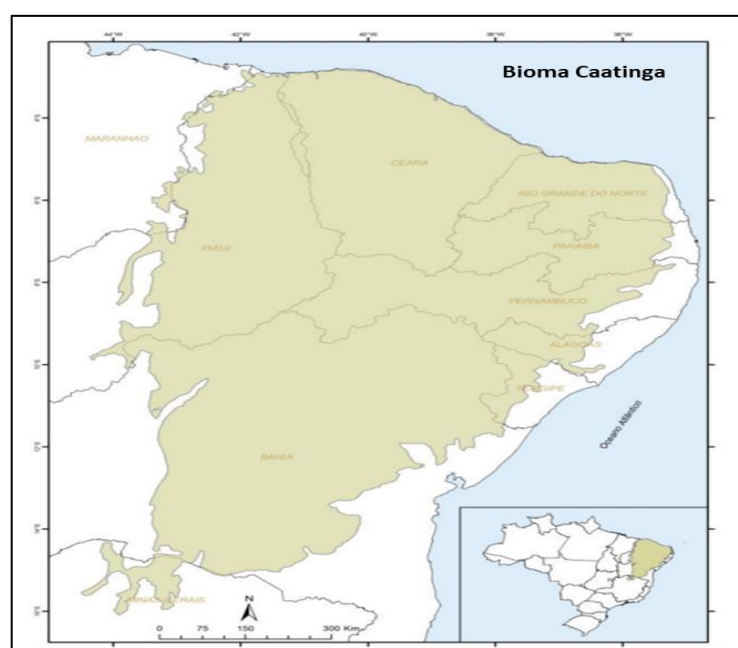
		IFN- β e MCP-1)	
<i>Conyza bonariensis</i> L.	Limoneno e β -Myrcene	Inibição da produção de NO	SOUZA et al. 2003

De fato, a inflamação tornou-se um dos principais problemas da sociedade atual devido ao aumento da poluição ambiental, aumento no número emergente de doenças infecciosas e exposição a produtos químicos perigosos. A invenção de terapias seguras e eficientes para combater a inflamação é de extrema importância, sendo os óleos essenciais, uma das fontes mais promissoras. Entretanto, estudos são necessários para descobrir novos compostos anti-inflamatórios, para que em um futuro próximo, estes possam ser utilizados na prática clínica médica.

2.7 A CAATINGA

A Caatinga é um domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro, com 900 mil Km² de área, representando 60% da região Nordeste e 11% do território do Brasil que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (Figura 12) (CORREIA et al., 2019).

Figura 12 – Mapa do Brasil, com destaque para o Bioma Caatinga.



Fonte: Adaptado de Giongo, 2011.

É uma região composta por florestas, matas tropicais sazonalmente secas, matas de galeria, áreas úmidas, florestas tropicais úmidas, savanas e campos rupestres. Essa heterogeneidade ambiental da Caatinga é consequência da interação de fatores geomorfológicos, pedológicos e climáticos (ANDRADE-LIMA, 1981; QUEIROZ et al., 2018; THOMAS; LACHER, 2020).

O Bioma possui a vegetação mais heterogênea dentre os biomas encontrados no Brasil, tendo como principal característica o potencial hídrico reduzido no solo, que se acentua em períodos de estação seca, que pode perdurar de sete a dez meses. Além disso, sua flora nativa apresenta então caracteres morfológicos, anatômicos e funcionais especializados para a sobrevivência destas plantas às condições adversas de clima e solo (SAMPAIO et al., 2002).

A negligência sofrida pelo domínio fitogeográfico provém da caracterização equivocada de um ambiente com pouca diversidade e endemismo. O impacto foi direto nas políticas de conservação, já que apenas aproximadamente 7% da Caatinga é coberta por áreas protegidas, e 1% do seu território é protegido por unidades de conservação (FONSECA et al., 2017, SILVA et al., 2017; CORREIA et al., 2019). A Bahia, Piauí e Ceará são os estados que mais possuem áreas protegidas, sendo o Piauí o único estado com mais de 10% de área protegida. O Rio Grande do Norte, Sergipe, Paraíba e Alagoas possuem menos de 1% do território destinado a conservação (OLIVEIRA; SILVA; MOURA, 2019).

Associados ao baixo nível de proteção, a Caatinga é uma região altamente impactada pela atividade humana. Práticas ligadas a agropecuárias e extrativismo, como queimadas, desmatamento, pastagem, crescimento populacional e introdução de espécies exóticas ameaçam cada vez mais este domínio (MELO, 2017, SILVA; BARBOSA, 2017; ANTONGIOVANNI et al., 2018). Mudanças climáticas também estão levando a um aumento da temperatura e mudanças na frequência e intensidade das secas. Como consequência, já é observando aceleração no processo de desertificação (MAKSIC et al., 2022). As implicações ecológicas e conservacionistas serão devastadoras, no qual o domínio poderá sofrer perda geral da biodiversidade (MARENGO et al., 2017; SILVA Et al., 2019; CORREIA et al., 2019).

Diversas espécies de animais e plantas endêmicas apenas recentemente foram descritas para a região (LEITE; CAMARGOS; CASTILHO, 2021). Em levantamento florístico realizado por Fernandes, Cardoso & Queiroz (2020), foram identificados pelo menos 3.347 espécies, 962 gêneros e 153 famílias de plantas com flores. Ervas, subarbustos e trepadeiras herbáceas representam 56,3% da diversidade de espécies, enquanto árvores, arbustos e trepadeiras lenhosas representaram 43,7%. Os autores constataram que em comparação com

outras regiões neotropicais, a Caatinga continha a maior diversidade em relação espécie/área. Estudos de Cardoso et al. (2017) identificaram a existências de $2,5 \times 10^{-3}$ espécies/km² na Amazônia, enquanto Fernandes, Cardoso & Queiroz (2020) constataram $4,0 \times 10^{-3}$ espécies/km² na Caatinga, ou seja, superior ao bioma Amazonia.

Além de apresentar uma vasta dimensão territorial, a Caatinga apresenta grande variedade de plantas utilizadas na medicina popular pelas comunidades tradicionais (ALVES et al., 2019), constituindo-se como importante fonte de novos compostos bioativos para o tratamento de doenças (MALAFAIA et al., 2017; SILVA; ALMEIDA, 2020) sendo considerado o segundo domínio com mais estudos etnobotânicos no Brasil, contribuindo para que o Nordeste seja a região com o maior número de pesquisas no ramo (SGANZERLA et al., 2021).

A conservação não é importante apenas do ponto de vista ecológico, mas também sócio-econômico. É fundamental que pesquisas futuras identifiquem as principais ameaças a essas espécies por meio de estudos etnobotânicos e percepções ambientais (SILVA et al., 2017; CAMPOS et al., 2018, SILVA et al., 2020; CAMPOS; ALBUQUERQUE, 2020). Cerca de 10 espécies vegetais encontradas na caatinga possuem a maior necessidade de conservação, sendo elas: *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos (pau d'arco roxo), *Anacardium occidentale* L. (caju), *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira), *Libidibia ferrea* (jucá), *Hymenaea courbaril* L. (jatobá), *Anadenanthera colubrina* (angico), *Bowdichia virgilioides* Kunth (sucupira), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha), e *Amburana cearensis* (Allemão) AC Sm. (umburana) (Figura 13) (CAMPOS; ALBUQUERQUE, 2020).

Estudos realizados em comunidades do Nordeste contribuíram para o conhecimento e desenvolvimento de conceitos sobre plantas, ajudando na preservação da cultura local e obtenção de informações sobre o potencial medicinal e fitoquímico das espécies utilizadas (ALBUQUERQUE; ANDRADE 2002; SANTOS et al., 2018), sendo por isso necessário pesquisa com levantamento de dados fitoquímicos e farmacológicos (CARTAXO et al., 2010; SONAGLIO et al., 2010; SÁ-FILHO et al., 2021).

Figura 13 – Imagens de remoção de cascas de espécies de plantas medicinais da Caatinga. **A:** *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan; **B:** *Myracrodruon urundeuva* Allemão; **C:** *Maytenus rígida* Mart.; **D:** *Schinopsis brasiliensis* Engl.; **E:** *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz; **F:** *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm.



Fonte: Campos e Albuquerque, 2020.

2.8 *Amburana cearensis*

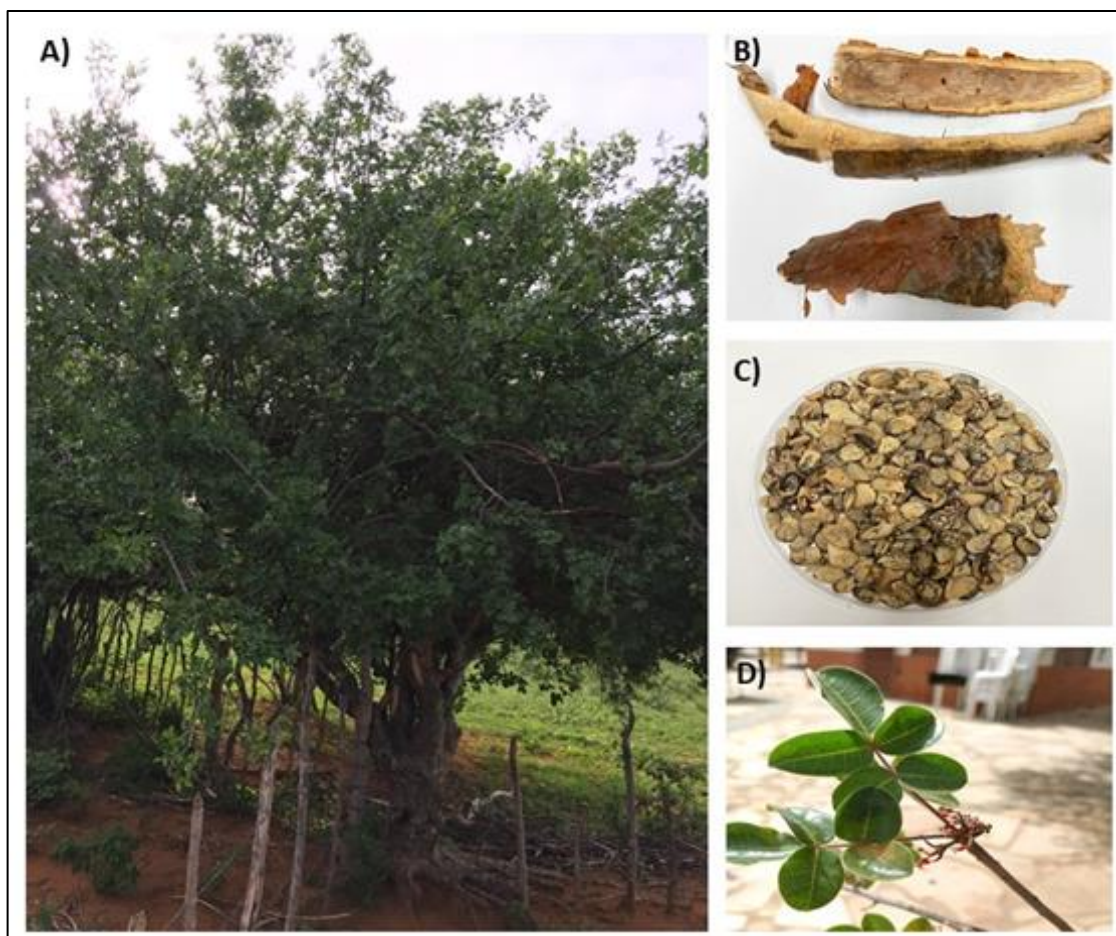
O gênero *Amburana* é um dos mais importantes da família Fabaceae, e atualmente possui três representantes (*Amburana acreana*, *Amburana erythrosperm* e *Amburana cearensis*), sendo a *A. acreana* (Ducke) A.C. Smith a que possui ocorrência nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil, com ocorrência no domínio fitogeográfico Amazônico. A *A. erythrosperma* Seleme C.H. Stirt. & Mansano é endêmica no sul da Chapada Diamantina, no estado da Bahia; e a *A. cearensis* (Allemão) AC Smith, possui ampla distribuição na América do Sul (Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Peru), sendo sua maior disseminação na Caatinga e Cerrado brasileiro (SELEME et al., 2015; LIMA, 2015).

Amburana cearensis (syn. *Torresea cearensis* Fr. All) possui porte arbóreo, podendo atingir de 10-20 metros de altura (Figura 14A). Seu tronco possui casca lisa, coloração castanho-avermelhada, que soltam lâminas finas e irregulares (Figura 14B). As vagens são curtas, achatadas, escura, contendo uma semente alada e rugosa e oleaginosas (Figura 7C). As folhas são compostas, alternas, imparipenadas, com 7-11 folíolos, peciolados, ovados, arredondados no ápice e na base (Figura 14D). Suas inflorescências são esbranquiçadas ou branco-amareladas, pequenas e dispostas em racimos axilares. No Nordeste, o período de floração ocorre entre maio e julho (CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010; ARAUJO et al., 2018).

No semiárido nordestino (Caatinga) a espécie é popularmente conhecida como "cumaru", "cumaru de cheiro", "imburana", "imburana de cheiro", "amburana" ou "amburana de cheiro", sendo o último o termo mais utilizado (GOUVEIA et al., 2016). Possui grande importância econômica, onde sua madeira possui alto valor comercial por ser utilizada para a construção de mobília, fonte de combustível (carvão), forragem e alimentação (OLIVEIRA et al., 2020). Além disso, possui importância econômica medicinal por ser utilizada para o tratamento de várias enfermidades (MACÊDO et al., 2018).

É comum o uso de preparações como infusões, chás, decocções, banhos, tinturas e inalações utilizando as cascas do caule e da raiz, folhas, frutos e suas sementes para o tratamento de doenças como sinusite, gripe, doenças respiratórias, cólica intestinal, dor de estômago, picada de cobra, infecções do trato urinário, desidratação, diarreia, dor de cabeça e articulações, vertigem, febre e infecções do trato urinário (MARINHO, 2004; SILVA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014; BAPTISTEL et al., 2014; BITU et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; MACEDO et al., 2018; ALBERGARIA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

Figura 14 – Registro da *Amburana cearensis* (*in situ*) (A), com destaque em suas diversas partes: cascas (B), sementes (C) e folhas (D).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

O uso versátil da planta é devido diversidade de metabólitos secundários, incluindo cumarinas, flavonoides, polifenóis e terpenos (PEREIRA et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2019). Diversos estudos foram e vem sendo realizados com objetivo de investigar e elucidar os fitoconstituintes presentes na espécie vegetal, além das suas bioatividades (Tabela 5). Entretanto, pouco se conhece sobre os seus potenciais de aplicação, como por exemplo, os compostos voláteis presentes em suas folhas (óleo essencial).

Tabela 5 – Efeito biológico e modos de preparações de extratos utilizando casca, folhas e sementes de *Amburana cearensis*.

Partes da Planta	Efeitos Biológico	Preparação dos Extratos	Resultados	Referências
Casca	Antitumoral	Etanólico	Atividade antitumoral contra HL-60 (células de leucemia promielocítica humana)	FORTIER et al., 2003
		Hidroalcoólico	Atividade antiproliferativa em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 e MDA-MCF7	LATALIZA et al., 2019
	Citotoxicidade	Hidroalcoólico	Não apresenta citotoxicidade sobre L929 (Fibroblasto de camundongo) e HaCaT (queratinócitos)	LATALIZA et al., 2019
	Anti-Inflamatória e Analgésica	Etanólico	Supressão da dor e inflamação no teste de formalina	SILVEIRA et al., 2022
	Antimicrobiana	Etanólico e Clorofórmio	Atividade contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Listeria</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Nocardia</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp. e <i>Edwardsiella</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i>	SÁ et al., 2014
	Anti-inflamatória e	Hidroalcoólico	Reduz a nocicepção por ácido acético e formalina, e	ALMEIDA et al.,

	Antinociceptiva		edema de pata induzido por carregenina	2010
	Atividade Neuroprotetora	Aquoso, Fração fenólica e Amburosídeo	Neuroproteção sobre células microgliais	PIERDONÁ et al., 2014
Folha	Antimicrobiana	Etanólico	Atividade contra <i>S. aureus</i> SA-ATCC 25923 e efeito sinérgico com gentamicina e amicacina	SILVEIRA et al., 2022
	Antioxidante	Etanólico	Atividade antioxidante com baixo valor de IC ₅₀	
Semente	Antioxidante	Etanólico	Atividade antioxidante com baixo valor de IC ₅₀	
	Neuroprotetora	Etanólico, Hexano, Diclorometano e Acetato de Etila	Apresentaram um potencial neuroprotetor sobre células neurais PC12 expostas a dano neuronal induzido por glutamato (1 mM) em concentrações de 0,1-1000 µg/mL	
	Antiedematogênica	Aquoso	Redução do edema de pata induzido pela carragenina, com efeito estatisticamente semelhante à do AAS	LIMA et al., 2013
	Antimicrobiana	Hidroalcólico e Aquoso	Atividade contra <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. flexneri</i>	AGUIAR et al., 2017

Apesar da importância e potencialidades da espécie vegetal em vários âmbitos, desde ambiental até fins medicinais, sua exploração vem sendo feita de maneira desordenada e extrativista, diminuindo o número de exemplares dessa espécie vegetal, do qual, motivou sua inserção na lista vermelha das espécies em risco de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais - IUCN (RAMOS et al., 2004; CAMPOS et al., 2013). Tais problemas ocorrem devido à falta de estudos e pesquisas que promovam a conservação e manutenção da espécie, bem como seu potencial de aplicação medicinal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico, farmacológico e avaliar a aplicação medicinal do óleo essencial do óleo essencial de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. obtida do domínio Caatinga.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter óleo essencial a partir das folhas de *A. cearensis*;
- Caracterizar quimicamente o óleo essencial;
- Investigar a atividade antioxidante do óleo essencial;
- Investigar o potencial antimicrobiano do óleo essencial sobre isolados de bactérias gram positivas, gram negativas e fungos;
- Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), Bactericidas (CBMs) e fungicidas (CFMs) do óleo essencial;
- Investigar o efeito modulador da Amoxicilina pelo óleo essencial em bactérias e Fluconazol pelo óleo essencial em fungos;
- Investigar a toxicidade aguda não clínica do óleo essencial;
- Investigar o potencial antinociceptivo (analgesia) do óleo essencial;
- Investigar os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos no efeito antinociceptivo (analgesia) do óleo essencial;
- Investigar o potencial anti-inflamatório do óleo essencial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas (folhas) de *A. cearensis* (Allemão) A.C. Smith foram coletadas no município de Lagoa Grande, no estado de Pernambuco, PE (coordenadas geográficas de 08° 59' 49" Se 40° 16' 19" W) em novembro de 2019 (Figura 15). Uma exsicata foi depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho (UFRPE) da Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE) sob número 55.150.

Figura 15 – Coleta das folhas de *A. cearensis* (Allemão) A.C. Smith no município de Lagoa Grande – PE.



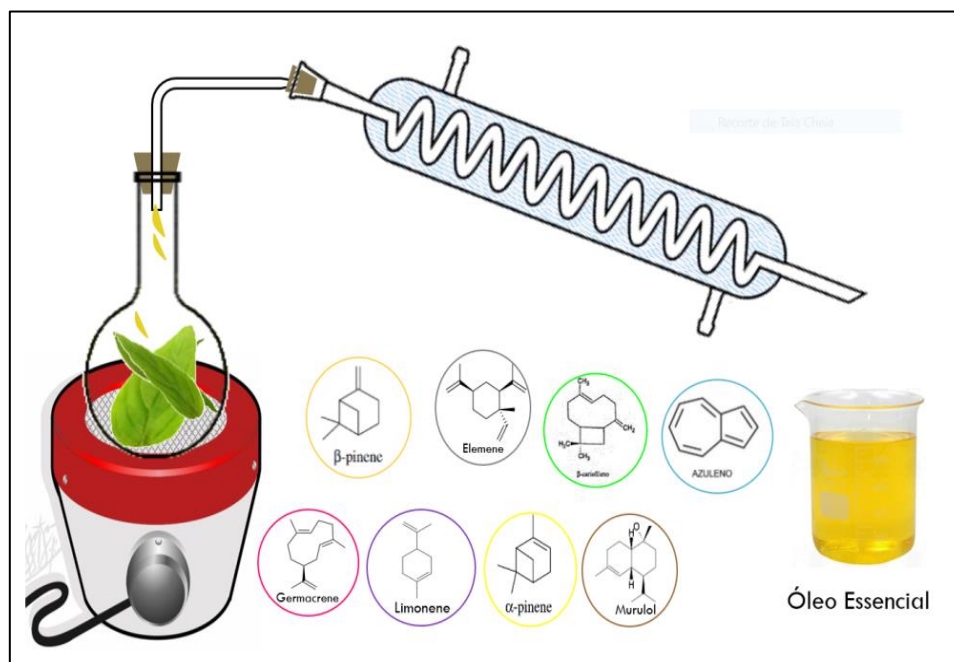
Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.1.1 Extração de óleo essencial

Neste processo, foram utilizados 600 g de folhas frescas. O material foi limpo, higienizado e posteriormente triturado em moinho de facas (Tecnal TE-625), com posterior segregação em três porções contendo 200 g de material, onde cada partição foi submetida à Hidrodestilação (HD) por 3 horas em aparelho tipo Clevenger (Figura 16).

Após a hidrodestilação, o excesso de água foi removido com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), e o cálculo do rendimento foi obtido com base na quantidade de material utilizado no processo e na massa obtida % (m/m). O óleo essencial obtido foi armazenado sob refrigeração a -4°C protegido da luz para posterior análise.

Figura 16 – Esquema explicativo demonstrando o processo de extração do óleo essencial.



Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.1.2 Análise química do óleo essencial

A composição do óleo essencial foi analisada no Cromatógrafo a Gás Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA) série 5975C, com sistema de detecção de quadrupolo equipado com coluna apolar DB-5 Agilent J&W, (60 m × 250 m i.d. × 0,25 m de espessura do filme). A partir da análise dos Tempos de Retenção (TR) dos compostos presentes na amostra de óleo essencial, dos padrões de hidrocarbonetos e da combinação do óleo essencial com a mistura padrão, foram calculados os Índices de Retenção (IR) para cada componente. Os compostos foram identificados comparando seus espectros de massa (MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integrado ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) e Índice de Retenção com os padrões autênticos disponíveis no Adams (2017). A amostra de óleo foi quantificada em Cromatografia Gasosa com Detector de

Ionização de Chama (GC-FID), nas mesmas condições de CG-EM, em triplicata para cálculo do desvio padrão da porcentagem da área de pico de cada composto no cromatograma. Este foi usado para determinar a proporção dos compostos no óleo essencial (De Veras et al., 2020).

4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.2.1 Ensaio de eliminação de radicais ABTS

A atividade antioxidante do ABTS (Ácido 2,2'-Azino-Bis-3-etilbenzotiazolino-6-Sulfônico) foi avaliada conforme descrito por De Veras et al. (2020) com modificações. Inicialmente, o radical ABTS foi formado a partir da reação da solução estoque 7 mM de ABTS com persulfato de potássio 140 mM. Diluições de óleo essencial foram misturadas com solução etanólica de ABTS. O análogo da vitamina E (Trolox®) e Hidroxitolueno Butilado (BHT) foram usados como controles positivos e etanol com branco. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(A_{734b} - A_{734s}) / (A_{734b})] \times 100$, onde A_{734b} é a absorbância do branco e A_{734s} é a absorbância das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As concentrações das amostras responsáveis por 50% de diminuição da atividade inicial do radical livre ABTS (IC_{50}) foram calculadas por meio de regressão linear.

4.2.2 Ensaio de eliminação de radicais DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de radicais livres DPPH (2,2-Difenil-1-PicrilHidrazil) foi realizada conforme descrito por De Veras et al. (2020). Diluições de óleo essencial foram misturadas com solução metanólica 0.2 mM de DPPH. Um análogo da vitamina E (Trolox®) e Hidroxitolueno Butilado (BHT) foram usados como controles positivos e metanol com branco. As misturas foram incubadas no escuro por um período de 30 min a 25°C, então a absorbância foi medida a 517 nm. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(A_{517b} - A_{517s}) / (A_{517b})] \times 100$, onde A_{517b} é a absorbância do branco e A_{517s} é a absorbância das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As concentrações das amostras responsáveis por 50% de diminuição da atividade inicial do radical livre DPPH (IC_{50}) foram calculadas por meio de regressão linear.

4.2.3 Atividade de eliminação de radical hidroxila (OH-)

A atividade sequestradora de radicais hidroxila foi investigada usando a reação de Fenton com base na metodologia de Costa et al. (2009) com modificações, ou a geração de radicais hidroxila em tampão fosfato de sódio 150 mM (pH 7,4) utilizando salicilato de sódio 2 mM, H₂O₂ 30%, EDTA 10 mM e FeSO₄7H₂O 10 mM. Diluições de óleo essencial foram adicionadas à mistura. A quercetina foi utilizada como controle positivo e o etanol com branco. As amostras foram misturadas e incubadas a 37 °C por 1 h, e então lidas a 510 nm. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(A_{510b} - A_{510s}) / (A_{510b})] \times 100$, onde A_{510b} é a absorbância do branco e A_{510s} é a absorbância das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As concentrações das amostras responsáveis por 50% de diminuição da atividade inicial do radical hidroxila (IC₅₀) foram calculadas por meio de regressão linear.

4.2.4 Ensaio de eliminação de radical superóxido (O₂-)

A avaliação foi realizada com base na metodologia de Costa et al. (2009) com modificações, utilizando uma mistura contendo 0,5 mM de riboflavina, 0,375 mM de nitroazul cloreto de tetrazólio (NBT), 0,5 mM de EDTA e 65 mM de metionina, em 50 mM de tampão fosfato pH 7,4. A mistura incubada foi exposta a luz fluorescente (15w) por 15 min e a absorbância lida em 560 nm. A quercetina foi utilizada como controle positivo e o etanol com branco. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(A_{560b} - A_{560s}) / (A_{560b})] \times 100$, onde A_{560b} é a absorbância do branco e A_{560s} é a absorbância das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As concentrações das amostras responsáveis por 50% de diminuição da atividade inicial do radical superóxido (IC₅₀) foram calculadas por meio de regressão linear.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E MODULADOR

4.3.1 Cepas microbianas e condições de cultivo

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC

700603, *Candida albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* ATCC 10261, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). Cepas de *S. aureus* UFPEDA-709, *P. aeruginosa* UFPEDA-39, *E. coli* UFPEDA 224, *K. pneumoniae* UFPEDA 396, com diferentes perfis de resistência, obtidas da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Também foram utilizadas cepas de fungos da espécie *Candida albicans* (URM-6366, URM-6542 e URM-5788) com diferentes perfis de resistências fornecidas pelo Departamento de Micologia da UFPE. Caldo e Ágar Mueller-Hinton padrão (MHB e MHA) foram usados como meios de cultura bacterianos, e RPM-1640 e Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) como meios de cultura fúngicos.

4.3.2 Avaliação do efeito antimicrobiano

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas frente as cepas microbianas testadas de acordo com os protocolos M100 (2017) e M27 (2008) do CLSI.

As CIM foram determinadas com inóculos iniciais de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias e fungos. Alíquotas do meio apropriado, soluções de óleo essencial e inóculo foram dispensadas em uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas para bactérias e fungos, respectivamente. A CIM foi detectada usando um método colorimétrico adicionando 10 µL de solução aquosa de resazurina a 0,01% (m/v) em cada poço no final do período de incubação. Para determinação de CBM e CFM, alíquotas de 10 µL de cada poço foram transferidas para placas de Petri contendo MHA ou SDA para bactérias e fungos, respectivamente (Da Silva et al., 2020). Como controle positivo, utilizou-se o fármaco padrão Amoxicilina (Aldrich-Sigma) e Fluconazol (Aldrich-Sigma). O meio de cultura e o DMSO (solvente usado para dissolver o óleo essencial) foi usado como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

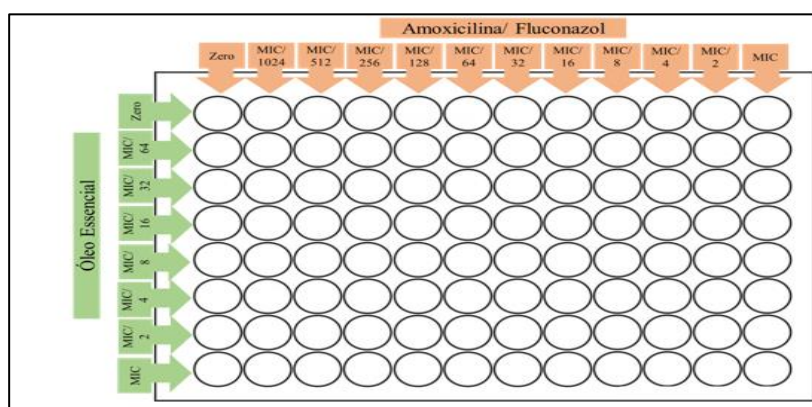
4.3.3 Avaliação do efeito modulador

A interação antimicrobiana entre Amoxicilina, fluconazol e o óleo essencial de *A. cearensis* foi realizado pelo método checkerboard segundo metodologia de Brandt et al. (2010). Alíquotas de 50 µL de óleo essencial foram adicionadas aos poços da placa

na orientação horizontal e alíquotas de 50 µL das diluições da Amoxicilina ou Fluconazol adicionadas na orientação vertical de modo que a placa continha várias combinações de concentração dos dois compostos (Figura 17). Em seguida, em cada poço foi adicionado 10 µL de inóculos bacterianos e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Ao final do crescimento, foi adicionado 10 µL de uma solução de resazurina (0,01%) para verificar a presença e/ou ausência de crescimento bacteriano. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Após a incubação, 20µL de resazurina foi adicionado em todos os poços e novamente foi mantida a 37 °C por 2h. O crescimento no meio é indicado pela mudança de cor de azul para rosa.

A análise da combinação foi obtida calculando o Índice de Concentração Inibitória da Fração (ICIF) usando a seguinte fórmula (Van vuuren et al., 2009): **CIF do óleo essencial** = CIM do óleo essencial em combinação Amoxicilina ou Fluconazol / CIM de óleo essencial isolado; **CIF da Amoxicilina/ Fluconazol** = CIM da Amoxicilina ou Fluconazol em combinação com óleo essencial/CIM da Amoxicilina ou Fluconazol isolada; **ICIF=CIF do óleo essencial + CIF da Amoxicilina ou Fluconazol**. Os tipos de efeitos foram classificados da seguinte forma: **ICIFs** ≤0.5, sinergismo; **ICIFs** 0.5 ≤1, efeito aditivo; **ICIFs** >1–4, efeito indiferente e **ICIFs** ≥4, antagonismo.

Figura 17 – Esquema representativo demonstrando a montagem das combinações do óleo essencial com a Amoxicilina pela técnica de Checker board.



Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.4 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* E PROCEDIMENTOS ÉTICOS

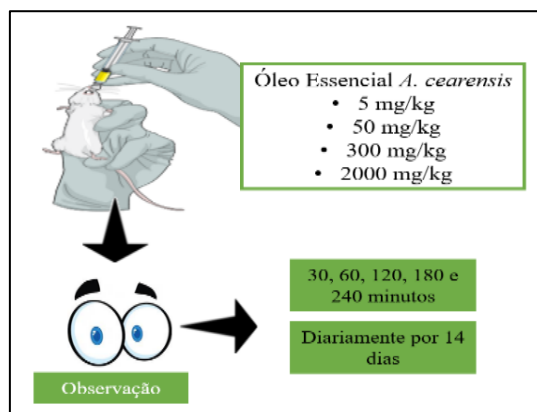
Camundongos machos e fêmeas (30–32 g) de Swiss albino (*Mus musculus*) foram obtidos do biotério central do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-

Lika/UFPE. Os animais foram aclimatados em gaiolas com fundo sólido de polipropileno (tamanho: 18 cm x 34 cm x 41 cm) com cama de maravalha, sob condições ambientais padrão (22 ± 3 °C, ciclo claro-escuro 12/12 horas) e alimentados com ração padrão recomendada e água potável *ad libitum*. O protocolo experimental em animais foi realizado seguindo as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Brasil (CONCEA) e do Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS). Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, sob o nº 30/2020.

4.5 INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DOSE LETAL MEDIANA (DL₅₀)

A fim de avaliar a segurança toxicológica aguda não clínica do óleo essencial, os ensaios foram realizados utilizando o protocolo 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2002). Os camundongos (fêmeas) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 3$), e tratados por via oral (v.o.) com 100 µL das seguintes doses de óleo essencial: 5, 50, 300 e 2.000 mg/kg. Os animais foram observados aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o tratamento oral, e diariamente por 14 dias. Possíveis sinais de alteração, como tremores, convulsões, salivação, piloereção, hiperatividade, sangramento, entre outros indicadores de toxicidade foram avaliados (Figura 18). A mortalidade também foi avaliada por 14 dias e a DL₅₀ também foi calculada.

Figura 18 – Esquema representativo demonstrando a investigação da toxicidade aguda do óleo essencial.



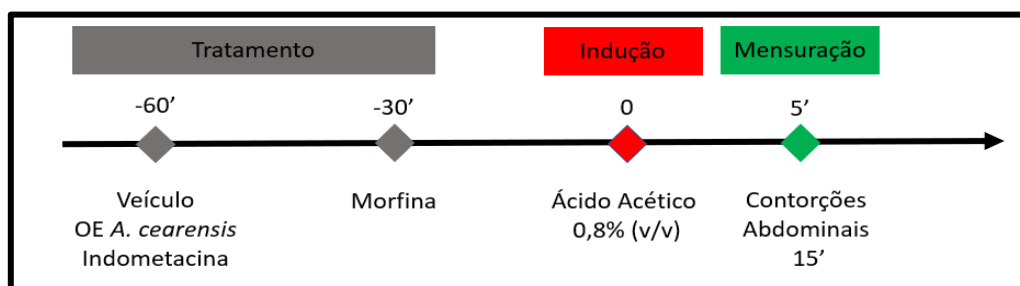
Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO (ANALGÉSICO)

4.6.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

A avaliação foi realizada pelo teste de contorção induzida por ácido acético de acordo com Radulović et al. 2015. Foram utilizados seis grupos (n = 6) experimentais de camundongos machos, sendo tratados por via oral (v.o.) com os seguintes tratamentos: veículo (solução salina 0,9%, p/v; v.o.), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg; v.o.) e indometacina (20 mg/kg; v.o.); o grupo morfina (10 mg/kg; i.p.) recebeu tratamento via intraperitoneal (i.p.). Após 30 min (para morfina) ou 60 minutos (para os demais grupos) foi injetado ácido acético (0,8%, v/v) (10 mL/kg) intraperitonealmente (i.p.) para estimular a nocicepção. Após o estímulo, os animais foram colocados dentro de uma câmara de observação (15 cm de diâmetro e 20 cm de altura) equipada com um espelho inclinado a 45° abaixo da câmara e aguardou-se 5 minutos para avaliação da intensidade da nocicepção, que foi quantificada pelo número de contorções durante 15 min de observação, sendo expressa em relação ao número de contorções abdominais (Figura 19). Todo o experimento foi gravado através de um circuito de câmera-computador para posterior análise do comportamento e análise da resposta nociceptiva.

Figura 19 – Esquema representativo demonstrando a investigação do efeito antinociceptivo do óleo essencial no modelo de nocicepção induzido por ácido acético (0,8%).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

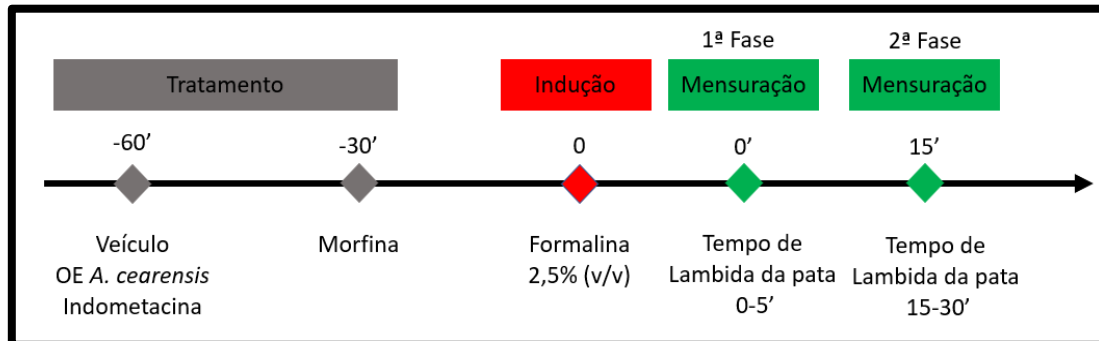
4.6.2 Teste de formalina

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Tjølsen et al. (1992). Foram utilizados seis grupos experimentais (n = 6) de camundongos machos, sendo

tratados por via oral (v.o.) com os seguintes tratamentos: veículo (solução salina 0,9%, p/v; v.o.), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg; v.o.) e indometacina (20 mg/kg; v.o.); o grupo morfina (10 mg/kg) recebeu tratamento via intraperitoneal (i.p.). Após 30 min (para morfina) ou 60 minutos (para os demais grupos), a nocicepção foi induzida por injeção subplantar (i.pl.) de formalina a 2,5% (v/v) (20 µL) na pata traseira esquerda (Figura 20).

Após a injeção de formalina, os animais foram transferidos para câmara de observação (15 cm de diâmetro e 20 cm de altura) equipada com um espelho inclinado a 45° abaixo da câmara, e observados de 0 a 5 min (primeira fase, fase neurogênica) e 15 a 30 min (segunda fase, fase inflamatória) em relação ao tempo gasto em segundos (s) lambendo ou mordendo a pata que recebeu o agente nociceptor. Todo o experimento foi gravado através de um circuito de câmera-computador para posterior análise do comportamento e análise da resposta nociceptiva.

Figura 19 – Esquema representativo demonstrando a investigação do efeito antinociceptivo do óleo essencial no modelo de nocicepção induzido por formalina (2,5%).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

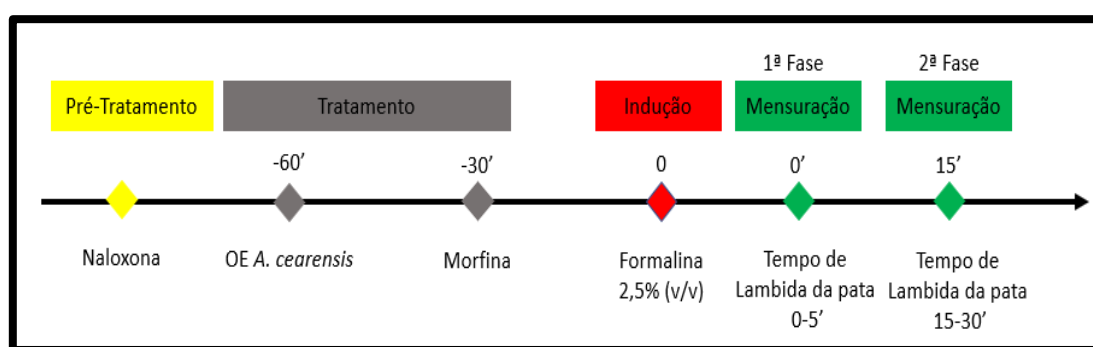
4.6.2.1 Investigação de mecanismos farmacológicos

4.6.2.1.1 Participação da via opioide

Para investigação de uma possível participação de receptores opioides no efeito antinociceptivo do óleo essencial, foi utilizado o antagonista Naloxona (um antagonista não seletivo de receptores opioides) e o agonista a Morfina (um agonista de receptores opioides), segundo a metodologia de De Veras et al. (2020).

Foram utilizados três grupos experimentais (n=6) sendo: óleo essencial de *A. cearensis* (100 mg/kg) + Naloxona (5 mg/kg, i.p.), Naloxona (5 mg/kg, i.p.) e Morfina (10 mg/kg; i.p.) + Naloxona (5 mg/kg, i.p.). Os animais foram pré-tratados com a Naloxona trinta minutos antes do tratamento com o óleo essencial ou Morfina. Sessenta minutos após os tratamentos (apenas 30 min para Morfina), a nocicepção foi induzida por injeção subplantar (i.pl.) de formalina a 2,5% (v/v), e as respostas nociceptivas promovidas foram observadas, conforme descrito no item 4.8.2. (Figura 21).

Figura 20 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação da via opioide no efeito antinociceptivo do óleo essencial.



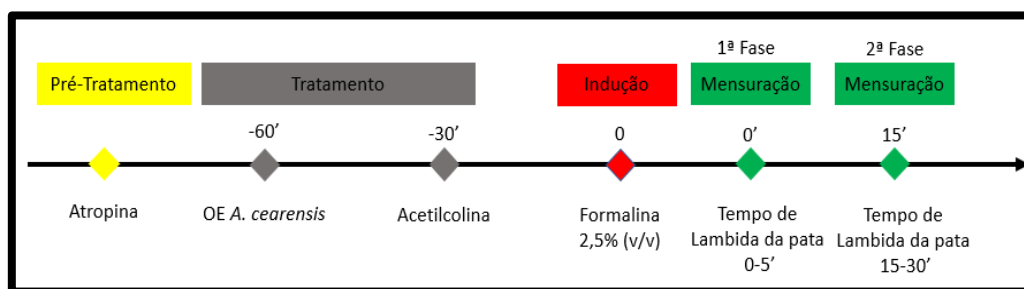
Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.6.2.1.2 Participação do sistema colinérgico

Para investigação de uma possível participação do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial, foi utilizado o antagonista Atropina (antagonista colinérgico muscarínico não seletivo) e agonista a Acetilcolina (um agonista colinérgico), segundo a metodologia de De Lavor et al. (2018).

Foram utilizados quatro grupos experimentais (n=6) sendo: óleo essencial de *A. cearensis* (100 mg/kg) + Atropina (5 mg/kg, i.p.), Acetilcolina (1 mg/kg; i.p.), Atropina (5 mg/kg, i.p.) e Acetilcolina (1 mg/kg; i.p.) + Atropina (5 mg/kg; i.p.). Os animais foram pré-tratados com a Atropina trinta minutos antes do tratamento com o óleo essencial ou Acetilcolina. Sessenta minutos após os tratamentos (apenas 30 min para acetilcolina), a nocicepção foi induzida por injeção subplantar (i.pl.) de formalina a 2,5% (v/v), e as respostas nociceptivas promovidas foram observadas, conforme descrito no item 4.8.2. (Figura 22).

Figura 21 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial.



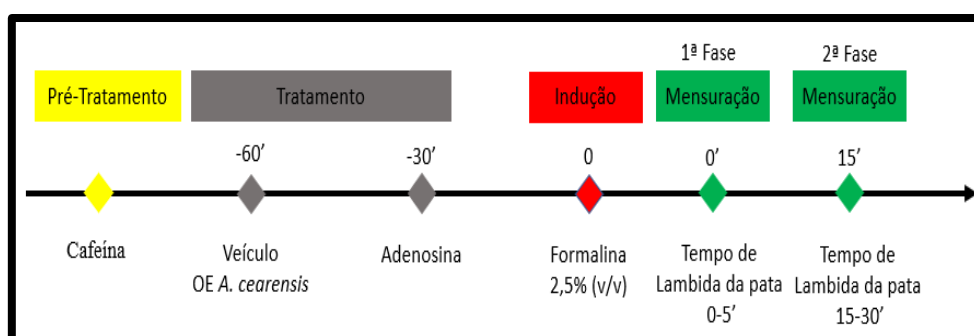
Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.6.2.1.3 Participação do sistema adenosinérgico

Para investigação de uma possível participação do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial, foi utilizado o antagonista Cafeína (antagonista de receptores adenosinérgico) e agonista a Adenosina (agonistas dos receptores de adenosinérgicos), segundo a metodologia de De Lavor et al. (2018).

Foram utilizados quatro grupos experimentais (n=6) sendo: óleo essencial de *A. cearensis* (100 mg/kg) + Cafeína (10 mg/kg, i.p.); Adenosina (100 mg/kg; i.p.), Cafeína (10 mg/kg, i.p.) e Adenosina (100 mg/kg; i.p.) + Cafeína (10 mg/kg; i.p.). Os animais foram pré-tratados com a Cafeína trinta minutos antes do tratamento com o óleo essencial ou Adenosina. Sessenta minutos após os tratamentos (apenas 30 min para Adenosina), a nocicepção foi induzida por injeção subplantar (i.pl.) de formalina a 2,5% (v/v), e as respostas nociceptivas promovidas foram observadas, conforme descrito no item 4.8.2. (Figura 23).

Figura 22 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial.

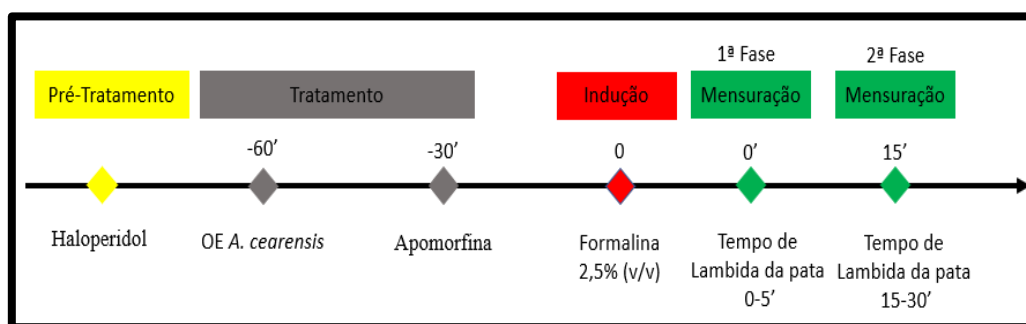


Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.6.2.1.4 Participação do sistema dopaminérgico

Para investigação de uma possível participação do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial, foi utilizado o antagonista Haloperidol (antagonista de receptores dopaminérgicos) e agonista a Apomorfina (agonista dopaminérgico), segundo a metodologia de De Lavor et al. (2018). Foram utilizados quatro grupos experimentais (n=6) sendo: óleo essencial de *A. cearensis* (100 mg/kg) + Haloperidol (1 mg/kg, i.p.); Apomorfina (8 mg/kg; i.p.), Haloperidol (1 mg/kg, i.p.) e Apomorfina (8 mg/kg; i.p.) + Haloperidol (1 mg/kg; i.p). Os animais foram pré-tratados com a Haloperidol trinta minutos antes do tratamento com o óleo essencial ou Apomorfina. Sessenta minutos após os tratamentos (apenas 30 min para Apomorfina), a nocicepção foi induzida por injeção subplantar (i.pl.) de formalina a 2,5% (v/v), e as respostas nociceptivas promovidas foram observadas (Figura 24).

Figura 23 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo do óleo essencial.



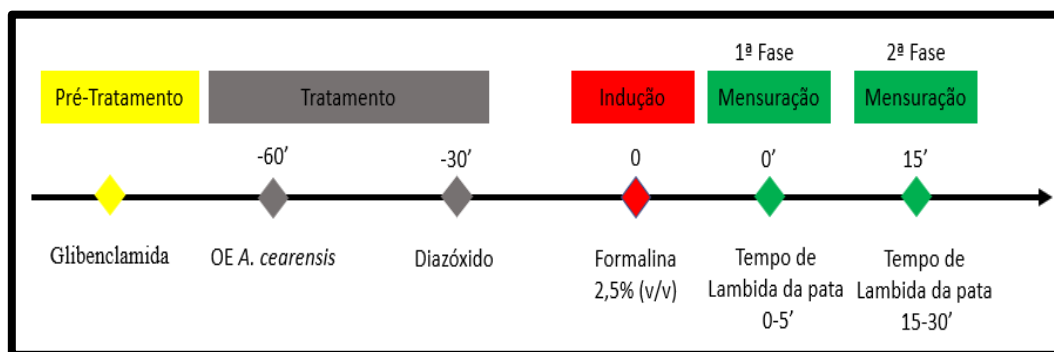
Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.6.2.1.5 Participação dos Canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP)

Para investigação de uma possível participação dos canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP) no efeito antinociceptivo do óleo essencial, foi utilizado o antagonista Glibenclamida (bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis a ATP) e agonista a Diazóxido (agonista do canal de potássio sensível ao ATP), segundo a metodologia de De Lavor et al. (2018). Foram utilizados quatro grupos experimentais (n=6) sendo: óleo essencial de *A. cearensis* (100 mg/kg) + Glibenclamida (10 mg/kg, i.p.); Diazóxido (3 mg/kg; i.p.), Glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) e Diazóxido (3 mg/kg; i.p.) + Glibenclamida (10 mg/kg; i.p). Os animais foram pré-tratados com a Cafeína trinta

minutos antes do tratamento com o óleo essencial ou Diazóxido. Sessenta minutos após os tratamentos (apenas 30 min para Diazóxido), a nocicepção foi induzida por injeção subplantar (i.pl.) de formalina a 2,5% (v/v), e as respostas nociceptivas promovidas foram observadas, conforme descrito no item 4.8.2. (Figura 25).

Figura 24 – Esquema representativo demonstrando a investigação da participação dos canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP) no efeito antinociceptivo do óleo essencial.



Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO

4.7.1 Edema de pata induzida por carragenina

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Ou et al. 2019. Os camundongos machos foram divididos em cinco grupos ($n = 6$), sendo tratados por via oral (v.o.) com 100 μ L de veículo (solução salina, 0,9% (p/v)), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg) ou indometacina (20 mg/kg). Após 60 minutos, os animais receberam carragenina 1% (p/v) (20 μ L/pata) na pata traseira direita e soro fisiológico (0,9%, p/v), (20 μ L/pata) na pata esquerda. O volume da pata traseira direita e esquerda de cada animal foi registrado com o auxílio de um paquímetro após 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção de carragenina e soro fisiológico 0,9%. A inibição do edema foi calculada por (pata direita - pata esquerda) e expressa em mm.

4.7.2 Edema de pata induzida por histamina

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Cavalher-Machado et al. 2008. Os camundongos machos foram divididos em cinco grupos ($n = 6$), sendo tratados por via oral (v.o.) com 100 μ L de veículo (solução salina, 0,9% (p/v)), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg) ou prometazina (6 mg/kg). Após 60

minutos, os animais receberam 1% de histamina (p/v) (20 µL/pata) na pata traseira direita e soro fisiológico (0,9%, p/v), (20 µL/pata) na pata esquerda. A inibição do edema foi calculada por (pata direita - pata esquerda) e expressa em mm.

4.7.3 Peritonite induzida por carragenina

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Longhi-Balbinot et al. (2012). Os camundongos (machos) foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=6), sendo: sham (não recebeu tratamento), veículo (solução salina, 0,9% (p/v)), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg) e indometacina (20 mg/kg). Os compostos foram administrados 60 minutos antes da indução da peritonite. Após este período, 2% de carragenina (p/v) (750 µg/cavidade) foi injetado na cavidade intraperitoneal (i.p.). Quatro horas após a administração da carragenina, os animais foram eutanasiados, sendo injetado 3 ml de PBS heparinizado gelado (10 UI/mL) na cavidade peritoneal. Após 30 s de massagem manual, o exsudato foi retirado.

Para contagem total de leucócitos, 1 mL do líquido peritoneal foi misturado com 0,2 mL de solução de Turk (30 mL de ácido acético, 100 mL de água destilada e 100 mL de azul de metileno) e uma alíquota foi colocada na câmara de Neubauer (com profundidade de 0,100 mm e área de 0,0025 mm²) e a migração leucocitária foi quantificada. Alíquotas de fluido peritoneal também foram utilizadas para quantificação de TNF-α e IL-1β usando citocinas de camundongo ELISA Kit, High Sensitivity in ELISA, Thermo Fisher (Waltham, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.4 Pirexia induzida por levedura

A atividade foi realizada de acordo com a metodologia modificada de Sobeh et al. 2019. Os camundongos machos foram distribuídos em cinco grupos (n = 6). Inicialmente, a temperatura retal foi registrada antes da suspensão de levedura de cerveja (20%, p/v) por via subcutânea s.c. (20 mL/kg). Após 18 h, foram selecionados para o estudo os animais que apresentaram aumento da temperatura retal basal média entre 38,0 e 39,0 °C. Os grupos foram tratados por via oral (v.o.) com 100 µL de veículo (solução salina 0,9%, p/v), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg) ou dipirona (100 mg/kg). A temperatura retal foi aferida em intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas após a administração das amostras, utilizando-se termômetro digital lubrificado.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism® (versão 8.4.3; San Diego Califórnia EUA). A análise estatística foi feita usando ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Os dados foram expressos em média $\pm$ Desvio Padrão (D.P.). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1: Atividades antioxidante, antimicrobiana e moduladora do óleo essencial de folhas de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith do nordeste do Brasil

1. Introdução

As plantas produzem óleos essenciais para executar diversas funções, incluindo proteção contra herbívoros, defesa contra patógenos, atração de polinizadores e proteção contra estresse oxidativo (Ahmed et al., 2017; Sharifi-Rad et al., 2017). Os óleos essenciais e alguns de seus constituintes possuem alto valor econômico, tendo aplicações na agricultura como conservantes e aditivos para uso humano ou animal, em cosméticos e perfumes, e em outros campos industriais (Jamshidi-Kia et al., 2018). A diversidade de compostos que compõem os óleos essenciais permite a existência de diferentes respostas biológicas (Tariq et al., 2019).

O uso de fitoterápicos pode promover efeitos benéficos à saúde humana, sendo utilizados de forma indireta, abrangendo mais de 80% da população mundial que utiliza plantas ou produtos oriundos delas para prevenir diversas doenças. Na fitoterapia, os óleos essenciais são aplicados na medicina para a promoção da saúde e bem-estar. A diversidade estrutural dos compostos é um contribuinte positivo para a existência de diferentes propriedades medicinais (Ahmed et al., 2017; Jamshidi-Kia et al., 2018; Veras et al., 2020).

Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae) é uma planta com distribuição na América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai). No Brasil, possui ampla distribuição no semiárido, conhecido principalmente como "cumaru", "cumaru de cheiro", "imburana", "imburana de cheiro", "amburana", "amburana de cheiro" ou "cerejeira", sendo explorada comercialmente por sua madeira nobre, utilizada na fabricação de móveis de luxo (Macedo et al., 2018). *A. cearensis* é considerada uma importante planta medicinal em estudos etnobotânicos, pois possui poderes curativos para diversas doenças (Canuto et al., 2014; Macedo et al., 2018). As cascas do caule são amplamente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de resfriados, bronquites, gripes, asma, contra dores, analgésicos e espasmolíticos (Oliveira et al., 2021).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar o primeiro relato da composição química do óleo essencial de folhas de *Amburana cearensis*, e avaliar sua atividade antioxidante, antimicrobiana e moduladora com antibióticos convencionais (Amoxicilina e Fluconazol).

2. Resultados e Discussão

2.1. Composição química

As folhas de *A. cearensis* (Allemão) A.C. Smith foram coletadas no interior da cidade de Lagoa Grande, no estado de Pernambuco-PE, Brasil. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação (HD), e posteriormente analisado quanto à composição química em Cromatografia Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM) e Detector de Ionização de Chama (CG-DIC) (Veras et al., 2020). A Hidrodestilação (HD) das folhas de *A. cearensis* resultou no óleo essencial com rendimento de $0,42 \pm 0,03\%$ (m/m%) com identificação de 95,21% de seus constituintes químicos. Os componentes majoritários quantificados foram germacrone ($45,76 \pm 0,15\%$), germacreno B ($17,74 \pm 0,06\%$), (E)-cariofileno ($5,55 \pm 0,04\%$) e biciclogermacreno ($4,13 \pm 0,03\%$) (Tabela 1).

O óleo essencial de *A. cearensis* possui compostos bioativos em sua composição, entre eles o germacreno, que possui ação antiviral (Liao et al., 2013), inseticida (Benelli et al., 2017), antitumoral (Ye et al., 2017), antioxidante e neuroprotetor (Wu et al., 2019), anti-inflamatório, antibacteriano e antitumoral (Zhang et al., 2017).

2.2. Atividade antioxidante

O óleo essencial apresentou efeito antioxidante em todas as técnicas utilizadas, apresentando valores de IC_{50} de $298,23 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ e $183,89 \pm 0,12$ nas técnicas ABTS e DPPH, respectivamente, e testes de sequestro dos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($OH^{\cdot}$) mostraram valores de IC_{50} de $234,38 \pm 0,12$ e $324,86 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 2). Representando quase metade da composição química do óleo essencial de *A. cearensis*, o germacrone é um sesquiterpenoide oxigenado que teve seu papel antioxidante relacionado principalmente à cetona cíclica germacrone (Zeljko et al., 2017). Embora o OE *A. cearensis* seja uma mistura química complexa, pode se tornar uma fonte alternativa de antioxidante natural com base em seu potencial e utilização de sua forma bruta em alimentos, produtos alimentícios e farmacêuticos, entre outros, que visam combater danos decorrentes do estresse oxidativo, e que promovam a melhoria da qualidade de vida das pessoas (Figueiredo et al., 2019).

2.3. Atividade antimicrobiana

O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana efetiva contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* UFPEDA-709, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* UFPEDA-39, *Escherichia coli* ATCC 8739, *E. coli* UFPEDA-224, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* UFPEDA-396, *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 10261, *C. albicans* URM-UFPE 6366, *C. albicans* URM-UFPE 6542 e *C. albicans* URM-UFPE 5788 com valores de CIM variando de 64 a 1024 µg/mL (Tabela 3). Como observado acima, a diferença entre as atividades antimicrobianas do óleo essencial é explicada pela diversidade na composição e pela interação de cada componente no microrganismo alvo, conforme observado por Khoury et al. (2019).

2.4. Avaliação do efeito modulador

O óleo essencial foi investigado para possível efeito modulador combinado com amoxicilina ou fluconazol. Observou-se que o óleo essencial apresentou potencial efeito sinérgico quando combinado com a amoxicilina (Tabela 4) promovendo uma redução de 8 vezes nos valores de CIMs em *S. aureus* ATCC 6538, e uma redução de 4 vezes em *S. aureus* UFPEDA-709 e *P. aeruginosa* ATCC 9027. Foi possível verificar a diminuição de 4 vezes nos valores de CIMs do fluconazol quando combinado com óleo essencial na cepa de *C. albicans* URM-UFPE 5788 (Tabela 4). A resistência aos antibióticos utilizados na prática clínica tornou-se um grande desafio para o tratamento de infecções bacterianas e fungicas. Vários estudos têm sido realizados para investigar o potencial dos óleos essenciais para atuar como adjuvantes na prática clínica com antibióticos já disponíveis (Tariq et al., 2019). Os dados obtidos do óleo essencial de *A. cearensis* indicam que ele tem potencial de aplicação, porém, mais estudos são necessários para entender seus possíveis mecanismos de ação, bem como sua eficácia em outros organismos.

3. Conclusão

Este trabalho valoriza a *A. cearensis* como uma espécie ameaçada de extinção que pouco é explorada do ponto de vista biológico e farmacológico. O óleo essencial apresentou como constituintes majoritários germacreno (45,76±0,15%), germacreno B (17,74±0,06%), (E)-cariofileno (5,55±0,04%) e biciclogermacreno (4,13±0,03%), apresentando efeitos antimicrobiano, antioxidante e modulador de antibióticos. O óleo essencial pode ser utilizado como fonte natural de agentes antioxidantes e

antimicrobianos para evitar perdas econômicas, reduzindo os riscos à saúde de patógenos microbianos, como bactérias resistentes a diversos antibióticos, tornando-se um candidato para o desenvolvimento de novos fármacos.

Referências

- Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M. Z., Amjad, M. S., Sadaf, H. M., Riaz, I., Ahmad, N. 2017. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J. Pharmacogn. Phytochem*, **6**, 2, 205-214
- Canuto, K.M., Leal, L.K., Lopes, A.A., Coleman, C.M. 2014. Amburanins A and B from *Amburana cearensis*: daphnodorin-type biflavonoids that modulate human neutrophil degranulation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **25**, 639–647.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. 2018. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of HerbMed Pharmacology*. **7**, 1–7.
- Macedo, J.G.F., De Menezes, I.R.A., Ribeiro, D.A., Santos, M.D.O., De Mâcedo, D.G., Macêdo, M.J.F., De Almeida, B.V., Souza De Oliveira, L.G., Pereira Leite, C., De Almeida Souza, M.M. 2018. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **2018**, 1–28.
- Oliveira, C. R., Cal, V. D. L. J., Vaz, D. F., Fialho, P. B., Curiele, R. S., Figueira, F. S., Paula Vieira, R. 2021. Known and unknown medicinal plants used in respiratory disorders in Brazilian folk medicine: a brief review. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, **4**, 1, 2021.
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Iriti, M. 2017. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, **22**, 1, 1-70.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Rather, M. A. A. 2019. Comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial pathogenesis*, **134**, 103580, 2019.
- Wu, T., Yin, F., Kong, H., Peng, J. 2019. Germacrone attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via antioxidative and antiapoptotic mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120**, 18901–18909.

Ye, L., Wu, J., Chen, W., Feng, Y., Shen, Z. 2017. Novel anti-cancer agents based on germacrone: design, synthesis, biological activity, docking studies and MD simulations. *RSC Advances*, **7**, 3760–3767.

Zhang, L., Yang, Z., Wei, J., Su, P., Pan, W., Zheng, X., Zhang, K., Lin, L., Tang, J., Fang, Y., Du, Z. 2017. Essential oil composition and bioactivity variation in wild-growing populations of *Curcuma phaeocaulis* Valetton collected from China. *Industrial Crops and Products*, **103**, 274–282.

MATERIAL SUPLEMENTAR

1. Metodologia

1.1. Material vegetal

As amostras (folhas) de *A. cearensis* (Allemão) A.C. Smith foram coletadas no município de Lagoa Grande, no estado de Pernambuco-PE (coordenadas geográficas de 08° 59' 49" S e 40° 16' 19" W) em novembro de 2019. O material vegetal teve sua identidade botânica confirmada e uma exsicata do material vegetal depositada sob o número 55.150, no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

1.2. Extração do óleo essencial

Neste processo, foram utilizados 600 g de folhas frescas. O material foi limpo e triturado em moinho de facas (Tecnal TE-625), posteriormente dividido em três porções contendo 200 g de material, sendo cada partição submetida à Hidrodestilação (HD) por 3 horas em aparelho tipo Clevenger. Após a hidrodestilação, o excesso de água foi removido com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), e o cálculo do rendimento foi obtido com base na quantidade de material utilizado no processo e na massa obtida % (m/m). O óleo essencial obtido foi armazenado sob refrigeração a -4°C protegido da luz para posterior análise.

1.3. Análise química do óleo essencial

A caracterização dos compostos foi realizada de acordo com De Veras et al., (2020) analisados no Cromatógrafo a Gás Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA) série 5975C, com sistema de detecção de quadrupolo equipado com coluna apolar DB-5 Agilent J&W, (60 m × 250 m de diâmetro interno × 0,25 m de espessura de filme). Aliquotas de 1 µL em modo split (1:50) do óleo essencial na concentração de 3000 ppm foram injetadas no Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectrometria de Massa (CG-

EM). Posteriormente, 1 µL em split (1:50) da mistura de padrões de hidrocarbonetos: C9-C30 foi injetado. A mistura de óleo essencial e a mistura de padrões de hidrocarbonetos, 1 µL (0,2 µL de alcanos e 0,8 µL de óleo) foram então injetados sob o modo splitless. A temperatura do CG foi mantida a 60°C por 3 min, depois aumentando de 2,5°C.min⁻¹ até 240°C e mantida por 10 min nessa temperatura. O fluxo de hélio foi mantido a uma pressão constante de 100 kPa. A interface EM foi ajustada a 200°C e o injetor a 250°C e os espectros de massa registrados a 70 eV (no modo EI) com uma taxa de varredura de 0,5 varredura s⁻¹ de 20-350 m/z. A partir da análise dos Tempos de Retenção (TR) dos compostos presentes na amostra de óleo essencial, dos padrões de hidrocarbonetos e da combinação do óleo essencial com a mistura padrão, foram calculados os Índices de Retenção (IR) para cada componente do óleo. Os compostos foram identificados comparando seus espectros de massa (MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integrado ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) e Índice de Retenção com os padrões autênticos disponíveis no Adams (2017). A amostra de óleo foi quantificada em Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG-DIC), sob as mesmas condições de CG-EM, em triplicata para cálculo do desvio padrão da porcentagem da área de pico de cada composto no cromatograma. Isso foi usado para determinar a proporção dos compostos no óleo essencial.

1.4. Atividades antioxidante

1.4.1. Ensaio de eliminação de radicais ABTS

A atividade antioxidante do ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) foi avaliada conforme descrito por De Veras et al. (2020) com modificações. Inicialmente, o radical ABTS foi formado a partir da reação da solução estoque 7 mM de ABTS com persulfato de potássio 140 mM. Diluições de óleo essencial foram misturadas com solução etanólica de ABTS. O análogo da vitamina E (Trolox®) e Hidroxitolueno Butilado (BHT) foram utilizados como controles positivos e etanol com branco. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(A_{734b} - A_{734a}) / (A_{734b})] \times 100$, onde A_{734b} é a absorbância do branco e A_{734a} é a absorbância das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As concentrações das amostras responsáveis por 50% de diminuição da atividade inicial do radical livre ABTS (IC₅₀) foram calculadas por meio de regressão linear.

1.4.2. Ensaio de eliminação de radicais DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de radicais livres DPPH (2,2-Difenil-1-PicrilHidrazil) foi realizada conforme descrito por De Veras et al. (2020). Diluições de óleo essencial foram misturadas com solução metanólica 0.2 mM de DPPH. Um análogo da vitamina E (Trolox®) e Hidroxitolueno Butilado (BHT) foram usados como controles positivos e metanol com branco. As misturas foram incubadas no escuro por um período de 30 min a 25°C, então a absorbância foi medida a 517 nm. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(A_{517b} - A_{517a}) / (A_{517b})] \times 100$, onde A_{517b} é a absorbância do branco e A_{517a} é a absorbância das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As concentrações das amostras responsáveis por 50% de diminuição da atividade inicial do radical livre DPPH (IC_{50}) foram calculadas por meio de regressão linear.

1.4.3. Atividade de eliminação de radical hidroxila (OH⁻)

A atividade sequestradora de radicais hidroxila foi investigada usando a reação de Fenton com base na metodologia de Costa et al. (2009) com modificações, ou a geração de radicais hidroxila em tampão fosfato de sódio 150 mM (pH 7,4) utilizando salicilato de sódio 2 mM, H₂O₂ 30%, EDTA 10 mM e FeSO₄7H₂O 10 mM. Diluições de óleo essencial foram adicionadas à mistura. A quercetina foi utilizada como controle positivo e o etanol com branco. As amostras foram misturadas e incubadas a 37 °C por 1 h, e então lidas a 510 nm. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(A_{510b} - A_{510a}) / (A_{510b})] \times 100$, onde A_{510b} é a absorbância do branco e A_{510a} é a absorbância das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As concentrações das amostras responsáveis por 50% de diminuição da atividade inicial do radical hidroxila (IC_{50}) foram calculadas por meio de regressão linear.

1.4.4. Ensaio de eliminação de radical superóxido (O²⁻)

A avaliação foi realizada com base na metodologia de Costa et al. (2009) com modificações, utilizando uma mistura contendo 0,5 mM de riboflavina, 0,375 mM de nitroazul cloreto de tetrazólio (NBT), 0,5 mM de EDTA e 65 mM de metionina, em 50 mM de tampão fosfato pH 7,4. A mistura incubada foi exposta a luz fluorescente (15w) por 15 min e a absorbância lida em 560 nm. A quercetina foi utilizada como controle positivo e o etanol com branco. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(A_{560b} - A_{560a}) / (A_{560b})] \times 100$, onde A_{560b} é a absorbância do branco e A_{560a} é a absorbância das amostras. Todos os ensaios foram realizados em

triplicado. As concentrações das amostras responsáveis por 50% de diminuição da atividade inicial do radical superóxido (IC₅₀) foram calculadas por meio de regressão linear.

1.5. Atividade antimicrobiana

1.5.1. Cepas microbianas e meios de cultura

As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Candida albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* ATCC 10261 foram obtidas da American Type Culture Collection. As cepas de *S. aureus* UFPEDA-709, *P. aeruginosa* UFPEDA-39, *E. coli* UFPEDA 224, *K. pneumoniae* UFPEDA 396 com diferentes perfis de resistência foram obtidas da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. As cepas de *C. albicans* (URM-6366, URM-6542 e URM-5788) com diferentes perfis de resistência foram fornecidas pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. Caldo e Ágar Mueller-Hinton padrão (MHB e MHA) foram usados como meios de cultura bacterianos, e RPM-1640 e Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) foram usados como meios de cultura fúngicos.

1.5.2. Determinação da CIM e CBM

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (MBC) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) foram determinadas contra cepas microbianas testadas de acordo com os protocolos CLSI M100 (2017) e M27 (2008). A CIM foi determinada com inóculos iniciais de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias e fungos. Alíquotas do meio apropriado, soluções de óleo essencial e inóculo foram dispensadas em uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas para bactérias e fungos, respectivamente. A CIM foi detectada usando um método colorimétrico adicionando 10 µL de solução aquosa de resazurina a 0,01% (m/v) em cada poço no final do período de incubação. Para determinação de MBC e MFC, alíquotas de 10 µL de cada poço foram transferidas para placas de Petri contendo MHA ou SDA para bactérias e fungos, respectivamente (Da Silva et al., 2020). Como controle positivo, utilizou-se a droga padrão Amoxicilina (Aldrich-Sigma) e Fluconazol (Aldrich-Sigma). O meio de cultura e o DMSO (solvente usado para dissolver o óleo essencial) foram usados como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

1.5.3. Avaliação do efeito modulador

A interação antimicrobiana entre Amoxicilina ou Fluconazol e óleo essencial de *A. cearensis* foi estudada pelo método do tabuleiro de xadrez segundo a metodologia de Brandt et al. (2010). O óleo essencial foi testado nas concentrações de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64 das CIMs obtidas. Diluições de Amoxicilina ou Fluconazol também foram obtidas correspondendo a 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 e 1/ 1024 dos MICs obtidos. Aliquotas de 50 µL de óleo essencial foram adicionadas aos poços da placa na orientação horizontal e alíquotas de 50 µL das diluições de Amoxicilina ou Fluconazol foram adicionadas na orientação vertical para que a placa contivesse várias combinações de concentração dos dois compostos. Controles de crescimento positivos (para avaliar a presença de turbidez) foram realizados em poços que não continham antimicrobiano. Além disso, o controle de crescimento negativo foi aplicado em uma placa de 96 poços. Em seguida, cada poço foi adicionado 10 µL de inóculo bacteriano aos poços e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Ao final do crescimento, foram adicionados 10 µL de uma solução de resazurina (0,01%) para verificar a presença e/ou ausência de crescimento bacteriano. Todos os testes serão realizados em triplicata. Após a incubação, 10µL de resazurina foi adicionado a todos os poços e novamente cultivado a 37°C por 2h. O crescimento no meio é indicado pela mudança de cor de azul para rosa. A análise de combinação foi obtida calculando o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (**ICIF**) usando a seguinte fórmula (Van vuuren et al., 2009):

CIF de óleo essencial = CIM do óleo essencial em combinação Amoxicilina ou Fluconazol / CIM do óleo essencial sozinho;

CIF da Amoxicilina ou Fluconazol = CIM de Amoxicilina ou Combinação de Fluconazol com óleo essencial / CIM de Amoxicilina ou Fluconazol isolado;

ICIF=**CIF** do óleo essencial + **CIF** de Amoxicilina ou Fluconazol.

Os tipos de efeito foram classificados da seguinte forma: ICIFs ≤0,5, sinergismo; ICIFs 0,5 ≤1, efeito aditivo; ICIFs >1–4, efeito indiferente e ICIFs ≥4, antagonismo.

Referências

Brandt, A.L., Castillo, A., Harris, K.B., Keeton, J.T., M.D. Hardin, Taylor, T.M. 2010. Inhibition of listeria monocytogenes by food antimicrobials applied singly and in combination J. Food Sci., **75**, M557-M563.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (27st ed) Wayne: M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute (2017).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts (3st ed) Wayne: M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).
- Costa, E.V., Pinheiro, M.L.B., Silva, J.R.A., Maia, B.H.L.N.S., Duarte, M.C.T., Amaral, A.C.F., Leon, L.L. 2009. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Química Nova*, 32(1), 78–81. doi.org/10.1590/S0100-40422009000100015
- Da Silva, G.C., de Veras, B.O., de Assis, C.R.D., Navarro, D.M. do A.F., Diniz, D.L.V., Brayner Dos Santos, F.A., de Aguiar, J.C.R. de O.F., da Silva, M.V., Dos Santos Correia, M.T. 2020. Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic effects with conventional antibiotics under clinical isolates by essential oil of *Hymenaea rubriflora* Ducke (FABACEAE). *Natural product research*, 0, 1–5. doi.org/10.1080/14786419.2020.1729150
- De Veras, B.O., Oliveira, M.B.M., Oliveira, F.G.S., Santos, Y.Q., Oliveira, J.R.S., Lima, V.L.M., Almeida, J.R.G., Navarro, D.M.A.F., Aguiar, J.C.R.O., Aguiar, J.S., Gorlach-Lira, K., Assis, C.R.O.F., Silva, M.V., Lopes, A.C.S. 2020. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 247, 112265. doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265
- Ghramh, H. A., Khan, K. A., Ibrahim, E. H. 2019. Biological Activities of *Euphorbia peplus* Leaves Ethanolic Extract and the Extract Fabricated Gold Nanoparticles (AuNPs). *Molecules*, 24 (7), 1431. doi.org/10.3390/molecules24071431
- Van vuuren, S.F., Suliman, S., Viljoen, A.M. 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48, 440-446.

Tabelas

Table 1 – Composição química do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*) por CG-EM e CG-DIC, destacando em negrito os componentes majoritários.

Pico	Composto	Índices de retenção		%	D.P.
		Cal	Lit		
1	δ -elemene	1335	1339	0.27	0.03
2	Trans- β -elemene	1389	1393	1.07	0.02
3	α -gurjunene	1409	1411	1.41	0.05
4	(E)-caryophyllene	1417	1421	5.55	0.04
5	γ -elemene	1434	1435	1.18	0.02
6	α -humulene	1452	1455	1.22	0.03
7	alloaromadendrene	1460	1463	0.64	0.01
8	germacrene D	1480	1483	1.95	0.02
9	β -selinene	1489	1488	2.26	0.02
10	bicyclogermacrene	1500	1499	4.13	0.03
11	germacrene A	1508	1507	0.75	0.01
12	cubebol	1514	1518	0.16	0.01
13	7-epi- α -selinene	1522	1520	0.22	0.01
14	δ -cadinene	1522	1526	0.30	0.01
15	α -cadinene	1537	1541	0.62	0.01
16	elemol	1548	1552	0.89	0.02
17	germacrene B	1559	1561	17.74	0.06
18	palustrol	1567	1570	0.37	0.03
19	spathulenol	1577	1580	0.47	0.01
20	viridiflorol	1592	1594	0.23	0.01
21	trans- β -elemenone	1602	1606	3.13	0.02
22	γ -eudesmol	1630	1635	0.39	0.01
23	α -muurolol	1644	1645	1.48	0.02
24	α -cadinol	1652	1658	2.02	0.01
25	germacrone	1693	1702	46.76	0.15
Monoterpenos de hidrocarbonetos (MH)				–	
Monoterpenos oxigenados (MO)				–	
Hidrocarbonetos sesquiterpenos (HS)				39.31	
Oxygenated sesquiterpenes (SO)				55.90	

TOTAL	95.21
--------------	-------

Cal- Índices de retenção calculados; Lit- Índices de retenção Literatura; (%) - Conteúdo percentual; D.P. Desvio padrão.

Table 2 – Atividade antioxidante do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*) expressa em IC₅₀ (µg/mL).

Amostras	Metodos (IC ₅₀)			
	ABTS ⁺	DPPH ⁺	OH [•]	O ₂ ^{•-}
Trolox [®]	129,49±0,22 ^a	63,71±0,12 ^a	N.T.	N.T.
BHT	336,82±0,15 ^c	228,20±0,21 ^c	N.T.	N.T.
Quercetina	N.T.	N.T.	33,61±0,23 ^a	28,29±0,23 ^a
OE <i>A. cearensis</i>	298,23±0,11 ^b	183,89±0,12 ^b	324,86±0,49 ^b	234,38±0,12 ^b

^{abc} Diferentes letras minúsculas sobrescritas significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni. ABTS: 2',2-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato); DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil; OH[•]: radical hidroxilo; O₂^{•-}: radical superóxido; BHT: Hidroxitolueno Butilado; N.T. - Não testado.

Table 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) em (µg/mL) do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*). N.T. - Não testado.

Cepas	Fluconazol		Amoxicilina		OE <i>A. cearensis</i>	
	CIM	CFM	CIM	CBM	CIM	CBM/CFM
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	N.T.	N.T.	16	32	256	512
<i>S. aureus</i> UFPEDA-709	N.T.	N.T.	128	256	512	1024
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	N.T.	N.T.	256	512	128	256
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-39	N.T.	N.T.	512	1024	128	256
<i>E. coli</i> ATCC 8739	N.T.	N.T.	128	256	64	128
<i>E. coli</i> UFPEDA- 224	N.T.	N.T.	512	1024	128	256
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	N.T.	N.T.	128	256	256	512
<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA-396	N.T.	N.T.	128	256	512	1024
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16	32	N.T.	N.T.	128	256
<i>C. albicans</i> ATCC 10261	8	16	N.T.	N.T.	128	256
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6366	128	256	N.T.	N.T.	512	1024
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6542	64	128	N.T.	N.T.	256	512
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 5788	256	512	N.T.	N.T.	1024	512

Table 4 – Efeitos combinados do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*), fluconazol e amoxicilina.

Cepas	Fluconazol			Amoxicilina			OE <i>A. cearensis</i>			Resultado	
	CIM _I	CIM _{II}	CIF	CIM _I	CIM _{II}	CIF	CIM _I	CIM _{II}	CIF	ICIF	Classificação
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	N.T.	N.T.	N.A.	16	2	0.125	256	64	0.25	0.375	Sinergico
<i>S. aureus</i> UFPEDA-709	N.T.	N.T.	N.A.	128	32	0.25	512	32	0.0625	0.3125	Sinergico
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	N.T.	N.T.	N.A.	256	64	0.25	128	16	0.125	0.375	Sinergico
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-39	N.T.	N.T.	N.A.	512	512	1	128	32	0.25	1.25	Indiferente
<i>E. coli</i> ATCC 8739	N.T.	N.T.	N.A.	128	32	0.25	64	32	0.5	0.75	Aditivo
<i>E. coli</i> UFPEDA- 224	N.T.	N.T.	N.A.	512	512	1	128	32	0.25	1.25	Indiferente
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	N.T.	N.T.	N.A.	128	64	0.5	256	128	0.5	1	Aditivo
<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA-396	N.T.	N.T.	N.A.	128	128	1	512	512	1	2	Indiferente
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16	8	0.5	N.T.	N.T.	N.A.	128	64	0.5	1	Aditivo
<i>C. albicans</i> ATCC 10261	8	8	1	N.T.	N.T.	N.A.	128	32	0.25	1.25	Indiferente
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6366	128	32	0.25	N.T.	N.T.	N.A.	512	128	0.5	0.75	Aditivo
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6542	64	64	1	N.T.	N.T.	N.A.	256	64	0.25	1.25	Indiferente
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 5788	256	32	0.125	N.T.	N.T.	N.A.	1024	256	0.25	0.375	Sinergico

N.T. - Não testado; N.A. – Não Aplicável; CIM_I: CIM do óleo essencial ou antibiótico isolado (µg/ml); CIM_{II}: CIM do antibiótico ou óleo essencial em combinação (µg/ml); CIF: concentração inibitória fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória da Fração.

ARTIGO 2: Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. em camundongos

1. Introdução

Os medicamentos fitoterápicos podem promover efeitos benéficos à saúde humana, sendo utilizados de forma indireta, abrangendo mais de 80% da população mundial que utiliza plantas ou produtos provenientes delas para prevenir diversas doenças (Jamshidi-Kia et al., 2018). Pesquisas recentes voltadas ao uso de plantas terapêuticas fazem parte do estudo da etnobotânica e permitiram o acesso a um amplo conhecimento vinculado ao uso de plantas na medicina popular no Brasil (De Veras et al., 2021; De Veras et al., 2020; Coelho-De-Souza et al., 2018; Ribeiro et al., 2014; Cartaxo et al., 2010).

O Brasil é conhecido pela maior biodiversidade do mundo, abrigando aproximadamente 20% do total de espécies existentes com alto grau de endemismo (Ribeiro et al., 2014). Esse patrimônio está dividido entre os biomas brasileiros e um deles, o bioma Caatinga (região semiárida) abrange um amplo território na região nordeste do Brasil e abriga muitas plantas utilizadas na medicina tradicional e também na fabricação comercial de produtos fitoterápicos (Silva et al., 2012; De Albuquerque et al., 2007). Dentre os estudos etnobotânicos no semiárido brasileiro, a família Fabaceae se destaca pela alta representatividade de suas espécies e diversidade na maioria dos estudos envolvendo plantas medicinais (Macedo et al., 2018; Cartaxo et al., 2010; De Albuquerque et al., 2007).

Amburana cearensis (Allemão) B.C. Smith (Fabaceae) (sin. *Torresea cearensis* Fr. All) é uma espécie vegetal com ampla distribuição na América do Sul (Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Peru), com maior distribuição na Caatinga e Cerrado do Brasil. No semiárido é popularmente conhecida como "cumarú", "cumarú de cheiro", "imburana", "imburana de cheiro", "amburana" ou "amburana de cheiro", considerada uma espécie ameaçada devido à alta exploração de sua madeira que apresenta alta resistência e durabilidade (Oliveira et al., 2019; Seleme et al., 2015; Figueredo et al., 2013; Canuto et al., 2010).

É considerada uma importante planta medicinal em estudos etnobotânicos, pois possui poderes curativos para diversas doenças (Canuto et al., 2014; Lima et al., 2013; Albuquerque e Oliveira, 2007). É comum o uso de preparações como infusões, chás,

decocções, banhos, tinturas e inalações utilizando as cascas do caule e da raiz, folhas, frutos e sementes (Macedo et al., 2018; Bitu et al., 2015; Costa e Marinho, 2016; Oliveira et al., 2010), para o tratamento de doenças como sinusite, gripe, doenças respiratórias, inflamações, dores generalizadas, dor de cabeça, problemas gástricos e intestinais, cicatrização de feridas, infecção do trato urinário, hipertensão, febre picada de cobra, dores musculares, tranquilizante, dor de dente, náusea, dor articular, depurativo, infecção renal, inflamação da pele, inflamação ginecológica, dor nas costas e febre, entre outros (Albergaria et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Macedo et al., 2018; Pereira et al., 2017; Bitu et al., 2015; Baptistel et al., 2014; Monteiro et al., 2014; Silva et al., 2012; Marinho, 2004).

Várias atividades desta espécie foram avaliadas, como antioxidante e antitumoral do extrato hidroalcoólico do caule (Lataliza et al., 2019), efeito antimicrobiano da casca do caule (Ferreira et al., 2020; Sá et al., 2011), antimicrobiano e modulador do efeito antibiótico dos extratos de sementes e folhas (Figueredo et al., 2013), anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico da casca do caule (Leal et al., 2003), neuroprotetor dos extratos hexano, etanol, diclorometano e acetato de etila, de sementes (Pereira et al., 2017), atividades antiedematogênicas, antimicrobianas e mutagênicas do extrato aquoso de sementes (Lima et al., 2013), atividades antioxidantes de extratos etanólicos e metanólicos de folhas (Dos Santos et al., 2009). No entanto, não há relatos de atividades utilizando o óleo essencial de *A. cearensis*.

O objetivo desse estudo foi validar as atividades etnofarmacológicas atribuídas à espécie e suas diferentes formas de uso, utilizando os compostos voláteis obtidos de suas folhas (óleo essencial), para investigar as atividades anti-inflamatórias, antinociceptivas e a segurança toxicológica.

2. Material e métodos

2.1. Modelo experimental *in vivo* e procedimentos éticos

Machos e fêmeas (30–32 g) de camundongos Swiss albino (*Mus musculus*) foram obtidos do biotério central do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-Lika/UFPE. Os animais foram aclimatados em gaiolas com fundo sólido de polipropileno (tamanho: 18 cm x 34 cm x 41 cm) com cama de madeira, sob condições ambientais padrão de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro 12/12, e alimentados com a ração padrão e água potável *ad libitum*. O protocolo de experimentação animal foi realizado seguindo as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação

Animal do Brasil (CONCEA) e Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS). Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, sob o nº 30/2020.

2.1.1. Teste de toxicidade aguda e dose letal mediana

Estudos de toxicidade aguda para avaliar a segurança foram realizados usando a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2002). Primeiramente, albinos suíços (fêmea) foram divididos em quatro grupos ($n = 3$), e tratados por via oral (v.o.) por gavagem com 100 μ L das seguintes doses de óleo essencial: 5, 50, 300 e 2.000 mg/kg. Os animais foram observados aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o tratamento oral e diariamente por 14 dias. Seu peso e alimentos ingeridos foram registrados diariamente, bem como possíveis sinais de alteração, como tremores, convulsões, salivação, piloereção, hiperatividade, sangramento, entre outros indicadores de toxicidade. A mortalidade também foi avaliada por 14 dias e a DL50 também foi calculada.

2.1.2. Avaliação do efeito antinociceptivo

2.1.2.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Radulović et al. 2015. Foram utilizados seis grupos experimentais ($n = 6$) de camundongos machos, com os seguintes tratamentos: veículo (solução salina 0,9%, m/v; v.o.), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg; v.o.) e indometacina (20 mg/kg; v.o.); grupo morfina (10 mg/kg) recebeu tratamento via intraperitoneal (i.p.). Após 30 min (para morfina) ou 60 minutos (para os outros grupos) ácido acético (0,8%, v/v) (10 mL/kg) foi injetado intraperitonealmente (i.p.) para estimular a nocicepção. Após a estimulação, os animais foram colocados dentro de uma câmara de observação (15 cm de diâmetro e 20 cm de altura) equipada com um espelho inclinado a 45° abaixo da câmara e aguardaram 5 minutos para avaliar a intensidade da nocicepção, que foi quantificada pelo número de contorções durante 15 min de observação, sendo expressa em relação ao número de contorções abdominais.

2.1.2.2. Teste de formalina

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Tjølsen et al. (1992). Foram utilizados seis grupos experimentais ($n = 6$) de camundongos machos, com os seguintes tratamentos: veículo (solução salina 0,9%, m/v; v.o.), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg; v.o.) e indometacina (20 mg/kg; v.o.); grupo morfina (10

mg/kg) recebeu tratamento via intraperitoneal (i.p.). Após 30 minutos (para morfina) ou 60 minutos (para os demais grupos), a nocicepção foi induzida por injeção subplantar (i.pl.) de formalina 2,5% (v/v) (20 µL) na pata traseira esquerda. Após a injeção de formalina, os animais foram transferidos para uma câmara de observação (15 cm de diâmetro e 20 cm de altura) equipada com um espelho inclinado a 45° abaixo da câmara, e observados de 0 a 5 min (primeira fase, fase neurogênica) e 15 a 30 min (segunda fase, fase inflamatória) em relação ao tempo gasto em segundos(s) lambendo ou mordendo a pata que recebeu o agente nociceptor.

Para verificar a ação antinociceptiva do OE *A. cearensis* sobre os sistemas de canais de potássio opióides, colinérgicos, adenosinérgicos, dopaminérgicos e ATP-sensíveis (K-ATP), os antagonistas farmacológicos Naloxona (5 mg/kg, i.p.), Atropina (5 mg/kg, i.p.), Cafeína (10 mg/kg, i.p.), Haloperidol (1 mg/kg, i.p.) e Glibenclamida (10 mg/kg, i.p.), respectivamente, foram injetados 30 min antes do tratamento dos grupos com óleo essencial (100 mg/kg, v.o.) ou os agonistas farmacológicos Morfina (10 mg/kg; i.p.), Acetilcolina (1 mg/kg; i.p.), Adenosina (100 mg/kg; i.p.), Apomorfina (8 mg/kg; i.p.) e Diazóxido (3 mg/kg; i.p.) (De (De Lavor et al., 2018). Após os tratamentos, formalina a 2,5% (20 µL/pata) foi injetada na pata traseira direita dos camundongos. Tempo de lambida da pata foi registrado, em segundos, de 0 a 5 min (fase neurogênica) e de 15 a 30 min (fase inflamatória) após a administração da formalina.

2.1.3. Atividade anti-inflamatória

2.1.3.1. Edema de pata induzido por carragenina

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Ou et al. 2019. Os camundongos machos foram divididos em cinco grupos (n = 6), sendo tratados por via oral (p.o.) por gavagem com 100 µL de veículo (solução salina 0,9%, m/v; v.o.), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg; v.o.) ou indometacina (20 mg/kg; v.o.). Após 1 hora, os animais receberam carragenina 1% (p/v) (20 µL/pata) na pata traseira direita e soro fisiológico (0,9%, p/v), (20 µL/pata) na pata esquerda. O volume da pata traseira direita e esquerda de cada animal foi registrado com o auxílio de um paquímetro após 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção de carragenina. A inibição do edema foi calculada por (pata direita - pata esquerda) e expressa em mm.

2.1.3.2. Edema de pata induzido por histamina

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Cavalher-Machado et al. 2008. Os camundongos machos foram divididos em cinco grupos ($n = 6$), sendo tratados por via oral (p.o.) com 100 μ L de veículo (solução salina, 0,9% (m/v)), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg; v.o.) ou prometazina (6 mg/kg; v.o.). Após 60 minutos, os animais receberam histamina 1% (p/v) (20 μ L/pata) na pata traseira direita e soro fisiológico (0,9%, m/v) (20 μ L/pata) na pata esquerda. A inibição do edema foi calculada por (pata direita - pata esquerda) e expressa em mm.

2.1.3.3. Peritonite induzida por carragenina

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia de Longhi-Balbinot et al. (2012). Os camundongos (machos) foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos ($n=6$), sendo: sham (não recebeu tratamento), veículo (solução salina, 0,9% (m/v)), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg; v.o.) e indometacina (20 mg/kg; v.o.). Após 60 minutos, carragenina a 2% (p/v) (750 μ g/poço) foi injetada na cavidade intraperitoneal (i.p.), para indução de peritonite. Quatro horas após a administração de carragenina, os animais foram eutanasiados e 3 mL de PBS heparinizado gelado (10 UI/ml) foram injetados na cavidade peritoneal. Após 30 s de massagem manual, o exsudato foi recuperado. Para a contagem total de leucócitos, 1 mL de líquido peritoneal foi misturado com 0,2 mL de solução de Turk (30 mL de ácido acético, 100 mL de água destilada e 100 mL de azul de metileno) e uma alíquota foi colocada no Neubauer e a migração leucocitária foi realizada com o auxílio de um microscópio binocular.

Alíquotas do líquido peritoneal também foram utilizadas para quantificação de TNF- α e IL-1 β utilizando o Kit Mouse Cytokines ELISA, High Sensitivity in ELISA, Thermo Fisher (Waltham, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

2.1.3.4. Pirexia induzida por levedura

A atividade foi realizada de acordo com a metodologia modificada de Sobeh et al. 2019. Os camundongos machos foram distribuídos em cinco grupos ($n = 6$). Inicialmente, a temperatura retal foi registrada antes da suspensão de levedura de cerveja (20% m/v) por via subcutânea s.c. (20 mL/kg). Após 18 h, foram selecionados para o estudo os animais que apresentaram aumento da temperatura retal basal média entre 38,0 e 39,0 °C. Os grupos foram tratados por via oral (v.o.) por gavagem com 100 μ L de veículo (solução salina, 0,9% (m/v)), óleo essencial de *A. cearensis* (25, 50 e 100 mg/kg; v.o.) ou dipirona (100 mg/kg; v.o.). A temperatura retal foi aferida em intervalos

de 1, 2, 3 e 4 horas após a administração das amostras, utilizando-se termômetro digital lubrificado.

2.2. Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism® (versão 8.4.3; San Diego Califórnia EUA). A análise estatística foi feita usando ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Os dados foram expressos em média±DP. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados e discussão

3.1. Teste de toxicidade aguda e dose letal mediana

Segundo a FDA, muitos óleos essenciais são conhecidos como substâncias GRAS (Generally Recognized Safe), porém, como muitas espécies medicinais podem apresentar efeitos tóxicos, é importante que sejam realizados estudos para avaliar sua segurança antes de avaliar seu potencial terapêutico (Stojanović e outros, 2019).

Neste estudo, o óleo essencial de *A. cearensis* foi investigado quanto à toxicidade aguda por meio da determinação da dose letal mediana (DL₅₀) e mudanças no comportamento em camundongos. Esses resultados estão resumidos na Tabela 1. Observou-se que o óleo essencial não apresenta dose letal mediana (DL₅₀) até a concentração de 2.000 mg/kg administrado por via oral, pois não causa mortalidade em camundongos, bem como alterações significativas no comportamento animal, aparência geral ou quaisquer sinais de toxicidade, podendo este óleo ser classificado como não tóxico segundo a OCDE (2002).

Aqui, os resultados relacionados à mortalidade e alterações comportamentais pelo óleo essencial de *A. cearensis* são comparáveis aos registros encontrados na literatura em que seus constituintes são considerados seguros (Oliveira et al., 2017; Kong et al., 2017). Óleos essenciais contendo compostos químicos importantes em comum com EO *A. cearensis* foram descritos como seguros. O OE *Hyptis fruticosa* tem como compostos majoritários o biciclogermacreno (12,32%), cariofileno (8,82%), germacreno (3,26%) e não apresenta toxicidade em concentrações até 5.000 mg/kg, administrado por via oral, fato que pode viabilizar sua aplicação como potencial antinociceptivo (Menezes et al., 2007). O OE *Verbesina macrophylla* possui atividades anti-inflamatória e antipirética, apresentando entre seus constituintes cariofileno (9,88%) e biciclogermacreno (11,33%) e o óleo essencial não apresentou toxicidade aguda até a dose de 5.000mg/kg, p.o. (De Veras et al., 2021). O óleo essencial de

Ageratum fastigiatum, com germacreno como composto majoritário (24,15%), apresentou DL₅₀ de 2.500 mg/kg (Del-Velchio-Vieira et al., 2009).

3.2. Avaliação do efeito antinociceptivo

3.2.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético

A dor é relatada como o sintoma mais comum nas doenças, e apesar da existência de medicamentos analgésicos, há grande preocupação com o controle inadequado da dor, além das inúmeras reações adversas que esses compostos podem trazer, como a dependência química e isso requer o desenvolvimento de novos medicamentos, com eficácia e segurança (Volkow e McLellan, 2016; Rathmell e Fields, 2015). Estudos recentes mostraram que produtos naturais, como óleos essenciais, são algumas das fontes mais importantes de descoberta de medicamentos para o controle da dor, pois possuem compostos químicos que podem bloquear ou ativar receptores nociceptivos, entre outros mecanismos (Jamshidi-Kia et al., 2018; Arulselvan et al., 2016; Barreto et al., 2016).

O teste de contorções induzidas por ácido acético tem sido amplamente utilizado como ferramenta de triagem para avaliar as propriedades analgésicas de diversos produtos. É um modelo de nocicepção inespecífica, causando sensibilização periférica em animais por liberação indireta de mediadores nociceptivos endógenos, sendo amplamente utilizado para detectar a antinocicepção de anormalidades centrais, como opioides e periféricas, como AINEs (Barreto et al., 2016; Hossain et al., 2015; Ramezani et al., 2001).

Os resultados sobre a atividade antinociceptiva do OE *A. cearensis* apresentados na Figura 1, mostram que o óleo essencial inibiu significativamente a nocicepção induzida pelo ácido acético de forma dose-dependente. Observou-se que nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg o óleo essencial reduziu significativamente as contorções abdominais em 69,38%, 82,04% e 93,87%, nas doses de 50 e 100 mg/kg, o efeito foi estatisticamente superior ao de referência fármaco indometacina (20 mg/kg), que promoveu 60,03% de inibição quando comparado ao grupo controle.

Os compostos presentes no OE *A. cearensis* podem ser encontrados em outra espécie de planta, que também apresentou efeito antinociceptivo. Hossain et al. (2015) verificaram que a germacrona é o princípio ativo da atividade antinociceptiva do rizoma de *Curcuma aeruginosa*, com inibição de 22,66%, 34,77% e 51,17% em relação ao número de contorções induzidas pelo ácido acético nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg,

respectivamente. O OE *Hymenaea cangaceira* tem atividade antinociceptiva, reduzindo as contorções em 76% na dose de 100 mg/kg, com cariofileno (23,38%) e germacreno (14,46%) em comum com OE *A. cearensis* (De Veras et al., 2020). O OE de *Pterodon polygalaefloru* apresenta cariofileno em sua composição (19,51%), e reduziu o número de contorções em mais ou menos 50% (Coelho-De-Souza et al., 2018). O OE de *A. fastigiatum*, com germacreno (24,15%) como composto majoritário, reduziu a nocicepção em 7,32%, 12,19% e 30,29% nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg, respectivamente. (Del-Velchio-Vieira et al., 2009). O OE de *Hyptis fruticosa* presente reduz em 27,3%, 26,6% e 35,7% a nocicepção na contorção abdominal induzida pelo ácido acético nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, tendo como princípios ativos biciclogermacreno (12,32%) e cariofileno (8,82%) (Menezes et al., 2007).

3.2.2. Teste de formalina

O tratamento com OE *A. cearensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg reduziu significativamente o tempo de lambida na primeira fase (neurogênica) em 29,558%, 53,45% e 72,95%, respectivamente. Na segunda fase (inflamatória), o essencial também promoveu inibição significativa da nocicepção induzida pela formalina em 61,68%, 74,49% e 86,95%, respectivamente. Em ambas as fases o OE *A. cearensis* apresentou atividade dose-dependente. A morfina (10 mg/kg) reduziu a resposta nociceptiva tanto na primeira (81,76%) quanto na segunda fase (96,20%), enquanto a indometacina (20 mg/kg) produziu um baixo efeito antinociceptivo na primeira fase (10,06%). e redução significativa na segunda fase (69,63%) (Figura 2).

O teste da formalina é um dos experimentos mais utilizados para avaliar os efeitos antinociceptivos de drogas, sendo dividido em duas fases. A primeira fase (neurogênica) consiste na nocicepção neurogênica não relacionada à inflamação, na qual os sinais de dor são transmitidos por estimulação direta de nociceptores via fibras C para o corno dorsal da medula espinhal após a substância P ser secretada e atuar como neurotransmissor. Na segunda fase (inflamatória), a dor é gerada como resultado de reações inflamatórias no tecido lesado pela formalina, a partir da qual estimula a liberação de histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (PGs) e provoca o processo doloroso (Li et al., 2018; Rosland et al., 1990; Shibata et al., 1989).

Drogas de ação central, como analgésicos opioides, inibem ambas as fases do teste de formalina, porém drogas de ação periférica, como anti-inflamatórios, só são eficazes na segunda fase (Mohammadifard e Alimohammadi, 2018; Somchit et al.,

2004; Shibata et al., 1989). Nossos resultados mostraram que o OE *A. cearensis* reduziu a resposta dolorosa de ambas as fases do teste de formalina de forma dose-dependente, mostrando um efeito antinociceptivo nos níveis central e periférico, o que também implica que o óleo essencial tem não apenas antinociceptivo, mas também anti-inflamatório.

Os possíveis mecanismos pelos quais o OE *A. cearensis* produz um efeito antinociceptivo foram investigados. O antagonista Naloxona (5 mg/kg, i.p) não alterou o efeito antinociceptivo do OE *A. cearensis* (100 mg/kg) em ambas as fases do teste, porém reverteu o efeito da morfina (10 mg/kg, i.p) (Figura 3A e B). O efeito reverso foi verificado com atropina (5 mg/kg, i.p.) que inibiu o efeito antinociceptivo do OE *A. cearensis* (100 mg/kg) e do agonista Acetilcolina (1 mg/kg) em ambas as fases (Figura 4A e B). A cafeína (10 mg/kg, i.p.) também reverteu o efeito antinociceptivo do OE *A. cearensis* e do agonista Adenosina (100 mg/kg) em ambas as fases (Figura 5A e B). O antagonista Haloperidol (1 mg/kg) inibiu o efeito antinociceptivo do agonista apomorfina (8 mg/kg), porém não alterou o efeito do OE *A. cearensis* (Figura 6A e B). Glibenclamida (10 mg/kg) mostrou ter a capacidade de inibir significativamente o efeito antinociceptivo do óleo essencial e do agonista Diazóxido (3 mg/kg) (Figura 7A e B). Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que o óleo essencial de *A. cearensis* possui efeito antinociceptivo em nível central e periférico, tendo como mecanismos de ação os sistemas colinérgicos, adenosinérgicos e canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP).

Do ponto de vista mecanicista, a atividade antinociceptiva do OE *A. cearensis* pode ser atribuída aos inúmeros constituintes químicos presentes em sua composição, os quais são capazes de exercer efeitos antinociceptivos por meio de diversos mecanismos. Santos et al. (2005) verificaram que o óleo essencial de *Croton sonderianus* possui em sua composição biciclogermacreno e (E)-cariofileno, e tem efeito antinociceptivo com mecanismo de ação relacionado a canais de potássio sensíveis a ATP (K+ATP). Saldanha et al. (2019) investigaram a composição química do óleo essencial de *Duguetia furfuracea* e efeito antinociceptivo, sendo observados efeitos antinociceptivos em ambas as fases no teste de formalina, tendo como mecanismo de ação os sistemas adenosinérgico e opioidérgico, tendo o óleo os compostos biciclogermacreno e E-cariofileno em comum com EO *A. cearensis*. O cariofileno, que tem efeitos potentes contra a dor aguda e neuropática, pode atuar nos canais de K⁺, ou como agonista

seletivo dos receptores CB2, induzindo a liberação de precursores de queratinócitos peptídicos endógenos β -endorfinas, levando à ativação de receptores μ -opioides nos queratinócitos. neurônios aferentes primários e, conseqüentemente, analgesia (Paula-Freire et al., 2014).

Outros estudos foram realizados a fim de verificar os possíveis mecanismos de ação dos componentes isolados do óleo essencial de *Amburana cearensis*, bem como verificar se há efeitos cumulativos aos antagonistas desses compostos tanto no efeito antinocicetipo, quanto como nos mecanismos de ação (Mohammadifard e Alimohammadi, 2018; Hossain et al., 2015; Paula-Freire et al., 2014).

3.2.3. Atividade anti-inflamatória

3.2.3.1. Edema de pata induzido por carragenina

Os resultados relacionados à atividade anti-inflamatória são mostrados na Figura 8. Na figura 8A é possível observar que o OE *A. cearensis* teve efeito anti-inflamatório com redução do edema de pata em todas as doses testadas, de forma dose-dependente maneira, mostrando um efeito superior à indometacina mesmo no intervalo de 1, 2 e 3, e estatisticamente igual no intervalo de 4 e 5 horas do teste. A resposta inflamatória total medida como área sob a curva (AUC) foi significativamente reduzida em camundongos tratados com EO *A. cearensis* em dose dependente, reduzindo a AUC em 77,09%, 93,12 e 98,11% nas doses de 25, 50 e 100 mg /kg, respectivamente, em relação ao grupo controle, enquanto a droga indometacina reduziu a AUC em 64,38%, também em relação ao grupo controle (Figura 8B)

A resposta inflamatória induzida pela injeção de carragenina pode ser caracterizada em duas fases, na primeira ocorre a liberação de vários marcadores pró-inflamatórios e inicialmente ocorre a liberação de histamina, serotonina e bradicinina, seguida pela segunda fase onde ocorre uma maior atividade de COX e As atividades da sintase do óxido nítrico aumentam, o pico de liberação de moléculas pró-inflamatórias ocorre 2 horas após a injeção, esse processo resultará em exsudação plasmática e migração celular (Mckim et al., 2016; Seibert et al. 1994). Como nossos resultados mostraram que o EO *A. cearensis* reduziu a formação de edema durante 5 horas seguidas, isso sugere que as moléculas do óleo essencial podem inibir mais de uma via de sinalização celular.

O efeito antioxidante de produtos naturais como os óleos essenciais está associado a uma marcada atividade anti-inflamatória, como a inibição da produção de

diferentes citocinas, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucinas IL-6, IL-1 β e IL-13, metaloproteinases (ex: MMP-9), enzimas inflamatórias (ex: COX-2, iNOS, 5-LOX), moléculas de adesão de diapedese (ex: ICAM-1, VCAM-1), quimiocinas (ex: MIP-1, MIP-2) supressão da expressão do receptor-4 toll-like (TLR4) e ativação do fator nuclear do fator de transcrição- κ B (NF κ B), entre outros (Borges et al., 2018; Arulselvan et al., 2016).

A composição do óleo essencial reflete nas atividades biológicas que eles podem induzir e espera-se que as concentrações dos compostos majoritários sejam proporcionais à amplitude da atividade biológica induzida. No entanto, a atividade dos compostos principais pode ser modulada pelos outros compostos menores (Mancianti e Ebani, 2020). O efeito anti-inflamatório do OE *A. cearensis* pode ser atribuído ao efeito sinérgico de todos os constituintes químicos do óleo essencial, principalmente os compostos principais. No presente estudo, a alta concentração de sesquiterpenos pode explicar a alta atividade anti-inflamatória (Sá et al., 2015). Makabe et al., (2006) relataram que a germacrona apresenta potente atividade anti-inflamatória in vivo, mesmo em baixa concentração. O cariofileno é um dos princípios ativos do anti-inflamatório Acheflan® utilizado para processos inflamatórios agudos e crônicos, apresentando notória atividade isolada ou combinada como no óleo essencial de *Cordia verbenacea* (Passos et al., 2007). Saldanha et al. (2019) descobriram que EO *D. furfuracea* tem efeito anti-inflamatório dose-dependente no edema de pata, além de promover a inibição da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), apresentando em comum com o OE *A. cearensis* a presença dos constituintes majoritários biciclogermacreno (16,7%) e cariofileno (4,6%).

3.2.3.2. Edema de pata induzido por histamina

Os resultados relacionados ao teste de edema de pata induzido por histamina são mostrados na Figura 9. Na Figura 9A observa-se que o OE *A. cearensis* apresentou atividade anti-inflamatória com redução do edema de pata em todas as doses testadas, de forma dose-dependente. Nas concentrações de 50 e 100 mg/kg, o EO *A. cearensis* apresentou efeito estatisticamente superior em relação à prometazina padrão em intervalos de tempo de 1, 2, 3 e 4 horas. A conversão dos valores em área sob a curva (AUC) mostrou que o óleo essencial foi eficaz no combate ao processo inflamatório ao longo do tratamento, reduzindo a AUC em 66,67%, 80,60 e 94,84% nas doses de 25, 50

e 100 mg/kg, respectivamente, em relação ao grupo controle. A administração oral de prometazina, antagonista do receptor de histamina 1 (H1), preveniu significativamente a formação de edema de pata com AUC em 63,08%, também em relação ao grupo controle (Figura 9B). Foi demonstrado que o óleo essencial apresentou atividade superior ao fármaco padrão nas doses de 50 e 100 mg/kg, e estatisticamente igual na dose de 25 mg/kg.

A histamina é uma amina vasoativa originada da descarboxilação do aminoácido histidina pela enzima histidina descarboxilase. É produzida por mastócitos adjacentes aos vasos e placas adjacentes a eles, estando entre as primeiras moléculas liberadas após a indução do processo inflamatório (Toriyabe et al., 2004; MacGlashan, 2003; Buske, 1996). Sua liberação ocorre pelo processo de exocitose durante reações alérgicas ou inflamatórias por meio da interação de antígenos com IgE nos mastócitos e fatores do sistema complemento (C3a e C5a). Após lesão tecidual ou em resposta ao estresse, a histamina armazenada em grânulos basofílicos e plaquetas é liberada na corrente sanguínea, concomitantemente à degranulação dos mastócitos (Criado et al., 2010; Maintz et al., 2007; Feitosa et al., 2002).

A administração intraplantar de histamina induz edema principalmente por sua ação nos receptores H1 no tecido vascular, resultando em aumento da vasodilatação e permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de fluidos e proteínas do sangue para os espaços entre os tecidos, resultando na formação de edema (Ghosh et al., 2015; Criado et al., 2010; Toriyabe et al., 2004). De fato, o OE *A. cearensis* reduz significativamente a formação de edema induzido pela administração intraplantar de histamina, suprimindo a liberação de histamina de mastócitos, basófilos ou plaquetas durante a fase aguda, possivelmente por antagonismo dos receptores de histamina.

Óleos essenciais com atividade anti-histamínica observada pelo EO *A. cearensis* têm sido relatados. Santos e Rao (1997) mostraram que o 1,8-cineol, um composto muito presente em diversos óleos essenciais, foi capaz de reduzir o edema de pata causado pela histamina, tendo como mecanismos de ação a redução da degranulação dos mastócitos e a redução da ação da histamina. Oliveira-Tintino et al. (2018) mostraram que o óleo essencial de *Croton campestris* possui constituintes químicos em comum com o OE *A. cearensis*, como β -cariofileno e germacreno-D, e tem efeito anti-histamínico no modelo de edema de pata induzido por histamina, como observado em este estudo. Martins et al. (2017) observaram que o óleo essencial de *Croton*

rhamnifolioides possui efeito anti-histamínico, sendo o β -cariofileno um dos constituintes do óleo essencial. De Oliveira et al. (2021) investigaram o efeito antiedematogênico do óleo essencial obtido das folhas de *Lantana montevidensis*, observando alta atividade nos modelos de edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina ou ácido araquidônico, com efeito anti-histamínico. A composição química do óleo essencial mostrou a presença de biciclogermacreno (16,35%), (E)-cariofileno (12,84%) e germacreno D (12,18%) como constituintes majoritários do óleo essencial, comuns ao OE *A. cearensis*.

Embora existam dados na literatura que demonstrem o potencial anti-histamínico de óleos essenciais que possuem constituintes químicos em comum com o OE *A. cearensis*, não há dados que indiquem essa atividade pela germacrona, sendo necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação.

3.2.3.3. Peritonite induzida por carragenina

Os resultados da infiltração de leucócitos e neutrófilos são apresentados na tabela 2. Ao analisar o exsudato peritoneal, é possível observar que o tratamento com OE *A. cearensis* inibiu significativamente a infiltração de leucócitos e neutrófilos nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de forma dose-dependente em comparação com o grupo controle. No tratamento com o óleo essencial na dose de 100 mg/kg, os níveis de leucócitos e neutrófilos foram estatisticamente iguais aos do grupo sham. Os animais tratados com o antiinflamatório não esteroide indometacina também apresentaram redução nos níveis de infiltrado celular, em relação ao grupo controle. No entanto, a atividade foi inferior à do OE *A. cearensis*.

Na dosagem de citocinas no lavado peritoneal, observou-se redução significativa nos níveis de TNF- α e IL-1 β nos grupos tratados com OE *A. cearensis*, onde nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg o óleo reduziu os níveis de TNF- α em 55,22%, 70,60% e 81,84% em relação ao grupo veículo. Os níveis de IL-1 β também foram reduzidos em 59,26%, 68,93% e 76,35% em relação ao grupo veículo, nas respectivas doses (Figura 10A e B). O padrão de indometacina também reduziu estatisticamente os níveis de TNF- α e IL-1 β em 30,25% e 67,24%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 10A e B). Observou-se que na dose de 50 mg/kg, o OE *A. cearensis* apresentou estatisticamente a mesma redução que o fármaco padrão indometacina, porém, na dose de 100 mg/kg, a atividade foi superior ao fármaco, apresentando estatisticamente valores significativos de citocinas. igual ao grupo sham.

O modelo de peritonite induzida por carragenina tem sido amplamente utilizado para investigar o efeito anti-inflamatório de compostos. Nesse modelo, há aumento da permeabilidade vascular peritoneal, migração celular representada principalmente pelo influxo de leucócitos e neutrófilos e alterações na produção de citocinas (Martins et al., 2017; Campos e Calixto, 2000). Os neutrófilos estão disponíveis nos leucócitos circulantes e proporcionam um mecanismo de defesa de primeira linha contra agentes infecciosos ou nocivos, desempenhando um papel importante na defesa do hospedeiro contra todas as classes de agentes infecciosos, além de estarem envolvidos em inúmeras patologias de condições inflamatórias (De Veras et al., 2021; Barreto et al., 2016; Laveti et al., 2013; Kolaczowska e Kubes, 2013). Quando recrutados, os neutrófilos são capazes de produzir citocinas que estão associadas na patologia da inflamação, expondo o tecido do hospedeiro a causar efeitos deletérios (Kolaczowska e Kubes, 2013; Campos e Calixto, 2000).

O recrutamento de leucócitos é um passo essencial no desenvolvimento da inflamação. Em resposta a estímulos nocivos, as células residentes liberam citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), quimiocinas (CXCL8 (KC) e CCL2 (MCP-1)) e mediadores lipídicos (Leucotrieno B4 (LTB4) e PGE2), que iniciam alterações locais envolvidas na migração de leucócitos (Oliveira-Tintino et al., 2018; Barreto et al., 2016; Kolaczowska e Kubes, 2013).

Neste trabalho, demonstramos que um pré-tratamento oral com OE *A. cearensis* inibiu significativamente o número de leucócitos totais e neutrófilos, além de reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β na cavidade abdominal de animais estimulados com carragenina, demonstrando a eficácia durante uma resposta inflamatória aguda. Corroborando esses dados, óleos essenciais contendo constituintes químicos em comum com OE *A. cearensis* têm sido descritos como tendo efeitos anti-inflamatórios mediando citocinas inflamatórias e infiltração celular. De Veras et al. (2021) verificaram que o óleo essencial de *Verbesina macrophylla* tem efeito anti-inflamatório por reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β , tendo o óleo essencial em sua composição os compostos germacreno D, biciclogermacreno e (E)-cariofileno. Oliveira-Tintino et al. (2018) observaram que o óleo essencial de *Croton campestris* e um de seus principais constituintes, β -cariofileno, reduzem a infiltração de linfócitos no modelo de peritonite induzida por carragenina. Valer et al. (2016) verificaram que o óleo essencial de *Croton zehntneri* reduz a migração intrapleural de leucócitos induzida pela carragenina, e essa

redução está associada ao β -cariofileno na composição química do óleo essencial. O óleo essencial de *Croton argyrophyllus* reduziu significativamente o número de leucócitos em relação ao controle na peritonite induzida por carragenina, apresentando este óleo o biciclogermacreno como constituinte químico (Ramos et al., 2013).

3.2.3.4. Atividade antipirética

Conforme mostrado na Tabela 3, camundongos injetados com suspensão de levedura de cerveja (20%, 20 mL/kg, s.c.) apresentaram temperatura corporal retal elevada quando medida 18 h após a injeção de levedura. Os camundongos tratados com OE *A. cearensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg apresentaram redução da temperatura logo após 1 h de tratamento oral, restabelecendo a temperatura basal dos animais. Isso foi comparável à resposta apresentada pela dipirona (100 mg/kg), tanto em termos de início quanto de resposta (Tabela 3).

A febre é uma resposta fisiológica complexa coordenada pelo sistema nervoso central, que induz a ativação de mecanismos endócrinos e imunológicos, entre outros sistemas do corpo, desencadeados por agentes infecciosos ou tecidos lesados (Walter et al., 2016). O aumento da temperatura corporal ocorre por meio da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (por exemplo, IL-1 β , IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que posteriormente causará a produção de prostaglandinas E2 (PGE₂) que sinaliza ao hipotálamo para aumentar a temperatura corporal (Evans et al., 2015).

A partir dos resultados aqui obtidos, o óleo essencial teve um efeito antipirético dose-dependente significativo, comparável à dipirona e é possível afirmar que o óleo essencial de *A. cearensis* tem impactos no sistema nervoso central, considerando que seus constituintes químicos (ex. cariofileno) exercem algum efeito inibitório sobre a COX-3, o que diminui a quantidade de prostaglandina PGE₂ na região hipotalâmica do cérebro e, portanto, reduz a hipertermia (De Veras et al., 2021; Paula-Freire et al., 2014; Park e outros, 2011). No entanto, é possível que haja interação entre os componentes ativos do óleo essencial, de modo que possa resultar em alguns efeitos sinérgicos ou antagônicos que possam interferir nas atividades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos princípios ativos. Portanto, é necessário avaliar os mecanismos que podem estar envolvidos na atividade do OE *A. cearensis*.

4. Conclusões

Os dados obtidos confirmaram as propriedades etnofarmacológica do uso de *A. cearensis* na medicina tradicional para dor, inflamação e febre. O teste de toxicidade aguda e a determinação da DL₅₀ do óleo essencial de *A. cearensis* demonstraram que não apresenta mortalidade até a concentração de 2.000 mg/kg; p.o. o que comprova a relativa segurança do óleo essencial em exposição aguda. Portanto, concluímos que esta planta se apresenta como uma fonte promissora de metabólitos secundários com potencial uso no tratamento da dor e inflamação.

Referências

- Ramos., J.M., Santos, C.A., Santana, D.G., Santos, D.A., Alves,, P.B., Thomazi, S.M, 2013. Chemical constituents and potential antiinflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. Rev. Bras. Farmacogn., 23 pp. 644-650
- Albergaria, E.T., Silva, M.V., Silva, A.G. 2019. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais localizadas na Unidade de Conservação Tatu-Bola, município de Lagoa Grande, PE – Brasil. Revista Fitos, 13(2), 137-154 10.17648/2446-4775.2019.713
- Albuquerque, U.P., Oliveira, R.F. 2007. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants?. J. Ethnopharmacol., 113, 156-170. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.025>
- Arulselvan, P., Fard, M.T., Tan, W.S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M.E., Kumar, S.S. 2016. Role of antioxidant and natural products in inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016, 1-15. doi.org/10.1155/2016/5276130
- Baptistel, A.C., Coutinho, J.M.C.P., Lins Neto, E.M.F., Monteiro, J.M. 2014. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 16, 406–425. 10.1590/1983-084x/12_137
- Barreto, R.S.S., Quintans, J.S.S., Amarante, R.K.L., Nascimento, T.S., Amarante, R.S., Barreto, A.S., Pereira, E.W.M., Duarte, M.C., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Zengin, G., Aktumsek, A., Quintans-Júnior, L.J. 2016. Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. Journal of Ethnopharmacology, 191, 9–

18. doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.022
- Barros, L.M., Duarte, A.E., Morais-Braga, M.F.B., Waczuk, E.P., Vega, C., Leite, N.F., De Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Rocha, J.B.T., Kamdem, J.P. 2016. Chemical characterization and trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxicity potential of *Lantana camara* L. (verbenaceae) essential oil. *Molecules* 21, 1–9. doi.org/10.3390/molecules21020209
- Bitu, V.C.N., Bitu, V.C.N., Matias, E.F.F., De Lima, W.P., Da Costa, P.A., Coutinho, H.D.M., De Menezes, I.R.A. 2015. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 265–272. [10.1016/j.jep.2015.06.022](https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.022)
- Borges, R.S., Ortiz, B.L.S., Pereira, A.C.M., Keita, H., Carvalho, J.C.T. 2018. *Rosmarinus officinalis* Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29–45. doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038
- Buske, D.L.M. 1996. Clinical comparison of histamine H1-receptor antagonist drugs. *J Allergy Clin Immunol.*, 98, S307–318. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(96\)80116-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(96)80116-3)
- Campos, M.M., Calixto, J.B. 2000. Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides*, 34, 314–322.
- Canuto, K., Silveira, E., Bezerra, A. 2010. Phytochemical analysis of cultivated specimens of cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith.). *Química Nova*, 33, 662–666. doi.org/10.1590/S0100-40422010000300034.
- Canuto, K.M., Leal, L.K., Lopes, A.A., Coleman, C.M. 2014. Amburanins A and B from *Amburana cearensis*: daphnodorin-type biflavonoids that modulate human neutrophil degranulation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 639–647. dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140011
- Cartaxo, S.L., de Almeida Souza, M.M., de Albuquerque, U.P. 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 326–342. doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.003
- Coelho-De-Souza, A.N., Santos, C.F., Lopes-Filho, L.N., Holanda, F.R., Oliveira, A.C., Vasconcelos, Y.A.G., Oliveira, K.A., Silva, F.W.F., Alves, K.S.S., Cardoso, J.H.L. 2018. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* Benth attenuates

- nociception in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(11), 1-9. doi.org/10.1590/1414-431x20187356
- Costa, J.C., Marinho, M.G.V. 2016. Etnobotânica de plantas medicinais em duas comunidades do município de Picuí, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18, 125-134. doi.org/10.1590/1983-084X/15_071
- Costa, R.G.A., Anunciação, T.A. d., Araujo, M. de S., Souza, C.A., Dias, R.B., Sales, C.B.S., Rocha, C.A.G., Soares, M.B.P., Silva, F.M.A. d., Koolen, H.H.F., Costa, E. V., Bezerra, D.P. 2020. In vitro and in vivo growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 122, 109713. doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109713
- Criado, P.R., Fachini, R., Criado, J., Maruta, C.W., D'apparecida, C., Filho, M. 2010. Histamine, histamine receptors and antihistamines: New concepts. *Braz. Ann. Dermatol.*, 85, 195–210. doi.org/10.1590/S0365-05962010000200010
- De Albuquerque, U.P., de Medeiros, P.M., de Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., de Freitas Lins Neto, E.M., de Melo, J.G., dos Santos, J.P. 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 325–354. doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017
- De Lavor, E.M., Leal, A.E.B.P., Fernandes, A.W.C., Ribeiro, F.P.R.A., Barbosa, J.M., Gama S.M., Teles, R.B.A., Oliveira, L.F.S., Silva, J.C., Rolim, L.A., De Menezes, I.R.A., Almeida, J.R.G.S. 2018. Ethanolic extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. *PHYTOMEDICINE*, 47, 58-68. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.052
- De Oliveira, M.R.C., de Lima Silva, M.G., Alcântara, I.S. 2021. Biological activities of the essential oil from the leaves of *Lantana montevidensis* (Spreng) Briq. in mice. *Environ Dev Sustain* 23, 14958–14981.
- De Veras, B.O., Oliveira, M.B.M., Oliveira, F.G.S., Santos, Y.Q., Oliveira, J.R.S., Lima, V.L.M., Almeida, J.R.G., Navarro, D.M.A.F., Aguiar, J.C.R.O., Aguiar, J.S., Gorlach-Lira, K., Assis, C.R.O.F., Silva, M.V., Lopes, A.C.S. 2020. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto,

- Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 247, 112265. doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265
- De Veras, B.O.; Oliveira, J.R.S.; Lima, V.L.M.; Navarro, D.M.A.F.; Aguiar, J.C.R.O.F.; Moura, G.M.M.; Silva, J.W.; Assis, C.R.D.; Gorlach-Lira, K.; Assis, P.A.C.; Barbosa, J.I.S.; Melo, M.R.C.S.; Oliveira, M.B.M.; Silva, M.V.; Lopes, A.C.S. 2021. The essential oil of the leaves of *Verbenisa macrophylla* (Cass.) S.F. Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology*. 265, 113248. doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248
- Del-Velchio-Vieira, G., Sousa, O.V., Miranda, M.A., Senna-Valle, L., Kaplan, M.A.C. 2009. Analgesic and anti-inflammatory properties of essential oil from *Ageratum fastigiatum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1115-1121. doi.org/10.1590/S1516-89132009000500008
- Dos Santos, P.H.A., Dos Santos, I.S., Melo, V.M.M., Vasconcelos, I.M., Carvalho, A.D.O., Gomes, V.M. 2009. Partial characterization and antimicrobial activity of peptides from *Amburana cearensis* seeds against phytopathogenic fungi and yeasts. *Acta Physiol. Plant.*, 32, 597–603.
- Evans, S.S., Repasky, E.A., Fisher, D.T. 2015. Fever and thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nature Reviews Immunology*, 15, 335-349. doi.org/10.1038/nri3843
- Feitosa, R.F., Melciades, G.B., Assreuy, A.M.S., Rocha, M.F., Ribeiro, R.A., Lima, A.A. 2002. The pharmacological profile of ovoalbumin induced paw oedema in rats. *Med Inflamm.*, 11, 155–163.
- Ferreira, M.J.G., Nogueira, P.C.D.N., Dias, F.G.B., da Silva, L.M.R., Silveira, E.R., de Figueiredo, E.A.T. 2020. Antimicrobial activity and chemical characterization of the bark decoction of cumaru stem. *Ciencia Rural*, 50, 1–6. doi.org/10.1590/0103-8478cr20190785
- Figueredo, F.G., Ferreira, E.O., Lucena, B.F.F., Torres, C.M.G., Lucetti, D.L., Lucetti, E.C.P., Silva, J.M.F.L., Santos, F.A.V., Medeiros, C.R., Oliveira, G.M.M., Colares, A. V., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Silva, J.C.F., Kerntopf, M.R., Figueiredo, P.R.L., Matias, E.F.F. 2013. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. *BioMed Research International*,

- 2013, 1-5. doi.org/10.1155/2013/640682
- Ghosh, S., Saha, K., Dasgupta, S., Gomes, A. 2015. In vitro and in vivo anti-arthritic and anti-inflammatory activity of Bungarus fasciatus venom. J. Toxins, 2, 1-5.
- Hossain, C.F., Al-Amin, M., Sayem, A.S.M., Siragee, I.H., Tunan, A.M., Hassan, F., Kabir, M.M. 2015. Antinociceptive principle from *Curcuma aeruginosa*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 191, 1-7. doi.org/10.1186/s12906-015-0720-6
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. 2018. Medicinal plants: Past history and future perspective. Journal of HerbMed Pharmacology 7, 1–7. https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01
- Kolaczowska, E., Kubes, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat. Rev. Immunol., 13,159-175.
- Kong, Q., Ma, Y., Yu, J., Chen, X. 2017. Predicted molecular targets and pathways for germacrone, curdione, and furanodiene in the treatment of breast cancer using a bioinformatics approach. Scientific Reports, 7(1), 15543. doi.org/10.1038/s41598-017-15812-9
- Lataliza, A.A.B., Cavalli, J., Amarante, C.B., Barbosa, D.B., Brandão, M.A.F., Dutra, F.C., Raposo, N.R.B. 2019. Antioxidant, Cytotoxic, Antiproliferative and Acetylcholinesterase Inhibition Properties of the Extract from *Amburana Cearensis*. Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology, 6, 1-8.
- Laveti, D., Kumar, M., Hemalatha, R., Sistla, R.G.M., Naidu, V., Talla, V., Verma, V., Kaur, N., Nagpal, R. 2013. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. Inflamm. Allergy-Drug Targets, 12, 349-361.
- Li, H., Zuo, J., Tang, W. 2018. Phosphodiesterase-4 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. Front. Pharmacol., 9, 1048.
- Lima, L.R., Cavalcante, R.R.L., Martins, M.C.C., Parente, D.M., Cavalcante, A.A.M.C. 2013. Evaluation of antiedematogenic, antimicrobial and mutagenic activity of seeds of *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 15, 415–422. doi.org/10.1590/S1516-05722013000300015
- Lu, C., Li, H., Li, C., Chen, B., Shen, Y. 2018. Chemical composition and radical scavenging activity of *Amygdalus pedunculata* Pall leaves' essential oil. Food

- and Chemical Toxicology, 119, 368–374. doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.012
- Lu, J.J., Dang, Y.Y., Huang, M., Xu, W.S., Chen, X.P., Wang, Y.T. 2012. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curcumae* - A review. Journal of Ethnopharmacology, 143, 406–411. doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.009
- Macedo, J.G.F., De Menezes, I.R.A., Ribeiro, D.A., Santos, M.D.O., De Mâcedo, D.G., Macêdo, M.J.F., De Almeida, B.V., Souza De Oliveira, L.G., Pereira Leite, C., De Almeida Souza, M.M. 2018. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 1–28. doi.org/10.1155/2018/6769193
- MacGlashan, D. 2003. Histamine: a mediator of inflammation. J Allergy Clin Immunol, 112, S53-S59. doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70215-0
- Maintz, L., Novak, N. 2007. Histamine and histamine intolerance. Am J Clin Nutr., 85, 1185-06. https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185
- Makabe, H., Maru, N., Kuwabara, A., Kamo, T., Hirota, M. 2006. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*. Natural Product Research, 70,680-685. doi.org/10.1080/14786410500462900
- Mancianti, F., Ebani, V.V. 2020. Biological activity of essential oils. Molecules, 25(3), 678. doi.org/10.3390/molecules25030678
- Marinho, M.G.V., 2004. Estudos etnobotânicos de plantas medicinais em duas comunidades do sertão paraibano, nordeste do Brasil, com ênfase na atividade imunológica de *Amburana cearensis* (Leguminosae). Thesis. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Martins, A.O.B.P.B., Rodrigues, L.B., Cesário, F.R.A.S., de Oliveira, M.R.C., Tintino, C.D.M., e Castro, F.F., Alcântara, I.S., Fernandes, M.N.M., de Albuquerque, T.R., da Silva, M.S.A. 2017. Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1, 8-cineole (eucalyptol). Biomed. Pharmacother., 96, 384–395.
- Mckim-Junior, J.M., Baas, H., Rice, G.P., Willoughby-Sr, J.A., Weiner, M.L., Blakemore, W. 2016. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. Food and chemical toxicology, 96, 1-10. doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.006

- Menezes, I.A.C., Marques, M.S., Santos, T.C., Dias, K.S., Silva, A.B.L., Mello, I.C.M., Lisboa, A.C.C.D., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C.H., Marçal, R.M., Antonioli, A.R. 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. *Fitoterapia*, 78, 192-195. doi.org/10.1016/j.fitote.2006.11.020
- Mohammadifard, F., Alimohammadi, S. 2018. Chemical composition and role of opioidergic system in antinociceptive effect of *Ziziphora clinopodioides* essential oil. *Basic Clin. Neurosci. J.*, 9 (5), 357–366. [dx.doi.org/10.32598/bcn.9.5.357](https://doi.org/10.32598/bcn.9.5.357)
- Monteiro, J. M., De Souza, J.S.N., Neto, E.M.F.L., Scopel, K., Trindade, E.F. 2014. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants from the Brazilian semi-arid region?. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 116–123. [10.1016/j.bjp.2014.02.001](https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.02.001)
- Ni, J., Mahdavi, B., Ghezi, S. 2019. Chemical Composition, Antimicrobial, Hemolytic, and Antiproliferative Activity of Essential Oils from *Ephedra intermedia* Schrenk & Mey. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22, 1562–1570. doi.org/10.1080/0972060X.2019.1707717
- OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, 2008. Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Modified Up-And-Down Procedure.
- Oliveira, F.C.S., Barros, R.F.M. e Moita Neto, J.M. 2010. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 12, 282-301. doi.org/10.1590/S1516-05722010000300006.
- Oliveira, G.LD.S., Machado, K.C., Machado, K.C., Da Silva, A.P.D.S.C.L., Feitosa, C.M., De Castro Almeida, F.R. 2017. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 92, 338-346. doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.013
- Oliveira, M.T.A., Moura, G.M.M., da Cruz, J.I.O., Lima, R.V.C., dos Santos, E.A., Andrade, J.C., Alencar, M.V.O.B., Landim, V.P.A., Coutinho, H.D.M., Uchoa, A.F. 2019. Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110946. doi.org/10.1016/j.fct.2019.110946
- Oliveira-Tintino, C., Pessoa, R., Fernandes, M., Alcântara, I., da Silva, B., de Oliveira, M., Martins, A., da Silva, M., Tintino, S., Rodrigues, F., da Costa, J., de Lima,

- S., Kerntopf, M., da Silva, T., de Menezes I. 2018. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. *Phytomedicine*, 41, 82-95.
- Ou, Zhaoping; Zhao, Jing; Zhu, Lijuan; Huang, Lin; Ma, Yurong; Ma, Chaoyang; Luo, Chenxi; Zhu, Zihan; Yuan, Zhihang; Wu, Jing; Li, Rongfang; Yi, Jine. 2019. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109347. doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109347
- Park, K., Nam, D., Yun, H., Lee, S., Jang, H., Sethi, G., Cho, S.K., Ahn, K.S. 2011. β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, 312(2), 0–188. doi.org/10.1016/j.canlet.2011.08.001
- Paula-Freire, L.I.G., Andersen, M.L., Gama, V.S., Molska, G.R., Carlini, E.L.A. 2014. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine*, 21(3), 356–362. doi.org/10.1016/j.phymed.2013.08.006
- Pereira, E., Braga-De-Souza, S., Santos, C.C., Santos, L.O., Cerqueira, M.D., Ribeiro, P.R., Fernandez, L.G., Silva, V.D.A., Costa, S.L. 2017. *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 199–205. doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.010
- Radulović, N.S., Randjelović, P.J., Stojanović, N.M., Cakić, N.D., Bogdanović, G.A., Živanović, A.V. 2015. Aboriginal bush foods: A major phloroglucinol from *Crimson Bottlebrush* flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. *Food Research International*, 77, 280–289. doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.023
- Ramezani, M., Hossinzadeh, H., Daneshmand, N. 2001. Antinociceptive effect of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice. *Fitoterapia*, 72, 255-262. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00290-2
- Ramos, J.M.O., Santos, C.A., Santana, D.G., Santos, D.A., Alves, P.B., Thomazzi, S.M. Rathmell, J.P., Fields, H.L. Pain: Pathophysiology and Management D.L. Kasper, A.S. Fauci, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson, J. Loscalzo (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Education, New York (2015), pp. 87-123.

- Ribeiro, D.A., Oliveira, L.G.S. De, Macêdo, D.G. De, Menezes, I.R.A. De, Costa, J.G.M. Da, Silva, M.A.P. Da, Lacerda, S.R., Souza, M.M.D.A. 2014. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 155, 1522–1533. doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.042
- Rosland, J.H., Tjølsen, A., Maehle, B., Hole, K. 1990. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*, 42, 235-242. oi: 10.1016/0304-3959(90)91167-H
- Sá, M.D.C.A.D., Peixoto, R.D.M., Krewer, C.D.C., Almeida, J.R.G.D.S., De Vargas, A.C., Da Costa, M.M. 2011. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. *Rev. Bras. Ciência Veterinária*, 18, 62–66. http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.122
- Sá, R.C.S., Andrade, L.N., De Sousa, D.P. 2015. Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity. *Natural Product Communications*, 10(10):1767-74. doi/pdf/10.1177/1934578X1501001033
- Saldanha, A.A., Vieira, L., Ribeiro, R.I.M. de A., Thomé, R.G., Santos, H.B. dos, Silva, D.B., Carollo, C.A., Oliveira, F.M. de, Lopes, D. de O., Siqueira, J.M. de, Soares, A.C. 2019. Chemical composition and evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: Effect on edema, leukocyte recruitment, tumor necrosis factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioid. *Journal of Ethnopharmacology*, 231, 325–336. doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.017
- Santos, F.A., Jeferson, F.A., Santos, C.C., Silveira, E.R., Rao, V.S.N. 2005. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. *Life Sciences*, 77(23), 2953–2963. doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.032
- Santos, F.A., Rao, V.S.N. 1997. Mast cell involvement in the rat paw oedema response to 1 8-cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. *Eur. J. Pharmacol.*, 331, 253-258.
- Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Perkins, W.; Lee, L.; Isakson, P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91, 12013– 12017. doi.org/10.1073/pnas.91.25.12013

- Seleme, E.P., Lewis, G.P., Stirton, C.H., Sartori, A.L.B., Mansano, V.F. 2015. A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa*, 4, 249–263. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.212.4.1>
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38, 347-352. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(89)90222-4)
- Silva, M.I.G., Melo, C.T.V. De, Vasconcelos, L.F., Carvalho, A.M.R. De, Sousa, F.C.F. 2012. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22 (1), 193–207. doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000171
- Silva, S.L.C., Gualberto, S.A., Macedo, G.E.L., Silveira, T.C., Silva, D.C. 2012. Plantas medicinais usadas pela comunidade do povoado de laços (Tanhaçu/Bahia) e encontradas na floresta nacional contendas do sincorá Revista Caatinga, 25(3), 130-136.
- Sobeh, M., Rezq, S., Sabry, O. M., Abdelfattah, M. A. O., El Raey, M. A., El-Kashak, W. A., Wink, M. 2019. *Albizia anthelmintica*: HPLC-MS/MS profiling and in vivo anti-inflammatory, pain killing and antipyretic activities of its leaf extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, 108882. doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108882
- Somchit, M.N., Sulaiman, M.R., Ahmad, Z., Israf, D.A., Hosni, H. 2004. Non-Opioid anti-nociceptive effect of *Psidium guajava* leaves extract. *J. Nat. Remedies*, 4 (2), 174-178. <https://doi.org/10.18311/jnr/2004/183>
- Stojanović, N.M., Randjelović, P.J., Mladenović, M.Z., Ilić, I.R., Petrović, V., Stojiljković, N., Ilić, S. Radulović, N.S. 2019. Toxic essential oils, part VI: Acute oral toxicity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) essential oil in BALB/c mice. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110794. doi.org/10.1016/j.fct.2019.110794
- Toriyabe, M., Omote, K., Kawamata, T., Namiki, A. 2004. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology*, 101, 983–990. doi: 10.1097/00000542-200410000-00025.

- Valer, C.M., Wiirzler, L.A.M., Silva-Filho, S.E., Cavalcante, H.A.O., Silva-Comar, F.M.S., Cuman, R.K.N. 2016. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Croton zehntneri* and its main constituent estragole. *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, 2, 188-193.
- Volkow, N.D., McLellan, A. T. 2016. Opioid Abuse in Chronic Pain — Misconceptions and Mitigation Strategies. *New England Journal of Medicine*, 374(13), 1253–1263. doi/full/10.1056/nejmra1507771
- Walter, E.J.; Hanna-Jumma, S.; Carraretto, M.; Forni, L. 2016. The pathophysiological basis and consequences of fever. *Critical care*, 20 (200), 1375-85. doi.org/10.1186/s13054-016-1375-5

Tabelas

Tabela 1 – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) em teste de toxicidade aguda.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Alterações de comportamento	Nº de animais mortos (M/T)	Mortalidade (%)
OE <i>A. cearensis</i>	5	Nenhum	0/3	0.00
	50	Nenhum	0/3	0.00
	300	Nenhum	0/3	0.00
	2.000	Nenhum	0/3	0.00

M/T: número de camundongos mortos/número de camundongos tratados. Nenhum: nenhum sintoma de toxicidade observado durante o período de observação.

Tabela 2 – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*) e Indometacina (20 mg/kg) na migração de leucócitos totais e neutrófilos quantificados na lavagem peritoneal de camundongos com peritonite induzida por carragenina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Leucocitos (10 ⁶ mL/ Cavidade)	Neutrófilos (10 ⁶ mL/ Cavidade)
Sham	-	2,00±0,70 ^a	0,80±0,44 ^a
Veículo	-	11,60±0,14 ^d	7,80±0,83 ^d
Indometacina	20	5,20±0,83 ^b	2,40±0,89 ^b
	25	7,20±0,83 ^c	4,60±0,89 ^c
OE <i>A. cearensis</i>	50	4,40±0,54 ^b	2,60±0,54 ^b
	100	2,60±0,54 ^a	1,00±0,70 ^a

Todos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) (n=6).

^{abcd} Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

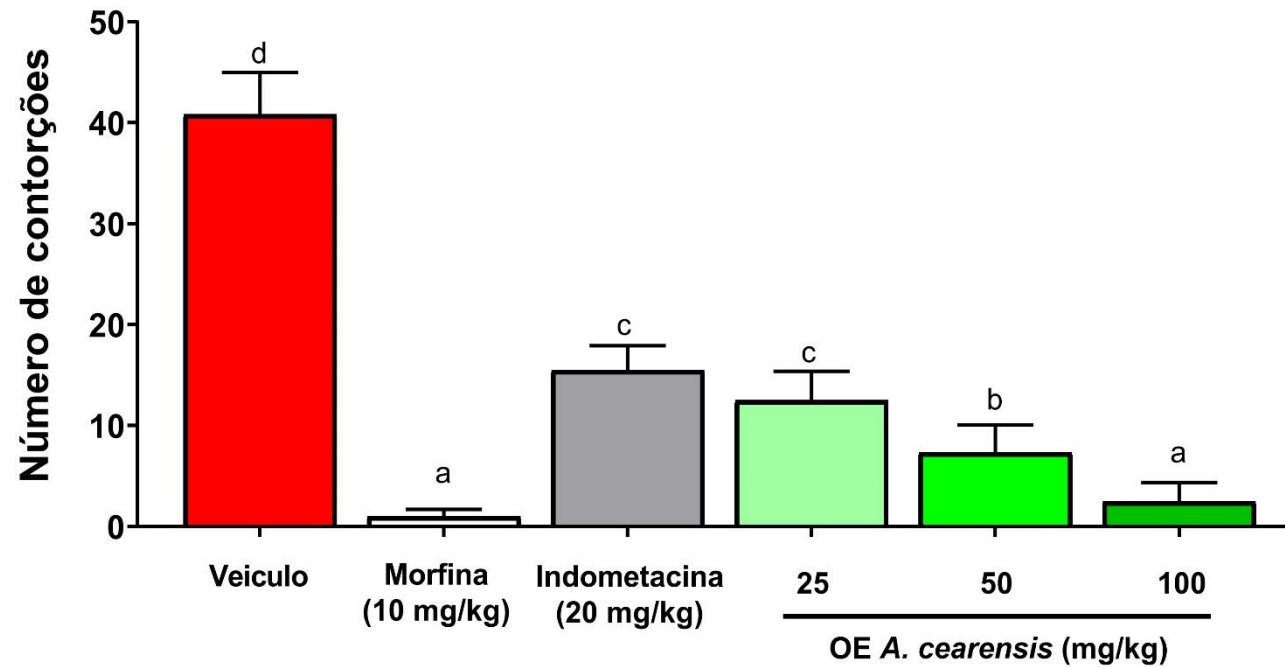
Tabela 3 – Atividade antipirética do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*) e Dipirona (100 mg/kg) sobre pirexia induzida por levedura de cerveja em diferentes tempos (h).

Tratamento	Dose (mg/kg)	Temperatura real (°C) em diferentes tempos em horas (h)					
		Antes do tratamento		Depois do tratamento			
		18 h	0h	1h	2h	3h	4h
Veiculo	-	36,47±0,16	38,64±0,20	38,71±0,06 ^b	38,81±0,08 ^c	38,82±0,04 ^b	38,93±0,07 ^b
Dipirona	100	36,45±0,11	38,88±0,24	36,60±0,15 ^a	36,68±0,13 ^a	36,71±0,16 ^a	36,43±0,09 ^a
	25	36,62±0,22	38,66±0,32	37,31±0,13 ^b	37,30±0,14 ^b	36,68±0,15 ^a	36,50±0,11 ^a
OE <i>A. cearensis</i>	50	36,52±0,17	38,73±0,34	36,85±0,18 ^a	36,95±0,11 ^a	36,46±0,16 ^a	36,41±0,13 ^a
	100	36,55±0,19	38,82±0,12	36,61±0,10 ^a	36,53±0,12 ^a	36,51±0,15 ^a	36,31±0,17 ^a

Todos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) (n=6). ^{abcd}Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

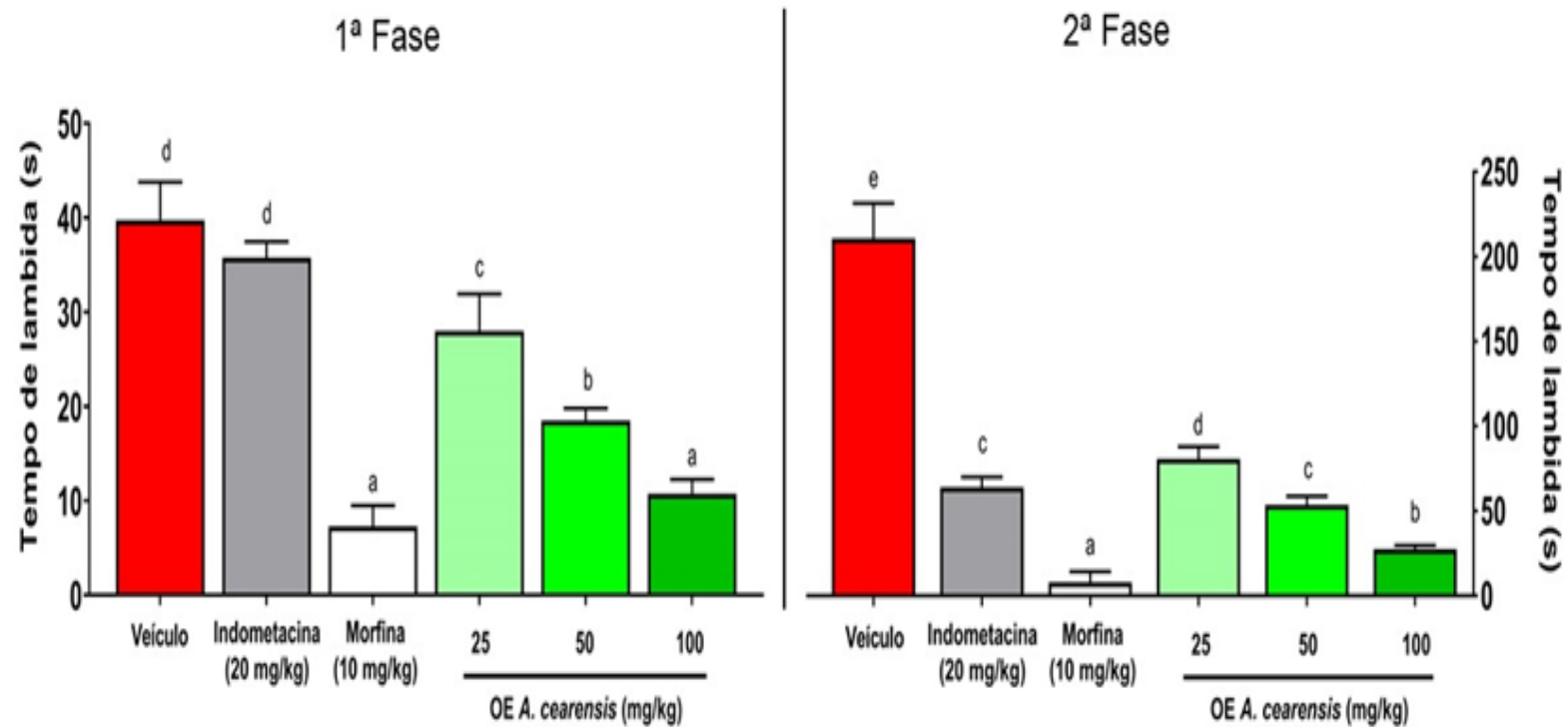
Figuras

Figura 1 – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*), Morfina (10 mg/kg) e Indometacina (20 mg/kg) nas contorções induzidas por ácido acético intraperitoneal em camundongos.



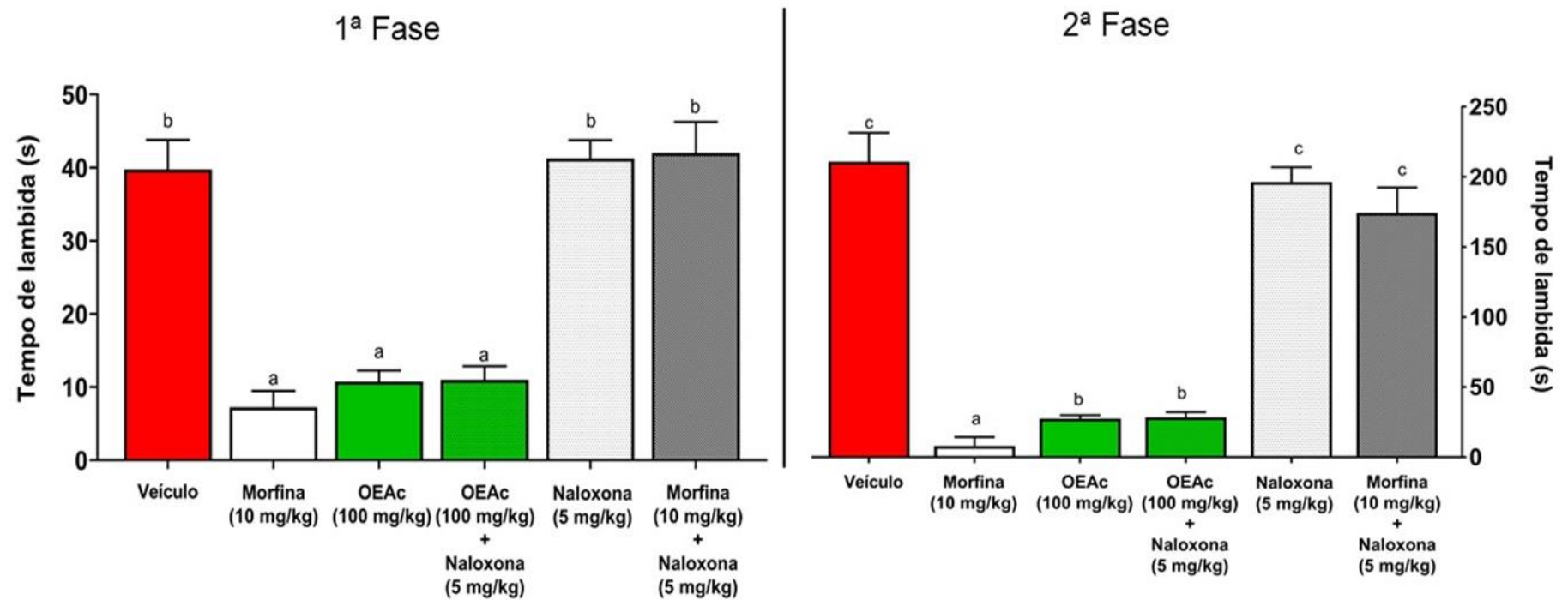
Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6). ^{abcd}Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

Figura 2 – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*), Indometacina (20 mg/kg) e Morfina (10 mg/kg) na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fase em formalina- nocicepção induzida (2,5% v/v; i.p.l.).



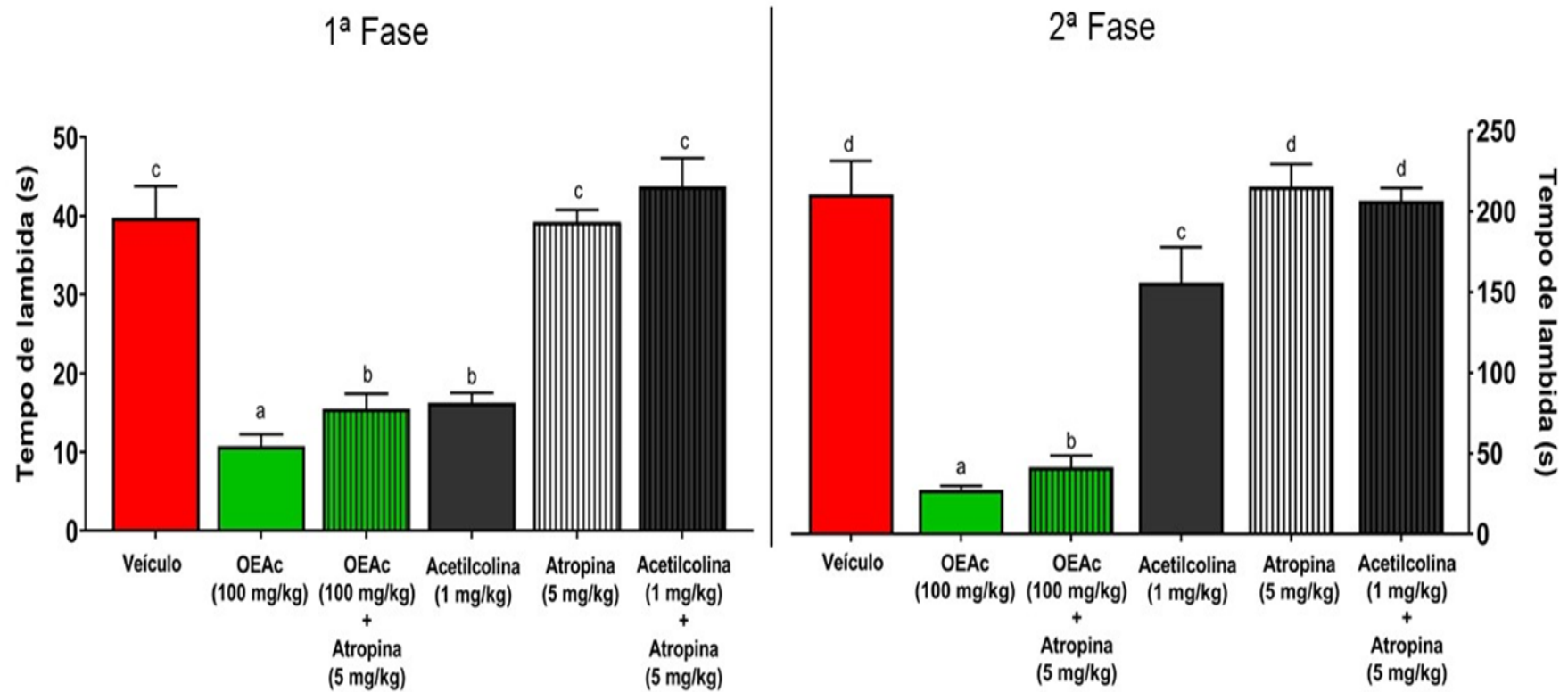
Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6). ^{abcd}Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

Figura 3 – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) em receptores opióides na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fases na nocicepção induzida por formalina (2,5% v/v; i.p.l.).



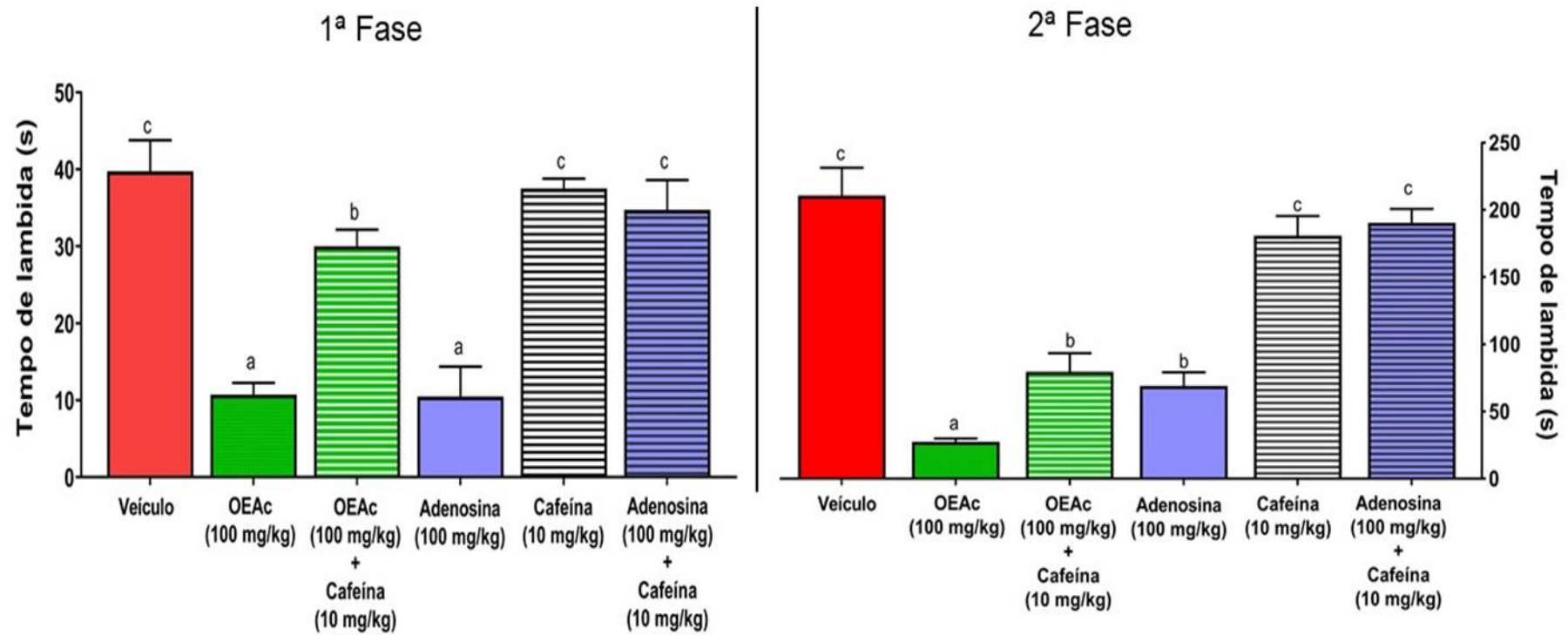
Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6). ^{abcd}Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

Figura 4 – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) sobre o sistema colinérgico na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fases na nocicepção induzida por formalina (2,5% v/v; i.p.l.).



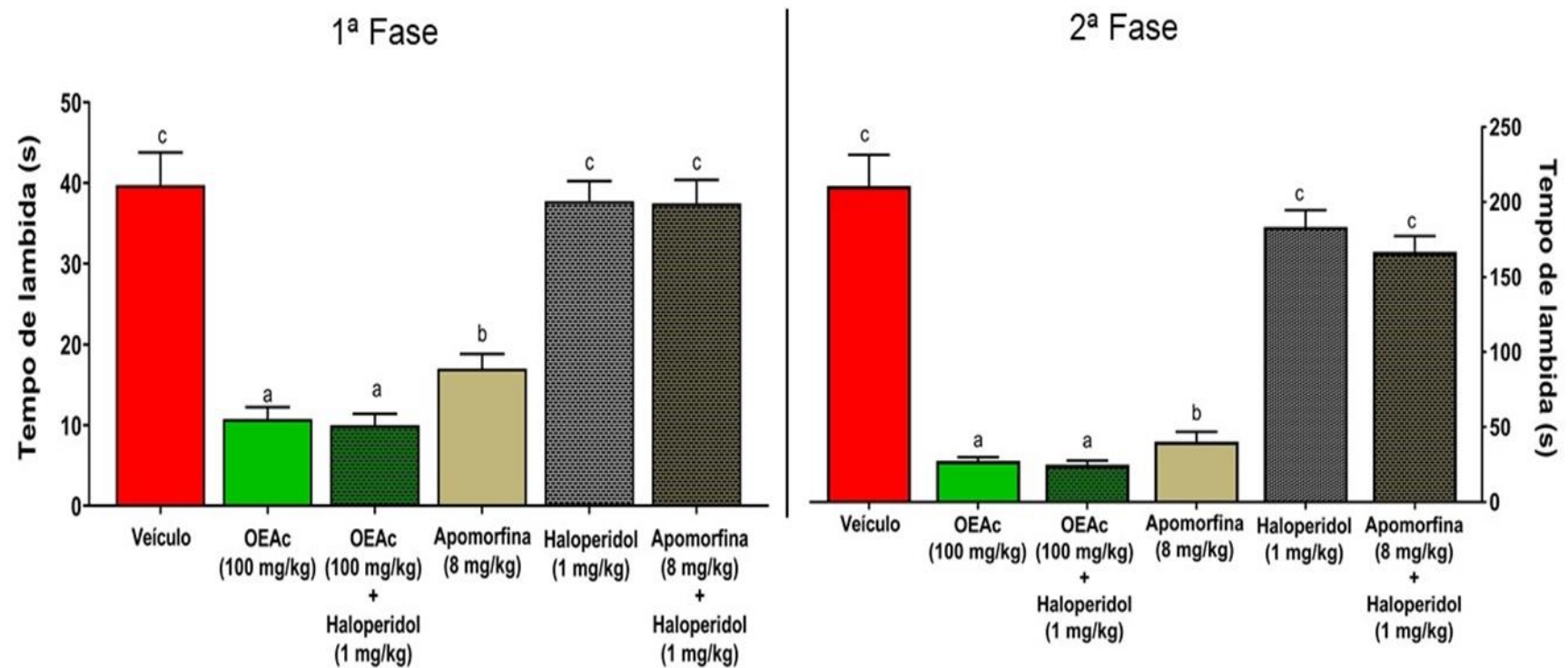
Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6). ^{abcd}Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

Figura 5 – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) no sistema adenosinérgico na primeira (0-5 min) e na segunda (15-30 min) fases na nocicepção induzida por formalina (2,5% v/v; i.p.l.).



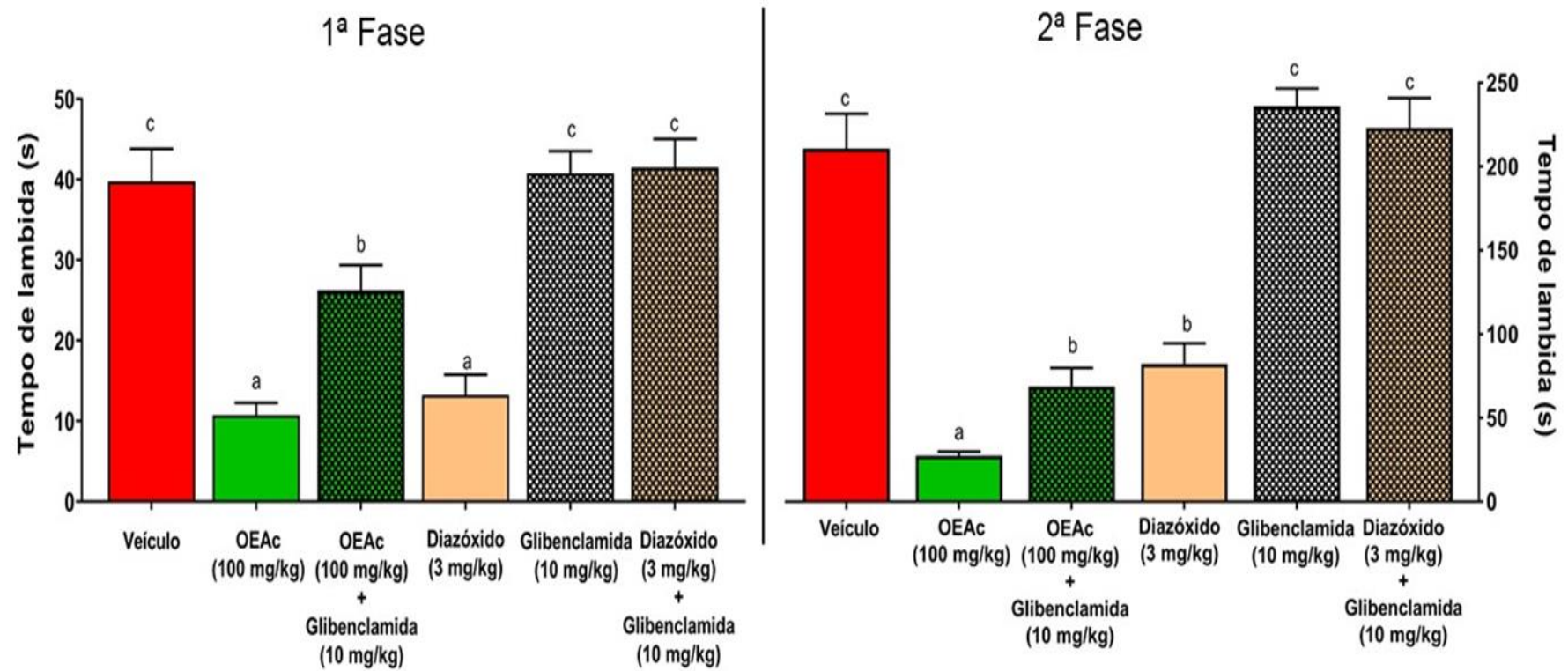
Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6). ^{abcd}Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

Figura 6 – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) sobre o sistema dopaminérgico na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fases na nocicepção induzida por formalina (2,5% v/v; i.p.l.).



Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6). ^{abcd}Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

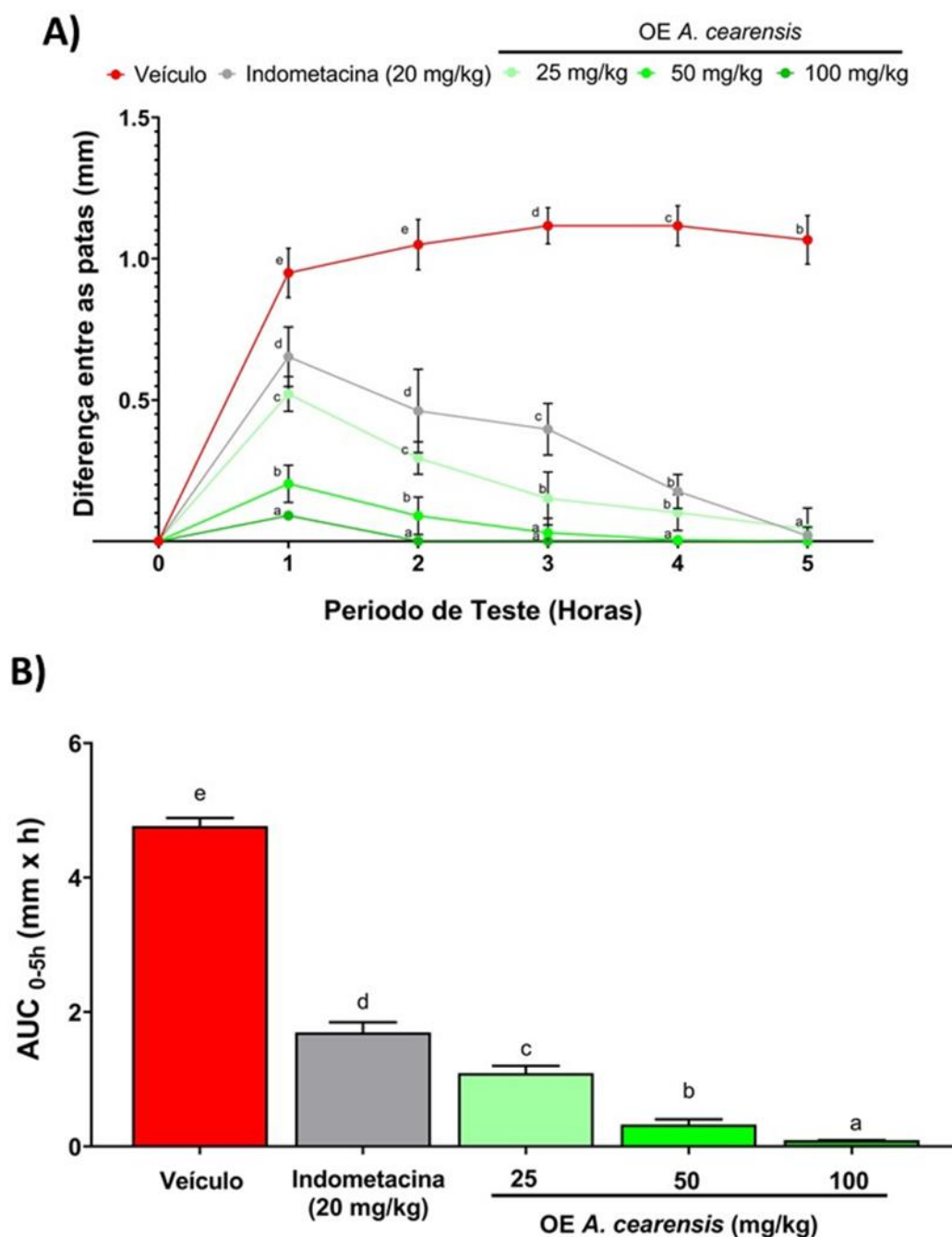
Figura 7 – Efeitos do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OEAc 100 mg/kg) em canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP) na primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fase na nocicepção induzida por formalina (2,5 % v/v; i.p.l.).



Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6). ^{abcd}Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

Figura 8 – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) e Indometacina (20 mg/kg) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

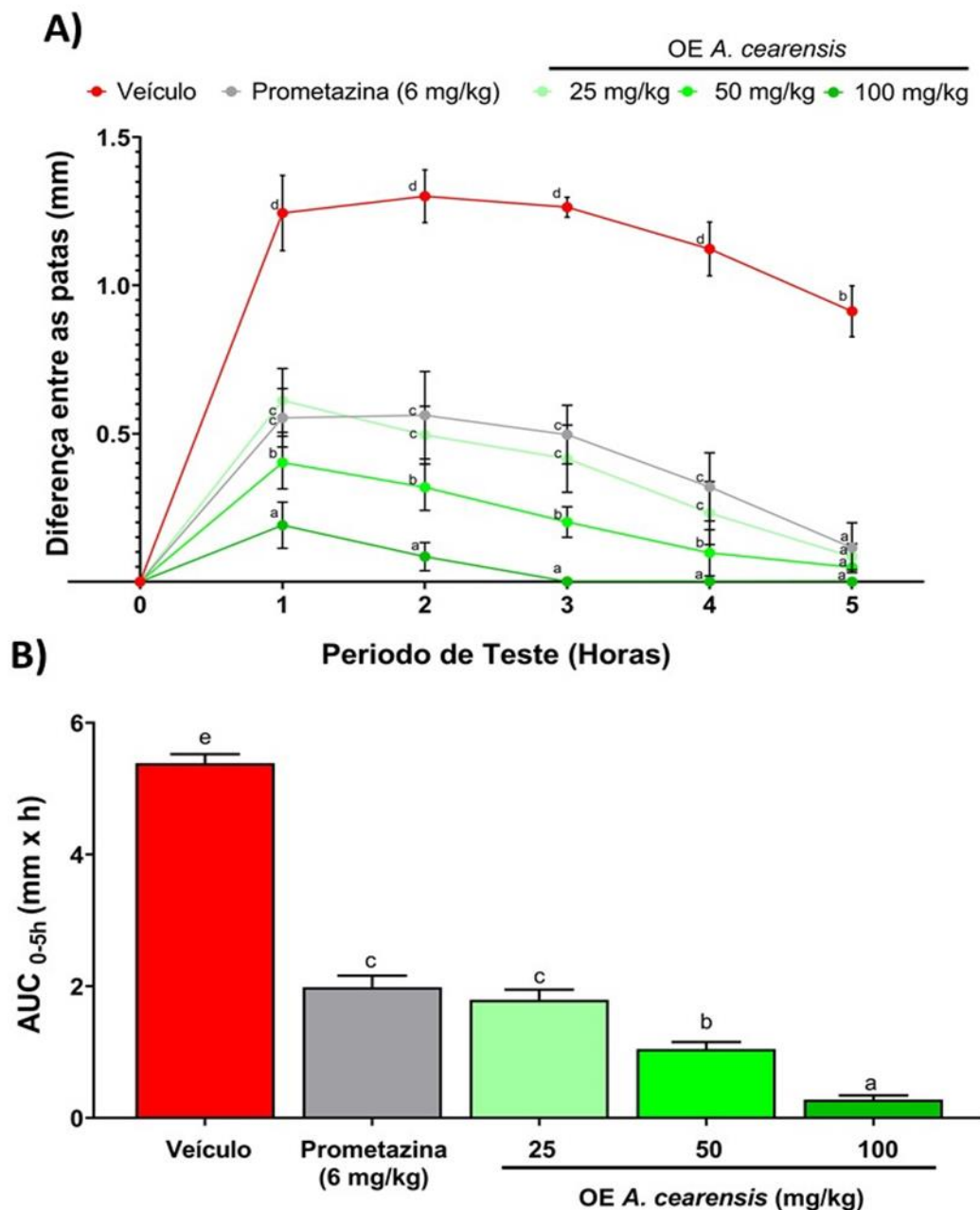
A) Os resultados expressam a diferença entre o volume da pata (mm) ao longo do tratamento e e (B) as respostas totais de edema, medidas como Área sob a curva (AUC) dos grupos tratados.



Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6).

^{abcd} Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

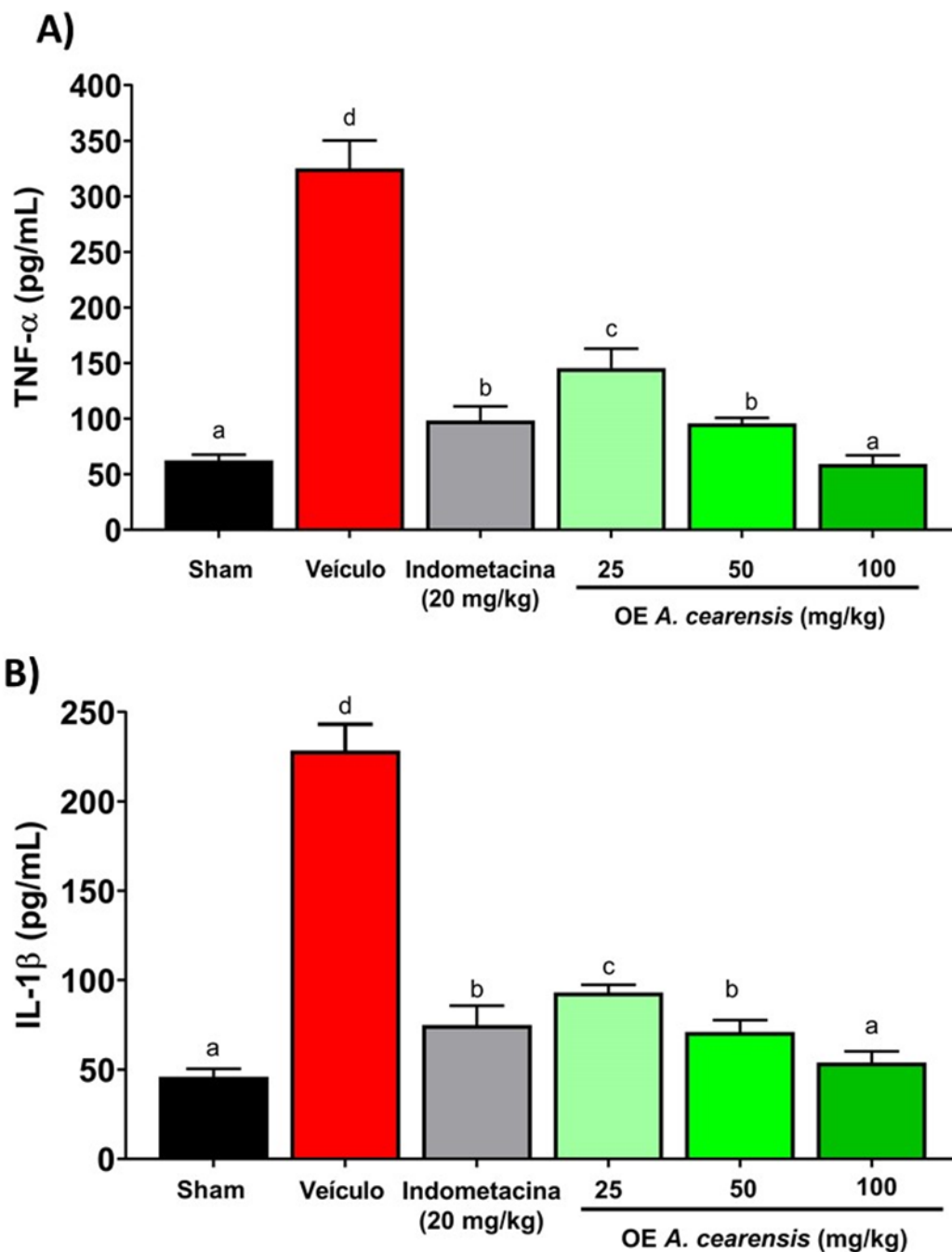
Figura 9 – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*) e Prometazina (6 mg/kg) no edema de pata induzido por histamina em camundongos. A) Os resultados expressam a diferença entre o volume da pata (mm) ao longo do tratamento e (B) as respostas totais de edema, medidas como Área sob a curva (AUC) dos grupos tratados.



Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6).

^{abcd} Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

Figura 10 – Efeito do óleo essencial de *Amburana cearensis* (OE *A. cearensis*) e Indometacina (20 mg/kg) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β na peritonite induzida por carragenina em camundongos.



Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) (n=6).

^{abcd} Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA unidirecional seguida de Teste de Bonferroni.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A metodologia empregada possibilitou a obtenção do óleo essencial, proporcionando um rendimento de $0,42 \pm 0,03\%$, tendo o óleo uma composição química heterogênea, contendo aproximadamente 25 constituintes químicos, com maior teor dos compostos germacrone ($46,76 \pm 0,15\%$), germacreno B ($17,74 \pm 0,06\%$), (E)-cariofileno ($5,55 \pm 0,04\%$) e biciclogermacreno ($4,13 \pm 0,03\%$).
- ✓ Os dados revelam que o óleo essencial apresenta atividade antioxidante nos métodos dos radicais DPPH, ABTS, $\text{OH}^\cdot$ e $\text{O}_2^\cdot$, podendo essa mistura ser utilizada em alimentos, medicamentos ou suplementos, mediante seus possíveis efeitos benéficos, entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de comprovar essas atividades em sistemas biológicos *in vivo*.
- ✓ Os dados demostram que óleo essencial de folhas de *A. cearensis* apresenta atividade antibacteriana e antifúngica, apresentando efeitos sob bactérias gram positivas e gram negativas, além de fungos de importância clínica. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para verificar os possíveis mecanismos da atividade antimicrobiana do óleo essencial.
- ✓ O óleo essencial possui efeito modulador sinérgico dos antibióticos amoxicilina e do fluconazol, podendo a mistura química ser utilizada na prática clínica como adjuvante para combater patógenos aos quais os fármacos disponíveis não apresentam mais efeitos terapêuticos. No entanto, estudos devem ser realizados para averiguar sua eficácia clínica *in vivo*.
- ✓ Os resultados aqui apresentados revelam a utilização segura do OE de *A. cearensis*, o qual não produziu nenhum sinal de toxicidade até a concentração de 2.000 mg/kg.
- ✓ Os dados obtidos indicam que o óleo essencial possui efeito analgésico (antinociceptivo), atuando a níveis central e periférico da dor, com efeito dose-dependente, e tendo como mecanismos farmacológicos os sistemas colinérgicos, adenosinérgicos e canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP). No entanto, estudos devem ser realizados para investigar possíveis efeitos colaterais, ou potencialização dos seus efeitos com analgésicos já utilizados na prática clínica.

- ✓ Os dados obtidos revelam que o óleo essencial possui efeito inflamatório em todas as doses testadas, atuando sobre diferentes vias, como exemplo, a redução de citocinas inflamatórias e migração de leucócitos e neutrófilos.
- ✓ Os resultados sugerem que o óleo essencial apresenta efeitos anti-histamínico e antipirético. No entanto, estudos devem ser realizados para investigar seus possíveis mecanismos farmacológicos.
- ✓ Os resultados obtidos corroboram as propriedades terapêutica medicinal associada a *Amburana cearensis*, e fornecem elementos para o desenvolvimento de novos agentes antioxidante, antimicrobiano, modulador, anti-inflamatório, antinociceptivo e antipirético.

REFERENCIAS

ABBASIJAHROMI et al. Compare the effect of aromatherapy using lavender and Damask rose essential oils on the level of anxiety and severity of pain following C-section: A double-blinded randomized clinical trial. **J Complement Integr Med.**, v.23, pp. 1-17, 2019.

AGUIAR et al. Development of a rich fraction in phenolic compounds with high antioxidant and antimicrobial activity in *Amburana cearensis* seeds extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.11, pp.648-655, 2017.

AICH et al. 2015. Mast cell-mediated mechanisms of nociception. **Int. J. Mol. Sci.**, v.16, pp. 29069-29092, 2015.

ALBERGARIA, E.T.; SILVA, M.V.; SILVA, A.G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais localizadas na Unidade de Conservação Tatu-Bola, município de Lagoa Grande, PE – Brasil. **Revista Fitos**, v.13, n.2, pp.137-154, 2019.

ALBUQUERQUE, U.P. How to improve the quality of scientific publications in ethnobiology. **Ethnobiology and Conservation**, v. 2, n.4, p. 1-6, 2013.

ALBUQUERQUE, U.P. Implications of ethnobotanical studies on bioprospecting strategies of new drugs in semi-arid regions. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2010.

ALBUQUERQUE, U.P.D.; ANDRADE, L.D.H.C Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n.3, p. 273-285, 2002.

ALJAAFARI, M. N.; ALALI, A. O.; BAQAIS, L.; ALQUBAISY, M.; ALALI, M.; MOLOUKI, A.; LIM, S. H. E. An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 1-27, 2021.

ALMEIDA, B.V.; RIBEIRO, D. A.; SANTOS, M.O.; DE MACÊDO, D.G.; MACEDO, J. G. F.; MACÊDO, M. J. F.; SOUZA, M. M. A Mixtures of medicinal plants from caatinga: Basis for further bioprospecting studies. **South African Journal of Botany**, n.21, v.3, p. 1-20, 2022.

ALMEIDA, C.; SILVA, B. Estudo etnobotânico de plantas medicinais da Mata Ciliar do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil. **Revista Ouricuri**, v. 10, n. 1, p. 011-026, 2020.

ALMEIDA, J.R.G.D.S.; GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.D.S.S., SANTOS, M.R.V.D.; LIMA, J.T.D., NUNES, X.P., & QUINTANS-JÚNIOR, L.J. *Amburana cearensis*: uma revisão química e farmacológica, **Scientia Plena**, n. 6, v.11, p. 1-8, 2010.

ALVES, M.S.; MEDEIROS, M.A.A.; PEREIRA, C.T.; SIMÃO, K.L.A.; SIMÃO, B.L.A.; FILHO, A.A.O. Avaliação da atividade antineoplásica e antiviral do monoterpeno Ascaridol presente em plantas da caatinga: estudo in silico. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, n.13, v.03, p. 2317-3122, 2019.

AMOROZO, M.C.M. Use and diversity of medicinal plants in Santo Antonio do Leverger, MT, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, pp.189-203, 2002.

and formalin tests and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. **Pain**, v. 61, p. 203-213, 1995.

ANTONGIOVANNI, M.; VENTICINQUE, E.M.; FONSECA, C.R. Fragmentation patterns of the Caatinga drylands, **Landscape Ecology**, v. 33, n. 8, p. 1353-1367, 2018.

ANTONIO, G.D.; TESSER, C.D.; MORETTI-PIRES, R.O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n.3, p. 541-553, 2014.

ARAUJO, H. F.; GARDA, A. A.; E SILVA, W. A. D. G.; DO NASCIMENTO, N. F. F.; DE FREITAS MARIANO, E.; DA SILVA, J. M. The Caatinga region is a system and not an aggregate. **Journal of Arid Environments**, v. 203, p. 1-8, 2022.

ARAÚJO, K. A.; DE ANDRADE MIRANDA, I. P.; CAMARGO, C.; REPETTO, M. Knowledge of medicinal plants used by residents in two peripheral districts of Boa Vista, Roraima, Northern Brazilian Amazon: Phytotherapy as a new strategy in collective health. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 26, p. 435-447, 2018.

ARRUDA CAMARGO, Maria Thereza L. **As plantas medicinais e o sagrado: a etnofarmacobotânica em uma revisão historiográfica da medicina popular no Brasil**. Ícone Editora: São Paulo, 2014

ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N. D.; BIGI, M. D. F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2015.

AYDEDE, M.; SHRIVER, A. Recently introduced definition of "nociceptive pain" by the International Association for the Study of Pain needs better formulation. **Pain**, v.159, pp. 1176-1177, 2018.

BAKKALI, F; AVERBEK, S.; AVERBEK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALLHORN, D. J.; KAUTZ, S.; JENSEN, M.; SCHMITT, I.; HEIL, M.; HEGEMAN, A. D. Genetic and environmental interactions determine plant defences against herbivores. **Journal of Ecology**, v. 99, n. 1, p. 313-326, 2011.

BAPTISTEL et al. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, pp. 406–425, 2014.

BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I.M. Pain and immunity: implications for host defence. **Nat Rev Immunol**, v.19, n.7, pp. 433-447, 2019.

BARTEKOVÁ et al. Natural and synthetic antioxidants targeting cardiac oxidative stress and redox signaling in cardiometabolic diseases. **Free Radic. Biol. Med.**, v.169, pp. 446-477, 2021,

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BECERRIL, R.; NERÍN, C.; GÓMEZ-LUS, R. Evaluation of Bacterial Resistance to Essential Oils and Antibiotics After Exposure to Oregano and Cinnamon Essential Oils. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**, v.9, n. 8, pp. 699–705, 2012.

BERGER, A.C.; WHISTLER, J.L. How to design an opioid drug that causes reduced tolerance and dependence. **Ann. Neurol.**, v.67, n.5, pp. 559-569, 2010.

BERLIN, E. A.; BERLIN, B. Some field methods in medical ethnobiology. **Field methods**, v. 17, n. 3, p. 235-268, 2005.

BHATTACHARYA, A. **Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules**. London: Academic Press, 2019.

BITU et al. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.172, pp. 265–272, 2015.

BORTOLUZZI, M. M.; SCHMITT, V.; MAZUR, C. E. Efeito fitoterápico de plantas medicinais sobre a ansiedade: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 1, p. 291-04, 2020.

BRANDT, A.L.; CASTILLO, A.; HARRIS, K.B.; KEETON, J.T.; HARDIN, M.D.; TAYLOR T.M. Inhibition of listeria monocytogenes by food antimicrobials applied singly and in combination. **J. Food Sci.**, v. 75, pp. M557-M563, 2010.

BRUHN, J.G.; HOLMSTEDT, B. Ethnopharmacology: objectives, principles, and perspectives. In: Reinhard E & Beal JL (eds.) Natural products as medicinal agents., Hippokrates, Stuttgart. pp. 405-430, 1982.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. D. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, n.10, p. 2675-2685, 2012.

BUCAGEL. Disponível em: <<https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/bucagel/pil>> Acesso em: 07 de julho de 2022.

BYUN, E.B.; KIM, W.S.; SUNG, N.Y.; BYUN, E.H. Epigallocatechin-3-gallate regulates anti-inflammatory action through 67-kDa laminin receptor-mediated tollip signaling induction in lipopolysaccharide-stimulated human intestinal epithelial cells, **Cell. Physiol. Biochem.**, v.46, pp.2072-2081, 2018.

CAMARGO, M. T. L. A. **As plantas medicinais e o sagrado: a etnofarmacobotânica** em uma revisão historiográfica da medicina popular no Brasil. São Paulo: Ícone, 2014. 264 p.

CAMPÊLO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.L.M.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and Antinociceptive Effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2011, Article ID 678673, 8 pages.

CAMPOS, J. L. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Indicators of conservation priorities for medicinal plants from seasonal dry forests of northeastern Brazil. **Ecological Indicators**, v. 121, p. 106993, 2020.

CAMPOS, J. L. A.; DE LIMA ARAÚJO, E.; GAOUE, O. G.; ALBUQUERQUE, U. P. How can local representations of changes of the availability in natural resources assist in targeting conservation?. **Science of the Total Environment**, v. 628, p. 642-649, 2018.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA. Estudo fitoquímico de espécimes cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* AC Smith). **Química Nova**, v. 33, n.3, p. 662-666, 2010.

CARDOSO, D.; SÄRKINEN, T.; ALEXANDER, S.; AMORIM, A. M.; BITTRICH, V.; CELIS, M.; FORZZA, R. C. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 2017.

CARTAXO, S. L.; ALMEIDA SOUZA, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CARTER et al. Weeks Side effects of commonly prescribed analgesic medications. **Phys. Med. Rehabil. Clin.**, v.25, pp. 457-470, 2014.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.

CASTRO, M. R.; FIGUEIREDO, F. F. Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 31, p. 56, 2019.

CAVALHER-MACHADO et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **Int Immunopharmacol**, v. 8, pp.1552-60, 2008.

CHEESMAN, M. J.; ILANKO, A.; BLONK, B.; COCK, I. E. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with

conventional antibiotics the solution?. **Pharmacognosy reviews**, v. 11, n. 22, p. 57-72, 2018.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 212-229, 2011.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J., ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, pp.7204–7218, 2018.

CHEN, L.L.; ZHANG, H.J.; CHAO, J.; LIU, J.F. Essential oil of *Artemisia argyi* suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation. **J. Ethnopharmacol.**, v.204, pp. 107-117, 2017.

CHOU, S.T.; LAI, C.C.; LAI, C.P.; CHAO, W.W. Chemical composition, antioxidant, anti-melanogenic and anti-inflammatory activities of *Glechoma hederacea* (Lamiaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v.122, n.675–685, 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (27st ed) Wayne: M100-S21, **Clinical and Laboratory Standards Institute** (2017).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts (3st ed) Wayne: M27-A3, **Clinical and Laboratory Standards Institute** (2008).

COOK-MILLS, J.M.; MARCHESE, M.E.; ABDALA-VALENCIA, H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. **Antioxid. Redox Signal**, v.15, pp. 1607-1638, 2011.

CORREIA, R. A.; RUETE, A.; STROPP, J.; MALHADO, A. C.; DOS SANTOS, J. W.; LESSA, T.; LADLE, R. J. Using ignorance scores to explore biodiversity recording effort for multiple taxa in the Caatinga. **Ecological Indicators**, v. 106, p.1-10, 2019

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; MAIA, B.H.L.N.S.; DUARTE, M.C.T.; AMARAL, A.C.F.; LEON, L.L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n.1, pp. 78–81, 2009.

DA SILVA, G.C.; DE VERAS, B.O.; DE ASSIS, C.R.D.; NAVARRO, D.M. DO A.F.; DINIZ, D.L.V.; BRAYNER DOS SANTOS, F.A.; DE AGUIAR, J.C.R. DE O.F.; DA SILVA, M.V.; DOS SANTOS CORREIA, M.T. Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic effects with conventional antibiotics under clinical isolates by essential oil of *Hymenaea rubriflora* Ducke (FABACEAE). **Natural product research**, v.0, pp. 1–5, 2020.

DAHAM, S.S. et al. In vivo toxicity and antitumor activity of essential oils extract from agarwood (*Aquilaria crassna*). **BMC Complement. Alter. Med.**, v.16, 2016.

DAIBER et al. Discovery of new therapeutic redox targets for cardioprotection against ischemia/reperfusion injury and heart failure. **Free Radic. Biol. Med.**, v.163, pp. 325-343, 2021.

DAVID, M.; PASA, M. C. As plantas medicinais e a etnobotânica em Várzea Grande, MT, Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 16, v.1, p. 97-108, 2015.

DAVIES, K. M.; ALBERT, N. W.; ZHOU, Y.; SCHWINN, K. E. Functions of flavonoid and betalain pigments in abiotic stress tolerance in plants. **Annual Plant Reviews Online**, v., n.1, p. 21-62, 2018.

DE VERAS, B.O.; OLIVEIRA, M.B.M.; OLIVEIRA, F.G.S.; SANTOS, Y.Q.; OLIVEIRA, J.R.S.; LIMA, V.L.M.; ALMEIDA, J.R.G.; NAVARRO, D.M.A.F.; AGUIAR, J.C.R.O.; AGUIAR, J.S.; GORLACH-LIRA, K.; ASSIS, C.R.O.F.; SILVA, M.V., LOPES, A.C.S. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, 112265, 2020.

DEMIRBAĞ, B. ERCI, B. The effects of sleep and touch therapy on symptoms of fibromyalgia and depression. **Iran. J. Public Health.**, v.41, n.11, pp. 44-53, 2012.

DICLOSPRAY. Disponível em: <<https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/diclopray/pil>> Acesso em: 07 de julho de 2022.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of

compounds alpha humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 569, p. 228–236, 2007.

FERNANDES, M. F.; CARDOSO, D.; DE QUEIROZ, L. P. An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga seasonally dry forests and woodlands reveals high species richness and endemism. **Journal of Arid Environments**, v. 174, p.1-8, 2020.

FERRAZ, C. A.; PASTORINHO, M. R.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; SOUSA, A. C. Ecotoxicity of plant extracts and essential oils: A review. **Environmental Pollution**, v. 292, p. 1-22, 2022.

FERRAZ, C. M.S.; SANTOS, A. Q.; DE JESUS SANTOS, M.; SILVA, V. R.; DE SOUZA SANTOS, L.; SOARES, M. B. P.; QUEIROZ, R. F. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities of *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae) stem bark. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 210-217, 2021.

FERREIRA, M. E. A.; ELIAS, G. A.; ASSUNÇÃO, V. K.; CITADINI-ZANETTE, V. Plantas medicinais utilizadas em rituais de umbanda: estudo de caso no sul do Brasil. **Ethnoscintia-Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology**, v. 6, n. 3, p. 1-14, 2021.

FONSECA, C. R.; ANTONGIOVANNI, M.; MATSUMOTO, M.; BERNARD, E.; VENTICINQUE, E. M. **Conservation opportunities in the Caatinga**. Springer: Switzerland ,2017.

FULLERTON, J.N.; GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.15, pp. 551–567, 2016.

GHRAH, H. A.; KHAN, K. A.; IBRAHIM, E. H. Biological Activities of *Euphorbia peplus* Leaves Ethanolic Extract and the Extract Fabricated Gold Nanoparticles (AuNPs). **Molecules**, v. 24, n.7, 2019.

GIACOMETTI, J.; KOVAČEVIĆ, D. B.; PUTNIK, P.; GABRIĆ, D.; BILUŠIĆ, T.; KREŠIĆ, G.; JAMBRAK, A. R. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. **Food research international**, v. 113, p. 245-262, 2018.

GIONGO et al. Carbono no Sistema Solo-Planta no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.6, pp.1233-1253, 2011.

GISELLE F.P.; ELIZABETH S.F.; FERNANDA M.D.C.; JULIANO F.; LUIZ F.P.; MARIA M.C.; JOÃO B.C. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n.2, pp. 0–333, 2007.

GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nat. Med.**, v.16, n.11, pp. 1248–1257, 2010.

GOMEZ-CASATI, D. F.; BUSI, M. V. María V. Interaction Between Plant Secondary Metabolites and the Human Metabolome. **Module in Food Science**, p.1-6,2021.

GOUIN et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. **Protein Cell**, v.8, n.9, pp. 644-661, 2017.

GOUVEIA, B.B. et al. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, pp. 1275–1284, 2016.

GRICHNIK, K.P.; FERRANTE, F.M. The difference between acute and chronic pain. **Mt Sinai J. Med.**, v.58, n.3, pp. 217-20, 1991.

GRINTUSS. Disponível em: <[www.grintuss.pt/grintuss/grintuss-adult-xarope/#:~:text=Composi%C3%A7%C3%A3o,%3E20.000%20Dalton\)%20%E2%89%A5%2020%25](http://www.grintuss.pt/grintuss/grintuss-adult-xarope/#:~:text=Composi%C3%A7%C3%A3o,%3E20.000%20Dalton)%20%E2%89%A5%2020%25)> Acesso em: 07 de julho de 2022.

GULYAS et al. COX-2 expression and effects of celecoxib in addition to standard chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer, **Acta Oncol.**, v.57, pp.244-250, 2018.

GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; DESHMUKH-TASKAR, P.; HINOJOSA, M.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 91-99, 2014.

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

HEFTI et al. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.27, n.2, pp. 85-91, 2006.

HELFAND, W. H.; COWEN, D. L. **Pharmacy: an Illustrated History**. MOSBY: New York, 1990.

J. North Khorasan Univ. Med. Sci., v.5, n.2, pp. 469-475, 2013.

JERMNAK, U.; YOSHINARI, T.; SUGIYAMA, Y.; TSUYUKI, R.; NAGASAWA, H.; SAKUDA, S. Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds. **Int. J. Food Microbiol.**, v.153, pp. 339-344, 2012.

JOHNSON, L. M. Gitksan medicinal plants-cultural choice and efficacy. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2006.

JUÁREZ-REYES, K.; ANGELES-LÓPEZ, G.E.; RIVERO-CRUZ, I.; BYE, R.; MATA R. Antinociceptive activity of *Ligusticum porteri* preparations and compounds. **Pharm Biol.** v.52, n.1, pp.14-20, 2014.

JUNG et al. a-Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NFkB signaling in RAW 264.7 cells. **J. Ethnopharmacol.**, v.147, pp. 208-214, 2013.

JUNIOR, W. J.S.; MELO. M. F.; SOUZA C. R.; MARIANO, R. F., YAGUINUMA, R. V., NORONHA, F. M. B.; FONTES, M. A. L. Importance of Ethnobotanical Studies in Protected Areas: a Case Study in Brazil. **Biodiversidade Brasileira**, n.12, v.2, p.1-12, 2021.

JÚNIOR, W. S. F.; LADIO, A. H.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 238-252, 2011.

JUNIOR, W. S.; FONSECA MELO, M.; DE SOUZA, C. R.; MARIANO, R. F.; YAGUINUMA, R. V.; NORONHA, F. M. B.; FONTES, M. A. L. Importância dos

Estudos Etnobotânicos em Áreas Protegidas: um Estudo de Caso no Brasil. **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, v. 12, n. 2, p.1-16, 2022.

KHUMALO, G. P.; VAN WYK, B. E.; FENG, Y.; COCK, I. E. A review of the traditional use of Southern African medicinal plants for the treatment of inflammation and inflammatory pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 283, p.1-20, 2022.

KOMPENSAN. Disponível em: <<https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/kompensan/pil>>. Acesso em: 07 de julho de 2022.

KUMAR, A.; SINGH, S. K.; SINGH, V. K.; KANT, C.; SINGH, A. K.; TRIPATHI, V.; SINGH, J. An insight into the molecular docking interactions of plant secondary metabolites with virulent factors causing common human diseases. **South African Journal of Botany**, v. 204, p.1-9, 2021.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p.1-10, 2019.

KUNNUMPURATH et al. Global supply and demand of opioids for pain management. **Curr Pain Headache Rep**, v.22, pp. 1-34, 2018.

KUSNIERCZYK, A.; WINGE, P.; MIDELFART, H.; ARMBRUSTER, W. S.; ROSSITER, J. T.; BONES, A. M. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 10, p. 2537-2552, 2007.

LATALIZA et al. Antioxidant, Cytotoxic, Antiproliferative and Acetylcholinesterase Inhibition Properties of the Extract from *Amburana Cearensis*. **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 6, n.1, 2019.

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

LEITE et al. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. **Pharm Biol.** v. 48, pp.1164-9, 2010.

LEITE et al. Topical Antinociceptive Effect of *Vanillosmopsis arborea* Baker on Acute Corneal Pain in Mice. Hindawi Publishing Corporation Volume 2014, Article ID 708636, 6 pages.

LEITE, P. M.; CAMARGO, L. M.; CASTILHO, R. O. O. Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 41, p. 1-9, 2021.

LI, W.; ZHOU, P.; ZHANG, Y.; HE, L. *Houttuynia cordata*, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.133, pp. 922-927, 2011.

LIMA et al. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). **Rev. bras. plantas med.**, v.15, n.3, 2013.

LIMA, H.C. *Amburana* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22781>. Acesso em: 16 de maio de 2022.

LONGHI-BALBINOT et al. Anti-inflammatory effect of triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20 (29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142 pp. 59-64, 2012,

LOU, Y. R.; PICHERSKY, E.; LAST, R. L. Deep roots and many branches: Origins of plant-specialized metabolic enzymes in general metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 66, p. 1-9, 2022.

LUZ, I.S. et al. Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Applied. Environmental Microbiology**, v.78, pp.5021–5024, 2012.

MACEDO et al.. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, pp. 1–28, 2018.

MACÊDO, M. J. F.; RIBEIRO, D. A.; SANTOS, M. D. O.; MACÊDO, D. G. D.; MACEDO, J. G. F.; ALMEIDA, B. V. D.; SOUZA, M. M. D. A. Fabaceae medicinal

flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n.6, p. 738-750, 2018.

MAHAJANA, M.; KUIRYA, R.; PAL, P. K. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 18, p. 1-10, 2020.

MAKABE, H.; MARU, N.; KUWABARA, A.; KAMO, T.; HIROTA, M. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*. **Natural Product Research**, v.70, pp.680-685, 2006.

MAKSIC, J.; VENANCIO, I. M.; SHIMIZU, M. H.; CHIESSI, C. M.; PIACSEK, P.; SAMPAIO, G.; ALEXANDRE, F. F. Brazilian biomes distribution: Past and future. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 585, p.1-12, 2022.

MALAFIA, C. B.; JARDELINO, A. C. S.; SILVA, A. G.; DE SOUZA, E. B.; MACEDO, A. J.; CORREIA, M. T. D. S.; SILVA, M. V. Effects of Caatinga plant extracts in planktonic growth and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*. **Microbial ecology**, v. 75, n. 3, p. 555-561, 2018.

MANCONI, M. et al. Thymus essential oil extraction, characterization and incorporation in phospholipid vesicles for the antioxidant/antibacterial treatment of oral cavity diseases. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.171, p.115–122, 2018.

MARENGO, J. A. TORRES, R. R.; ALVES, L. M. Drought in Northeast Brazil—past, present, and future. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 129, n. 3, p. 1189-1200, 2017.

Marinho, M.G.V., 2004. Estudos etnobotânicos de plantas medicinais em duas comunidades do sertão paraibano, nordeste do Brasil, com ênfase na atividade imunológica de *Amburana cearensis* (Leguminosae). Thesis. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MARZOUKET al. Lavender-thymol as a new topical aromatherapy preparation for episiotomy: a randomised clinical trial. **J Obstet Gynaecol.**, v.35, pp. 472-475, 2015.

MATOTOKA, M. M.; MASOKO, P. Phytochemical screening and pharmacological evaluation of herbal concoctions sold at Ga Maja Limpopo Province. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 1-10, 2018.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v.140, n.6, pp. 771–776, 2010.

MEGAWATI, F. D.; SEDIAWAN, W. B.; HISYAM, A. Kinetics of mace (*Myristicae arillus*) essential oil extraction using microwave assisted hydrodistillation: Effect of microwave power. **Ind Crops Prod**, v. 131, p. 315-322, 2019.

MELO, J. G.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: a comparison of different selection approaches. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 47-53, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**, in: Cad. Atenção Básica No 31, Brasília, 2012.

MISHRA, D.; BISHT, G.; MAZUMDAR, P.M.; SAH, S.P. Chemical composition and analgesic activity of Senecio rufinervis essential oil. **Pharm Biol.** v. 48, pp. 1297-1301, 2010.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. 2017. Disponível em: www.mma.gov.br/portallbio. Acesso em: 15 de maio de 2022.

MONTEIRO et al. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants from the Brazilian semi-arid region?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, n.2, pp.116–123, 2014.

MOREIRA, F. A. (2015). Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler 302 (Santalaceae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, São Paulo. Universidade de São Paulo (Orientadora: Furlan, C. M.).

MORSY, N. F. S. Chemical Structure, Quality Indices and Bioactivity of Essential Oil Constituents. In (Ed.), **Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants**. **IntechOpen**, 2017.

MOSTAFA, D. M.; KASSEM, A. A.; ASFOUR, M. H.; AL OKBI, S. Y.; MOHAMED, D. A.; HAMED, T. E.S. Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: In-vitro and in-vivo evaluation. **Journal of Molecular Liquids**, 212, 6–15, 2015.

MYUNG-JA, K.; EUN-SOOK, N.; SEUN-IN, P. The effects of aromatherapy on pain, depression, and life satisfaction of arthritis patients. **Taehan Kanho Hakhoe Chi**, v.35, 2005.

Najaphi et al. Effect Supermint oil (peppermint oil) on children's pain during colonoscopy

NAJEM, M.; IBIBIJEN, J.; NASSIRI, L. Ethnobotanical treatment of respiratory diseases in the central Middle Atlas (Morocco): Qualitative and quantitative approach. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 46, p. 1-15, 2021.

NASCIMENTO et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **J. Ethnopharmacol.**, v. 210, pp.351–358, 2018.

NELSON, K. E.; PELL, A. N.; DOANE, P. H.; GINER-CHAVEZ, B. I.; SCHOFIELD, P. Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 4, p. 1175-1194, 1997.

NEMMANI et al. NO-NSAIDs, Gastric-sparing nitric oxide-releasable prodrugs of non-steroidal anti-inflammatory drugs, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.19, pp. 5297-5301, 2009.

NONATO, C. D. F. A.; CAMILO, C. J.; LEITE, D. O. D.; DA NOBREGA, M. G. L. A.; RIBEIRO-FILHO, J.; DE MENEZES, I. R. A.; DA COSTA, J. G. M. Comparative analysis of chemical profiles and antioxidant activities of essential oils obtained from species of *Lippia* L. by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 384, p. 1-8, 2022.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2002.

OLAPOUR et al. The effect of inhalation of aromatherapy blend containing lavender essential oil on cesarean postoperative pain. **Anesth Pain Med.**, v.3, pp. 203-207, 2013.

OLIVEIRA et al. Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*. **Food and Chemical Toxicology**, v.135, 110946, 2019.

OLIVEIRA, C. D. L.; DA SILVA, A. P. A.; MOURA, P.A.G. Distribuição e Importância das Unidades de Conservação no Domínio Caatinga. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 42, n. 1, p. 425-429, 2019.

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, M.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na Odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.

OLIVEIRA, G. P.; DA SILVA, T. M. G.; CAMARA, C. A.; SANTANA, A. L. B. D.; MOREIRA, M. S. A.; SILVA, T. M. S. Isolation and structure elucidation of flavonoids from *Amburana cearensis* resin and identification of human DNA topoisomerase II- α inhibitors. **Phytochemistry letters**, v. 22, p. 61-70, 2017.

OLIVEIRA, L.; MOTA, E.; MOREIRA, G.; PASSOS, I.; MIRANDA, J.; ANDRADE, I.; ROCHA, J. Ethnobotanical study of medicinal plants used at extrema neighbourhood, in the city of Grajaú, MA. **Journal of Global Innovation**, v. 3, n. 9, p. 2184-7738, 2019.

OLIVEIRA, M. T.; MOURA, G. M.; DA CRUZ, J. I.; LIMA, R. V.; DOS SANTOS, E. A.; ANDRADE, J. C.; UCHOA, A. F. Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p.1-4, 2020.

OU, ZHAOPING; ZHAO, JING; ZHU, LIJUAN; HUANG, LIN; MA, YURONG; MA, CHAOYANG; LUO, CHENXI; ZHU, ZIHAN; YUAN, ZHIHANG; WU, JING; LI, RONGFANG; YI, JINE. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.118, 109347, 2019.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, **Physiol. Rev.**, v.87, pp. 315-424, 2007.

PAHWA, R.; JIALAL, I. Chronic inflammation. StatPearls Publishing, Treasure Island, p. 2020, 2018.

PAVLIĆ, B.; VIDOVIĆ, S.; VLADIĆ, J.; RADOSAVLJEVIĆ, R.; ZEKOVIĆ, Z. Isolation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil by green extractions versus traditional techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 23-28, 2015.

PEI, R. S.; ZHOU, F., JI; B. P.; XU, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of food science**, v. 74, n. 7, p. 379-383, 2009.

PEREIRA et al. *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, pp. 199–205, 2017.

PERINI et al. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: A histopathological, immunohistochemical and biochemical study. **Complementary and Alternative Medicine**, 15, 1–8, 2015.

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A. Why do plants produce so many terpenoid compounds?. **New Phytologist**, v. 220, n. 3, p. 692-702, 2018.

PINHO-RIBEIRO et al. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. **Trends Immunol.**, v.38, n.1, pp. 5-19, 2017.

PIRES, M. V.; ABREU, P. P.; SOARES, C. S.; DA COSTA SILVA, D.; DO NASCIMENTO SOUZA, B.; MARIANO, D. M.; DE LUCENA, E. A. R. M. Etnobotânica de terreiros de candomblé nos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 1, p. 3-8, 2009.

POPOVIĆ, Z.; MATIĆ, R.; BOJOVIĆ, S.; STEFANOVIĆ, M.; VIDAKOVIĆ, V. Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001–2013. **Journal of ethnopharmacology**, v. 181, p. 182-192, 2016.

PRASAD, S.; GUPTA, S.C.; TYAGI, A.K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Lett**, v.387, pp.95-105, 2017.

QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. **Revista Fitos**, v.2, n. 3, p.39-53, 2006.

QUEIROZ, L. P. D.; CARDOSO, D., FERNANDES, M. F.; MORO, M. F. Diversity and evolution of flowering plants of the Caatinga domain. In: **Caatinga**. Springer, Cham, 2018. p. 23-63.

RADULOVIĆ, N.S., RANDJELOVIĆ, P.J., STOJANOVIĆ, N.M., CAKIĆ, N.D., BOGDANOVIĆ, G.A., ŽIVANOVIĆ, A.V. Aboriginal bush foods: A major phloroglucinol from *Crimson Bottlebrush* flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. **Food Research International**, v.77, pp. 280–289, 2015.

RAHMAN, I.U.; AFZAL, A.; IQBAL, Z.; IJAZ, F.; ALI, N.; SHAH, M.; BUSSMANN, R. W. Historical perspectives of ethnobotany. **Clinics in dermatology**, v. 37, n. 4, p. 382-388, 2019.

RAO, P.; KNAUS, E. E Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 2, p. 81-110, 2008.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RAYMUNDO, L.J.; GUILHON, C.C.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S.C.; ALVES, P.B.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterization of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **J Ethnopharmacol.**, v.12, n.134, pp. 725-32, 2011.

RHUD et al. Pain catastrophizing is related to temporal summation of pain but not temporal summation of the nociceptive flexion reflex. **Pain**, v.152, n.4, pp. 794-801, 2011.

RIBALDONE, D.G.; PELLICANO, R.; ACTIS, G.C. Inflammation: a highly conserved, Janus-like phenomenon—a gastroenterologist’s perspective. **J. Mol. Med.** v.96, n.9, pp. 861–871, 2018.

RICARDO, L. M.; GOULART, E. M. A.; BRANDÃO, M. G. L. Plantas medicinais da Bacia do Rio das Velhas: avaliação das condições para produção e uso em saúde pública. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 398-406, 2015.

RICARDO, L. M.; PAULA-SOUZA, J. D.; ANDRADE, A.; BRANDÃO, M. G. Plants from the Brazilian traditional medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 388-400, 2017.

RIESEBERG, T. P.; DADRAS, A.; FÜRST-JANSEN, J. M.; ASHOK, A. D.; DARIENKO, T.; DE VRIES, S.; DE VRIES, J. Crossroads in the evolution of plant specialized metabolism. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2020.

RIOS, J. L. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In: **Essential oils in food preservation, flavor and safety**. Academic Press, Massachusetts, 2016.

Robbins patologia básica. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

ROCHA, R.; MARISCO, G. Estudos etnobotânicos em comunidades indígenas no Brasil. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 95-219, 2016.

RUDDARAJU, L.K. et al. A review on anti-bacterials to combat resistance: from ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, n.1, 42-59, 2019.

RUTLEDGE, D.N.; JONES, C.J. Effects of topical essential oil on exercise volume after a 12-week exercise program for women with fibromyalgia: a pilot study. **J. Alternative Compl. Med.**, v.13, n.10, pp. 1099-1106, 2007.

RYABUSHKINA, N. A. Synergism of metabolite action in plant responses to stresses. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, n. 4, p. 547-552, 2005.

SADEH, D.; NITZAN, N.; CHAIMOVITSH, D.; SHACHTER, A.; GHANIM, M.; DUDAI, N. Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 138, p. 1-7, 2019.

SÁ-FILHO, G. F.; SILVA, A. I. B.; COSTA, E. M.; NUNES, L. E.; FREITAS RIBEIRO, L. H.; PAIVA CAVALCANTI, J. R. L.; SOUZA CAVALCANTE, J. Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos

metabólitos secundários: uma revisão. **Research, society and development**, v. 10, n. 13, p. 1-13, 2021.

SAH, S.P.; MATHELA, C.S.; CHOPRA, K. Elucidation of possible mechanism of analgesic action of *Valeriana wallichii* DC chemotype (patchouli alcohol) in experimental animal models. **Indian J Exp Biol.**, v.48, n.3, pp.289-93, 2010.

SALDANHA et al. Chemical composition and evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: Effect on edema, leukocyte recruitment, tumor necrosis factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, pp.325–336, 2019.

SALEHZADEH, A. et al. The Effect of Thyme (*Thymus vulgaris*) Extract on the Expression of norA Efflux Pump Gene in Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Genetic Resources**, v.4, pp.26– 36, 2018.

SALIBA, R.; HUBER, R.; PENTER, J.D. Pain control in small animals. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1981-1988, 2011.

SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULLETTI, A. M.; VÍRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. Vegetação e flora da Caatinga. **Recife: associação plantas do nordeste**, v.176. 2002.

SANA, S. S.; LI, H.; ZHANG, Z.; SHARMA, M.; USMANI, Z.; HOU, T.; GUPTA, V. K. Recent advances in essential oils-based metal nanoparticles: A review on recent developments and biopharmaceutical applications. **Journal of Molecular Liquids**, v. 333, p. 1-15, 2021.

SANTOS, D.Y.A.C **Biossíntese, funções e aplicações dos metabólitos secundários de plantas**. Appris: Curitiba, 2020.

SANTOS, J. C.; LEAL, I. R.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G. W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v. 4, n. 3, p. 276-286, 2011.

SANTOS, M. O.; RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; MACEDO, M. J.; MACEDO, J. G.; LACERDA, M. N. S.; MARIA, A. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 2767-2779, 2018

SANTOS, N.K.A.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, W.E.M.; CAMPOS, A.R.; DA COSTA, J.G.M. The essential oil from *Vanillosmopsis arborea* Baker (Asteraceae) presents antinociceptive, anti-inflammatory, and sedative effects. **Int J Green Pharm.**, v.9, pp.138–143, 2015.

SAWYNOK, J.; REID, A. R.; DOAK, G. J. Caffeine antinociception in the rat hot plate
SCHNAKERS, C.; CHATELLE, C.; DEMERTZI, A.; MAJERUS, S.; LAUREYS, S. What about pain in disorders of consciousness? **AAPS Journal**, v. 14, p. 437-444, 2012.

SELEME, E.P.; LEWIS, G.P.; STIRTON, C.H.; SARTORI, A.L.B.; MANSANO, V.F. A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). **Phytotaxa**, n.212, v. 4, p. 249–263. 2015.

SGANZERLA, C. M.; PREDEBOM, A. J.; VELOSO, J.; DA SILVA CORRALO, V.; JUNIOR, W. A. R. Revisão Integrativa Aplicada a Levantamentos Etnobotânicos de Plantas Medicinais no Brasil. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 19, n. 1, p. 01-16, 2021.

SHARMA, A. Gene expression analysis in medicinal plants under abiotic stress conditions. In: **Plant metabolites and regulation under environmental stress**. Academic Press: Massachusetts, 2018

SHARMA, M.; KUMAR, A. Ethnobotanical uses of medicinal plants: A review. **Life**, v. 50, p. 1-11, 2013.

SHEN et al. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.383, 132531, 2022.

SHER, A. Antimicrobial activity of Natural products from Medicinal Plants. **Gomal Journal of Medical Sciencies**. V. 7, n. 1, p. 72-28. 2009.

SHIELDS et al. Insensitivity to pain upon adult-onset deletion of Nav1.7 or its blockade with selective inhibitors. **J. Neurosci.**, v.38, n.47, pp. 10180-10201, 2018.

SIENIAWSKA, E.; MICHEL, P.; MROCZEK, T.; GRANICA, S.; SKALICKA-WOŹNIAK. *Nigella damascena* L. essential oil and its main constituents, damascenine

and β -elemene modulate inflammatory response of human neutrophils ex vivo. **Food Chem. Toxicol.**, v.125, pp. 161-169, 2019.

SILVA et al. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22, n.1, pp.193–207, 2012.

SILVA, B. D.; BERNARDES, P. C.; PINHEIRO, P. F.; FANTUZZI, E.; ROBERTO, C. D. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. **Meat Science**, v. 176, p.1-11, 2021.

SILVA, J. M. C.; LACHER JR, T. E. Caatinga—South America. in **Earth Systems and Environmental Sciences**. Springer: Switzerland 2020.

SILVA, T. C. D.; CAMPUS, J. L. D. A.; OLIVEIRA, R. C. D. S. The Role of Local Perceptions in Environmental Diagnosis. In: **Participatory Biodiversity Conservation**. Springer: Switzerland 2021.

SILVEIRA et al. Phytochemistry and Biological Activities of *Amburana cearensis* (Allemão) ACSm. **Molecules**, v.27, n.2, 2022.

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

SIQUEIRA, B. V.; SAKURAGUI, C. M.; SOARES, B. E.; OLIVEIRA, D. R. The rise of medicalization of plants in Brazil: a temporal perspective on vernacular names. **Journal of ethnopharmacology**, v. 224, p. 535-540, 2018.

SOBEH et al. *Albizia anthelmintica*: HPLC-MS/MS profiling and in vivo anti-inflammatory, pain killing and antipyretic activities of its leaf extract. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.115, 108882, 2019.

SOBRINHO, A. C. N.; NUNES, J. A.; DE SOUZA, R. U.; DA SILVA LUCENA, L.; DA SILVA, F. B. G.; DE FIGUEIREDO, D. Estudo etnobotânico de plantas medicinais comercializadas no mercado público de Iguatu-Ceará, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. 1-15, 2021.

SOEJARTO, D. D.; GYLLENHAAL, C.; RILEY, M. C.; ZHANG, H. Ethnobotany of natural products. **Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers: Oxford**, 2009.

SONG, X. et al. Failure of *Staphylococcus aureus* to Acquire Direct and Cross Tolerance after Habituation to *Cinnamon* Essential Oil. **Microorganisms**, v.7, n.1, 2019.

SOUZA, E. M.; SANTOS, P. H. C.; PEIXOTO, A. R.; COCOZZA, F. D. M.; NETO, T. F. D. S. C. Óleos Essenciais De Plantas Medicinais: Produção E Tratamentos De Doenças Respiratórias (Comorbidades) Na Prevenção Aos Sintomas Da Covid-19. **Revista Brasileira De Agroecologia**, V. 15, n. 4, p.56-68, 2020.

SOUZA, M.C.; SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE-LIMA, O.J.R.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. **Die Pharm.**, v.58, pp.582–586, 2003.

SRIVASTAVA, S.K; SINGH, N. K. General overview of medicinal and aromatic plants: A. **Journal of Medicinal Plants**, v. 8, n. 5, p. 91-93, 2020.

STREPSILS. Disponível em: <<https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/strepsils-menta-fresca/pil>> Acesso em: 07 de julho de 2022.

SULEIMAN, M. H. A. Prenylated flavonoids from the stem wood of *Commiphora opobalsamum* (L.) Engl. (Burseraceae). **Journal of King Saud University-Science**, v. 27, n. 1, p. 71-75, 2015.

SUROOWAN, S.; PYNEE, K. B.; MAHOMOODALLY. A comprehensive review of ethnopharmacologically important medicinal plant species from Mauritius. **South African Journal of Botany**, v. 122, p. 189-213, 2019.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 51-88, 2019.

TEIXEIRA, L. P.; LUGHADHA, E. N.; SILVA, M. V. C. D.; MORO, M. F. How much of the Caatinga is legally protected? An analysis of temporal and geographical coverage of protected areas in the Brazilian semiarid region. **Acta Botanica Brasilica**, v. 35, p. 473-485, 2021.

THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.

THOMMA, B. P.; EGGERMONT, K.; PENNINCKX, I. A.; MAUCH-MANI, B.; VOGELSANG, R.; CAMMUE, B. P.; BROEKAERT, W. F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 15107-15111, 1998.

Tjølsen, A.; Berge, O.-G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H. Hole, The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, pp. 5–17, 1992.

TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; TRINDADE, H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 89-99, 2019.

TOUYZ et al. Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension. **Can. J. Cardiol.**, v.36, pp. 659-670, 2020.

TRINH, H.T.; LEE, I.A.; HYUN, Y.J.; KIM, D.H. *Artemisia princeps* Pamp. essential oil and its constituents eucalyptol and α -terpineol ameliorate bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting bacterial growth and NF- κ B activation.

VAN VUUREN, S.; MUHLARHI, T. Do South African medicinal plants used traditionally to treat infections respond differently to resistant microbial strains?. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 186-192, 2017.

Van vuuren, S.F.; Suliman, S.; Viljoen, A.M. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.48, pp. 440-446, 2009.

VAN WYK, B. E. A family-level floristic inventory and analysis of medicinal plants used in Traditional African Medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, p. 112351, 2020

VAN WYK, B.E.; WINK, M.. **Medicinal plants of the world**. CABI: Joanesburgo, 2017.

VAPORIL. Disponível em: <<https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/vaporil/pil>>

Acesso em: 07 de julho de 2022.

VASCONCELOS, J. N. C.; BRITO, A. L.; PINHEIRO, A. L. E.; COSTA, D. I. J. G.; DA SILVA ALMEIDA, J. R. G.; SOARES, T. L.; DE SANTANA, J. R. F. Stimulation of 6-benzylaminopurine and meta-topolin-induced in vitro shoot organogenesis and production of flavonoids of *Amburana cearensis* (Allemão) AC Smith. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 1-10, 2019.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **J Ethnopharmacol.**, v. 112, pp.248–254, 2007.

VENÂNCIO, A.M.; ONOFRE, A.S.; LIRA, A.F.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; ANTONIOLLI, A.R.; MARCHIORO, M.; ESTEVAM, C. DOS S.; DE ARAUJO, B.S. Chemical composition, acute toxicity, and antinociceptive activity of the essential oil of a plant breeding cultivar of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Planta Med**, v.77, n.8, pp. 825-9, 2011.

VENDITTI, A. What is and what should never be: artifacts, improbable phytochemicals, contaminants and natural products. **Natural Product Research**, v. 34, n. 7, p. 1014-1031, 2020.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol. Rev.**, v. 88 pp.1547-1565, 2008.

WANI et al. *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo: A Critically Endangered Perennial Orchid from the North-West Himalayas. **Plants**, v.9, n.12, 2020.

WINK, M. Secondary metabolites, the role in plant diversification of. **Encyclopedia of Evolutionary Biology**, v. 4, p. 1-9, 2016.

XIAO et al. The anti-inflammatory potential of *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl essential oil in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, 2021.

XIMENES et at. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. **J Nat Med.** v.67, n.4, pp.758-64, 2013.

YADAV, B.; JOGAWAT, A.; RAHMAN, M. S.; NARAYAN, O. P. Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review. **Gene Reports**, v. 23, p. 1-14, 2021.

YEUNG, A. W. K. HEINRICH, M.; KIJJOA, A.; TZVETKOV, N. T.; ATANASOV, A. G. The ethnopharmacological literature: An analysis of the scientific landscape. **Journal of ethnopharmacology**, v. 250, p. 1-12, 2020.

YEUNG, A. W. K.; HEINRICH, M.; ATANASOV, A. G. Ethnopharmacology—a bibliometric analysis of a field of research meandering between medicine and food science? **Frontiers in Pharmacology**, v.9, p. 1-15, 2018.

ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; ABBAS, S.; SHARIF, Y.; UMAIR, M.; ZAFAR, M. H.; BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 198-202, 2018.

ZHOU, F.; PICHERSKY, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 1-10, 2020.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.58, pp.1260-1270, 2018.

APÊNDICE A– COMPROVANTE DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

	PLANTAE FABACEAE Amburana cearensis (Allemão) A.C. Sm.. Det: Andrade-Lima 08/05/1950 PEUFR 729 Coleta: D. de Andrade-Lima 50-538 08/05/1950. Loc: Estrada Ibimirim-Petrolândia Pernambuco, Brasil Notas: Árvore de flores com centro róseo e vermelho Tipo de registro: PreservedSpecimen Status taxonômico: aceito, Flora do Brasil 2020	7	PEUFR - Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho	nova anotação detalhes
	PLANTAE FABACEAE Amburana cearensis (Allemão) A.C. Sm.. Det: B.O. Veras 25/11/2019 PEUFR 55150 Coleta: B.O. Veras 4 20/11/2019. Loc: Lagoa Grande, Pernambuco, Brasil Coord. orig.: [lat: -8.996944 long: -40.274056 WGS84] Notas: Árvore. Tipo de registro: PreservedSpecimen Status taxonômico: aceito, Flora do Brasil 2020	8	PEUFR - Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho	nova anotação detalhes
	PLANTAE FABACEAE Amburana cearensis (Allemão) A.C. Sm.. Det: D. Cardoso 01/2008 PEUFR 14868 Coleta: D.P. Lima 13113 09/04/1973. Loc: Fazenda Murrinho, Campo Formoso, Bahia, Brasil Coord. munic.: [lat: -10.5074996948242 long: -40.3213996887207 err: ±104183 WGS84] Notas: Árvore de ca. de 7 m de altura por 15 cm de diâmetro; flores rosa "schoking"; perfume agradável; resina preta inodora Tipo de registro: PreservedSpecimen Status taxonômico: aceito, Flora do Brasil 2020	9	PEUFR - Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho	nova anotação detalhes

Comprovante de Depósito da Exsicata disponível em: <https://specieslink.net/search/>

APÊNDICE B- PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA



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

Recife, 26 de junho de 2020

Ofício nº 34/20

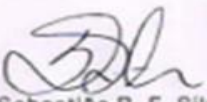
Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Marcia Vanusa da Silva**
Centro de Biociências
Departamento de Bioquímica/UFPE
processo nº0030/2020

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da composição química, toxicidade e atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antipirética do óleo essencial de amburana cearensis (allemão) a.c. smith (fabaceae)**”, registrado com o nº0030/2020 sob a responsabilidade da **Prof. Marcia Vanusa da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/04/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Julho/2020 a julho/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogêneo
Nº de animais	336
Peso/Idade	30-35g / 10 a 12 semanas
Sexo	macho (312) e (24) fêmeas
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério experimentação animal do Departamento de Bioquímica da UFPE

Atenciosamente


Prof. Sebastião R. F. Silva
--Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

APÊNDICE C – ARTIGO 1 EM INGLÊS**Antioxidant, antimicrobial and modulatory activity of essential oil from leaves of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith from northeast Brazil**

Bruno Oliveira de Veras^{a,b}, Amanda Vieira de Barros^c, Geovanna Maria de Medeiros Moura^d, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^e, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^e, Márcia Vanusa da Silva^b, Maria Betânia Melo de Oliveira^c and Ana Catarina de Souza Lopes^a

^a Post-graduation in Tropical Medicine, Laboratory of Microbiology, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Post-graduation in Biological Sciences, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^d Department of Biochemistry, Laboratory Chemistry and Function of Bioactive Proteins, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

^e Department of Chemistry, Center for Exact and Nature Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

Antioxidant, antimicrobial and modulatory activity of essential oil from leaves of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith from northeast Brazil

Amburana cearensis is a medicinal plant with wide distribution in South America. The aim of this study was to investigate chemical composition and biological (antioxidant, antimicrobial and modulatory activity) activities of essential oil of *A. cearensis*. The chemical components were analyzed by Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and Flame Ionization Detector (CG-FID). Twenty-five constituents were identified in the essential oil, germacrone ($45.76 \pm 0.15\%$), germacrene B ($17.74 \pm 0.06\%$), (E)-caryophyllene ($5.55 \pm 0.04\%$) and bicyclogermacrene ($4.13 \pm 0.03\%$) being the ones with the highest levels. The essential oil showed an antioxidant effect with IC_{50} values ranging from 183.89 to 324.86 $\mu\text{g/mL}$. Antimicrobial activity with MIC ranging from 64 to 1024 $\mu\text{g/mL}$. It observed synergistic effect with Fluconazole and Amoxicillin, on fungi and bacteria, respectively. The data obtained suggest that the essential oil can be used as a therapeutic tool for the treatment of infections alone or in combination with conventional antibiotics.

Keywords: Infections, germacrone, antimicrobial, synergistic potential, natural product.

1. INTRODUCTION

Plants produce essential oils to execute several functions, including protection against herbivores, defense against pathogens, attraction of pollinators, and protection against oxidative stress (Ahmed et al., 2017; Sharifi-Rad et al., 2017). Essential oils and some of their constituents have high economic value, having applications in agriculture as preservers and additives for human or animal use, in cosmetics and perfumes, and in other industrial fields (Jamshidi-Kia et al., 2018). The diversity of compounds that compose essential oils permits the existence of different biological responses (Tariq et al., 2019).

The use of herbal medicines can promote beneficial effects on human health, being used indirectly, covering more than 80% of the world population that use plants or products that come from them to prevent various diseases. In phytotherapy, essential oils are applied in medicine for the promotion of health and welfare. The structural diversity of the compounds, is a positive contributor to the existence of different medicinal properties (Ahmed et al., 2017; Jamshidi-Kia et al., 2018; Veras et al., 2020).

Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae) is a plant with distribution in South America (Argentina, Bolivia, Brazil and Paraguay). In Brazil, it has a wide distribution in the semi-arid region, known in particular as "cumaru", "cumaru de cheiro", "imburana", "imburana de cheiro", "amburana", "amburana de cheiro" or "cerejeira", being exploited commercially for its noble wood, used in the manufacture of luxury furniture (Macedo et al., 2018). *A. cearensis* is considered an important medicinal plant in ethnobotanical studies, as it possesses curative powers for several diseases (Canuto et al., 2014; Macedo et al., 2018). The stem barks are extensively used in traditional medicine for the treatment of colds, bronchitis, flu, asthma, against pain, analgesic, and spasmolytic (Oliveira et al., 2021).

In this context, this study aimed to investigate the first report of the chemical composition of essential oil of leaves from *Amburana cearensis*, and evaluate its antioxidant, antimicrobial activity, and modulatory effect with conventional antibiotics (Amoxicillin and Fluconazole).

2. RESULTS AND DISCUSSIONS

2.1. Chemical composition

The leaves of *A. cearensis* (Allemão) A.C. Smith were collected in countryside of Lagoa Grande, in the state of Pernambuco-PE Brazil. The essential oil was obtained by hydrodistillation (HD), and subsequently analyzed regarding chemical composition in Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and Flame Ionization Detector (CG-FID) (Veras et al., 2020). The Hydrodistillation (HD) of leaves of *A. cearensis* resulted in the essential oil with a yield of $0.42 \pm 0.03\%$ (w/w) with identification of 95.21% of its chemical constituents. The majoritarian quantified components were germacrone ($45.76 \pm 0.15\%$), germacrene B ($17.74 \pm 0.06\%$), (E)-caryophyllene ($5.55 \pm 0.04\%$) and bicyclogermacrene ($4.13 \pm 0.03\%$) (Table S1).

The essential oil has bioactive compounds in its composition, including germacrene, which has antiviral (Liao et al., 2013), insecticide (Benelli et al., 2017), antitumor (Ye et al., 2017), antioxidant and neuroprotective (Wu et al., 2019), anti-inflammatory, antibacterial and antitumor (Zhang et al., 2017).

2.2. Antioxidant activities

The essential oil showed an antioxidant effect in all the techniques used, presenting IC_{50} values of $298.23 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ and 183.89 ± 0.12 in the ABTS and DPPH and techniques, respectively, and sequestration tests for the superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and

hydroxyl ($\text{OH}^\cdot$) radicals showed IC_{50} values of 234.38 ± 0.12 and 324.86 ± 0.49 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Table S2). Representing almost half of the chemical composition of the essential oil of *A. cearensis*, the germacrone is an oxygenated sesquiterpene which had its antioxidant role mainly related to cyclic ketone germacrone (Zeljko et al., 2017). Although EO *A. cearensis* is a complex chemical mixture, it may become an alternative source of natural antioxidant based on its potential and use of its raw form in food, edible and pharmaceutical products, among others, which aim to counteract damages arising from oxidative stress, and that promote an improvement in people's quality of life (Figueiredo et al., 2019).

2.3. Antimicrobial activity

The essential oil presented effective antibacterial activity against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* UFPEDA-709, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* UFPEDA-39, *Escherichia coli* ATCC 8739, *E. coli* UFPEDA-224, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* UFPEDA-396, *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 10261, *C. albicans* URM-UFPE 6366, *C. albicans* URM-UFPE 6542 and *C. albicans* URM-UFPE 5788 with MIC values ranging from 64 to 1024 $\mu\text{g/mL}$ (Table S3). As noted above, the difference between the antimicrobial activities by the essential oil is explained by the diversity in composition, and the interaction of each component in the target microorganism, as observed by Khoury et al. (2019).

2.4. Evaluation of the modulating effect

The essential oil was investigated for possible synergistic effect combined with amoxicillin and fluconazole. It was observed that the essential oil showed a potential synergistic effect when combined with amoxicillin (Table S4) promoting an 8-fold reduction in MICs values in *S. aureus* ATCC 6538, and a 4-fold reduction in *S. aureus* UFPEDA-709 and *P. aeruginosa* ATCC 9027. It was possible to verify the 4-fold decrease in MICs values of fluconazole when combined with essential oil in the strain of *C. albicans* URM-UFPE 5788 (Table S4). Resistance to antibiotics used in clinical practice has become a major challenge for the treatment of bacterial and fungal infections. Several studies have been carried out to investigate the potential of essential oils to act as adjuvants in clinical practice with antibiotics already available (Tariq et al., 2019). The data obtained from the essential oil of *A. cearensis* indicate that it has

potential for application, however, further studies are needed to understand its possible mechanisms of action, as well as its effectiveness on other organisms.

3. CONCLUSION

This work values *A. cearensis* as an endangered species that is little explored from a biological and pharmacological point of view. The essential oil presented as major constituents germacrone ($45.76 \pm 0.15\%$), germacrene B ($17.74 \pm 0.06\%$), (E)-caryophyllene ($5.55 \pm 0.04\%$) and bicyclogermacrene ($4.13 \pm 0.03\%$), with antimicrobial, antioxidant and antibiotic modulating effects. Essential oil can be used as a natural source of antioxidant and antimicrobial agents to avoid economic losses, reducing the health risks of microbial pathogens, such as bacteria resistant to several antibiotics, making it a candidate for the development of new drugs.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Experimental related to this article are available online.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M. Z., Amjad, M. S., Sadaf, H. M., Riaz, I., Ahmad, N. 2017. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J. Pharmacogn. Phytochem*, **6**, 2, 205-214
- Canuto, K.M., Leal, L.K., Lopes, A.A., Coleman, C.M. 2014. Amburanins A and B from *Amburana cearensis*: daphnodorin-type biflavonoids that modulate human neutrophil degranulation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **25**, 639–647.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. 2018. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of HerbMed Pharmacology*. **7**, 1–7.
- Macedo, J.G.F., De Menezes, I.R.A., Ribeiro, D.A., Santos, M.D.O., De Mâcedo, D.G., Macêdo, M.J.F., De Almeida, B.V., Souza De Oliveira, L.G., Pereira Leite, C., De Almeida Souza, M.M. 2018. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **2018**, 1–28.
- Oliveira, C. R., Cal, V. D. L. J., Vaz, D. F., Fialho, P. B., Curiele, R. S., Figueira, F. S., Paula Vieira, R. 2021. Known and unknown medicinal plants used in respiratory disorders in Brazilian folk medicine: a brief review. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, **4**, 1, 2021.

- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Iriti, M. 2017. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, **22**, 1, 1-70.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Rather, M. A. A. 2019. Comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial pathogenesis*, **134**, 103580, 2019.
- Wu, T., Yin, F., Kong, H., Peng, J. 2019. Germacrone attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via antioxidative and antiapoptotic mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120**, 18901–18909.
- Ye, L., Wu, J., Chen, W., Feng, Y., Shen, Z. 2017. Novel anti-cancer agents based on germacrone: design, synthesis, biological activity, docking studies and MD simulations. *RSC Advances*, **7**, 3760–3767.
- Zhang, L., Yang, Z., Wei, J., Su, P., Pan, W., Zheng, X., Zhang, K., Lin, L., Tang, J., Fang, Y., Du, Z. 2017. Essential oil composition and bioactivity variation in wild-growing populations of *Curcuma phaeocaulis* Valetton collected from China. *Industrial Crops and Products*, **103**, 274–282.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Antioxidant, antimicrobial and modulatory activity of essential oil from leaves of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith from northeast Brazil

Bruno Oliveira de Veras^{a,b}, Amanda Vieira de Barros^c, Geovanna Maria de Medeiros Moura^d, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^e, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^e, Márcia Vanusa da Silva^b, Maria Betânia Melo de Oliveira^c and Ana Catarina de Souza Lopes^a

^a Post-graduation in Tropical Medicine, Laboratory of Microbiology, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Post-graduation in Biological Sciences, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^d Department of Biochemistry, Laboratory Chemistry and Function of Bioactive Proteins, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

^e Department of Chemistry, Center for Exact and Nature Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author: Bruno Oliveira de Veras, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel: +55 81 2526-8570, E-mail: bruno.veras@ufpe.br; brunooveras@hotmail.com

Abstract:

Amburana cearensis is a medicinal plant with wide distribution in South America. The aim of this study was to investigate chemical composition and biological (antioxidant, antimicrobial and modulatory activity) activities of essential oil of *A. cearensis*. The chemical components were analyzed by Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and Flame Ionization Detector (CG-FID). Twenty-five constituents were identified in the essential oil, germacrone ($45.76 \pm 0.15\%$), germacrene B ($17.74 \pm 0.06\%$), (E)-caryophyllene ($5.55 \pm 0.04\%$) and bicyclogermacrene ($4.13 \pm 0.03\%$) being the ones with the highest levels. The essential oil showed an antioxidant effect with IC_{50} values ranging from 183.89 to 324.86 $\mu\text{g/mL}$. Antimicrobial activity with MIC ranging from 64 to 1024 $\mu\text{g/mL}$. It observed synergistic effect with Fluconazole and Amoxicillin, on fungi and bacteria, respectively. The data obtained suggest that the essential oil can be used as a therapeutic tool for the treatment of infections alone or in combination with conventional antibiotics.

Keywords: Infections, germacrone, antimicrobial, synergistic potential, natural product.

1. Methodology**1.1. Plant material**

The samples (leaves) of *A. cearensis* (Allemão) A.C. Smith were collected in the municipality of Lagoa Grande, in the state of Pernambuco-PE (geographic coordinates of $08^{\circ} 59' 49''$ S and $40^{\circ} 16' 19''$ W) in November of 2019. The plant material had its botanical identity confirmed, and an exsiccate of the plant material deposited under number 55.150, at the Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE).

1.2. Essential oil extraction

In this process, 600 g of fresh leaves were used. The material were cleaned and crushed in a knife mill (Tecnal TE-625), later partitioned into three portions containing 200 g of material, each partition being subjected to Hydrodistillation (HD) for 3 hours in a Clevenger type apparatus. After hydrodistillation, the water excess was removed with anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4), and the calculation of the yield was obtained based on the amount of material used in the process and the mass obtained % (w/w).

The essential oil obtained was stored under refrigeration at -4 °C protected from light for further analysis.

1.3. Chemical analysis of the essential oil

The characterization of the compounds was carried out according to De Veras et al., (2020) analyzed on Agilent Technologies Gas Chromatograph (Palo Alto, CA, USA) 5975C series, with quadrupole detection system equipped with apolar column DB-5 Agilent J&W, (60 m × 250 m i.d. × 0.25 m film thickness). Aliquots of 1 µL in split mode (1:50) of the essential oil in the concentration of 3000 ppm were injected in the Gas Chromatograph coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). Subsequently, 1 µL in split (1:50) of the mixture of hydrocarbon standards: C9-C30 was injected. The essential oil mixture and the mixture of hydrocarbon standards, 1 µL (0.2 µL of alkanes and 0.8 µL of the oil) were then injected under the splitless mode. The GC temperature was maintained at 60 °C for 3 min, then increasing at 2.5 °C.min⁻¹ to 240 °C and held for 10 min at this temperature. The helium flow was maintained at a constant pressure of 100 kPa. The MS interface was set at 200 °C and injector at 250 °C and the mass spectra recorded at 70 eV (in EI mode) with a scan rate of 0.5 scan s⁻¹ of 20-350 m/z. From the analysis of the retention times (RT) of the compounds present in the essential oil sample, the hydrocarbon standards and the combination of the essential oil with the pattern mixture, the Retention Indexes (RI) for each component of the oil were calculated. Compounds were identified by comparing their mass spectra (MassFinder 4, NIST08 and Wiley Registry TM 9th Edition, integrated into the software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) and Retention Index to those of authentic standards available in the Adams (2017). The oil sample were quantified in Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID), under the same GC-MS conditions, in triplicate for calculation of standard deviation of peak area percentage of each compound in the chromatogram. This was used to determine the proportion of the compounds in the essential oil.

1.4. Antioxidant activities

1.4.1. ABTS Radical-Scavenging Assay

Antioxidant activity by the ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) was evaluated as described by De Veras et al. (2020) with modifications. Initially, the ABTS radical was formed from the reaction of the 7 mM stock solution of ABTS with 140 mM potassium persulfate. Dilutions of essential oil

were mixed with ethanolic ABTS solution. The vitamin E analogue (Trolox®) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) were used as a positive controls, and ethanol with blank. The percent inhibition (I%) was calculated using the following equation: $I\% = [(A_{734b} - A_{734s}) / (A_{734b})] \times 100$, where A_{734b} is the absorbance of blank, and A_{734s} is the absorbance of the samples. All assays were carried out in triplicate. The concentrations of the samples responsible for 50% of decrease of the initial activity of ABTS free radical (IC_{50}) was calculated through linear regression.

1.4.2. DPPH Radical-Scavenging Assay

The assessment of the antioxidant activity using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical method was evaluated as described by De Veras et al. (2020). Dilutions of essential oil were mixed with 0.2 mM methanolic DPPH solution. A vitamin E analogue (Trolox®) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) were used as a positive controls, and methanol with blank. The mixtures were incubated in the dark for a period of 30 min at 25 °C, then the absorbance was measured at 517 nm. The percent inhibition (I%) was calculated using the following equation: $I\% = [(A_{517b} - A_{517s}) / (A_{517b})] \times 100$, where A_{517b} is the absorbance of blank, and A_{517s} is the absorbance of the samples. All assays were carried out in triplicate. The concentrations of the samples responsible for 50% of decrease of the initial activity of DPPH free radical (IC_{50}) was calculated through linear regression.

1.4.3. Hydroxyl radical scavenging activity ($OH^\cdot$)

The activity by hydroxyl radical scavenging activity was investigated using the Fenton reaction based on the methodology of Costa et al. (2009) with modifications, or the generation of hydroxyl radicals in 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) using 2 mM sodium salicylate, 30% H_2O_2 , 10 mM EDTA e 10 mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Dilutions of essential oil were added to the mix. Quercetin was used as a positive control, and ethanol with blank. Samples were mixed and incubated at 37 °C for 1 h, and then read at 510 nm. The percent inhibition (I%) was calculated using the following equation: $I\% = [(A_{510b} - A_{510s}) / (A_{510b})] \times 100$, where A_{510b} is the absorbance of blank and A_{510s} is the absorbance of the samples. All assays were carried out in triplicate. The concentrations of the samples responsible for 50% of decrease of the initial activity of hydroxyl radical (IC_{50}) were calculated through linear regression.

1.4.4. Superoxide radical scavenging assay ($O_2^{\cdot-}$)

The evaluation was carried out based on the methodology of Costa et al. (2009) with modifications, using a mixture containing 0.5 mM riboflavin, 0.375 mM nitroblue tetrazolium chloride (NBT), 0.5 mM EDTA and 65 mM methionine, in 50 mM phosphate buffer pH 7.4. The mixture was incubated under fluorescent light (15w) for 15 min and the absorbance read at 560 nm. Quercetin was used as a positive control, and ethanol with blank. The percent inhibition (I%) was calculated using the following equation: $I\% = [(A_{560b} - A_{560s}) / (A_{560b})] \times 100$, where A_{560b} is the absorbance of blank and A_{560s} is the absorbance of the samples. All assays were carried out in triplicate. The concentrations of the samples responsible for 50% of decrease of the initial activity of superoxide radical (IC_{50}) were calculated through linear regression.

1.5. Antimicrobial activity

1.5.1. Microbial strains and cultural medium

Strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Candida albicans* ATCC 10231 and *C. albicans* ATCC 10261 were obtained of American Type Culture Collection. Strains of *S. aureus* UFPEDA-709, *P. aeruginosa* UFPEDA-39, *E. coli* UFPEDA 224, *K. pneumoniae* UFPEDA 396 with different resistance profiles were obtained from the collection of microorganisms from the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco. Strains of fungi *C. albicans* (URM-6366, URM-6542 and URM-5788) with different resistance profiles were provided by the Department of Mycology of the Federal University of Pernambuco. Standard Mueller–Hinton Broth and Agar (MHB and MHA) were used as the bacterial culture media, and RPM-1640 and Sabouraud Dextrose Agar (SDA) were used as the fungal culture media.

1.5.2. Determination of MIC and MBC

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were determined against tested microbial strains according to CLSI protocols M100 (2017) and M27 (2008). The MIC were both determined with starting inoculums of 1.0×10^8 CFU/mL for bacteria and fungi. Aliquots of the appropriate medium, solutions of essential oil and inoculum were dispensed in a 96-well plate. The plates were incubated for 24 and 48 hours for bacteria and fungi, respectively. The MIC was detected using a colorimetric method by adding 10 μ L of 0.01% resazurin (w/v) aqueous solution in each well at the end of the incubation period. For determining MBC and MFC, aliquots of 10 μ L of each

well were transferred to petri dishes containing MHA or SDA for bacteria and fungi, respectively (Da Silva et al., 2020). As a positive control, it was used standard drug Amoxicillin (Aldrich- Sigma) and Fluconazole (Aldrich- Sigma). The culture medium and DMSO (solvent used for dissolving essential oil) were used as a negative control. All experiments were performed in triplicate.

1.5.3. Evaluation of the modulating effect

The antimicrobial interaction between Amoxicillin, Fluconazole and essential oil of *A. cearensis* was studied by the checkerboard method according to the methodology of Brandt et al. (2010). The essential oil was tested at concentrations of 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 and 1/64 of the MICs obtained. Dilutions of Amoxicillin or Fluconazole were also obtained corresponding to 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 and 1/1024 of the MICs obtained. Aliquots of 50 μ L of essential oil were added to the plate wells in horizontal orientation and 50 μ L aliquots of the Amoxicillin or Fluconazole dilutions were added in vertical orientation so that the plate contained various combinations of concentration of the two compounds. Positive growth controls (to assess the presence of turbidity) were performed in wells that did not contain antimicrobial. In addition, negative growth control was applied in a 96-well plate. Then, each well was added 10 μ L of bacterial inoculum to the wells and the plates incubated at 37 °C for 24 hours. At the end of growth, 10 μ L of a resazurin solution (0.01%) was added to verify the presence and/or absence of bacterial growth. All tests will be performed in triplicate. After incubation, 10 μ L of resazurin was added to all wells and again cultured at 37°C for 2h. Growth in the medium is indicated by the color change from blue to pink. Combination analysis was obtained by calculating the fraction inhibitory concentration index (FICI) using the following formula (Van vuuren et al., 2009):

FIC of Essential oil = MIC of essential oil in combination Amoxicillin or Fluconazole / MIC of essential oil alone;

FIC of Amoxicillin or Fluconazole = MIC of Amoxicillin or Fluconazole combination with essential oil / MIC of Amoxicillin or Fluconazole alone;

FICI=FIC of essential oil + FIC of Amoxicillin or Fluconazole.

Effect types were classified as follows: **FICIs** ≤ 0.5 , synergism; **FICIs** $0.5 \leq 1$, additive effect; **FICIs** $>1-4$, indifferent effect and **FICIs** ≥ 4 , antagonism.

REFERENCES

- Brandt, A.L., Castillo, A., Harris, K.B., Keeton, J.T., M.D. Hardin, Taylor, T.M. 2010. Inhibition of *listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination J. Food Sci., **75**, M557-M563.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (27st ed) Wayne: M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute (2017).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts (3st ed) Wayne: M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).
- Costa, E.V., Pinheiro, M.L.B., Silva, J.R.A., Maia, B.H.L.N.S., Duarte, M.C.T., Amaral, A.C.F., Leon, L.L. 2009. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Química Nova*, **32**(1), 78–81. doi.org/10.1590/S0100-40422009000100015
- Da Silva, G.C., de Veras, B.O., de Assis, C.R.D., Navarro, D.M. do A.F., Diniz, D.L.V., Brayner Dos Santos, F.A., de Aguiar, J.C.R. de O.F., da Silva, M.V., Dos Santos Correia, M.T. 2020. Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic effects with conventional antibiotics under clinical isolates by essential oil of *Hymenaea rubriflora* Ducke (FABACEAE). *Natural product research*, **0**, 1–5. doi.org/10.1080/14786419.2020.1729150
- De Veras, B.O., Oliveira, M.B.M., Oliveira, F.G.S., Santos, Y.Q., Oliveira, J.R.S., Lima, V.L.M., Almeida, J.R.G., Navarro, D.M.A.F., Aguiar, J.C.R.O., Aguiar, J.S., Gorlach-Lira, K., Assis, C.R.O.F., Silva, M.V., Lopes, A.C.S. 2020. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **247**, 112265. doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265
- Ghramh, H. A., Khan, K. A., Ibrahim, E. H. 2019. Biological Activities of *Euphorbia peplus* Leaves Ethanolic Extract and the Extract Fabricated Gold Nanoparticles (AuNPs). *Molecules*, **24** (7), 1431. doi.org/10.3390/molecules24071431
- Van vuuren, S.F., Suliman, S., Viljoen, A.M. 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett. Appl. Microbiol.*, **48**, 440-446.

Tables

Table 1 – The composition chemical of essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) by GC-MS and GC-FID, highlighting in bold the major components.

Peak	Compound	Retention indexes		%	S.D.
		Cal	Lit		
1	δ -elemene	1335	1339	0.27	0.03
2	Trans- β -elemene	1389	1393	1.07	0.02
3	α -gurjunene	1409	1411	1.41	0.05
4	(E)-caryophyllene	1417	1421	5.55	0.04
5	γ -elemene	1434	1435	1.18	0.02
6	α -humulene	1452	1455	1.22	0.03
7	alloaromadendrene	1460	1463	0.64	0.01
8	germacrene D	1480	1483	1.95	0.02
9	β -selinene	1489	1488	2.26	0.02
10	bicyclogermacrene	1500	1499	4.13	0.03
11	germacrene A	1508	1507	0.75	0.01
12	cubebol	1514	1518	0.16	0.01
13	7-epi- α -selinene	1522	1520	0.22	0.01
14	δ -cadinene	1522	1526	0.30	0.01
15	α -cadinene	1537	1541	0.62	0.01
16	elemol	1548	1552	0.89	0.02
17	germacrene B	1559	1561	17.74	0.06
18	palustrol	1567	1570	0.37	0.03
19	spathulenol	1577	1580	0.47	0.01
20	viridiflorol	1592	1594	0.23	0.01
21	trans- β -elemenone	1602	1606	3.13	0.02
22	γ -eudesmol	1630	1635	0.39	0.01
23	α -muurolol	1644	1645	1.48	0.02
24	α -cadinol	1652	1658	2.02	0.01
25	germacrone	1693	1702	46.76	0.15
Hydrocarbon monoterpenes (MH)				–	
Oxygenated monoterpenes (MO)				–	
Hydrocarbon sesquiterpenes (SH)				39.31	

Oxygenated sesquiterpenes (SO)	55.90
TOTAL	95.21

Cal- Experimental retention indexes relative and Lit- Literature retention indexes; (%) - Percentage content; S.D. Standard Deviation.

Table 2 – Antioxidant activity of essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) as expressed in IC₅₀ (µg/mL).

Sample	Methods (IC ₅₀)			
	ABTS ⁺	DPPH ⁺	OH [•]	O ₂ ^{•-}
Trolox [®]	129.49±0.22 ^a	63.71±0.12 ^a	N.T.	N.T.
BHT	336.82±0.15 ^c	228.20±0.21 ^c	N.T.	N.T.
Quercetin	N.T.	N.T.	33.61±0.23 ^a	28.29±0.23 ^a
EO <i>A. cearensis</i>	298.23±0.11 ^b	183.89±0.12 ^b	324.86±0.49 ^b	234.38±0.12 ^b

^{abc} Different lowercase supercript letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni Test. ABTS: 2',2-Azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-sulfonato); DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; OH[•]:Hydroxyl radical; O₂^{•-}: Superoxide radical; BHT: Butylated Hydroxytoluene; N.T. – Not Tested.

Table 3 – Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) in ($\mu\text{g/mL}$) essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*). N.T. – Not Tested.

Strains	Fluconazole		Amoxicillin		EO <i>A. cearensis</i>	
	MIC	MFC	MIC	MBC	MIC	MBC/MFC
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	N.T.	N.T.	16	32	256	512
<i>S. aureus</i> UFPEDA-709	N.T.	N.T.	128	256	512	1024
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	N.T.	N.T.	256	512	128	256
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-39	N.T.	N.T.	512	1024	128	256
<i>E. coli</i> ATCC 8739	N.T.	N.T.	128	256	64	128
<i>E. coli</i> UFPEDA- 224	N.T.	N.T.	512	1024	128	256
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	N.T.	N.T.	128	256	256	512
<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA-396	N.T.	N.T.	128	256	512	1024
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16	32	N.T.	N.T.	128	256
<i>C. albicans</i> ATCC 10261	8	16	N.T.	N.T.	128	256
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6366	128	256	N.T.	N.T.	512	1024
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6542	64	128	N.T.	N.T.	256	512
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 5788	256	512	N.T.	N.T.	1024	512

Table 4 – Combined effects of essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*), fluconazole and amoxicillin.

Strains	Fluconazole			Amoxicillin			EO <i>A. cearensis</i>			Outcome	
	MIC _I	MIC _{II}	FIC	MIC _I	MIC _{II}	FIC	MIC _I	MIC _{II}	FIC	FICI	Classification
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	N.T.	N.T.	N.A.	16	2	0.125	256	64	0.25	0.375	Synergic
<i>S. aureus</i> UFPEDA-709	N.T.	N.T.	N.A.	128	32	0.25	512	32	0.0625	0.3125	Synergic
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	N.T.	N.T.	N.A.	256	64	0.25	128	16	0.125	0.375	Synergic
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA-39	N.T.	N.T.	N.A.	512	512	1	128	32	0.25	1.25	Indifferent
<i>E. coli</i> ATCC 8739	N.T.	N.T.	N.A.	128	32	0.25	64	32	0.5	0.75	Additive
<i>E. coli</i> UFPEDA- 224	N.T.	N.T.	N.A.	512	512	1	128	32	0.25	1.25	Indifferent
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	N.T.	N.T.	N.A.	128	64	0.5	256	128	0.5	1	Additive
<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA-396	N.T.	N.T.	N.A.	128	128	1	512	512	1	2	Indifferent
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16	8	0.5	N.T.	N.T.	N.A.	128	64	0.5	1	Additive
<i>C. albicans</i> ATCC 10261	8	8	1	N.T.	N.T.	N.A.	128	32	0.25	1.25	Indifferent
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6366	128	32	0.25	N.T.	N.T.	N.A.	512	128	0.5	0.75	Additive
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6542	64	64	1	N.T.	N.T.	N.A.	256	64	0.25	1.25	Indifferent
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 5788	256	32	0.125	N.T.	N.T.	N.A.	1024	256	0.25	0.375	Synergic

N.T. – Not Tested; N.A. – Not Applicable; MIC_I: MIC of the essential oil or antibiotic alone (µg/ml); MIC_{II}: MIC of antibiotic or essential oil in combination (µg/ml); FIC: fractional inhibitory concentration; FICI: fraction inhibitory concentration index.

02/08/2022 08:20

Email – Bruno Veras – Outlook

Submission received for Natural Product Research (Submission ID: 224543840)

rpsupport@tandf.co.uk <rpsupport@tandf.co.uk>

Ter, 02/08/2022 08:04

Para: brunooveras@hotmail.com <brunooveras@hotmail.com>



Dear Bruno Oliveira de Veras,

Thank you for your submission.

Submission ID	224543840
Manuscript Title	Antioxidant, antimicrobial and modulatory activity of essential oil from leaves of <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Smith from northeast Brazil
Journal	Natural Product Research

You can check the progress of your submission, and make any requested revisions, on the [Author Portal](#).

Thank you for submitting your work to our journal.
If you have any queries, please get in touch with GNPL-
peerreview@journals.tandf.co.uk.

Kind Regards,
Natural Product Research Editorial Office

Taylor & Francis is a trading name of Informa UK Limited, registered in England under no. 1072954.
Registered office: 5 Howick Place, London, SW1P 1W.

APÊNDICE D – ARTIGO 2 EM INGLÊS**Antinociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of the leaves of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. in mice**

Bruno Oliveira de Veras^{a,b}, Geovanna Maria de Medeiros Moura^c Amanda Vieira de Barros^d, Márcia Vanusa da Silva^b, Almir Gonçalves Wanderley^e, Maria Betânia Melo de Oliveira^d and Ana Catarina de Sousa Lopes^a

^a Post-graduation in Tropical Medicine, Laboratory of Microbiology, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Department of Biochemistry, Laboratory Chemistry and Function of Bioactive Proteins, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

^d Post-graduation in Biological Sciences, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

^e Department of Pharmaceutical Sciences, Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Federal University of São Paulo, 09913-030, Diadema, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Bruno Oliveira de Veras, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel: +55 81 2526-8570, E-mail: bruno.veras@ufpe.br; brunooveras@hotmail.com

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith is a medicinal plant with wide distribution in South America, popularly known in Brazil as "cumaru" or "amburana de cheiro". Is a medicinal plant used for its curative powers for the treatment of infections, besides the treatment of flu, diarrhea, fever, rheumatic, inflammations and pain, through infusions, teas, decoctions, baths, tinctures and inhalations of stem and root barks, leaves, fruits and seeds. However, none of the ethnopharmacological properties have been scientifically evaluated using volatile compounds obtained from its leaves (essential oil).

Aim of the study: This study investigated for the first time the toxicological safety, antinociceptive and anti-inflammatory activities of the essential oil from the leaves of *A. cearensis*

Material and methods: The acute toxicity of the essential oil was investigated in mice. The antinociceptive effect was evaluated using the models of abdominal writhing induced by acetic acid and the formalin test, being investigated the possible mechanisms of action involved in antinociception (opioid, cholinergic, adenosinergic, dopaminergic and ATP-sensitive potassium channels (K-ATP)). The acute anti-inflammatory effect was investigated through models of carrageenan-induced peritonitis, yeast-induced pyrexia and carrageenan- and histamine -induced paw inflammation.

Results: No acute toxicity were observed at doses up to 2,000 mg/kg; p.o.. The antinociceptive effect was statistically equal to morphine. In the formalin assay, the oil showed analgesic activity in the neurogenic and inflammatory phases, having as mechanisms the cholinergic, adenosinergic system and ATP-sensitive potassium channels (K-ATP). In peritonitis, a reduction in TNF- α and IL-1 β levels was observed, in addition to leukocyte migration. The antipyretic effect was statistically superior to dipyrene. The reduction in paw edema was statistically superior to the standard in both models.

Conclusion: This is the first report on the biological activity of essential oil of *A. cearensis*. The results obtained not only support the traditional use of the species in inflammatory conditions and pain in folk medicine, but also demonstrate that this is a rich source of phytocomponents such as germacrone, which can be used as a natural and sustainable therapeutic agent with industrial applications.

Keywords: Amburana de Cheiro; Paw; Treatment; Germacrone; Ethnopharmacological; Medicinal Plant.

Abbreviations:

ANOVA: analysis of variance.

EO *A. cearensis*: Essential oil of *Amburana cearensis*

i.p.: Intraperitoneal Administration

IL-1 β : Interleucin 1 β

LD₅₀: Median lethal dose

p.o.: Oral administration

PGE₂ : Prostaglandin E₂

RI: Retention index

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

1. Introduction

Herbal medicines can promote beneficial effects on human health, being used indirectly, covering more than 80% of the world population that use plants or products that come from them to prevent various diseases (Jamshidi-Kia et al., 2018). Recent researches focused on the use of therapeutic plants are part of the study of ethnobotany and allowed access to a wide knowledge linked to the use of plants in popular medicine in Brazil (De Veras et al., 2021; De Veras et al., 2020; Coelho-De-Souza et al., 2018; Ribeiro et al., 2014; Cartaxo et al., 2010).

Brazil is known for the greatest biodiversity in the world, housing approximately 20% of the total number of existing species with a high degree of endemism (Ribeiro et al., 2014). This patrimony is divided among the Brazilian biomes and one of them, the Caatinga biome (semi-arid region) covers a wide territory in the northeast region of Brazil and is home to many plants used in traditional medicine and also commercial manufacturing of phytotherapeutic products (Silva et al., 2012; De Albuquerque et al., 2007). Among the ethnobotanical studies in semi-arid region of Brazil, the Fabaceae family stands out due to the high representativeness of its species and diversity in most studies involving medicinal plants (Macedo et al., 2018; Cartaxo et al., 2010; De Albuquerque et al., 2007).

Amburana cearensis (Allemão) B.C. Smith (Fabaceae) (syn. *Torresea cearensis* Fr. All) is a plant species with wide distribution in South America (Argentina, Paraguay, Uruguay, Bolivia and Peru), with greater distribution in the Caatinga and Cerrado of Brazil. In semi-arid region it is popularly known as "cumaru", "cumaru de cheiro", "imburana", "imburana de cheiro", "amburana" or "amburana de cheiro", considered as a threatened species due to the high exploitation of its wood that presents high strength and durability (Oliveira et al., 2019; Seleme et al., 2015; Figueredo et al., 2013; Canuto et al., 2010).

It is considered an important medicinal plant in ethnobotanical studies, as it has healing powers for several diseases (Canuto et al., 2014; Lima et al., 2013; Albuquerque and Oliveira, 2007). It is common to use preparations such as infusions, teas, decoctions, baths, tinctures and inhalations using the stem and root barks, leaves, fruits and seeds (Macedo et al., 2018; Bitu et al., 2015; Costa and Marinho, 2016; Oliveira et al., 2010), for the treatment of diseases such as sinusitis, flu, respiratory diseases, inflammation, generalized pain, headache, gastric and intestinal problems, wound

healing, urinary tract infection, hypertension, snakebite fever, muscle pain, tranquilizer, toothache, nausea, joint pain, depurative, kidney infection, skin inflammation, gynecological inflammation, back pain and fever, among others (Albergaria et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Macedo et al., 2018; Pereira et al., 2017; Bitu et al., 2015; Baptistel et al., 2014; Monteiro et al., 2014; Silva et al., 2012; Marinho, 2004).

Various activities of this species were evaluated, as antioxidant and antitumor of the hydroalcoholic extract of the stem (Lataliza et al., 2019), antimicrobial effect of the stem bark (Ferreira et al., 2020; Sá et al., 2011), antimicrobial and modulation of the antibiotic effect of seeds and leaves extracts (Figueredo et al., 2013), anti-inflammatory of the hydroalcoholic extract stem bark (Leal et al., 2003), neuroprotective of extracts hexane, ethanol, dichloromethane and ethyl acetate, from seeds (Pereira et al., 2017), antiedematogenic, antimicrobial and mutagenic activities of the aqueous extract of seeds (Lima et al., 2013), antioxidant activities of ethanolic and methanolic extracts from leaves (Dos Santos et al., 2009). However, there are no reports of activities using the essential oil of *A. cearensis*.

The objective of this study was to validate the ethnopharmacological activities attributed to the species and its different forms of use, using the volatile compounds obtained from its leaves (essential oil), to investigate the anti-inflammatory, antinociceptive activities and toxicological safety.

2. Material and Methods

2.1. Experimental model *in vivo* and ethical procedures

Male and female (30–32 g) of mice Swiss albino (*Mus musculus*) were obtained of central bioterium of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami- Lika/UFPE. The animals were acclimated in cages a solid polypropylene bottom (size: 18 cm x 34 cm x 41 cm) with wooden bed, under standard environmental conditions of 22 ± 3 °C, 12/12 dark-light cycle, and fed with the recommended standard ration and drinking water *ad libitum*. The experimental animal protocol was carried out following the recommendations of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Brasil (CONCEA) and Council of International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). All experiments were approved by the Ethics Commission for Animal Use (CEUA) of Federal University of Pernambuco, under nº 30/2020.

2.1.1. Acute toxicity test and median lethal dose

Acute toxicity studies to assess the safety have been carried out using the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2002). First, Swiss albino (female) were divided four groups ($n = 3$), and treated orally (p.o.) by gavage with 100 μL of the following doses of essential oil: 5, 50, 300 and 2,000 mg/kg. The animals were observed at 30, 60, 120, 180 and 240 min after oral treatment and daily for 14 days. Their weight and ingested food were recorded daily, as well as possible signs of alteration, such as tremors, convulsions, salivation, piloerection, hyperactivity, bleeding, among other indicators of toxicity. Mortality was also assessed for 14 days and of the LD_{50} was also calculated.

2.1.2. Evaluation of the antinociceptive effect

2.1.2.1. Acetic acid-induced abdominal contortions

The evaluation was performed according to the methodology of Radulović et al. 2015. Six experimental groups ($n = 6$) of male mice were used, with the following treatments: vehicle (saline solution 0.9%, w/v; p.o.), essential oil of *A. cearensis* (25, 50 and 100 mg/kg; p.o.) and indomethacin (20 mg/kg; p.o.); morphine group (10 mg/kg) received treatment via intraperitoneal (i.p.). After 30 min (for morphine) or 60 minutes (for the other groups) acetic acid (0.8%, v/v) (10 mL/kg) was injected intraperitoneally (i.p.) to stimulate nociception. After stimulation, the animals were placed inside an observation chamber (15 cm in diameter and 20 cm in height) equipped with a mirror inclined at 45° below the chamber and waited 5 minutes to assess the intensity of nociception, which was quantified by the number of writhes during 15 min of observation, being expressed in relation to the number of abdominal contortions.

2.1.2.2. Formalin test

The evaluation was performed according to the methodology of Tjølsen et al. (1992). Six experimental groups ($n = 6$) of male mice were used, with the following treatments: vehicle (saline solution 0.9%, w/v; p.o.), essential oil of *A. cearensis* (25, 50 and 100 mg/kg; p.o.) and indomethacin (20 mg/kg; p.o.); morphine group (10 mg/kg) received treatment via intraperitoneal (i.p.). After 30 min (for morphine) or 60 minutes (for the other groups), nociception was induced by subplantar injection (i.pl.) of 2.5% (v/v) formalin (20 μL) in the left hind paw. After the formalin injection, the animals were transferred to an observation chamber (15 cm in diameter and 20 cm in height) equipped with a mirror inclined at 45° below the chamber, and observed from 0 to 5

min (first phase, neurogenic phase) and 15 to 30 min (second phase, inflammatory phase) in relation to the time spent in seconds (s) licking or biting the paw that received the nociceptor agent.

To verify the antinociceptive action of EO *A. cearensis* on the opioid, cholinergic, adenosinergic, dopaminergic and ATP-sensitive potassium channels (K-ATP) systems, the pharmacological antagonists Naloxone (5 mg/kg, i.p.), Atropine (5 mg /kg, i.p.), Caffeine (10 mg/kg, i.p.), Haloperidol (1 mg/kg, i.p.) and Glibenclamide (10 mg/kg, i.p.), respectively, were used, being injected 30 min before treatment of the groups with essential oil (100 mg/kg, p.o.) or the pharmacological agonists Morphine (10 mg/kg; i.p.), Acetylcholine (1 mg/kg; i.p.), Adenosine (100 mg/kg; i.p.), Apomorphine (8 mg/kg; i.p.) and Diazoxide (3 mg/kg; i.p.) (De (De Lavor et al., 2018). After treatments, 2.5% formalin (20 µL/paw) was injected into the right hind paw of mice. Paw licking time was recorded, in seconds, from 0 to 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 30 min (inflammatory phase) after formalin administration.

2.1.3. Anti-inflammatory activity

2.1.3.1. Carrageenan-induced paw edema

The evaluation was carried out according to the methodology of Ou et al. 2019. The male mice were divided into five groups (n = 6), being treated orally (p.o.) by gavage with 100 µL of vehicle (saline solution 0.9%, w/v; p.o.), essential oil of *A. cearensis* (25, 50 and 100 mg/kg; p.o.) or indomethacin (20 mg/kg; p.o.). After 1 hour, the animals received 1% carrageenan (w/v) (20 µL/paw) in the right hind paw and saline solution (0.9%, w/v), (20 µL/paw) in the left paw. The volume of the right and left rear paw of each animal was recorded with the aid of a caliper after 1, 2, 3, 4 and 5 hours after injection of carrageenan. Inhibition of edema was calculated by (right paw - left paw) and expressed in mm.

2.1.3.2. Histamine-induced paw edema

The evaluation was performed according to the methodology of Cavalher-Machado et al. 2008. The male mice were divided into five groups (n = 6), being treated orally (p.o.) with 100 µL of vehicle (saline solution, 0.9% (w/v)), essential oil of *A. cearensis* (25, 50 and 100 mg/kg; p.o.) or promethazine (6 mg/kg; p.o.). After 60 minutes, the animals received 1% histamine (w/v) (20 µL/paw) in the right hind paw and saline solution (0.9%, w/v) (20 µL/paw) in the left paw. Edema inhibition was calculated by (right paw - left paw) and expressed in mm.

2.1.3.3. Carrageenan-induced peritonitis

The evaluation was performed according to the methodology of Longhi-Balbinot et al. (2012). The mice (males) were randomly distributed into six groups (n=6), being: sham (did not receive treatment), vehicle (saline solution, 0.9% (w/v)), essential oil of *A. cearensis* (25, 50 and 100 mg/kg; p.o.) and indomethacin (20 mg/kg; p.o.). After 60 minutes, 2% carrageenan (w/v) (750 µg/well) was injected into the intraperitoneal cavity (i.p.), for induction of peritonitis. Four hours after the administration of carrageenan, the animals were euthanized, and 3 mL of ice-cold heparinized PBS (10 IU/ml) were injected into the peritoneal cavity. After 30 s of manual massage, the exudate was recovered. For total leukocyte counts, 1 mL of peritoneal fluid was mixed with 0.2 mL of Turk's solution (30 mL of acetic acid, 100 mL of distilled water and 100 mL of methylene blue) and an aliquot was placed in the Neubauer and leukocyte migration was performed with the aid of a binocular microscope.

Peritoneal fluid aliquots were also used for quantification of TNF- α and IL-1 β using Mouse Cytokines ELISA Kit, High Sensitivity in ELISA, Thermo Fisher (Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.1.3.4. Yeast induced pyrexia

The activity was carried out according to the modified methodology of Sobeh et al. 2019. The mice male was distributed into five groups (n = 6). Initially, rectal temperature was recorded before beer yeast suspension (20 % w/v) subcutaneously s.c. (20 mL/kg). After 18 h, animals that showed an increase of displaying mean basal rectal temperatures between 38.0 and 39.0 °C were selected for the study. The groups were treated orally (p.o.) by gavage with 100 µL of vehicle (saline solution, 0.9% (w/v)), essential oil of *A. cearensis* (25, 50 and 100 mg/kg; p.o.) or dipyrone (100 mg/kg; p.o.). The rectal temperature was measured at intervals of 1, 2, 3 and 4 hours after the administration of the samples, using a lubricated digital thermometer.

2.2. Statistical analysis

The data were analyzed using the GraphPad Prism[®] software (version 8.4.3; San Diego California USA). Statistical analysis was done using one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. The data were expressed in means $\pm$ SD. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Acute toxicity test and median lethal dose

According to the FDA, many essential oils are known as GRAS substances (Generally Recognized as Safe), however, as many medicinal species can have toxic effects, it is important that studies are carried out to assess their safety before evaluating their therapeutic potential (Stojanović et al., 2019).

In this study, essential oil of *A. cearensis* was investigated for acute toxicity by determining the median lethal dose (LD₅₀) and changes in behavior in mice. These results are summarized in Table 1. It was observed that the essential oil does not present a median lethal dose (LD₅₀) up to the concentration of 2,000 mg/kg administered orally, since it does not cause mortality in mice as well as significant changes in animal behavior, general appearance or any signs of toxicity, and this oil can be classified as non-toxic according to the OECD (2002).

Here, the results related to mortality and behavioral changes by the essential oil of *A. cearensis* are comparable to the records found in the literature in which their constituents are considered safe (Oliveira et al., 2017; Kong et al., 2017). Essential oils containing major chemical compounds in common with EO *A. cearensis* have been described as safe. The EO *Hyptis fruticosa* has as major compounds the bicyclogermacrene (12.32%), caryophyllene (8.82%), germacrene (3.26%) and does not present toxicity in concentrations up to 5,000 mg/kg, administered orally, a fact that may enable its application as potential antinociceptive (Menezes et al., 2007). The EO *Verbesina macrophylla* has anti-inflammatory and antipyretic activities, presenting among its constituents caryophyllene (9.88%) and bicyclogermacrene (11.33%) and the essential oil showed no acute toxicity up to the dose of 5,000mg/kg, p.o. (De Veras et al., 2021). The essential oil from *Ageratum fastigiatum*, with germacrene as major compound (24.15%) showed an LD₅₀ of 2,500 mg/kg (Del-Velchio-Vieira et al., 2009).

3.2. Evaluation of the antinociceptive effect

3.2.1. Acetic acid-induced abdominal contortions

Pain is reported as the most common symptom in diseases, and despite the existence of analgesic medicines, there is great concern about inadequate pain control, in addition to the numerous adverse reactions that these compounds can bring, such as chemical dependency and this requires the development of new medicines, with efficacy and safety (Volkow and McLellan, 2016; Rathmell and Fields, 2015). Recent studies

have shown that natural products such as essential oils are some of the most important sources of drug discovery to control pain because they have chemical compounds that can block or activate nociceptive receptors, among other mechanisms (Jamshidi-Kia et al., 2018; Arulselvan et al., 2016; Barreto et al., 2016).

The acetic acid-induced writhing test has been widely used as a screening tool to evaluate the analgesic properties of various products. It is a nonspecific nociception model, causing peripheral sensitization in animals by indirect release of endogenous nociceptive mediators, being widely used to detect the antinociceptive of central abnormalities, such as opioids and peripheral ones, such as NSAIDs (Barreto et al., 2016; Hossain et al., 2015; Ramezani et al., 2001).

The results on the antinociceptive activity of the EO *A. cearensis* presented in Fig. 1, show that the essential oil significantly inhibited nociception induced by acetic acid in a dose-dependent manner. It was observed that at doses of 25, 50 and 100 mg/kg the essential oil significantly reduced abdominal contortions by 69.38%, 82.04% and 93.87%, at doses of 50 and 100 mg/kg, the effect was statistically superior to the reference drug indomethacin (20 mg/kg), which promoted 60.03% inhibition when compared to the control group.

The compounds present in EO *A. cearensis* can be found in another species of plant, which also had an antinociceptive effect. Hossain et al. (2015) found that germacrone is the active principle of the antinociceptive activity of the rhizome of *C. aeruginosa*, with an inhibition of 22.66%, 34.77% and 51.17% regarding the number of contortions induced by acetic acid in doses of 10, 20 and 40 mg/kg, respectively. The EO *Hymenaea cangaceira* has antinociceptive activity, reducing contortions by 76% at a dose of 100 mg/kg, with caryophyllene (23.38%) and germacrene (14.46%) in common with EO *A. cearensis* (De Veras et al., 2020). The EO of *Pterodon polygalaefloru* present caryophyllene on its composition (19.51%), and reduced the writhing number in more or less than 50% (Coelho-De-Souza et al., 2018). The EO of *A. fastigiatum*, with germacrene (24.15%) as the major compound, reduced nociception by 7.32%, 12.19% and 30.29% at concentrations of 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. (Del-Velchio-Vieira et al., 2009). The EO of *Hyptis fruticosa* present reduces by 27.3%, 26.6% and 35.7% the nociception in abdominal contortion induced by acetic acid at doses of 100, 200, and 400 mg/kg, having as active ingredients bicyclogermacrene (12.32%) and caryophyllene (8.82%) (Menezes et al., 2007).

3.2.2. Formalin Test

Treatment with EO *A. cearensis* at doses of 25, 50 and 100 mg/kg significantly reduced licking time in the first (neurogenic) phase by 29.558%, 53.45% and 72.95%, respectively. In the second phase (inflammatory), the essential also promoted significant inhibition of formalin-induced nociception in 61.68%, 74.49% and 86.95%, respectively. In both phases the EO *A. cearensis* showed activity in a dose-dependent manner. Morphine (10 mg/kg) reduced the nociceptive response in both the first (81.76%) and second phases (96.20%), while indomethacin (20 mg/kg) produced a low antinociceptive effect in the first phase (10.06%). and significant reduction in the second phase (69.63%) (Figure 2).

The formalin test is one of the most used experiments to evaluate the antinociceptive effects of drugs, being divided into two phases. The first (neurogenic) phase consists of neurogenic nociception unrelated to inflammation, in which pain signals are transmitted by direct stimulation of nociceptors via C fibers to the dorsal horn of the spinal cord after substance P is secreted and acts as a neurotransmitter. In the second (inflammatory) phase, pain is generated as a result of inflammatory reactions in the tissue injured by formalin, from which it stimulates the release of histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandins (PGs) and causes the pain process (Li et al., 2018; Rosland et al., 1990; Shibata et al., 1989).

Centrally acting drugs such as opioid analgesics inhibit both phases of the formalin test, however peripherally acting drugs such as anti-inflammatories are only effective in the second phase (Mohammadifard and Alimohammadi, 2018; Somchit et al., 2004; Shibata et al., 1989). Our results showed that EO *A. cearensis* reduced the pain response of both phases of the formalin test in a dose-dependent manner, showing an antinociceptive effect at the central and peripheral levels, which also implies that the essential oil has not only antinociceptive, but also anti-inflammatory.

The possible mechanisms by which EO *A. cearensis* produces an antinociceptive effect were investigated. The antagonist Naloxone (5 mg/kg, i.p) did not change the antinociceptive effect of EO *A. cearensis* (100 mg/kg) in both phases of the test, however, it reversed the effect of morphine (10 mg/kg, i.p) (Figure 3A and B). Reversal effect was verified with atropine (5 mg/kg, i.p.) which inhibited the antinociceptive effect of EO *A. cearensis* (100 mg/kg) and the agonist Acetylcholine (1 mg/kg) in both phases (Figure 4A and B). Caffeine (10 mg/kg, i.p.) also reversed the antinociceptive

effect of EO *A. cearensis* and the agonist Adenosine (100 mg/kg) in both phases (Figure 5A and B). The antagonist Haloperidol (1 mg/kg) inhibited the antinociceptive effect of the agonist apomorphine (8 mg/kg), however, it did not alter the effect of EO *A. cearensis* (Figure 6A and B). Glibenclamide (10 mg/kg) was found to have the ability to significantly inhibit the antinociceptive effect of the essential oil and the agonist Diazoxide (3 mg/kg) (Figure 7A and B). Based on the results obtained, it is possible to affirm that the essential oil of *A. cearensis* has an antinociceptive effect at the central and peripheral level, having as mechanisms of action the cholinergic, adenosinergic systems and ATP-sensitive potassium channels (K-ATP).

From a mechanistic point of view, the antinociceptive activity of EO *A. cearensis* can be attributed to the numerous chemical constituents present in its composition, which are capable of exerting antinociceptive effects through several mechanisms. Santos et al. (2005) verified that the essential oil of *Croton sonderianus* has in its composition bicyclogermacrene and (E)-caryophyllene, and has an antinociceptive effect with a mechanism of action related to ATP-sensitive potassium channels (K+ATP). Saldanha et al. (2019) investigated the chemical composition of *Duguetia furfuracea* essential oil and antinociceptive effect, with antinociceptive effects being observed in both phases in the formalin test, with the adenosinergic and opioidergic systems as the mechanism of action, with the oil having the compounds bicyclogermacrene and (E)-caryophyllene in common with EO *A. cearensis*. Caryophyllene, which has potent effects against acute and neuropathic pain, can act on K⁺ channels, or as a selective agonist of CB2 receptors, inducing the release of endogenous peptide β -endorphin keratinocyte precursors, leading to the activation of μ -opioid receptors in keratinocytes. primary afferent neurons and, consequently, analgesia (Paula-Freire et al., 2014).

Further studies were carried out in order to verify the possible mechanisms of action of the isolated components of the essential oil of *Amburana cearensis*, as well as to verify if there are cumulative effects to the antagonists of these compounds both in the antinociceptive effect, as well as in the mechanisms of action (Mohammadifard and Alimohammadi, 2018; Hossain et al., 2015; Paula-Freire et al., 2014).

3.3. Anti-inflammatory activity

3.3.1. Carrageenan-induced paw edema

The results related to anti-inflammatory activity are shown in Figure 8. In figure 8A it is possible to observe that the EO *A. cearensis* had an anti-inflammatory effect with a reduction in paw edema at all doses tested, in a dose-dependent manner, showing a superior effect to indomethacin even in the interval of 1, 2 and 3, and statistically equal in the interval of 4 and 5 hours of the test. The total inflammatory response measured as area under the curve (AUC) was significantly reduced in mice treated as EO *A. cearensis* in a dose-dependent, reducing the AUC by 77.09%, 93.12 and 98.11% at doses of 25, 50 and 100 mg/kg, respectively, compared to the control group, while the drug indomethacin reduced the AUC by 64.38%, also in relation to the control group (Figure 8B)

The inflammatory response induced by carragenan injection can be characterized in two phases, during the first one occurs the release of several pro inflammatory markers and initially occurs the release of histamine, serotonin and bradykinin, followed by the second phase where an enhanced activity of COX and nitric oxide synthase activities increase, the peak of pro-inflammatory molecules release occurs 2 hours after the injection, those process will result in plasma exudation and cell migration (Mckim et al., 2016; Seibert et al. 1994). Since our results showed that EO *A. cearensis* reduced the edema formation during 5 hours straight, it suggests that the molecules from essential oil can inhibit more than one cellular signaling pathways.

The antioxidant effect of natural products such as essential oils is associated with a marked anti-inflammatory activity, such as the inhibition of the production of different cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukins IL-6, IL-1 β and IL-13, metalloproteinases (ex: MMP-9), inflammatory enzymes (ex: COX-2, iNOS, 5-LOX), adhesion molecules of diapedesis (ex: ICAM-1, VCAM-1), chemokines (ex: MIP-1, MIP-2) suppression of toll-like receptor-4 expression (TLR4) and activation of the transcription factor- κ B (NF κ B) nuclear factor, among others (Borges et al., 2018; Arulselvan et al., 2016).

Essential oil composition reflects on the biological activities they can induce and it is expected that the concentrations of the major compounds is proportional to the amplitude of the induced biological activity. However, the activity of major compounds may be modulated by the other minor compounds (Mancianti and Ebani, 2020). The anti-inflammatory effect of EO *A. cearensis* can be attributed to the synergistic effect of all chemical constituents of essential oil, especially the main compounds. In the present

study, the high concentration of sesquiterpenes may explain the high anti-inflammatory activity (Sá et al., 2015). Makabe et al., (2006) reported that the germacrone exhibits potent anti-inflammatory activity *in vivo*, even at low concentration. Caryophyllene is one of the active ingredients of the anti-inflammatory Acheflan[®] used for acute and chronic inflammatory processes, presenting notorious activity alone or combined as in the essential oil of *Cordia verbenacea* (Passos et al., 2007). Saldanha et al. (2019) found that EO *D. furfuracea* has dose-dependent anti-inflammatory effect on paw edema, as well as promoting inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production, recruitment of polymorphonuclear (PMN) leukocytes and inducible nitric oxide synthase (iNOS), presenting in common with EO *A. cearensis* the presence of major constituents bicyclogermacrene (16.7%) and caryophyllene (4.6%).

3.3.2. Histamine-induced paw edema

The results related to the histamine-induced paw edema test are shown in Figure 9. In Figure 9A it is observed that the OE *A. cearensis* showed anti-inflammatory activity with reduced paw edema at all doses tested, so dose-dependent manner. At concentrations of 50 and 100 mg/kg, EO *A. cearensis* showed a statistically superior effect compared to standard promethazine at time intervals of 1, 2, 3, and 4 hours. The conversion of values into area under the curve (AUC) showed that the essential oil was effective in combating the inflammatory process throughout the treatment, reducing AUC by 66.67%, 80.60 and 94.84% at doses of 25, 50 and 100 mg/kg, respectively, in relation to the control group. Oral administration of promethazine, a histamine 1 (H1) receptor antagonist, significantly prevented the formation of paw edema with AUC by 63.08%, also in relation to the control group (Figure 9B). It was shown that the essential oil showed an activity superior to the standard drug at the doses of 50 and 100 mg/kg, and statistically equal at the dose of 25 mg/kg.

Histamine is a vasoactive amine originated from the decarboxylation of the amino acid histidine by the enzyme histidine decarboxylase. It is produced by mast cells adjacent to vessels, and plaques adjacent to them, being among the first molecules released after induction of the inflammatory process (Toriyabe et al., 2004; MacGlashan, 2003; Buske, 1996). Its release occurs by the process of exocytosis during allergic or inflammatory reactions through the interaction of antigens with IgE on mast cells and factors of the complement system (C3a and C5a). After tissue injury or in response to stress, histamine stored in basophilic granules and platelets is released into

the blood stream, concomitantly with mast cell degranulation (Criado et al., 2010; Maintz et al., 2007; Feitosa et al., 2002).

Intraplantar administration of histamine induces edema mainly through its action on H1 receptors in vascular tissue, resulting in increased vasodilation and vascular permeability, allowing the extravasation of fluid and proteins from the blood into the spaces between the tissues, resulting in the formation of edema (Ghosh et al., 2015; Criado et al., 2010; Toriyabe et al., 2004). In fact, EO *A. cearensis* significantly reduces the formation of edema induced by intraplantar administration of histamine, suppressing histamine release from mast cells, basophils or platelets during the acute phase, possibly through antagonism of histamine receptors.

Essential oils with antihistamine activity as observed by EO *A. cearensis* have been reported. Santos and Rao (1997) showed that 1,8-cineole, a compound very present in several essential oils, was able to reduce paw edema caused by histamine, having as mechanisms of action the reduction of mast cell degranulation and reduction of histamine action. Oliveira-Tintino et al. (2018) showed that the essential oil of *Croton campestris* has chemical constituents in common with the EO *A. cearensis*, such as β -caryophyllene and germacrene-D, and has an antihistaminic effect in the histamine-induced paw edema model, as observed in this study. Martins et al. (2017) observed that the essential oil of *Croton rhamnifolioides* has an antihistamine effect, with β -caryophyllene as one of the constituents of the essential oil. De Oliveira et al. (2021) investigated the antiedematogenic effect of the essential oil obtained from the leaves of *Lantana montevidensis*, observing high activity in the models of paw edema induced by carrageenan, dextran, histamine, or arachidonic acid, with an antihistaminic effect. The chemical composition of the essential oil showed the presence of bicyclogermacrene (16.35%), (E)-caryophyllene (12.84%) and germacrene D (12.18%) as major constituents of the essential oil, which are common to EO *A. cearensis*.

Although there are data in the literature that demonstrate the antihistaminic potential of essential oils that have chemical constituents in common with EO *A. cearensis*, there is no data that indicate this activity by germacrone, and further studies are needed in order to elucidate the mechanisms of action.

3.3.3. Carrageenan-induced peritonitis

The results of the infiltration of leukocytes and neutrophils are presented in table 2. When analyzing the peritoneal exudate, it is possible to observe that the treatment

with EO *A. cearensis* significantly inhibited the infiltration of leukocytes and neutrophils at 25, 50 and 100 mg/kg in the dose dependent manner compared to the control group. In the treatment with the essential oil at a dose of 100 mg/kg, the levels of leukocytes and neutrophils were statistically equal to the sham group. The animals treated with the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin also showed a reduction in the levels of cellular infiltrate, in relation to the control group. However, the activity was lower than that of EO *A. cearensis*.

In the dosage of cytokines in the peritoneal lavage, a significant reduction in the levels of TNF- α and IL-1 β was observed in the groups treated as the EO *A. cearensis*, where in the doses of 25, 50 and 100 mg/kg the oil reduced the levels of TNF- α in 55.22%, 70.60% and 81.84% in relation to the vehicle group. IL-1 β levels were also reduced by 59.26%, 68.93% and 76.35% in relation to the vehicle group, in the respective doses (Figure 10A and B). The indomethacin pattern also statistically reduced the levels of TNF- α and IL-1 β by 30.25% and 67.24%, respectively, compared to the control group (Figure 10A and B). It was observed that at the dose of 50 mg/kg, the EO *A. cearensis* statistically presented the same reduction as the standard drug indomethacin, however, at the dose of 100 mg/kg, the activity was superior to the drug, presenting statistically significant cytokine values. same as the sham group.

The carrageenan-induced peritonitis model has been widely used to investigate the anti-inflammatory effect of compounds. In this model, there is an increase in peritoneal vascular permeability, cell migration represented mainly by the influx of leukocytes and neutrophils and changes in the production of cytokines (Martins et al., 2017; Campos and Calixto, 2000). Neutrophils are available in circulating leukocytes and provide a first-line defense mechanism against infectious or harmful agents, playing an important role in host defense against all classes of infectious agents, in addition to being involved in numerous pathologies of inflammatory conditions (De Veras et al., 2021; Barreto et al., 2016; Laveti et al., 2013; Kolaczowska and Kubes, 2013). When recruited, neutrophils are able to produce cytokines that are associated in the pathology of inflammation, thus exposing host tissue to cause deleterious effects (Kolaczowska and Kubes, 2013; Campos and Calixto, 2000).

Leukocyte recruitment is an essential step in the development of inflammation. In response to noxious stimuli, resident cells release cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), chemokines (CXCL8 (KC) and CCL2 (MCP-1)) and lipid mediators (Leukotriene B4

(LTB4) and PGE2), which initiate local changes involved in leukocyte migration (Oliveira-Tintino et al., 2018; Barreto et al., 2016; Kolaczowska and Kubes, 2013).

In this work, we demonstrated that an oral pretreatment with EO *A. cearensis* significantly inhibited the number of total leukocytes and neutrophils, in addition to reducing the levels of TNF- α and IL-1 β in the abdominal cavity of animals stimulated with carrageenan, demonstrating the efficacy during an acute inflammatory response.

Corroborating these data, essential oils containing chemical constituents in common with EO *A. cearensis* have been described to have anti-inflammatory effects mediating inflammatory cytokines and cellular infiltration. De Veras et al. (2021) verified that the essential oil of *Verbesina macrophylla* has an anti-inflammatory effect by reducing the levels of TNF- α and IL-1 β , having the essential oil in its composition the compounds germacrene D, bicyclogermacrene and (E)-caryophyllene. Oliveira-Tintino et al. (2018) observed that the essential oil of *Croton campestris* and one of its major constituents, β -caryophyllene, reduce lymphocyte infiltration in the carrageenan-induced peritonitis model. Valer et al. (2016) found that the essential oil of *Croton zehntneri* reduces the intrapleural migration of leukocytes induced by carrageenan, and this reduction is associated with β -caryophyllene in the chemical composition of the essential oil. The essential oil of *Croton argyrophyllus* significantly reduced the number of leukocytes in relation to the control in carrageenan-induced peritonitis, this oil presenting bicyclogermacrene as a chemical constituent (Ramos et al., 2013).

3.4. Antipyretic activity

As shown in Table 3, mice injected with Brewer's yeast suspension (20%, 20 mL/kg, s.c.) showed elevated rectal body temperature when measured 18 h after yeast injection. The mice treated with EO *A. cearenses* at doses of 25, 50 and 100 mg/kg showed a reduction in temperature shortly after 1 h of oral treatment, restoring the animals' baseline temperature. This was comparable to the response shown by dipyrone (100 mg/kg), both in terms of onset and response (Table 3).

Fever is a complex physiological response coordinated by the central nervous system, which induces the activation of endocrine and immunological mechanisms, among other body systems, triggered by infectious agents or damaged tissues (Walter et al., 2016). The increase in body temperature occurs through the synthesis and release of pro-inflammatory cytokines, such as interleukins (e.g. IL-1 β , IL-6) and tumor necrosis

factor- α (TNF- α), which will later cause a production of prostaglandin E2 (PGE2) that signals to the hypothalamus to raise body temperature (Evans et al., 2015).

From the results obtained here, the essential oil had a significant dose-dependent antipyretic effect, comparable to dipyrone and it is possible to state that the essential oil of *A. cearensis* has impacts on the central nervous system, considering that its chemical constituents (e.g. caryophyllene) exert some inhibitory effect on COX-3, which decreases the amount of prostaglandin PGE2 in the hypothalamic region of the brain and, therefore, reduces hyperthermia (De Veras et al., 2021; Paula-Freire et al., 2014; Park et al., 2011). However, it is possible that there is interaction between the active components of the essential oil, so that it may result in some synergistic or antagonistic effects that may impose interference on the pharmacokinetic and pharmacodynamic activities of the active ingredients. Therefore, it is necessary to evaluate the mechanisms that may be involved in the activity of EO *A. cearensis*.

4. Conclusions

The data obtained confirmed the ethnopharmacological properties of the use of *A. cearensis* in traditional medicine for pain, inflammation and fever. The acute toxicity test and determination of LD₅₀ of the essential oil of *A. cearensis* demonstrated that it does not present any mortality until the concentration of 2,000 mg/kg; p.o. which proves the relative safety of essential oil in acute exposure. Therefore, we concluded that this plant presents itself as a promising source of secondary metabolites with potential use in the treatment of pain and inflammation.

Acknowledgements

The authors are grateful to Brazilian agency CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for financial support.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

Author's contributions

Bruno Oliveira de Veras prepared the project, coordinated the study, supervised all trials, analyzed data and statistics and was responsible for writing the manuscript.

Geovanna Maria de Medeiros Moura and Amanda Vieira de Barros participated in the interpretation of the results and in the writing of the manuscript. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro and Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar were responsible for the characterization of the essential oil. Maria Betânia Melo de Oliveira, Almir Gonçalves Wanderley and Márcia Vanusa da Silva participated in the conception of the study and writing of the manuscript. Ana Catarina de Sousa Lopes coordinated and supervised the study.

References

- Ramos., J.M., Santos, C.A., Santana, D.G., Santos, D.A., Alves,, P.B., Thomazi, S.M, 2013. Chemical constituents and potential antiinflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. Rev. Bras. Farmacogn., 23 pp. 644-650
- Albergaria, E.T., Silva, M.V., Silva, A.G. 2019. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais localizadas na Unidade de Conservação Tatu-Bola, município de Lagoa Grande, PE – Brasil. Revista Fitos, 13(2), 137-154 10.17648/2446-4775.2019.713
- Albuquerque, U.P., Oliveira, R.F. 2007. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants?. J. Ethnopharmacol., 113, 156-170. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.025>
- Arulselvan, P., Fard, M.T., Tan, W.S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M.E., Kumar, S.S. 2016. Role of antioxidant and natural products in inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016, 1-15. doi.org/10.1155/2016/5276130
- Baptistel, A.C., Coutinho, J.M.C.P., Lins Neto, E.M.F., Monteiro, J.M. 2014. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 16, 406–425. 10.1590/1983-084x/12_137
- Barreto, R.S.S., Quintans, J.S.S., Amarante, R.K.L., Nascimento, T.S., Amarante, R.S., Barreto, A.S., Pereira, E.W.M., Duarte, M.C., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Zengin, G., Aktumsek, A., Quintans-Júnior, L.J. 2016. Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and anti-inflammatory

- activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 191, 9–18. doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.022
- Barros, L.M., Duarte, A.E., Morais-Braga, M.F.B., Waczuk, E.P., Vega, C., Leite, N.F., De Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Rocha, J.B.T., Kamdem, J.P. 2016. Chemical characterization and trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxicity potential of *Lantana camara* L. (verbenaceae) essential oil. *Molecules* 21, 1–9. doi.org/10.3390/molecules21020209
- Bitu, V.C.N., Bitu, V.C.N., Matias, E.F.F., De Lima, W.P., Da Costa, P.A., Coutinho, H.D.M., De Menezes, I.R.A. 2015. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 265–272. [10.1016/j.jep.2015.06.022](https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.022)
- Borges, R.S., Ortiz, B.L.S., Pereira, A.C.M., Keita, H., Carvalho, J.C.T. 2018. *Rosmarinus officinalis* Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29–45. doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038
- Buske, D.L.M. 1996. Clinical comparison of histamine H1-receptor antagonist drugs. *J Allergy Clin Immunol.*, 98, S307–318. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(96\)80116-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(96)80116-3)
- Campos, M.M., Calixto, J.B. 2000. Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides*, 34, 314–322.
- Canuto, K., Silveira, E., Bezerra, A. 2010. Phytochemical analysis of cultivated specimens of cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith.). *Química Nova*, 33, 662–666. doi.org/10.1590/S0100-40422010000300034.
- Canuto, K.M., Leal, L.K., Lopes, A.A., Coleman, C.M. 2014. Amburanins A and B from *Amburana cearensis*: daphnodorin-type biflavonoids that modulate human neutrophil degranulation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 639–647. dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140011
- Cartaxo, S.L., de Almeida Souza, M.M., de Albuquerque, U.P. 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 326–342. doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.003
- Coelho-De-Souza, A.N., Santos, C.F., Lopes-Filho, L.N., Holanda, F.R., Oliveira, A.C., Vasconcelos, Y.A.G., Oliveira, K.A., Silva, F.W.F., Alves, K.S.S., Cardoso,

- J.H.L. 2018. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* Benth attenuates nociception in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(11), 1-9. doi.org/10.1590/1414-431x20187356
- Costa, J.C., Marinho, M.G.V. 2016. Etnobotânica de plantas medicinais em duas comunidades do município de Picuí, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18, 125-134. doi.org/10.1590/1983-084X/15_071
- Costa, R.G.A., Anunciação, T.A. d., Araujo, M. de S., Souza, C.A., Dias, R.B., Sales, C.B.S., Rocha, C.A.G., Soares, M.B.P., Silva, F.M.A. d., Koolen, H.H.F., Costa, E. V., Bezerra, D.P. 2020. In vitro and in vivo growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 122, 109713. doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109713
- Criado, P.R., Fachini, R., Criado, J., Maruta, C.W., D'apparecida, C., Filho, M. 2010. Histamine, histamine receptors and antihistamines: New concepts. *Braz. Ann. Dermatol.*, 85, 195–210. doi.org/10.1590/S0365-05962010000200010
- De Albuquerque, U.P., de Medeiros, P.M., de Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., de Freitas Lins Neto, E.M., de Melo, J.G., dos Santos, J.P. 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 325–354. doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017
- De Lavor, E.M., Leal, A.E.B.P., Fernandes, A.W.C., Ribeiro, F.P.R.A., Barbosa, J.M., Gama S.M., Teles, R.B.A., Oliveira, L.F.S., Silva, J.C., Rolim, L.A., De Menezes, I.R.A., Almeida, J.R.G.S. 2018. Ethanolic extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. *PHYTOMEDICINE*, 47, 58-68. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.052
- De Oliveira, M.R.C., de Lima Silva, M.G., Alcântara, I.S. 2021. Biological activities of the essential oil from the leaves of *Lantana montevidensis* (Spreng) Briq. in mice. *Environ Dev Sustain* 23, 14958–14981.
- De Veras, B.O., Oliveira, M.B.M., Oliveira, F.G.S., Santos, Y.Q., Oliveira, J.R.S., Lima, V.L.M., Almeida, J.R.G., Navarro, D.M.A.F., Aguiar, J.C.R.O., Aguiar, J.S., Gorlach-Lira, K., Assis, C.R.O.F., Silva, M.V., Lopes, A.C.S. 2020. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and

- antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 247, 112265. doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265
- De Veras, B.O.; Oliveira, J.R.S.; Lima, V.L.M.; Navarro, D.M.A.F.; Aguiar, J.C.R.O.F.; Moura, G.M.M.; Silva, J.W.; Assis, C.R.D.; Gorlach-Lira, K.; Assis, P.A.C.; Barbosa, J.I.S.; Melo, M.R.C.S.; Oliveira, M.B.M.; Silva, M.V.; Lopes, A.C.S. 2021. The essential oil of the leaves of *Verbenisa macrophylla* (Cass.) S.F. Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology*. 265, 113248. doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248
- Del-Velchio-Vieira, G., Sousa, O.V., Miranda, M.A., Senna-Valle, L., Kaplan, M.A.C. 2009. Analgesic and anti-inflammatory properties of essential oil from *Ageratum fastigiatum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1115-1121. doi.org/10.1590/S1516-89132009000500008
- Dos Santos, P.H.A., Dos Santos, I.S., Melo, V.M.M., Vasconcelos, I.M., Carvalho, A.D.O., Gomes, V.M. 2009. Partial characterization and antimicrobial activity of peptides from *Amburana cearensis* seeds against phytopathogenic fungi and yeasts. *Acta Physiol. Plant.*, 32, 597–603.
- Evans, S.S., Repasky, E.A., Fisher, D.T. 2015. Fever and thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nature Reviews Immunology*, 15, 335-349. doi.org/10.1038/nri3843
- Feitosa, R.F., Melciades, G.B., Assreuy, A.M.S., Rocha, M.F., Ribeiro, R.A., Lima, A.A. 2002. The pharmacological profile of ovoalbumin induced paw oedema in rats. *Med Inflamm.*, 11, 155–163.
- Ferreira, M.J.G., Nogueira, P.C.D.N., Dias, F.G.B., da Silva, L.M.R., Silveira, E.R., de Figueiredo, E.A.T. 2020. Antimicrobial activity and chemical characterization of the bark decoction of cumaru stem. *Ciencia Rural*, 50, 1–6. doi.org/10.1590/0103-8478cr20190785
- Figueredo, F.G., Ferreira, E.O., Lucena, B.F.F., Torres, C.M.G., Lucetti, D.L., Lucetti, E.C.P., Silva, J.M.F.L., Santos, F.A.V., Medeiros, C.R., Oliveira, G.M.M., Colares, A. V., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Silva, J.C.F., Kerntopf, M.R., Figueiredo, P.R.L., Matias, E.F.F. 2013. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and

- Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. BioMed Research International, 2013, 1-5. doi.org/10.1155/2013/640682
- Ghosh, S., Saha, K., Dasgupta, S., Gomes, A. 2015. In vitro and in vivo anti-arthritis and anti-inflammatory activity of Bungarus fasciatus venom. J. Toxins, 2, 1-5.
- Hossain, C.F., Al-Amin, M., Sayem, A.S.M., Siragee, I.H., Tunan, A.M., Hassan, F., Kabir, M.M. 2015. Antinociceptive principle from *Curcuma aeruginosa*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 191, 1-7. doi.org/10.1186/s12906-015-0720-6
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. 2018. Medicinal plants: Past history and future perspective. Journal of HerbMed Pharmacology 7, 1–7. https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01
- Kolaczowska, E., Kubes, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat. Rev. Immunol., 13,159-175.
- Kong, Q., Ma, Y., Yu, J., Chen, X. 2017. Predicted molecular targets and pathways for germacrone, curdione, and furanodiene in the treatment of breast cancer using a bioinformatics approach. Scientific Reports, 7(1), 15543. doi.org/10.1038/s41598-017-15812-9
- Lataliza, A.A.B., Cavalli, J., Amarante, C.B., Barbosa, D.B., Brandão, M.A.F., Dutra, F.C., Raposo, N.R.B. 2019. Antioxidant, Cytotoxic, Antiproliferative and Acetylcholinesterase Inhibition Properties of the Extract from *Amburana Cearensis*. Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology, 6, 1-8.
- Laveti, D., Kumar, M., Hemalatha, R., Sistla, R.G.M., Naidu, V., Talla, V., Verma, V., Kaur, N., Nagpal, R. 2013. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. Inflamm. Allergy-Drug Targets, 12, 349-361.
- Li, H., Zuo, J., Tang, W. 2018. Phosphodiesterase-4 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. Front. Pharmacol., 9, 1048.
- Lima, L.R., Cavalcante, R.R.L., Martins, M.C.C., Parente, D.M., Cavalcante, A.A.M.C. 2013. Evaluation of antiedematogenic, antimicrobial and mutagenic activity of seeds of *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 15, 415–422. doi.org/10.1590/S1516-05722013000300015
- Lu, C., Li, H., Li, C., Chen, B., Shen, Y. 2018. Chemical composition and radical

- scavenging activity of *Amygdalus pedunculata* Pall leaves' essential oil. Food and Chemical Toxicology, 119, 368–374. doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.012
- Lu, J.J., Dang, Y.Y., Huang, M., Xu, W.S., Chen, X.P., Wang, Y.T. 2012. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curcumae* - A review. Journal of Ethnopharmacology, 143, 406–411. doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.009
- Macedo, J.G.F., De Menezes, I.R.A., Ribeiro, D.A., Santos, M.D.O., De Mâcedo, D.G., Macêdo, M.J.F., De Almeida, B.V., Souza De Oliveira, L.G., Pereira Leite, C., De Almeida Souza, M.M. 2018. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 1–28. doi.org/10.1155/2018/6769193
- MacGlashan, D. 2003. Histamine: a mediator of inflammation. J Allergy Clin Immunol, 112, S53-S59. doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70215-0
- Maintz, L., Novak, N. 2007. Histamine and histamine intolerance. Am J Clin Nutr., 85, 1185-06. https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185
- Makabe, H., Maru, N., Kuwabara, A., Kamo, T., Hirota, M. 2006. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*. Natural Product Research, 70,680-685. doi.org/10.1080/14786410500462900
- Mancianti, F., Ebani, V.V. 2020. Biological activity of essential oils. Molecules, 25(3), 678. doi.org/10.3390/molecules25030678
- Marinho, M.G.V., 2004. Estudos etnobotânicos de plantas medicinais em duas comunidades do sertão paraibano, nordeste do Brasil, com ênfase na atividade imunológica de *Amburana cearensis* (Leguminosae). Thesis. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Martins, A.O.B.P.B., Rodrigues, L.B., Cesário, F.R.A.S., de Oliveira, M.R.C., Tintino, C.D.M., e Castro, F.F., Alcântara, I.S., Fernandes, M.N.M., de Albuquerque, T.R., da Silva, M.S.A. 2017. Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1, 8-cineole (eucalyptol). Biomed. Pharmacother., 96, 384–395.
- Mckim-Junior, J.M., Baas, H., Rice, G.P., Willoughby-Sr, J.A., Weiner, M.L., Blakemore, W. 2016. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. Food and chemical toxicology, 96, 1-10. doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.006

- Menezes, I.A.C., Marques, M.S., Santos, T.C., Dias, K.S., Silva, A.B.L., Mello, I.C.M., Lisboa, A.C.C.D., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C.H., Marçal, R.M., Antonioli, A.R. 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. *Fitoterapia*, 78, 192-195. doi.org/10.1016/j.fitote.2006.11.020
- Mohammadifard, F., Alimohammadi, S. 2018. Chemical composition and role of opioidergic system in antinociceptive effect of *Ziziphora clinopodioides* essential oil. *Basic Clin. Neurosci. J.*, 9 (5), 357–366. [dx.doi.org/10.32598/bcn.9.5.357](https://doi.org/10.32598/bcn.9.5.357)
- Monteiro, J. M., De Souza, J.S.N., Neto, E.M.F.L., Scopel, K., Trindade, E.F. 2014. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants from the Brazilian semi-arid region?. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 116–123. [10.1016/j.bjp.2014.02.001](https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.02.001)
- Ni, J., Mahdavi, B., Ghezi, S. 2019. Chemical Composition, Antimicrobial, Hemolytic, and Antiproliferative Activity of Essential Oils from *Ephedra intermedia* Schrenk & Mey. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22, 1562–1570. doi.org/10.1080/0972060X.2019.1707717
- OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, 2008. Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Modified Up-And-Down Procedure.
- Oliveira, F.C.S., Barros, R.F.M. e Moita Neto, J.M. 2010. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 12, 282-301. doi.org/10.1590/S1516-05722010000300006.
- Oliveira, G.LD.S., Machado, K.C., Machado, K.C., Da Silva, A.P.D.S.C.L., Feitosa, C.M., De Castro Almeida, F.R. 2017. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 92, 338-346. doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.013
- Oliveira, M.T.A., Moura, G.M.M., da Cruz, J.I.O., Lima, R.V.C., dos Santos, E.A., Andrade, J.C., Alencar, M.V.O.B., Landim, V.P.A., Coutinho, H.D.M., Uchoa, A.F. 2019. Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110946. doi.org/10.1016/j.fct.2019.110946
- Oliveira-Tintino, C., Pessoa, R., Fernandes, M., Alcântara, I., da Silva, B., de Oliveira, M., Martins, A., da Silva, M., Tintino, S., Rodrigues, F., da Costa, J., de Lima,

- S., Kerntopf, M., da Silva, T., de Menezes I. 2018. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. *Phytomedicine*, 41, 82-95.
- Ou, Zhaoping; Zhao, Jing; Zhu, Lijuan; Huang, Lin; Ma, Yurong; Ma, Chaoyang; Luo, Chenxi; Zhu, Zihan; Yuan, Zhihang; Wu, Jing; Li, Rongfang; Yi, Jine. 2019. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109347. doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109347
- Park, K., Nam, D., Yun, H., Lee, S., Jang, H., Sethi, G., Cho, S.K., Ahn, K.S. 2011. β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, 312(2), 0–188. doi.org/10.1016/j.canlet.2011.08.001
- Paula-Freire, L.I.G., Andersen, M.L., Gama, V.S., Molska, G.R., Carlini, E.L.A. 2014. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine*, 21(3), 356–362. doi.org/10.1016/j.phymed.2013.08.006
- Pereira, E., Braga-De-Souza, S., Santos, C.C., Santos, L.O., Cerqueira, M.D., Ribeiro, P.R., Fernandez, L.G., Silva, V.D.A., Costa, S.L. 2017. *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 199–205. doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.010
- Radulović, N.S., Randjelović, P.J., Stojanović, N.M., Cakić, N.D., Bogdanović, G.A., Živanović, A.V. 2015. Aboriginal bush foods: A major phloroglucinol from *Crimson Bottlebrush* flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. *Food Research International*, 77, 280–289. doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.023
- Ramezani, M., Hossinzadeh, H., Daneshmand, N. 2001. Antinociceptive effect of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice. *Fitoterapia*, 72, 255-262. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00290-2
- Ramos, J.M.O., Santos, C.A., Santana, D.G., Santos, D.A., Alves, P.B., Thomazzi, S.M. Rathmell, J.P., Fields, H.L. Pain: Pathophysiology and Management D.L. Kasper, A.S. Fauci, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson, J. Loscalzo (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Education, New York (2015), pp. 87-123.

- Ribeiro, D.A., Oliveira, L.G.S. De, Macêdo, D.G. De, Menezes, I.R.A. De, Costa, J.G.M. Da, Silva, M.A.P. Da, Lacerda, S.R., Souza, M.M.D.A. 2014. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 155, 1522–1533. doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.042
- Rosland, J.H., Tjølsen, A., Maehle, B., Hole, K. 1990. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*, 42, 235-242. oi: 10.1016/0304-3959(90)91167-H
- Sá, M.D.C.A.D., Peixoto, R.D.M., Krewer, C.D.C., Almeida, J.R.G.D.S., De Vargas, A.C., Da Costa, M.M. 2011. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. *Rev. Bras. Ciência Veterinária*, 18, 62–66. http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.122
- Sá, R.C.S., Andrade, L.N., De Sousa, D.P. 2015. Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity. *Natural Product Communications*, 10(10):1767-74. doi/pdf/10.1177/1934578X1501001033
- Saldanha, A.A., Vieira, L., Ribeiro, R.I.M. de A., Thomé, R.G., Santos, H.B. dos, Silva, D.B., Carollo, C.A., Oliveira, F.M. de, Lopes, D. de O., Siqueira, J.M. de, Soares, A.C. 2019. Chemical composition and evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: Effect on edema, leukocyte recruitment, tumor necrosis factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioid. *Journal of Ethnopharmacology*, 231, 325–336. doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.017
- Santos, F.A., Jeferson, F.A., Santos, C.C., Silveira, E.R., Rao, V.S.N. 2005. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. *Life Sciences*, 77(23), 2953–2963. doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.032
- Santos, F.A., Rao, V.S.N. 1997. Mast cell involvement in the rat paw oedema response to 1 8-cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. *Eur. J. Pharmacol.*, 331, 253-258.
- Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Perkins, W.; Lee, L.; Isakson, P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91, 12013– 12017. doi.org/10.1073/pnas.91.25.12013

- Seleme, E.P., Lewis, G.P., Stirton, C.H., Sartori, A.L.B., Mansano, V.F. 2015. A taxonomic review and a new species of the south american woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa*, 4, 249–263. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.212.4.1>
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38, 347-352. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(89)90222-4)
- Silva, M.I.G., Melo, C.T.V. De, Vasconcelos, L.F., Carvalho, A.M.R. De, Sousa, F.C.F. 2012. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22 (1), 193–207. doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000171
- Silva, S.L.C., Gualberto, S.A., Macedo, G.E.L., Silveira, T.C., Silva, D.C. 2012. Plantas medicinais usadas pela comunidade do povoado de laços (Tanhaçu/Bahia) e encontradas na floresta nacional contendas do sincorá Revista Caatinga, 25(3), 130-136.
- Sobeh, M., Rezq, S., Sabry, O. M., Abdelfattah, M. A. O., El Raey, M. A., El-Kashak, W. A., Wink, M. 2019. *Albizia anthelmintica*: HPLC-MS/MS profiling and in vivo anti-inflammatory, pain killing and antipyretic activities of its leaf extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, 108882. doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108882
- Somchit, M.N., Sulaiman, M.R., Ahmad, Z., Israf, D.A., Hosni, H. 2004. Non-Opioid anti-nociceptive effect of *Psidium guajava* leaves extract. *J. Nat. Remedies*, 4 (2), 174-178. <https://doi.org/10.18311/jnr/2004/183>
- Stojanović, N.M., Randjelović, P.J., Mladenović, M.Z., Ilić, I.R., Petrović, V., Stojiljković, N., Ilić, S. Radulović, N.S. 2019. Toxic essential oils, part VI: Acute oral toxicity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) essential oil in BALB/c mice. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110794. doi.org/10.1016/j.fct.2019.110794
- Toriyabe, M., Omote, K., Kawamata, T., Namiki, A. 2004. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology*, 101, 983–990. doi: 10.1097/00000542-200410000-00025.

- Valer, C.M., Wiirzler, L.A.M., Silva-Filho, S.E., Cavalcante, H.A.O., Silva-Comar, F.M.S., Cuman, R.K.N. 2016. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Croton zehntneri* and its main constituent estragole. *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, 2, 188-193.
- Volkow, N.D., McLellan, A. T. 2016. Opioid Abuse in Chronic Pain — Misconceptions and Mitigation Strategies. *New England Journal of Medicine*, 374(13), 1253–1263. doi/full/10.1056/nejmra1507771
- Walter, E.J.; Hanna-Jumma, S.; Carraretto, M.; Forni, L. 2016. The pathophysiological basis and consequences of fever. *Critical care*, 20 (200), 1375-85. doi.org/10.1186/s13054-016-1375-5

Tables

Table 1 – Effect essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) in acute toxicity test.

Treatment	Dose (mg/kg)	Gross behaviour effect	No. of animal died (D/T)	Mortality (%)
EO <i>A. cearensis</i>	5	None	0/3	0.00
	50	No ne	0/3	0.00
	300	None	0/3	0.00
	2,000	None	0/3	0.00

D/T: number of dead mice/numbers of treated mice. None: no toxicity symptoms observed during the observation period.

Table 2 – Effect essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) and Indomethacin (20 mg/kg) on migration of the total leukocyte and neutrophils quantified in the peritoneal lavage of mice with carrageen-induced peritonitis

Treatment	Dose (mg/kg)	Leukocytes (10 ⁶ mL/ cavity)	Neutrophils (10 ⁶ mL/ cavity)
Sham	-	2.00±0.70 ^a	0.80±0.44 ^a
Vehicle	-	11.60±0.14 ^d	7.80±0.83 ^d
Indomethacin	20	5.20±0.83 ^b	2.40±0.89 ^b
	25	7.20±0.83 ^c	4.60±0.89 ^c
EO <i>A. cearensis</i>	50	4.40±0.54 ^b	2.60±0.54 ^b
	100	2.60±0.54 ^a	1.00±0.70 ^a

All results were expressed as the mean ± standard deviation (SD) (n=6). Different letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

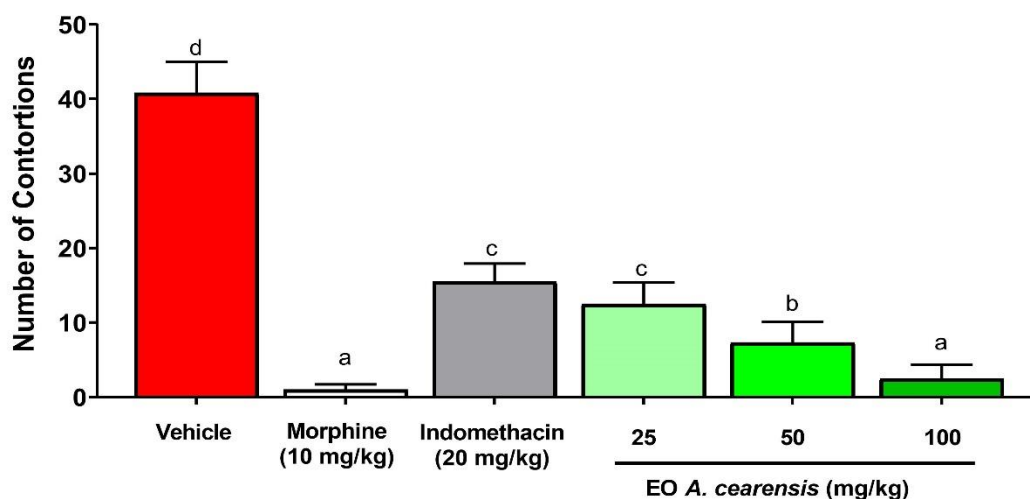
Table 3 – Antipyretic activity essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) and Dipyrone (100 mg/kg) on brewer's yeast-induced pyrexia at different times (h).

Treatment	Dose (mg/kg)	Rectal temperature (°C) at hours (h)					
		Before treatment		After treatment			
		18 h	0h	1h	2h	3h	4h
Vehicle	-	36.47±0.16	38.64±0.20	38.71±0.06 ^b	38.81±0.08 ^c	38.82±0.04 ^b	38.93±0.07 ^b
Dipyrone	100	36.45±0.11	38.88±0.24	36.60±0.15 ^a	36.68±0.13 ^a	36.71±0.16 ^a	36.43±0.09 ^a
	25	36.62±0.22	38.66±0.32	37.31±0.13 ^b	37.30±0.14 ^b	36.68±0.15 ^a	36.50±0.11 ^a
EO <i>A. cearensis</i>	50	36.52±0.17	38.73±0.34	36.85±0.18 ^a	36.95±0.11 ^a	36.46±0.16 ^a	36.41±0.13 ^a
	100	36.55±0.19	38.82±0.12	36.61±0.10 ^a	36.53±0.12 ^a	36.51±0.15 ^a	36.31±0.17 ^a

All results were expressed as the mean ± standard deviation (SD) (n=6). ^{abc}Different letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

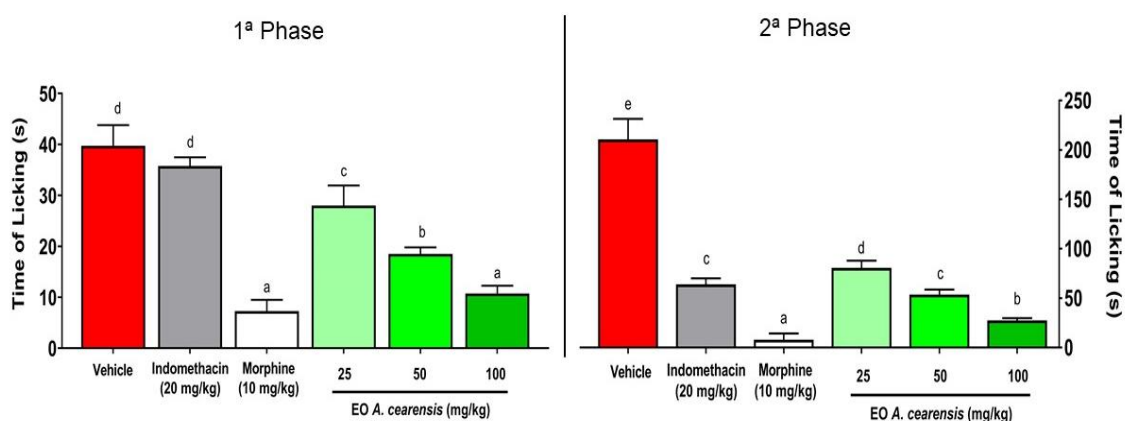
Figures

Figure 1 – Effect of the essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*), Morphine (10 mg/kg) and Indomethacin (20 mg/kg) on writhing induced by intraperitoneal acetic acid in mice.



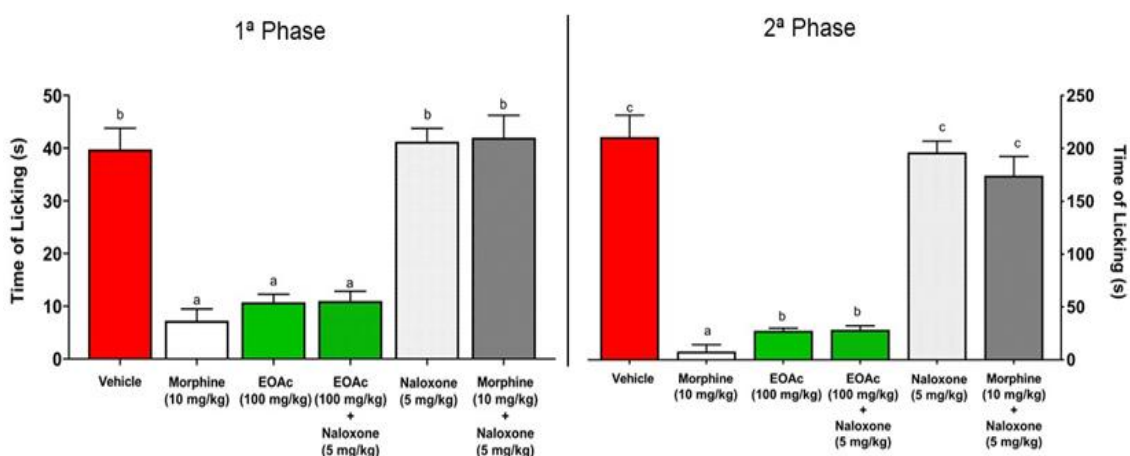
All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

Figure 2 – Effects of essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*), Indomethacin (20 mg/kg) and Morphine (10 mg/kg) in the first (0-5 min) and second (15-30 min) phase in formalin-induced nociception (2.5% v/v; i.p.l.).



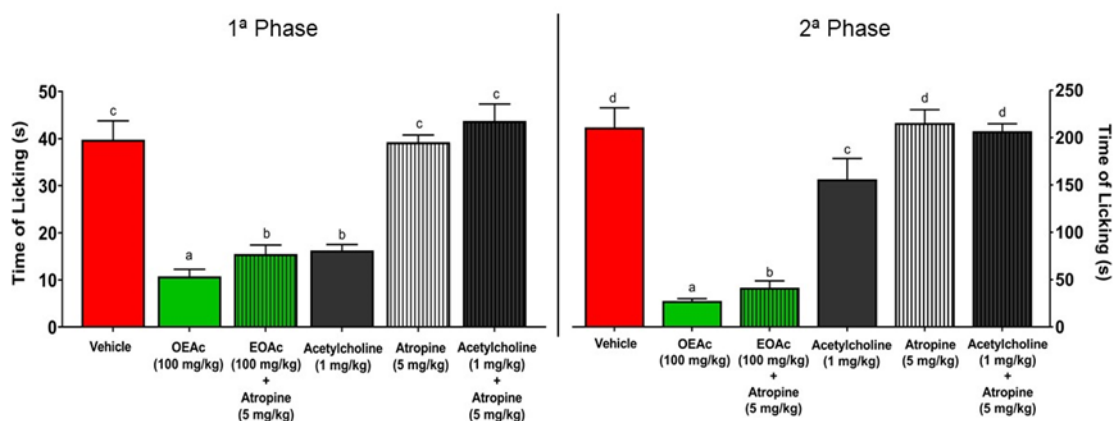
All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

Figure 3 – Effects of essential oil of *Amburana cearensis* (EOAc 100 mg/kg) on opioid receptors in the first (0-5 min) and second (15-30 min) phase in formalin-induced nociception (2.5% v/v; i.p.l.).



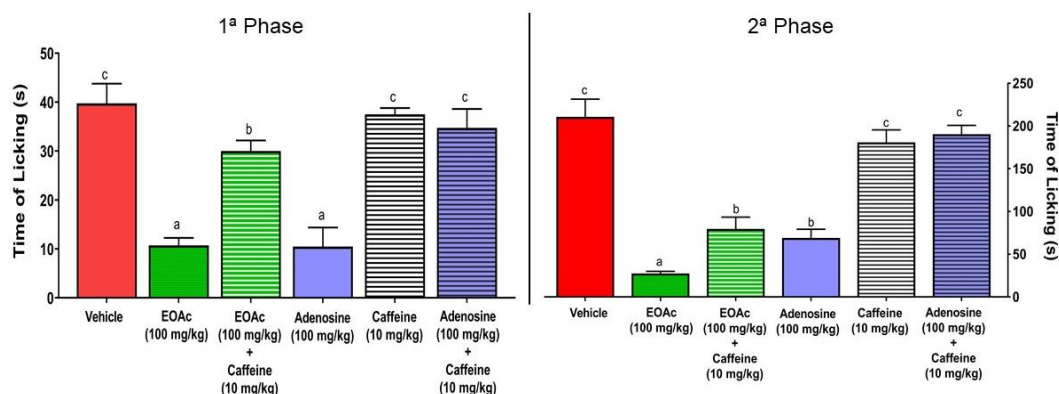
All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

Figure 4 – Effects of essential oil of *Amburana cearensis* (EOAc 100 mg/kg) on cholinergic system in the first (0-5 min) and second (15-30 min) phase in formalin-induced nociception (2.5% v/v; i.p.l.).



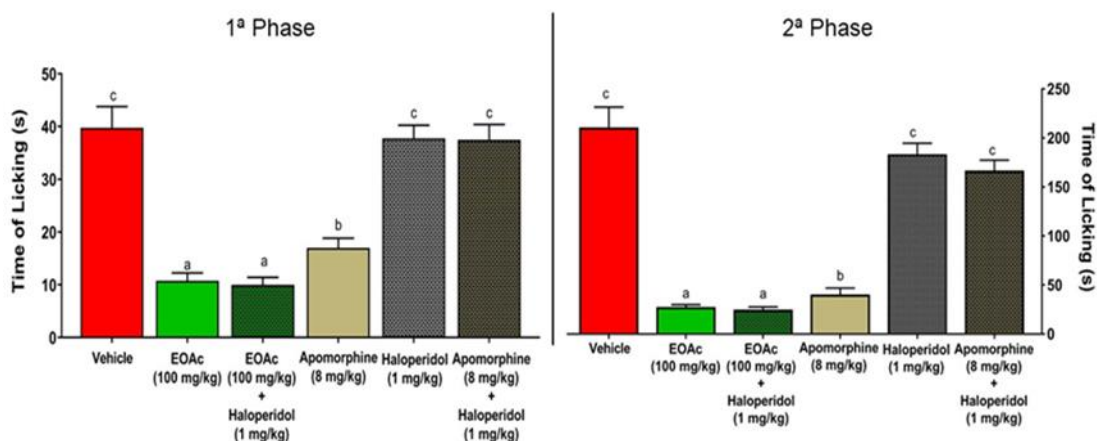
All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

Figure 5 – Effects of essential oil of *Amburana cearensis* (EOAc 100 mg/kg) on adenosinergic system in the first (0-5 min) and second (15-30 min) phase in formalin-induced nociception (2.5% v/v; i.p.l.).



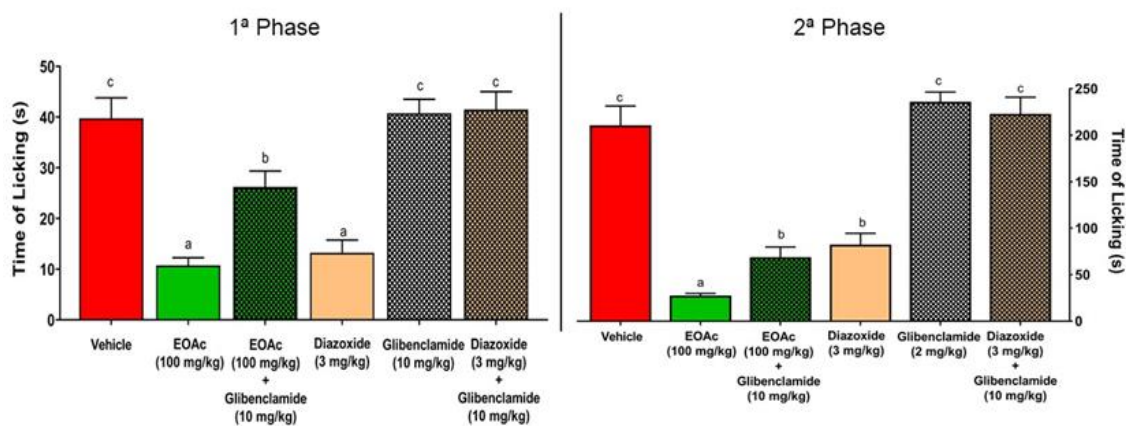
All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

Figure 6 – Effects of essential oil of *Amburana cearensis* (EOAc 100 mg/kg) on dopaminergic system in the first (0-5 min) and second (15-30 min) phase in formalin-induced nociception (2.5% v/v; i.p.l.).



All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

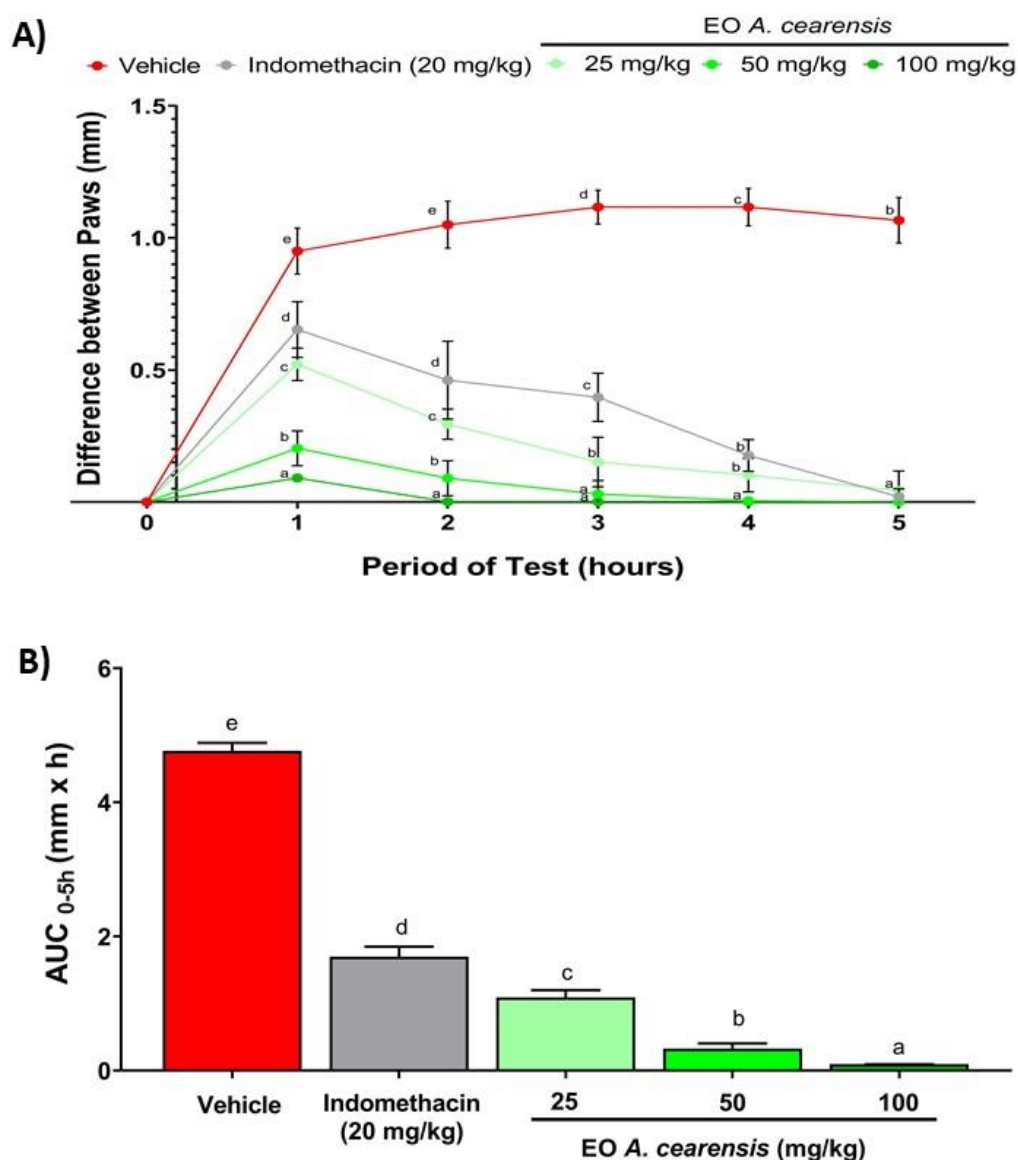
Figure 7 – Effects of essential oil of *Amburana cearensis* (EOAc 100 mg/kg) on ATP-sensitive potassium (K-ATP) channels in the first (0-5 min) and second (15-30 min) phase in formalin-induced nociception (2.5% v/v; i.p.l.).



All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

Figure 8 – Effect of essential oil of *Amburana cearensis* (EO A. cearensis) and Indomethacin (20 mg/kg) in carrageenan-induced paw edema in mice. A) Results are

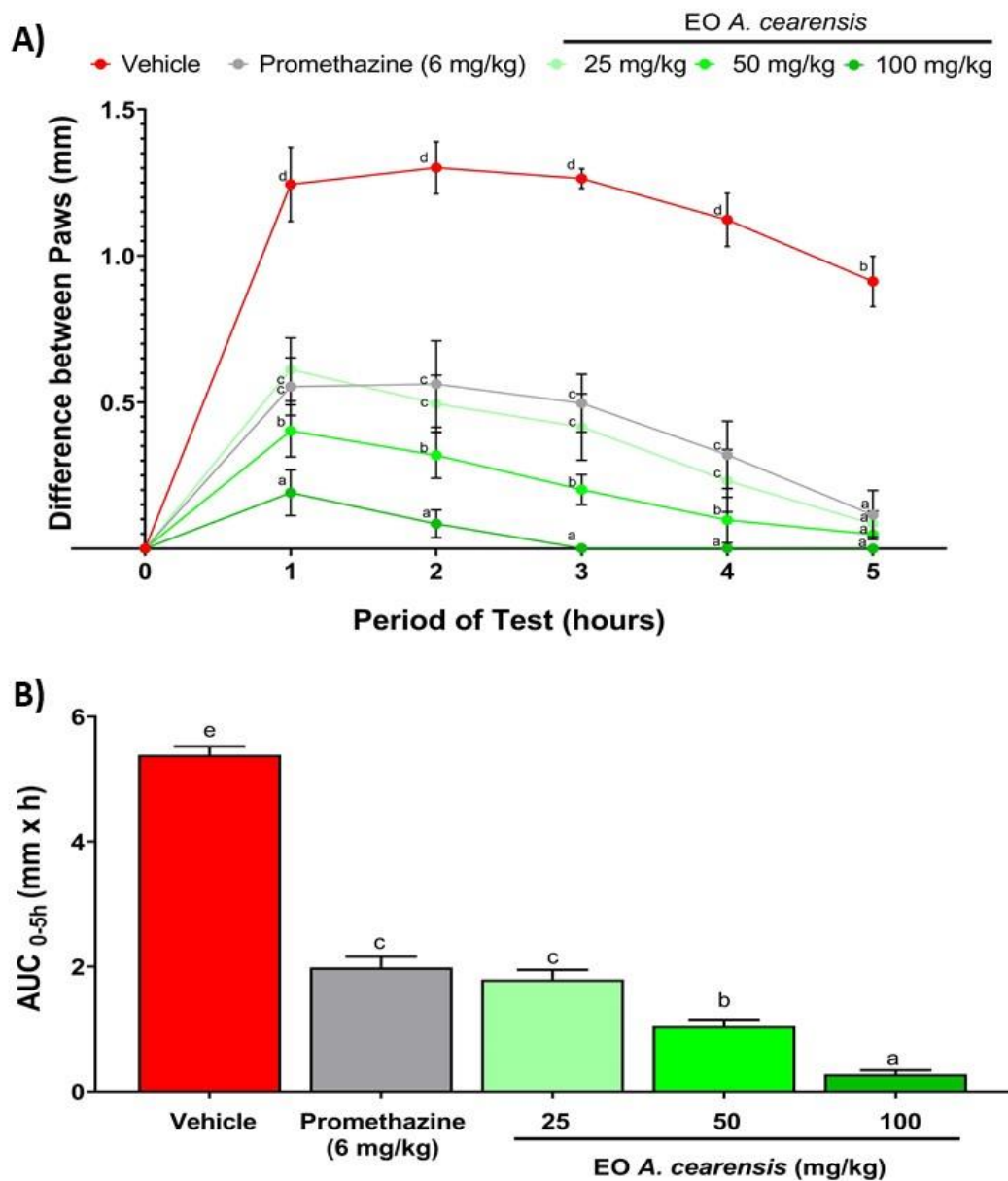
expressed difference between paw volume (mm) throughout treatment and (B) Total edema responses, measured as Area Under Curve (AUC) of treated groups.



All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

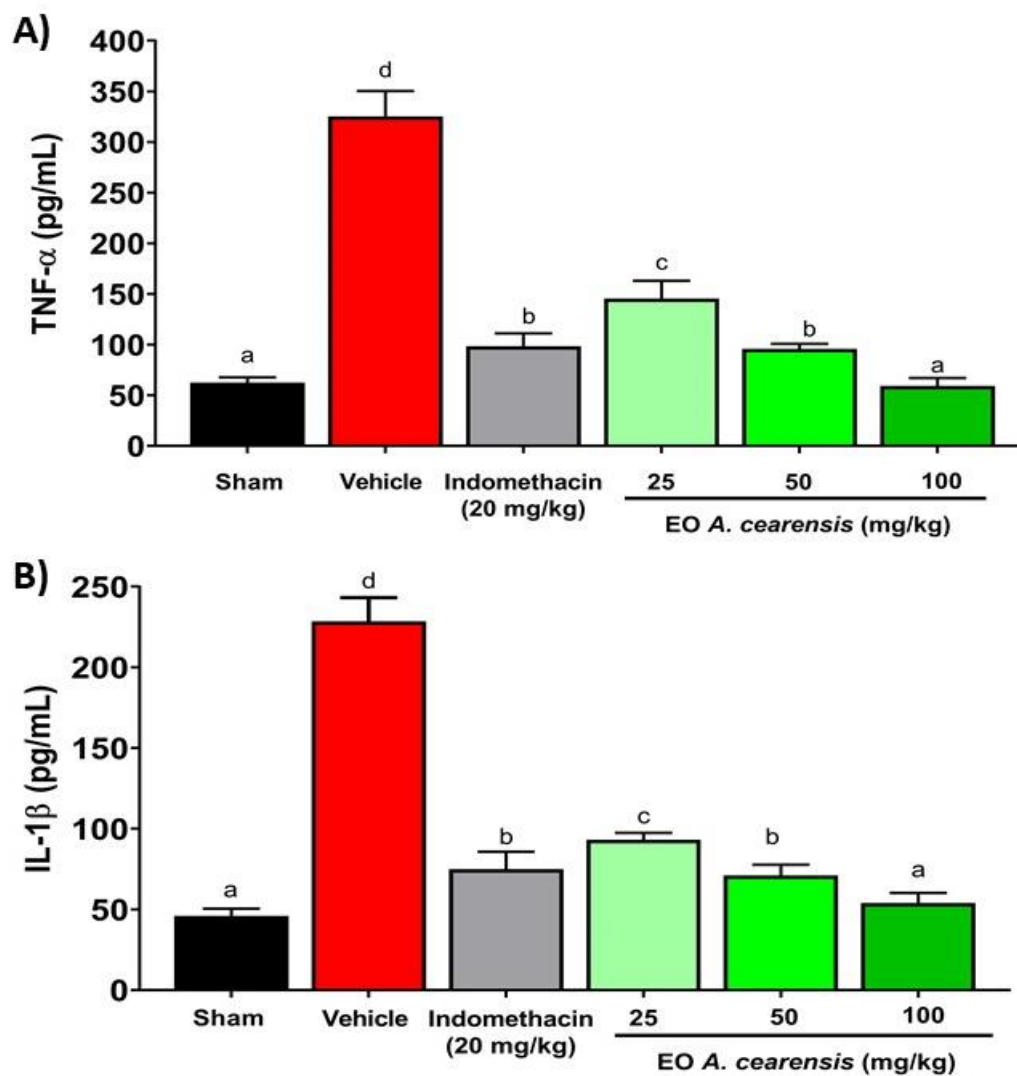
Figure 9 – Effect of essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) and Promethazine (6 mg/kg) in histamine-induced paw edema in mice. A) Results are

expressed difference between paw volume (mm) throughout treatment and (B) Total edema responses, measured as Area Under Curve (AUC) of treated groups.



All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

Figure 10 – Effect of of essential oil of *Amburana cearensis* (EO *A. cearensis*) and Indomethacin (20 mg/kg) on TNF- α and IL-1 β levels in carrageenan-induced peritonitis in mice.



All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n=6). ^{abcd} Different lowercase letters mean statistical difference, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.

APÊNDICE E – PUBLICAÇÕES DESDOBRADAS DA TESE



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

***Algrizea Minor* Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil**

Bruno Oliveira de Veras, Yago Queiroz dos Santos, Fernanda Granja da Silva Oliveira, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, Alexandre Gomes da Silva, Maria Tereza dos Santos Correia, Katharina Marques Diniz, João Ricardhis Saturnino de Oliveira, Vera Lúcia de Menezes Lima, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar, Maria Betânia Melo de Oliveira, Ana Catarina de Souza Lopes & Márcia Vanusa da Silva

To cite this article: Bruno Oliveira de Veras, Yago Queiroz dos Santos, Fernanda Granja da Silva Oliveira, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, Alexandre Gomes da Silva, Maria Tereza dos Santos Correia, Katharina Marques Diniz, João Ricardhis Saturnino de Oliveira, Vera Lúcia de Menezes Lima, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar, Maria Betânia Melo de Oliveira, Ana Catarina de Souza Lopes & Márcia Vanusa da Silva (2019): *Algrizea Minor* Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2019.1602832](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602832)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602832>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 23 Apr 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>

Qualis A4, Fator de Impacto:2.48

NATURAL PRODUCT RESEARCH
https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602832



SHORT COMMUNICATION



Algrizea Minor Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil

Bruno Oliveira de Veras^a, Yago Queiroz dos Santos^b, Fernanda Granja da Silva Oliveira^c, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida^d, Alexandre Gomes da Silva^e, Maria Tereza dos Santos Correia^e, Katharina Marques Diniz^e, João Ricardhis Saturnino de Oliveira^e, Vera Lúcia de Menezes Lima^e, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^f, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^f, Maria Betânia Melo de Oliveira^e, Ana Catarina de Souza Lopes^a and Márcia Vanusa da Silva^e

^aDepartment of Medicine Tropical, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^bDepartment of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Fortaleza, Brazil; ^cPost-graduation on Biotechnology, State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Brazil; ^dCenter for Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina, Brazil; ^eDepartment of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^fDepartment of Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

ABSTRACT

This work aimed to investigate the chemical composition, antimicrobial, antinociceptive, acute toxicity and antioxidant activity of the essential oil of *Algrizea minor* (EOAm). The essential oil presented as the major constituents β -Pinene (56.99%), α -Pinene (16.57%), Germacrene D (4.67%), Bicyclogermacrene (4.66%), (E)-Caryophyllene (3.76%) and Limonene (1.71%). It was verified that the essential oil did not show acute toxicity in the maximum dose of 5,000 mg/kg. In the evaluation of the antinociceptive activity it was verified that the essential oil reduced in 65.84% the number of writhing in the mice, reducing the pain in 59.17%, and the mechanism of action in pain reduction was opioid, similar to morphine. The essential oil also presented significant antimicrobial against Gram positive and Gram-negative bacteria and fungi, and the antioxidant activity was relevant. Therefore, these results demonstrate the great potential for the future development of pharmaceutical products with the essential oil of *Algrizea minor* (EOAm).

ARTICLE HISTORY

Received 28 November 2018
Accepted 24 March 2019

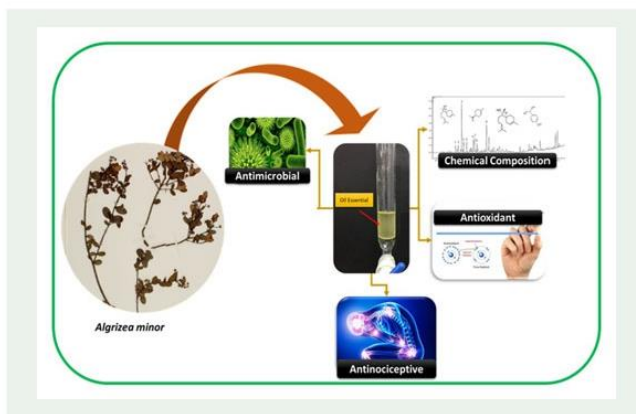
KEYWORDS

Algrizea minor; Myrtaceae; essential oil; chemical composition; biological activity

CONTACT Bruno Oliveira de Veras bruno.veras@ufpe.br Department of Medicine Tropical, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602832>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



1. Introduction

Myrtaceae is one of the most important angiosperm families being distributed in all Brazilian biomes, predominantly in the Atlantic Forest. It is believed that approximately 1.000 species can occur in Brazil (Proença et al. 2006). The Caatinga Biome, an ecosystem of the Brazilian northeastern with great extension, presents a semiarid climate, hot and with low rainfall indices, low relative air humidity with high and intense solar incidence and high temperatures during almost all the year (Reis et al. 2015). Due to the extreme environmental conditions to which the vegetation is exposed, the plants of this biome present interesting chemical characteristics that stimulate the investigation of their biotechnological and bioactive potential.

Several studies have pointed out that the essential oils produced by species of the Myrtaceae family as potential candidates for the development of drugs, with interesting activities, as antifungal (Hamini-Kadar et al. 2014), antibacterial (Dos Santos et al. 2018), antiparasitic (Rodrigues et al. 2015), antioxidant (Victoria et al. 2013) and antinociceptive (Amorim et al. 2009).

A new species of the genus *Algrizea* (Myrtaceae) was recently described by Sobral, Faria and Proença. *Algrizea minor* is an endemic species to the eastern portion of the Brazilian state of Bahia, and is distinguished from *A. macrochlamys* (DC.) Proença & NicLugh. by its smaller leaves and smaller calyx lobes (Sobral et al. 2010). Little is known about the pharmacological properties of this species, and to date no records of biological activity studies with *A. minor* have been found in the scientific literature consulted.

In this context, this work aimed to investigate the chemical composition, antimicrobial, antinociceptive, acute toxicity and antioxidant activity of the essential oil of *Algrizea minor* Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae).

2. Results and discussions

2.1. Activity antinociceptive and acute toxicity

The antinociceptive activity, performed by induction of abdominal pain, showed a significant reduction in the number of writhes, 65.84% less contortions than control group (Figure S1). In the formalin test, the essential oil similarly reduced pain by 59.17% (Figure S2). When the pathways were evaluated, the analgesic potential was blocked only by naloxone, indicating that the mechanism of action of the essential oil in pain reduction is opioid, similar to morphine. The essential oil did not cause mortality, neither changes in behavior, in concentrations up to 5000 mg/kg v.o. Studies show that antinociceptive activity is a property in essential oils of Myrtaceae family, as reported for *Eugenia uniflora* and *Callistemon citrinus*, demonstrating effectiveness in pain control and the pharmacological potential of Myrtaceae family (Amorim et al. 2009; Radulović et al. 2015). This is the first report of the biological activity of *Algrizea minor*, evidencing the novelty of this work.

2.2. Activity antimicrobial

The essential oil of *Algrizea minor* presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (32.5 µg/mL), *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 (128 µg/mL), *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (64.0 µg/mL), *Escherichia coli* ATCC 8739 (64.0 µg/mL) (Table S1) and *Candida albicans* ATCC 10231 (500 µg/mL) and *Candida glabrata* ATCC 15126 (1000 µg/mL) (Table S2). Other studies demonstrated the antimicrobial activity of Myrtaceae species. Leaves of *Eugenia uniflora* was found to be antimicrobial against *Paracoccidioides brasiliensis* (Costa et al. 2010). Dos Santos et al. (2018) obtained antifungal activity against strains of *Candida* spp. from the essential oil of *Eugenia uniflora*.

2.3. Activity antioxidant and photoprotective

The essential oil of *Algrizea minor* showed antioxidant activity, with IC₅₀ 114.25 µg/mL for DPPH method, value corresponding to approximately 2.3 times the value obtained by Trolox. For ABTS method, the oil showed IC₅₀ 163.75 µg/mL, and Total Antioxidant Capacity (TAC) was determined by phosphomolybdenum method, with IC₅₀ 626.1 µg/mL, and the Reducing Power (RP) showed IC₅₀ 2738.0 µg/mL, thus demonstrating the relevant antioxidant activity of the essential oil of *Algrizea minor* (Table S3). Studies have associated antioxidant activity to terpenes, such as α-Pinene, β-Pinene and Limonene as well as obtained in the essential oil of *Algrizea minor* (Martins et al. 2014; Salem et al. 2018). No previous reports with the antioxidant activity was found with the species from the *Algrizea*, demonstrating the cosmetic, food and pharmacological bioactive potential from this genus.

2.4. Chemical composition

The leaves of *Algrizea minor* were collected in the city of Brejo da Madre de Deus, in the state of Pernambuco, Brazil. The essential oil was extracted by hydrodistillation and subsequently analyzed in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and

chromatography-flame ionization detector (GC-FID) (Oliva et al. 2019). Fifteen components were identified, with the following constituents: β -Pinene (56.99%), α -Pinene (16.57%), Germacrene D (4.67%), Bicyclogermacrene (4.66%), (E)-Caryophyllene (3.76%) and Limonene (1.71%) (Table S4). The constituents found in *Algrizea minor* were described as major constituents in other species of the Myrtaceae family, being considered as a phytochemical signature of the family (Amorim et al. 2009; Salem et al. 2018; Dos Santos et al. 2018).

3. Conclusion

According to the results of this study, the essential oil of *Algrizea minor* is rich in β -Pinene and α -Pinene, showed important antioxidant, antimicrobial activity, emphasizing the industrial and pharmacological potential. The results for the antinociceptive activity indicated that the mechanism of action of the essential oil was similar to morphine. Therefore, these results demonstrate adequate values for the future development of pharmaceutical products with the essential oil of *Algrizea minor*.

Conflict of interest

Authors declare that there is no conflict of interest.

ORCID

Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida  <http://orcid.org/0000-0002-0867-1357>
 Vera Lúcia de Menezes Lima  <http://orcid.org/0000-0003-2581-9218>
 Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro  <http://orcid.org/0000-0003-0158-7221>

References

- Amorim ACL, Lima KKF, Hovell AMC, Miranda ALP, Rezende CM. 2009. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine*. 16(10):923–928.
- Costa DP, Alves Filho EG, Silva LMA, Santos SC, Passos XS, Silva M. D R R, Seraphin JC, Ferri PH. 2010. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *J Braz Chem Soc*. 21(5):851–858.
- Dos Santos JFS, Rocha JE, Bezerra CF, do Nascimento Silva MK, de Matos YMLS, de Freitas TS, Dos Santos ATL, da Cruz RP, Machado AJT, Rodrigues THS, et al. 2018. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. *Food Chem*. 261:233–239.
- Hamini-Kadar N, Hamdane F, Boutoutaou R, Kihal M, Henni JE. 2014. Antifungal activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil against phytopathogenic fungi of tomato (*Aolanum lycopersicum*) in Algeria. *J Exp Biol*. 2:447–454.
- Martins MDR, Arantes S, Candeias F, Tinoco MT, Cruz-Morais J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol*. 151(1): 485–492.
- Oliva A, Garzoli S, Sabatino M, Tadić V, Costantini S, Ragno R, Božović M. 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. *Nat Prod Res*. :1–4.

- Proença CEB, Nic-Lughadha EM, Lucas E, Woodgyer EM. 2006. *Algrizea* (Myrteae, Myrtaceae): a new genus from the Highlands of Brazil. *Syst Bot.* 31(2):320–326.
- Radulović NS, Randjelović PJ, Stojanović NM, Cakić ND, Bogdanović GA, Živanović AV. 2015. Aboriginal bush foods: a major phloroglucinol from Crimson Bottlebrush flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. *Food Res Int.* 77:280–289.
- Reis RLS, Leão NSR, Souza AF, Silva GKB, Luna MAC, Silva CAA, Okada K. 2015. Evaluation of biotechnological potential of *Asergillus parasiticus* UCP 1281 in the wastewater biotreatment of dairy industry and lipids production. *E-xacta.* 8:31–42.
- Rodrigues KAF, Amorim LV, Dias CN, Moraes DFC, Carneiro SMP, Carvalho F. 2015. *Syzygium cumini* (L.) skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit it anti-Leishmania activity through immuno modulation in vitro. *J Ethnopharmacol.* 160:32–40.
- Salem N, Kefi S, Tabben O, Ayed A, Jallouli S, Feres N, Hammami M, Khammassi S, Hrigua I, Nefisi S, et al. 2018. Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. *Ind Crops Prod.* 124:115–125.
- Sobral M, Faria JE, Proença C. 2010. A new species of *Algrizea* (Myrteae, Myrtaceae) from Bahia, Brazil. *Neodiv.* 5(1):1–6.
- Victoria FN, de Siqueira Brahm A, Savegnago L, Lenardão EJ. 2013. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. *Neurosc Lett.* 544:105–109.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine



Bruno Oliveira de Veras^{a,*}, Maria Betânia Melo de Oliveira^b, Fernanda Granja da Silva Oliveira^c, Yago Queiroz dos Santos^d, João Ricardhis Saturnino de Oliveira^b, Vera Lúcia de Menezes Lima^b, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida^c, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^e, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^e, Jaciana dos Santos Aguiar^f, Krystyna Gorlach-Lira^g, Caio Rodrigo Dias de Assis^b, Márcia Vanusa da Silva^b, Ana Catarina de Souza Lopes^a

^a Post-graduation in Tropical Medicine, Laboratory of Microbiology, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Post-graduation in Biotechnology, Laboratory of Natural Products, Federal University of São Francisco Valley, 56304-917, Pernambuco, Brazil

^d Department of Biochemistry, Laboratory of Proteins and Bioactive Peptides, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

^e Department of Chemistry, Center for Exact and Nature Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^f Post-graduation in Biotechnology, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^g Department of Molecular and Cellular Biology, Laboratory of Biology Molecular of Microorganisms, Federal University of Paraíba, 58059-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Fabaceae
Essential oil
Antimicrobial activity
Antioxidant activity
Antinociceptive

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Hymenaea cangaceira* Pinto, Mansano & Azevedo (Fabaceae) is a Brazilian medicinal plant widely known as “Jatobá”. In folk medicine, it is used to treat infections, respiratory problems, rheumatism, antitumoral, inflammation and pain, however, no activity has been scientifically validated.

Aim of the study: This study investigated chemical composition of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (EOHc), antimicrobial, antinociceptive and antioxidant activities besides protection against DNA damage and hemolysis.

Material and methods: The essential oil was obtained by hydrodistillation, and characterized by GC-MS and GC-FID. The evaluation of antimicrobial activity was performed by microdilution method. The evaluation of the antioxidant activity was performed using the radicals DPPH, ABTS, O₂⁻ and OH[•], and the protection of DNA damage using plasmid pBR322. Different experimental models were used to evaluate the antinociceptive effect (acetic acid and formalin), and evaluate the mechanisms of action involved with pharmacological antagonists (naloxone, atropine and gibenclamide) in mice. The essential oil was evaluated for hemolysis on human erythrocytes.

Results: The extraction of EOHc showed a yield of 0.18% on a dry basis, presenting high content of hydrocarbon sesquiterpenes (79.04%), high antioxidant activity and protect DNA from damage, besides presenting antifungal and antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria *in vitro*. It was found that the essential oil had no acute toxicity in mice up to 5000 mg/kg oral administration (o.a.), in addition to no hemolysis on human erythrocytes. The reduction of antinociceptive activity was 75%, with the opioid system as the mechanism of action.

Conclusion: Our results validate the main activities by the traditional use attributed to *H. cangaceira* for

Abbreviations: EOHc, Essential oil of *Hymenaea cangaceira*; GC-MS, Gas Chromatography/Mass Spectrometry; GC-FID, Gas Chromatography/Flame Ionization Detector; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate; ABTS, 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid; O₂⁻, Superoxide radical; OH[•], Hydroxyl radical; BHT, Butylated Hydroxytoluene; IC₅₀, The half maximal inhibitory concentration; MIC, Minimal Inhibitory Concentration; MBC, Minimal Bactericidal Concentration; MFC, Minimal Fungicidal Concentration; ANOVA, analysis of variance; SEM, standard error of mean

* Corresponding author.

E-mail address: brunoveras@hotmail.com (B. Oliveira de Veras).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265>

Received 9 August 2019; Received in revised form 29 September 2019; Accepted 29 September 2019

Available online 30 September 2019

0378-8741/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

antimicrobial and analgesic activity. In addition, the oil has a potent antioxidant activity, protecting the body against oxidative stress damage, adding new value to an endemic species not known to the industry.

1. Introduction

Plants are fundamental to the maintenance of the ecological dynamics in terrestrial ecosystems. They also provide various chemicals with potential therapeutic properties (Sultan et al., 2014). Since most of the plant species used as medicine in traditional health practices are characterized by its own taste and aromatic smell, the study of essential oils (EOs) is one of the best strategies to find new phytochemical bioactive molecules with best profile to match biodiversity and medicine (Rodrigues et al., 2015a; Donald et al., 2016; Salen et al., 2018; Singulani et al., 2018).

Many researches aimed to study the species of *Hymenaea* around the world due to the traditional use of these plants as a therapeutic alternative (Oliveira et al., 2016; Veggi et al., 2014). Being a genus of the family Fabaceae, highly distributed from Central America to South America, mainly in the Amazon basin, this genus comprises about 25 described species in America (Boniface et al., 2017).

The Caatinga region in Brazil is very rich and is considered a source of varied species with high Brazilian consumption, either for food or for treatment of diseases. Species from *Hymenaea* are known in Brazil as “jatobá”, “jetaí”, “jataí-uva”, “jetaíba” (Oliveira et al., 2016), and have traditionally been used as food, and in traditional medicine used to treat infections, respiratory problems, rheumatism, antitumoral, inflammation and pain (Almeida et al., 2012; Veggi et al., 2014; Lacerda et al., 2014). The activities of the oils and extracts of leaves and roots of this species are performed in the presence of several chemical constituents, such as terpenes, phenolic compounds, flavonoids, steroids, tannins, alkaloids, amino acids, fatty acids, carbohydrates and coumarins (Fernandes et al., 2005; Veggi et al., 2014; Oliveira et al., 2016).

Species of *Hymenaea* are consumed by traditional communities without species distinction, however, recently, some new species of this genus have been described in northeastern Brazil (Pinto et al., 2017). The specie *H. cangaceira* has been described as morphologically similar to the *H. martiana* and *H. longifolia* and their geographical distribution is superimposed on them. It differs, however, in the combination of glabrous, ovate to broad-elliptical leaflets, glabrous ovaries and a relatively small and cylindrical fruit and to date no records of biological activity studies related to these species have been found in the scientific literature consulted.

In this context, this study aimed to investigate the chemical composition of essential oil from *H. cangaceira*, as well as antimicrobial, antinociceptive and antioxidant activities and protection against DNA damage and hemolysis.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The aerial parts (leaves) of *H. cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) were collected in Catimbu National Park, Pernambuco, Brazil, Coordinates: 8°36'35"(S) and 37°14'40"(W). The sample was obtained on March 2018 by the team consisting of researchers from Federal University of Pernambuco. A voucher specimen used in this work was deposited in the herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco IPA under the number 84888.

2.2. Essential oil extraction

The essential oil was extracted from fresh leaves (500 g) by hydro-distillation in Clevenger type apparatus for 4 h. Anhydrous sodium

sulfate was used to remove all the water from the oil and stored in amber containers sealed at 4 °C. The yield % (w/w) of the oil was calculated based on the weight of the fresh material.

2.3. Chemical composition

The essential oil was analyzed on Agilent Technologies Gas Chromatograph (Palo Alto, CA, USA) 5975C series, with triple quadrupole detection system equipped with DB-5MS column Agilent Technologies (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Aliquots of 1 μL in split 1:50 of the essential oil were injected in the gas chromatography coupled to CG-MS mass spectrometry. Compounds were identified by comparing their mass spectra using MassFinder software 4, NIST08 and Wiley Registry™ 9th Edition, integrated into the software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) and Retention Index to those of authentic standards available in the Adams (Adams, 2007). The sample were quantified in gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), under the same GC-MS conditions, in triplicate for calculation of standard deviation of peak area percentage for each compound in the chromatogram.

2.4. Antioxidant activities

2.4.1. DPPH scavenging activity

The evaluation of the antioxidant activity of essential oil by the free radical sequestration method was measured by means of hydrogen donation using the stable radical DPPH (Kose et al., 2010). Measurements were performed in triplicate and inhibition activities were calculated based on the percentage of DPPH removed. An analogue of vitamin E (Trolox®) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) were used as standards. The percent inhibition (I%) was calculated using the following equation: $I\% = [(Ac - As)/(Ac)] \times 100$, where Ac is the absorbance of the control and As is the absorbance of the sample. IC₅₀ of DPPH activity was calculated based on the linear regression of the percentage of remaining DPPH against the sample concentration. All assays were carried out in triplicate.

2.4.2. ABTS scavenging activity

Antioxidant activity of the essential oil by the ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay was based on the generation of the cationic chromophore radical obtained from the oxidation of ABTS by potassium persulfate (Re et al., 1999). Measurements were performed in triplicate and inhibition activities were calculated based on the percentage of ABTS removed. An analogue of vitamin E (Trolox®) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) were used as standards. The percent inhibition (I%) was calculated using the following equation: $I\% = [(Ac - As)/(Ac)] \times 100$, where Ac is the absorbance of the control and As is the absorbance of the sample. IC₅₀ of ABTS activity was calculated based on the linear regression of the percentage of remaining ABTS against the sample concentration.

2.4.3. Hydroxyl radical scavenging activity (OH)

The activity was investigated using the Fenton reaction based on the methodology of Costa et al., 2011, with some modifications. Hydroxyl radicals were generated using 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 10 mM FeSO₄ × 7H₂O, 10 mM EDTA, 2 mM sodium salicylate, 30% H₂O₂. Samples were mixtures is incubated at 37 °C for 1 h, and then read at 510 nm. IC₅₀ of Hydroxyl radical scavenging activity was calculated based on the linear regression of the percentage of Hydroxyl radical reduced against the sample concentration. All assays

were carried out in triplicate.

2.4.4. Superoxide radical scavenging assay (O_2^-)

It was evaluated according to a modified procedure-based Costa et al., 2011, with some modifications. An aliquot of 200 μ L of sample was mixed with 200 μ L of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4), 200 μ L of metionin 65 mM, 200 μ L of EDTA solution 0.5 mM, 200 μ L of 0.375 mM Nitroterazolium Blue chloride (NBT) and 200 μ L of riboflavin 0.5 mM. Control samples were prepared by substituting 200 μ L of sample for 200 μ L of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4). The mixture was incubated under fluorescent light for 15 min and the absorbance read at 560 nm against a blank. A Quercetin (Sigma-Aldrich, Germany) was used as standard. The radical scavenging activity (I%) was calculated using the following equation: $I\% = [(Ac - As)/(Ac)] \times 100$, where Ac is the absorbance of the control and As is the absorbance of the sample. All assays were carried out in triplicate. IC_{50} of superoxide scavenging activity was calculated based on the linear regression of the percentage of radical O_2^- reduced against the sample concentration.

2.4.5. DNA damage protective effect

Induction of DNA scission by Fenton reagent was measured on plasmid pBR322 (Sigma-Aldrich, Germany) according to the procedure described by Lee et al. (2002). In addition, intact plasmid pBR322 (0.5 mg) was mixed with essential oil in different concentrations (12.5, 25, 50 and 100 μ g/mL) in TE buffer (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA), pH 7.2, and incubated for 10 min at 37 °C, followed by the addition of the Fenton reagent (30 mM H_2O_2 , 50 μ M ascorbic acid and 80 μ M $FeCl_3$), the mixture was incubated for 30 min at 37 °C. Samples were then subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis containing 0.5 μ g/mL ethidium bromide and photos of the DNA bands were collected under the Gel Analyzer*. All assays were carried out in triplicate.

2.4.6. Hemolytic assay

The hemolytic activity was measured by the determination of human erythrocyte lysis (hRBCs), ceded by the Hospital of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN). The hemolytic activity was assayed by incubating the essential oil (5 mg/mL) with of 2% erythrocytes group O⁺ washed three times with PBS (phosphate buffer saline), pH 7.2. The saline (NaCl 0.9%) was used as a negative control, and Triton X-100 (1%) as a positive control. The samples were incubated for 4, 8 and 12 h at 37 °C and then centrifuged at 2500 rpm for 5 min. Hemolysis was measured by spectrophotometry at a wavelength of 540 nm in 96-well using 200 μ L of samples. All experiments were performed in triplicate and expressed as percentage (Ahmad et al., 2010).

2.4.7. Antimicrobial activity

2.4.7.1. Microbial strains. The antimicrobial activity was evaluated in *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Candida tropicalis* ATCC 750 and *Candida krusei* ATCC 6258 provided by the Laboratory of Environmental and Clinical Microbiology at the Institute of Tropical Medicine of Federal University of Rio Grande do Norte.

2.4.7.2. Inoculum preparation. The bacteria and fungi were cultivated on the Mueller Hinton Agar and Sabouraud Dextrose Agar, respectively. After the incubation period, colonies of each lineage were aseptically transferred to sterile saline solution (0.8% NaCl). The turbidity of the solutions was standardized with 0.5 Mac Farland standard (10^8 CFU/mL).

2.4.7.3. Minimum inhibitory concentration (MIC). The broth microdilution susceptibility assay to identify the minimum inhibitory concentration (MIC) followed CLSI protocol M100 (CLSI, 2017) and M60 (CLSI, 2018). It was used 96-well flat bottom plates to carry this

assay out, being the essential oil diluted in medium Mueller Hinton (bacteria) and RPM-1640 (fungi) (Bessa et al., 2016), then added the microbial inoculum containing approximately 10^8 CFU/mL. The cells were incubated on a rotary shaker at 150 rpm at 37 °C for 24 h. Subsequently, 10 μ L of 0.001% resazurin was added and the plates were incubated for 4 h. Growth was indicated by color changes from purple to pink (or colorless) and the lowest concentration at which the color change occurred was taken as the MIC. The antibiotics vancomycin, cefepime and fluconazole were used as a positive control. Each trial in this experiment was performed in triplicate.

2.4.7.4. Minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBC/MFC). For the determination, followed CLSI protocol M100 (CLSI, 2017) and M60 (CLSI, 2018). Aliquots of 10 μ L from the wells before the MIC were transferred to Petri dishes containing Mueller Hinton Agar (MHA) and Sabouraud Dextrose Agar (SDA), incubated at 37 °C for 24 h. MBC/MFC were considered to be the lowest concentration from which no microbial growth was observed after culturing. The antibiotics vancomycin, cefepime and fluconazole were used as a positive control. Each trial in this experiment was performed in triplicate.

2.4.8. Toxicity acute and antinociceptive activity

2.4.8.1. Animals. The assessment of acute toxicity and antinociceptive activity was previously approved by the Animal's Use Ethics Committee (CEUA) of Federal University of Pernambuco, under process 23076.036381/2018-14. For evaluation, were used Swiss albino (*Mus musculus*) male mice 10–12 weeks old, weighing between 30 and 35 g, maintained in standard laboratory conditions ($22 \pm 1^\circ$ C and 12 h light/dark cycle). Mice were fed with standard rodent pellet food and water *ad libitum*. After a week of adaptation, the animals were randomly divided according to the evaluations to be performed (acute toxicity, antinociceptive activity and mechanisms of action involved in antinociception).

2.4.8.2. Acute toxicity. Acute toxicity was assessed as described by Chinedu et al. (2013). Firstly, the essential oil was orally administered (o.a.) in three groups, containing nine adult mice were equally divided: 10 mg/kg, 100 mg/kg and 1000 mg/kg. After administration, animals were housed and monitored during 24 h for changes in behavior and deaths. If no alteration was observed, the essential oil would be assessed in a second phase: nine animals was divided and received 1600 mg/kg, 2900 mg/kg and 5000 mg/kg (o.a.) and then was observed for alterations and mortality. The LD_{50} was calculated by the formula: $LD_{50} = \sqrt{(D0 \times D100)}$. D0 is the highest dose without mortality, and D100 is the lowest dose with deaths.

2.4.8.3. Nociceptive against acetic acid. The antinociceptive activity was performed by induction of pain with acetic acid 0.8% administered by intraperitoneal route (i.p.) (Radulović et al., 2015), then the animals were treated with vehicle (saline, o.a.), Indomethacin (20 mg/kg, v.o.) and essential oil (100 mg/kg, v.o.), and the number of abdominal writhing recorded between 5 - 15 min after injection was measured.

2.4.8.4. Nociception against formalin and mechanisms of action. In this model, it was used an experimental protocol similar to that described by Hunskaar et al. (1985). The nociceptive activity was also performed by pain induction by intraplantar administration (i.p.l.) of formalin 2.5%. Vehicle (saline), morphine (10 mg/kg), indomethacin (20 mg/kg) and essential oil (100 mg/kg) were orally administered (o.a.), 30 min before the formalin injection. The animals were observed to record the total time and number of paw licks, and nociception was considered based on the number of times the mouse licked the paw that received the chemical agent for 0–5 min (neurogenic phase) and 15–30 min (inflammatory phase).

Participation of the different pathways involved in nociception was

assessed by administering the following drugs (15 min prior to treatment): naloxone (5 mg/kg, o.a.) a non-selective opioid antagonist; atropine (5 mg/kg, o.a.) a non-selective muscarinic receptor antagonist and glibenclamide (5 mg/kg, o.a.) a ATP-sensitive K⁺ channel blocker. The tests were performed with oral administration of EOHc (100 mg/kg, o.a.), vehicle (0.9% saline) and morphine (10 mg/kg, o.a.) as standard group, after 30 min the animals were submitted to the formalin test (as described) and the licking time recorded and computed for analysis (Tjolsen et al., 1992).

2.5. Statistical analysis

All assays were performed in triplicate. Values were considered significantly different at $p < 0.05$. The data were analyzed using the GraphPad Prism® version 5.0 and expressed as mean $\pm$ SD. Statistically significant differences were calculated by the application of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Turkey post-hoc test.

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition of EOHc

Aerial parts of *H. cangaceira* were hydrodistilled and produced a yellow essential oil with characteristic odor, with yield of 0.18% (w/w). Fifteen compounds were detected, which represented 85.38% of the total composition (Table 1).

The essential oil was characterized by a high percentage of hydrocarbon sesquiterpenes (79.04%). The quantification showed that oil has as main components (E)-Caryophyllene (23.38 $\pm$ 0.51%), Germacrene D (14.66 $\pm$ 0.14%), α -Guaiene (9.75 $\pm$ 0.07%), β -Elemene (7.05 $\pm$ 0.02%), α -Copaene (6.34 $\pm$ 0.15%) and α -Humulene (4.65 $\pm$ 0.12%). There are few studies that evaluate the composition of essential oils from species of the genus *Hymenaea*. Aguiar et al. (2010) reported that the essential oil of *H. courbaril* var. *corbaril* have α -copaene, spatulenol and β -selinene as constituents, being present in small concentrations in the leaf oil (0.41–1.99%).

The major components present in the essential oil of *H. cangaceira* (EOHc) are considered biologically active. Several activities are ascribed to them. Anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, anti-rheumatic, antioxidant, antitumor, analgesic and antiviral activities were reported for caryophyllene (Astani et al., 2011; Singh et al., 2014; Hammami et al., 2015). Germacrene is reported as antitumoral, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities as well as α -amylase and acetylcholinesterase inhibitory activity (Setzer et al., 2006; Del-Vechio-Vieira et al., 2009). Guaiene is reported as an inhibitor of cyclooxygenase, 5-lipoxygenase and acetylcholinesterase, besides presenting antioxidant and anti-inflammatory activity (Wei and Shibamoto, 2007; Mendes et al., 2013; Ibrahim et al., 2016). Elemene is reported as potent antimicrobial, antioxidant and anaesthetic (Benovit et al., 2015; Chen et al., 2017; Sieniawska et al., 2018). Copaene is reported as antimicrobial, antileishmanial, antigenotoxic and antioxidant (Costa et al., 2009; Turkez et al., 2014; Rodrigues et al., 2018). Humulene is reported as a potent anti-inflammatory, analgesic and anti-allergic agent (Rogério et al., 2009).

Compounds of natural origin that perform pharmacological activities of medical importance, has driven several researches, culminating in pharmaceuticals. Acheflan® is an example of medicine derived from natural products of successful traditional knowledge, with anti-inflammatory and analgesic activity from essential oil of *Cordia verbenacea* (Rodrigues et al., 2012; Perini et al., 2015; Gomes et al., 2019). CalmAid® is a potent anxiolytic agent obtained from the essential oil of *Lavandula angustifolia* (Cardia et al., 2018). These products present as main constituents responsible for its activity caryophyllene and humulene, which are some of the major compounds found in the essential oil of *H. cangaceira*, indicating the medicinal potential of this species.

3.2. Antioxidant activity

Antioxidant and radical scavenging compounds are precious dietary supplements due to protection of the human health against various disorders since they play a crucial role by restoring physiological oxidative balance and modulating biological pathways and membrane function (Lee et al., 2002; Wei et al., 2007; Almeida et al., 2012; Hammami et al., 2015). Studies indicates that there is no single method capable of quantitatively and accurately evaluate the antioxidant properties of a particular compound, being necessary to use different techniques (Ormano et al., 2013).

In the present study, different kinds of assays were employed to evaluate the antioxidant potential of the essential oil from *H. cangaceira* (EOHc). The results on the free radicals scavenging inhibition in terms of IC₅₀ values are given in Table 2. The result of the scavenging activity of the DPPH⁺ radical presented an IC₅₀ value of 127.51 $\pm$ 0.01 μ g/mL. The scavenging of the ABTS⁺ radical by the oil was found to be higher than that of DPPH⁺ radical presenting an IC₅₀ value of 257.03 $\pm$ 0.11 μ g/mL. The sequestration of superoxide and hydroxyl radicals showed IC₅₀ values of 328.28 $\pm$ 0.11 and 467.29 $\pm$ 0.12 μ g/mL, respectively.

While analyzing the antioxidant capacity of essential oils, factors like stereoselectivity of the radicals or the extracts solubility at different testing systems have been reported to affect the capacity of extracts to react and quench different radicals. Some compounds which have ABTS⁺ scavenging activity did not show DPPH⁺ scavenging activity (Almeida et al., 2014; Borah et al., 2019).

According to the results obtained, it is possible to state that the essential oil of *H. cangaceira* (EOHc) has a huge antioxidant potential in all the methodologies analyzed. Its antioxidant activity is superior to other essential oils considered as potent antioxidants, such as *Amygdalus pedunculata*, analyzed by Lu et al., 2018 of which presented IC₅₀ values for elimination of DPPH, O₂[•] and OH[•] radicals of 2.32, 2.65 and 2.42 mg/mL, for these methods, respectively.

The variation in the chemical profiles of the oils in both assays could have accounted for their varied antioxidant activities. Previous *in vitro* and *in vivo* studies have reported caryophyllene (Thirugnanasampandan and David, 2014), Germacrene (Del-Vechio-Vieira et al., 2009), Guaiene (Ibrahim et al., 2016), Elemene (Chen et al., 2017), Copaene (Turkez et al., 2014), Humulene (Hammami et al., 2015), these

Table 1
Chemical composition of the essential oil from *Hymenaea cangaceira* (EOHc), highlighting in bold the major components.

Peak	Compound	RI Cal	RI Lit	Percentage (%)	S.D.
1	δ -Elemene	1341	1335	2.21	0.06
2	α -Copaene	1380	1374	6.34	0.17
3	β -Elemene	1396	1389	7.05	0.12
4	Cyperene	1403	1398	2.68	0.06
5	(E)-Caryophyllene	1424	1417	23.38	0.58
6	γ -Elemene	1438	1434	2.18	0.13
7	α -Guaiene	1443	1437	9.75	0.07
8	α -Humulene	1458	1452	4.65	0.12
9	γ -Muurolene	1481	1478	1.16	0.10
10	Germacrene D	1486	1480	14.66	0.14
11	δ -Selinene	1496	1492	1.14	0.04
12	Bicyclogermacrene	1501	1500	4.59	0.02
13	α -Bulnesene	1511	1509	2.84	0.04
14	δ -Cadinene	1529	1522	2.21	0.06
15	Germacrene B	1563	1559	0.53	0.02
TOTAL (%)				85.38	
Hydrocarbon monoterpenes (MH)				6.34	
Oxygenated monoterpenes (MO)				0.0	
Hydrocarbon sesquiterpenes (SH)				79.04	
Oxygenated sesquiterpenes (SO)				0.0	
TOTAL (%)				85.38	

RICal-Experimental retention indices relative and RILit- Literature retention indices; S.D. Standard Deviation.

Table 2
Antioxidant activity of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (EOHc).

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)			
	DPPH	ABTS	O ₂ ^{•−}	OH [•]
EOHc	127.51 ± 0.01 ^b	257.03 ± 0.04 ^b	328.28 ± 0.11 ^b	467.29 ± 0.12 ^b
Trolox ^a	49.14 ± 0.03 ^a	113.27 ± 0.02 ^a	N.T.	N.T.
BHT	212.30 ± 0.02 ^c	438.12 ± 0.10 ^c	N.T.	47.19 ± 0.23 ^a
Quercetin	N.T.	N.T.	19.27 ± 0.13 ^a	N.T.

DPPH: Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: Radical 2',2'-Azino-bis (3-ethylbenzotiazolona-6-sulfonato); O₂^{•−}: Superoxide radical; OH[•]: Hydroxyl radical; EOHc: Essential oil from *Hymenaea cangaceira*; BHT: Butylated Hydroxytoluene; N.T. – Not Tested.

components are present in the essential oil of *H. cangaceira*.

3.3. DNA damage protective effect

Excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) can lead to DNA damage and other changes in cellular organelles (Berić et al., 2008; Erdogan and Ozkan, 2013). The protection effects of the essential oil of *H. cangaceira* on DNA oxidative damage induced were evaluated. Supercoiled plasmid DNA was prone to oxidation by hydroxyl radicals or peroxyl radicals generated which resulted in the formation of open circular (Fig. 1).

The essential oil showed to be effective and concentration dependent in the reduction of nicked DNA formation whereas increased super coiled form of DNA. The protective effects of the essential oil against DNA damage induced by Fenton reagent was observed in concentrations ranging from 12.5 to 100 μg/mL. These findings showed that the EOHc presents potential to prevent DNA damage.

Studies demonstrates the effectiveness of essential oils in DNA protection. Bouaziz and Sayadi (2015) demonstrated that essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Hér. acts as the protector against DNA damage induced by the Fenton reaction, in a dose-dependent activity. Hu et al. (2017) found that the essential oil of *Cyperus rotundus* prevents induced oxidative DNA damage, protecting the integrity of the genetic material.

The molecular mechanism of cancer development involves the induction of three to seven mutations in the tumour suppressor gene and oncogenes (Utsumi et al., 2011). The main mutagenic source for these mutations is the free radicals that are produced during normal body metabolism and due to chronic oxidative stress and inflammation. Due to its antioxidant effect, the essential oil of *H. cangaceira* has demonstrated effectiveness on reducing DNA damage rates, acting indirectly in the prevention of cancer.

3.4. Hemolytic assay

Studies have shown that lipophilic substances can frequently induce hemolysis by lysis of erythrocytes and increase plasma hemoglobin levels, culminating in various complications such as hemolytic anaemia (Barros et al., 2016). The toxicity of any compound that has the purpose of pharmacological applications, including hemolytic parameters, is very important to provide informations on the interactions between molecules and biological entities at the cellular level, being considered as an indicator of general cytotoxicity for normal cells (Ghosh et al., 2018).

The essential oil of *H. cangaceira* demonstrated almost negligible hemolytic rates on hRBCs after incubation with blood cells for 12 h. The hemolytic rate of the essential oil was less than 5% and below the concentration of 5000 μg/mL (Fig. 2). The absence of this side effect favours some further studies on isolated constitutive of this essential oil with potential endovenous administration according to its concentration.

Several drugs used in therapeutics that have been reported as promoters of haemolysis at a rate of up to 5%, have been considered as

clinically safe (Yang et al., 2014). The hemolysis assay suggested the safety of EOHc to human, affirming its potential application as a safe food biopreservative and possible drugs.

Essential oils described as antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory and antioxidants are not suitable for use due to hemolysis, indicating interactions between the components present in the membrane and oil, as verified by Amber et al. (2010) evaluating the hemolytic activity of *Ocimum sanctum* antifungal oil, with increasing rates of hemolysis by this oil. Rodrigues et al. (2015a,b) evaluated anti-Leishmania activity of the essential oil of *Syzygium cumini*, which presented potential for leishmaniasis control, however, causes hemolysis. Sobrinho et al. (2016) found that the essential oil of *Baccharis trinervis* had potential antioxidant and antifungal activity, however, the oil has increased dose-dependent hemolysis rate.

The essential oil of *H. cangaceira* (EOHc) does not have hemolysis rate up to the concentration of 5000 mg/mL and can be considered safe for use in various therapies, according to its biological activities.

3.5. Antimicrobial activity

The emergence of microbial resistance to antibiotics has driven research on the prospection of new antimicrobial drugs with essential oils being one of the target sources (De Veras et al., 2019). Studies indicate that the antimicrobial activity of essential oils is consistent with the action of monoterpene constituents and sesquiterpenes on the cell membrane, causing lesions that lead to the destruction of microorganisms (Oliveira et al., 2016).

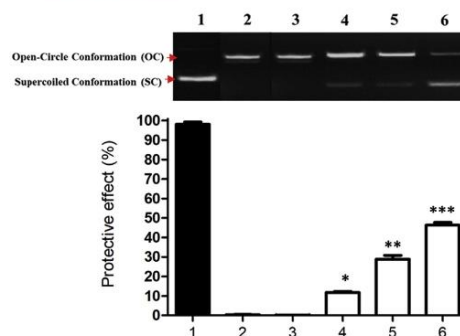


Fig. 1. Protective effect of against pBR322 plasmid DNA damage by essential oil from *Hymenaea cangaceira* (EOHc) in different concentrations, induced by photochemical reaction Fenton. (***) $P < 0.001$ vs. control; (**) $P < 0.01$ vs. control; and (*) $P < 0.05$ vs. control. Lane 1 = DNA without treatment (Control Positive); Lane 2 = DNA + Fenton reagent (Control Negative); Lane 3 = DNA + Fenton reagent + EOHc 12.5 μg/mL; Lane 4 = DNA + Fenton reagent + EOHc 25 μg/mL; Lane 5 = DNA + Fenton reagent + EOHc 50 μg/mL; Lane 6 = DNA + Fenton reagent + EOHc 100 μg/mL.

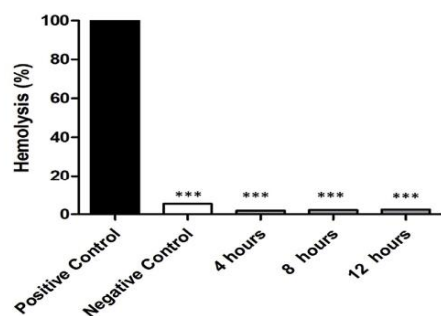


Fig. 2. Hemolytic activity of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (EOHc) in human erythrocytes. (***) $P < 0.001$ vs. positive control.

The antimicrobial activities of the EOHc were shown in Table 3. The essential oil was effective against *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *C. tropicalis* ATCC 750 and *C. krusei* ATCC 6258 with MIC values ranging from 4–1024 µg/mL, being its most effective antimicrobial activity in the fight against Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*), being superior to the antibiotic cefepime. The difference in antimicrobial activity between species of the same genus may be due to action at specific sites on the microorganisms by the major components (Ali et al., 2017).

The antimicrobial activities of the essential oil from *H. cangaceira* could be attributed to its main components. Among the essential oils that present compounds with antimicrobial activity, such as carophyllene, copene and germacrene, we find *Araucaria cunninghamii* (Verma et al., 2014). Sieniawska et al. (2018) associated the antimicrobial activity against Gram-positive, Gram-negative and fungi by the essential oil of *Nigella damascena* to the majoritarian component elemene. The terpenes guaiane and humulene were associated with antimicrobial activity in Gram-positive bacteria in essential oil of *Psidium guajava* (Silva et al., 2018).

3.6. Acute toxicity

Being a key tool for the use of a substance, acute toxicity provides information on the doses capable of causing toxic effects in a preclinical study (Chinedu et al., 2013; Radulović et al., 2015; Donald et al., 2016). The acute toxicity of the essential oil *H. cangaceira* was evaluated in two phases. In the first phase of the assessment, there was no death evidenced for 10 mg/kg, 100 mg/kg and 1000 mg/kg (o.a.) concentrations. In the second phase of the assessment, there was no death evidenced for 1600 mg/kg, 2900 mg/kg and 5000 mg/kg (o.a.) concentrations.

Table 3

Antimicrobial activity of the essential oil from *H. cangaceira*.

Strains	EOHc		VAN		CEF		FLU	
	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	1024	2048	16	64	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (MSSA)	512	1024	1	2	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4	16	-	-	8	16	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	8	16	-	-	2	4	-	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	256	512	-	-	-	-	8	16
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	512	1024	-	-	-	-	32	64

EOHc: Essential oil of *Hymenaea cangaceira*; VAN: Vancomycin; CEF: Cefepime; FLU: Fluconazole; MIC: Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL); MBC: Minimum Bactericidal Concentration (µg/mL); MFC: Minimum Fungicidal Concentration (µg/mL).

One of the major problems with the use of natural products such as essential oils is the presence of toxicity. On this basis, several studies aimed the toxicological safety of oils, such as the study by De Veras et al. (2019) evaluated the acute toxicity of the antinociceptive essential oil of *Algrizea minor*, being verified that it does not present toxicity in the same concentrations analyzed of essential oil of *H. cangaceira*, presenting as one of the major components the germacrene D.

Although essential oils have promising biological activities, however, they have toxicity, such as the essential oil of *Pimpinella saxifraga* which presents toxicity in rats with LD₅₀ of 976.2 mg/kg (o.a.) (Ksouda et al., 2019). The essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* is described with antinociceptive activity presenting as main component β-elemene and α-humulene, with reduction of the number of writhes in 51.9%, however, presents toxicity with LD₅₀ of 3380 mg/kg (o.a.) (Coelho-de-Souza et al., 2018).

It is possible to state that the essential oil of *H. cangaceira* presents toxicological safety when administered orally, through absence of side effects or mortality in the analyzed mice, being able to be used in the treatment of several diseases.

3.7. Antinociceptive activity and mechanisms of action

The management of pain is probably one of the most common and yet most difficult aspects in medical practice. A significant number of the world's population is affected by some kind of pain, culminating in the loss of life quality. Therefore, the demand for potent analgesics with low toxicity is increasing (Radulović et al., 2015; Donald et al., 2016; Ksouda et al., 2019).

It was verified in the test of abdominal writhings induced by 0.8% acetic acid via intraperitoneal, that the essential oil presented significant antinociceptive activity, with reduction of the number of writhes and pain in 76% being similar to indomethacin (Fig. 3). Different essential oils that present majoritarian components present in EOHc were described as the essential oil of *A. minor*, which reduces the number of writhes in the same concentration as the EOHc in 65.84%, with the constituents of germacrene D (De Veras et al., 2019). Essential oils which have other components than EOHc are described as potent analgesics such as *Nepeta pogonosperma* essential oil, which reduced the number of abdominal writhes by approximately 30% at the concentration of 100 mg/kg (o.a.) (Ali et al., 2012).

Formalin test evidenced that EOHc provokes analgesic effects through central and peripheral pathways. Fig. 4 shows that EOHc reduced central pain in more than 50% (20% less than morphine). In addition, central effect of EOHc was confirmed to be through opioid pathways, since naloxone could block its effect. This inhibition of EOHc was not detected via muscarinic, nor K⁺ ATPase mechanisms. Moreover, phase 2 of formalin test indicated that EOHc not only reduced pain through central activation, but also via anti-inflammatory routes (Fig. 5). Mice that received naloxone, and had their analgesic effect blocked, still had reduction of pain stimuli in this phase.

The formalin test is one of the appropriate methods to produce and

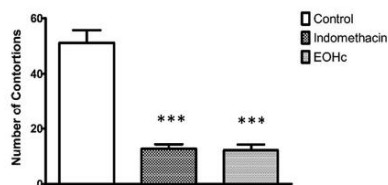


Fig. 3. Antinociceptive activity of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (EOHc) induced abdominal pain by intraperitoneal acetic acid. (***) $P < 0.001$ vs. control.

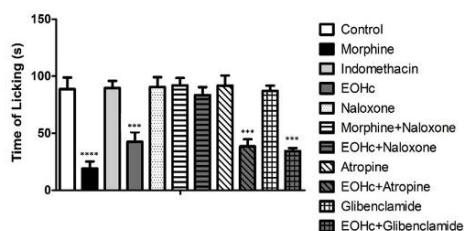


Fig. 4. Antinociceptive activity of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (EOHc) by intraplantar induction with 2.5% formalin, neurological phase. (****) $P < 0.0001$ vs. control; (***) $P < 0.001$ vs. control.

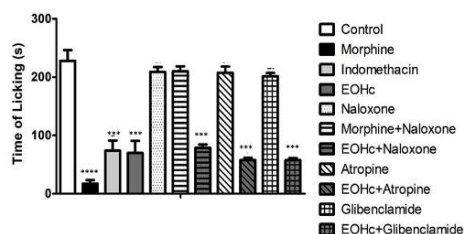


Fig. 5. Antinociceptive activity of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (EOHc) by intraplantar induction with 2.5% formalin, inflammatory phase. (****) $P < 0.0001$ vs. control; (***) $P < 0.001$ vs. control.

quantify chemical pain in the mouse model, whereby the intensity is converted to numerical values. Similar to the previous report, Queiroz et al. (2014) evaluated antinociceptive activity of *Xylopia laevigata*, which has α -copaene as its main constituent, and its activity in the formalin test presented a significant reduction in pain sensation at central and peripheral levels - mechanism of action of the opioid system.

Based on the data obtained, essential oil of *H. cangaceira* has antinociceptive activity at the central and peripheral levels, being absent of toxicity up to the concentration of 5000 mg/kg (o.a.), validating the popular knowledge about the species.

4. Conclusions

The essential oil obtained from the aerial parts of *H. cangaceira* presents as major constituents the (E)-Caryophyllene, Germacrene D, α -Guaiene, β -Elemene, α -Copaene and α -Humulene, presenting a high antioxidant, antimicrobial and analgesic activities, and does not present toxicity, making this oil an actual medicinal product. Additionally, the

results described in this study support the popular use of the species for the treatment of pain disorders, infections and prevention of cancer development. besides becoming a candidate for herbal medicine.

Author's contributions

Bruno Oliveira de Veras, Maria Betânia Melo de Oliveira, Márcia Vanusa da Silva and Ana Catarina de Souza Lopes were responsible for the orientation and writing of the research. Bruno Oliveira de Veras, Yago Queiroz dos Santos, João Ricardis Saturnino de Oliveira, Vera Lúcia de Menezes Lima, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro and Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar performed the experiments. Jaciana dos Santos Aguiar, Krystyna Gorlach-Lira and Caio Rodrigo Dias de Assis provided valuable suggestions for this study and revised the manuscript. Fernanda Granja da Silva Oliveira and Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida provided important suggestions for this research. All authors reviewed the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors have no conflict of interest to disclosure.

Acknowledgements

The authors would like to thank the collaboration of the Brazilian agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265>.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Co., Carol Stream, IL.
- Aguiar, J.C., Santiago, G.M., Lavor, P.L., Veras, H.N., Ferreira, Y.S., Lima, M.A., Arriaga, A.M., Lemos, T.L., Lima, J.Q., Jesus, H.C., 2010. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. Natural Product Communications 5, 1977–1980.
- Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., Khan, L.A., 2010. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. Microb. Pathog. 48, 35–41.
- Ali, N., Chhetri, B., Dosoky, N., Shari, K., Al-Fahad, A., Wessjohann, L., Setzer, W., 2017. Antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Ocimum forskolei* and *Teucrium yemense* (Lamiaceae) essential oils. Medicines 4 (17), 1–14.
- Ali, T., Javan, M., Sonboli, A., Semnani, S., 2012. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi in rats. Daru 20 (1), 1–48.
- Almeida, J., Souza, A.V., Oliveira, A.P., Santos, U., Souza, M., Bispo, L., Lopes, N., 2014. Chemical composition of essential oils from *Croton conduplicatus* (euphorbiaceae) in two different seasons. Journal of Essential Oil-Bearing Plants 17 (6), 1137–1145.
- Almeida, J.R.G.S., Silva, M.E.G.C., Guimarães, A.L., Oliveira, A.P., Araújo, C.S., Siqueira-Filho, J.A., Fontana, A.P., Damasceno, P.K.F., Branco, C.R.C., Branco, A., 2012. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). J. Chem. Pharm. Res. 4, 1160–1166.
- Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K.A., Nikhat, M., 2010. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. Phytomedicine 17 (12), 921–925.
- Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2011. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. Evid. Based Complement Altern. Med. 1–8 2011.
- Barros, F.J., Costa, R.J.O., Cesário, F.R.A.S., Rodrigues, L.B., Da Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Galvão, H.B.F., De Menezes, I.R.A., 2016. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. European Journal of Integrative Medicine 8 (4), 505–512.
- Benovit, S.C., Silva, L.L., Salbego, J., Loro, V.L., Mallmann, C.A., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., 2015. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. An. Acad. Bras. Cienc. 87 (3), 1675–1689.
- Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., 2008. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. Food Chem. Toxicol. 46 (2), 724–732.
- Bessa, C.M.A., Do Nascimento, R.S., Alves, R.C.C., Anselmo, J.E.M., Da Silva, A.P.S.A., Da Silva, A.G., 2016. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against

- multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Med. Plants Res. 10 (23), 310–317.
- Boniface, P.K., Ferreira, S.B., Kaiser, C.R., 2017. Current state of knowledge on the 365 traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. J. Ethnopharmacol. 206, 193–223.
- Borah, A., Paw, M., Gogoi, R., Loring, R., Sarma, N., Munda, S., Lal, M., 2019. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial and in-vitro cytotoxic efficacy of essential oil of *Curcuma caesia* Roxb. leaves: an endangered medicinal plant of North East India. Ind. Crops Prod. 129, 448–454.
- Bouzaz, M., Sayadi, S., 2015. Chemical composition, biological activities and DNA damage protective effect of *Pelargonium graveolens* L'Her. essential oils at different phenological stages. Ind. Crops Prod. 74, 600–606.
- Cardia, G.F.E., Silva-Filho, S.E., Silva, E.L., Uchida, N.S., Cavalcante, H.A.O., Cassarotti, L.L., Cuman, R.K.N., 2018. Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on acute inflammatory response. Evid. Based Complement Altern. Med. 1–10 2018.
- Chen, J., Wang, R., Wang, T., Ding, Q., Khalil, A., Xu, S., Xu, J., 2017. Antioxidant properties of novel dimers derived from natural β -elemene through inhibiting H2O2-induced apoptosis. ACS Med. Chem. Lett. 8 (4), 443–448.
- Chinedu, E., Arome, D., Ameh, F.S., 2013. A new method for determining acute toxicity in animal models. Toxicol. Int. 20, 224–226.
- CLSI, 2017. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. In: CLSI Supplement M60, 1 th. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI, 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: CLSI Supplement M100, 28 th. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Coelho-de-Souza, N.A., Dos-Santos, C.F., Lopes-Filho, L.N., Holanda, F.R., Oliveira, A.C., Gomes-Vasconcelos, Y.A., Oliveira, K.A., Ferreira-da-Silva, F.W., Silva-Alves, K.S., Leal-Cardoso, J.H., 2018. Essential oil of *Parodon polygalaeifolius* Benth attenuates nociception in mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 51 (11), e7356.
- Costa Silva, L., Fidelis P., G., Telles B., C., Santos D., N., Camara B., R., Cordeiro L., S., Costa S., M., Lima A., J., Silveira F., R., Oliveira M., R., Albuquerque R., I., Andrade P., G., Rocha A., H., 2011. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Heterofucans from the Seaweed *Sargassum filipendula*. Marine Drugs 9, 952–966. <https://doi.org/10.3390/md9060952>.
- Costa, E.V., Pinheiro, M.L.B., Silva, J.R.A., Maia, B.H.L.N.S., Duarte, M.C.T., Amaral, A.C.F., Leon, L.L., 2009. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). Quim. Nova 32 (1), 78–81.
- De Veras, B.O., Dos Santos, Y.Q., Oliveira, F.G.D.S., Almeida, J.R.G.D.S., Da Silva, A.G., Correia, M.T.D.S., Diniz, K.M., De Oliveira, J.R.S., Lima, V.L.M., Navarro, D.M.D.A.F., De Aguiar, J.C.R.O.F., De Oliveira, M.B.M., Lopes, A.C.S., Da Silva, M.V., 2019. *Albizia Minor* Sobral, Faria & Proença (Myrtaceae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil. Nat. Prod. Res. 23, 1–5.
- Del-Vechio-Vieira, G., Sousa, O.V., Miranda, M.A., Senna-Valle, L., Kaplan, M.A.C., 2009. Analgesic and anti-inflammatory properties of essential oil from *Ageratum fastigiatum*. Braz. Arch. Biol. Technol. 52 (5) 1115–112.
- Donald, G.R., Fernandes, P.D., Boylan, F., 2016. Antinociceptive activity of *Zanthoxylum piperitum* DC. Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (9), 1–8 2016.
- Erdogan, A., Ozkan, A., 2013. A comparative study of cytotoxic, membrane and DNA damaging effects of *Origanum majorana* essential oil and its oxygenated monoterpene component linalool on parental and epirubicin-resistant H1299 cells. Biologia 68 (4), 754–776.
- Fernandes, T.T., Santos, A.T.F., Pimenta, F.C., 2005. Antimicrobial activity of *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* and *Guazuma ulmifolia* plants. Rev. Patolog. Trop. 34, 113–122.
- Ghosh, T., Biswas, M.K., Chatterjee, S., Roy, P., 2018. In-vitro study on the hemolytic activity of different extracts of Indian medicinal plant *Croton bonplandianum* with phytochemical estimation: a new era in drug development. J. Drug Deliv. Ther. 8 (4), 155–160.
- Gomes, M.V.S., Silva, J.D., Ribeiro, A.F., Cabral, L.M., Sousa, V.P., 2019. Development and validation of a quantification method for α -humulene and trans-caryophyllene in *Cordia verbenacea* by high performance liquid chromatography. Revista Brasileira de Farmacognosia 29, 182–190.
- Hammami, S., Jmil, H., Mokni, R., Khmiri, A., Faidi, K., Dhaouadi, H., El Aouni, M., Aouni, M., Joshi, K., 2015. Essential oil composition, antioxidant, cytotoxic and antiviral activities of *Teucrium chamaepitys* growing spontaneously in Tunisia. Molecules 20, 20426–20443.
- Hu, Q.P., Cao, X.M., Hao, D.L., Zhang, L.L., 2017. Chemical composition, antioxidant, DNA damage protective, cytotoxic and antibacterial activities of *Cyperus rotundus* rhizomes essential oil against foodborne pathogens. Sci. Rep. 7 (1), 1–9.
- Hunskar, S., Fasmer, O.B., Hole, K., 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. J. Neurosci. Methods 14, 69–76.
- Ibrahim, M.S., Mohamed, E.H., Tan, W.N., Siong, J.Y.F., Andriani, Y., Tengku-Muhammad, T.S., 2016. Cyclooxygenase, 5-lipoxygenase and acetylcholinesterase inhibitory effects of fractions containing, α -guaiene and oil isolated from the root of *Xylocarpus moluccensis*. J. Med. Plants Res. 10, 286–294.
- Kose, E.O., Aktas, O., Deniz, I.G., Sarikurucu, C., 2010. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of endemic *Perula lycia* Boiss. J. Med. Plants Res. 4, 1698–1703.
- Ksouda, G., Sellimi, S., Merlier, F., Falcimaigne-cordin, A., Thomasset, B., Nasri, M., Hajji, M., 2019. Composition, antibacterial and antioxidant activities of *Pimpinella saxifraga* essential oil and application to cheese preservation as coating additive. Food Chem. 288 (1), 47–56.
- Lacerda, L.P., Malaquias, G., Peron, A.P., 2014. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. An. Acad. Bras. Cienc. 86 (3), 1147–1150.
- Lee, J.C., Kim, H.R., Kim, J., Jang, Y.S., 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. J. Agric. Food Chem. 50, 6490–6496.
- Lu, C., Li, H., Li, C., Chen, B., Shen, Y., 2018. Chemical composition and radical scavenging activity of *Amygdalus pedunculata* Pail leaves' essential oil. Food Chem. Toxicol. 119, 368–374.
- Mendes, S.A.C., Mansoor, T.A., Rodrigues, A., Armas, J.B., Ferreira, M.J.U., 2013. Anti-inflammatory guaiene-type sesquiterpenes from the fruits of *Pittosporum undulatum*. Phytochemistry 95, 308–314.
- Oliveira, F.G.S., Lima-Saraiva, S.R.G., Oliveira, A.P., Rabêlo, S.V., Rolim, L.A., Almeida, J.R.G.S., 2016. Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* Hayne. Pharmacogn. Res. 8 (4), 270–275.
- Ornano, L., Venditti, A., Ballero, M., Sanna, C., Quassinti, L., Bramucci, M., Bianco, A., 2013. Chemopreventive and antioxidant activity of the chamazulene-rich essential oil obtained from *Artemisia arborescens* L. Growing on the isle of La Maddalena, sardinia, Italy. Chem. Biodivers. 10 (8), 1464–1474.
- Perini, J.A., Angeli-Gamba, T., Alessandra-Perini, J., Ferreira, L.C., Nasciutti, L.E., Machado, D.E., 2015. Topical application of Acheilan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. BMC Complement Altern. Med. 15 (1), 203.
- Pinto, R.B., Mansano, D.F., Torke, B.M., Tozzi, A.M.G., 2017. On the “cangaço” route: a new species of *Hymenaea* (leguminosae) from the Brazilian Caatinga. Kew Bull. 72 (3), 1–42.
- Queiroz, J.C.C., Antoniolli, A.R., Quintans-Júnior, L.J., 2014. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the essential oil from leaves of *Xylopia laevis* in experimental models. Sci. World J. 1–11 2014.
- Radulović, N.S., Randjelović, P.J., Stojanović, N.M., Cakić, N.D., Bogdanović, G.A., Živanović, A.V., 2015. Aboriginal bush foods: a major phloroglucinol from Crimson Bottlebrush flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. Food Res. Int. 77, 280–289.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. Free Radic. Biol. Med. 26, 1231–1237.
- Rodrigues, F.G., Almeida, S.X., Campos, A., Oliveira, L.S., Saraiva, M., Costa, J.G., 2012. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. Pharmacogn. Res. 4 (3), 161–165.
- Rodrigues, I.A., Ramos, A.S., Falcão, D.Q., Ferreira, J.L.P., Baso, S.L., Silva, J.R.A., Amaral, A.C.F., 2018. Development of nanoemulsions to enhance the antileishmanial activity of *Copaifera paupera* oleoresins. BioMed Res. Int. 1–9 2018.
- Rodrigues, K.A.F., Amorim, L.V., Dias, C.N., Moraes, D.F.C., Carneiro, S.M.P., Carvalho, F.A.A., 2015a. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. J. Ethnopharmacol. 160, 32–40.
- Rodrigues, K.A.F., Amorim, L.V., Dias, C.N., Moraes, D.F.C., Carneiro, S.M.P., Carvalho, F.A.A., 2015b. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. J. Ethnopharmacol. 160 (1), 32–40.
- Rogério, A.P., Andrade, E.L., Leite, D.F.P., Figueiredo, C.P., Calixto, J.B., 2009. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. Br. J. Pharmacol. 158 (4), 1074–1087.
- Salen, N., Kefi, S., Tabben, O., Ayed, A., Jallouli, S., Feres, N., Elkahoui, S., 2018. Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. Ind. Crops Prod. 124 (1), 15–125.
- Setzer, W.N., Schmidt, J.M., Noleto, J.A., Vogler, B., 2006. Leaf oil compositions and bioactivities of abaco bush medicines. Pharmacologyonline 3, 794–802.
- Steniaswska, E., Sawicki, R., Golus, J., Swatko-Ossor, M., Ginalska, G., Skaliczka-Wozniak, K., 2018. *Nigella damascena* L. Essential oil—a valuable source of β -elemene for antimicrobial testing. Molecules 23 (2), 1–11.
- Silva, E.A.J., Estevam, E.B.B., Silva, T.S., Nicolella, H.D., Furtado, R.A., Alves, C.C.F., Miranda, M.L.D., 2018. Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). Braz. J. Biol. 79 (4), 1–6.
- Singh, T.P., Singh, R.K., Malik, P., 2014. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Annona squamosa* Linn bark. Journal of Scientific and Innovative Research 3, 60–64.
- Singulani, J.L., Pedrosa, R.S., Ribeiro, A.B., Nicolella, H.D., Freitas, K.S., Damasceno, J.L., Pires, R.H., 2018. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. Future Microbiol. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0200>.
- Sobrinho, A.C.N., et al., 2016. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). Ind. Crops Prod. 84, 108–115.
- Sultan, M.T., Butt, M.S., Karim, R., Zia-Ul-Haq, M., Batool, R., Ahmad, S., Aliberti, L., De Feo, V., 2014. *Nigella sativa* fixed and essential oil supplementation modulates hyperglycemia and allied complications in streptozotocin-induced diabetes mellitus. Evid. Based Complement Altern. Med. (1), 1–8 2014.
- Thiruganasampandan, R., David, D., 2014. In vitro antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of *Feronia elephantum* Correa. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 4 (4), 290–293.
- Tjolsen, A., Berge, O., Hunskar, S., Rosland, J.K., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. Pain 51, 5–17.
- Turkez, H., Celik, K., Togar, B., 2014. Effects of α -copene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells in vitro. Cytochrome 66 (4), 597–603.
- Utsumi, T., Ueda, T., Fukasawa, S., Komaru, A., Szuka, T., Kawamura, K., Ichikawa, T., 2011. Prognostic models for renal cell carcinoma recurrence: external validation in a Japanese population. Int. J. Urol. 18 (9), 667–671.
- Veggi, P.C., Prado, J.M., Bataglion, G.A., Eberlin, M.N., Meireles, M.A.A., 2014. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid

- extraction. *J. Supercrit. Fluids* 89, 68–77.
- Verma, R.S., Padalia, R.C., Goswami, P., Verma, S.K., Chauhan, A., Darokar, M.P., 2014. Chemical composition and antibacterial activity of foliage and resin essential oils of *Araucaria cunninghamii*, Alton ex D. Don and *Araucaria heterophylla*, (Salisb.) Franco from India. *Ind. Crops Prod.* 61, 410–416.
- Wei, A., Shibamoto, T., 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55 (5), 1737–1742.
- Yang, X.C., Niu, Y.L., Zhao, N.N., Mao, C., Xu, F.J., 2014. A biodegradable pullulan-based vector via ATRP for liver cell-targeting gene delivery. *Biomaterials* 35, 3873–3884.

Qualis A1 Fator de Impacto: 5.19

Journal of Ethnopharmacology 265 (2021) 113248



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe

Bruno Oliveira de Veras^{a,b,*}, João Ricardis Saturnino de Oliveira^b, Vera Lúcia de Menezes Lima^b, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^c, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^c, Geovanna Maria de Medeiros Moura^d, José Wellington da Silva^b, Caio Rodrigo Dias de Assis^b, Krystyna Gorlach-Lira^e, Priscilla Anne Castro de Assis^f, Jorge Irapuan de Souza Barbosa^g, Maria Rita Cabral Sales de Melo^g, Maria Betânia Melo de Oliveira^b, Márcia Vanusa da Silva^b, Ana Catarina de Souza Lopes^a

^a Post-graduation in Tropical Medicine, Laboratory of Microbiology, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Department of Chemistry, Center for Exact and Nature Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Department of Biochemistry, Laboratory Chemistry and Function of Bioactive Proteins, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

^e Department of Molecular and Cellular Biology, Laboratory of Biology Molecular of Microorganisms, Federal University of Paraíba, 58059-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^f Department of Physiology and Pathology, Laboratory of Immunology and Cell Biology, Federal University of Paraíba, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^g Department of Biology, Herbarium Professor Vasconcelos Sobrinho, Rural Federal University of Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Medicinal plant
Safety of use
Antimicrobial
Inflammation
Fever

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake is a medicinal plant from South America, popularly known as "asa de peixe", "asa de peixe branco", "cambarã branco" or "cambarã guaçu", being used by traditional communities for its healing powers in the form of teas, infusions, liqueurs and extracts, for the treatment of bacterial and fungal infections of the urinary and respiratory tracts, such as kidney problems, bronchitis, inflammation and fever. However, none of the ethnopharmacological properties has been scientifically evaluated.

Aim of the study: Based on the ethnopharmacological use of the species, this study investigated the chemical composition, and for the first time acute toxicity, hemolytic, antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities of the essential oil from leaves of *V. macrophylla*.

Material and methods: The essential oil was obtained from the leaves by hydrodistillation (HD), being characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography coupled to flame ionization detection (GC-FID). The antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution technique in bacteria and fungi that cause infections of the respiratory and urinary tract, and toxicological safety regarding hemolytic activity on human red blood cells (hRBCs), and acute toxicity in mice. The anti-inflammatory activity was evaluated by the model carrageenan-induced peritonitis with quantification of the levels of TNF- α and IL-1 β in the intraperitoneal fluid, and ear edema induced by croton oil. The antipyretic activity evaluated in mice with pyrexia induced by yeast.

Results: The extraction of essential oil by hydrodistillation (HD) showed a yield of $0.33 \pm 0.04\%$, with its composition constituted mainly by sesquiterpenes of hydrocarbons (94.00%). The essential oil demonstrated antibacterial and antifungal activity, with a low rate of hemolysis in human red blood cells (hRBCs) and no clinical signs of toxicity were observed in animals after acute treatment, which suggested that the LD₅₀ is greater

* Corresponding author. Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.
E-mail addresses: bruno.veras@ufpe.br, brunooveras@hotmail.com (B.O. de Veras).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248>

Received 25 May 2020; Received in revised form 28 July 2020; Accepted 1 August 2020

Available online 14 August 2020

0378-8741/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

than 5000 mg/kg; p.o. The essential oil demonstrated anti-inflammatory activity reducing levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α (38.83%, 72.42% and 73.52%) and IL-1 β (37.70%, 75.92% and 87.71%), and ear edema by 49.53%, 85.04% and 94.39% at concentrations of 4, 40 and 400 mg/kg, respectively. The antipyretic activity presented by the essential oil is statistically similar to dipyrone.

Conclusion: The set of results obtained, validates the main activities attributed to the traditional use of *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake. These data add industrial value to the species, considering that the antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities present results similar to the drugs already used also presenting safety. The results suggest that essential oil from *V. macrophylla* may be used by industry for the development of drugs with natural antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic effect.

Abbreviations:

GC-MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
GC-FID	Gas Chromatography/Flame Ionization Detector
ANOVA	Analysis of variance
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
MIC	Minimum inhibitory concentration
MBC	Minimum bactericidal concentration
MFC	Minimum fungicidal concentration
IL-1 β	Interleukin 1 β
TNF- α	Tumor necrosis alpha
LD ₅₀	Median lethal dose
p.o.	Oral administration
HD	Hydrodistillation
hRBCs	Human red blood cells
MOPS	3-(N-Morpholino) propane sulfonic acid

1. Introduction

According to the United Nations Conference on Trade and Development, more than 30% of medicines produced and marketed in the world come from plants considered medicinal, being used for the treatment of various diseases, such as inflammation, spasms, pain, diabetes, cancer, neurological diseases, parasitic diseases, infections, among others (Anand et al., 2019; Vyas et al., 2019; Sá et al., 2014).

Medicinal plants have proved to be a rich source for the discovery of molecules that can be therapeutically exploited. However, studies are needed to validate their therapeutic properties and their toxicological safety, in order to ensure their safe use by those who use them for therapeutic purposes, as well as to provide information necessary for the development of new medicines (De Veras et al., 2020; Da Silva et al., 2020; Branquinho et al., 2017). Based on this premise, several species used in traditional medicine have been evaluated and validated for their potential in the treatment of bacterial and fungal infections, action against inflammation (multifactorial disease that culminates in the establishment of cardiovascular diseases, arthritis and neurodegenerative diseases and reduced mobility of people) and pyrexia (fever caused by bacterial, fungal and/or viral infections, in addition to auto immune system responses) (Brandenburg et al., 2020; Postu et al., 2019; Sá et al., 2014).

The genus *Verbesina* (Asteracea family) and the tribe Heliantheae (subtribe Verbesininae) presents around 300 species distributed throughout the Americas, with most occurring in Mexico, Brazil and the Andes, with economic importance due to their chemical properties (Bezeira et al., 2018; Panero and Crozier, 2016). Species of this genus have been used by communities in the preparation of drinks, teas, infusions and extracts as popular medicines for the treatment of diabetes, hypertension, infections and inflammation (Mora et al., 2013), with some activities already validated, such as antibacterial and anti-inflammatory activities of *V. turbacensis* (Gualteri et al., 2005; Lobitz et al., 1998), antiparasitic and antitumor activities of *V.*

encelioides (Ezzat et al., 2016; Al-Oqail et al., 2016), antibacterial activity of *V. negrensis* (Mora et al., 2015) and anti-hypertensive activity of *V. caracasana* (Botta et al., 2003).

Among the species of *Verbesina* spp. that presents medicinal use there is *V. macrophylla* (Cass.) S.F.Blake (synonym *Ditrichum macrophyllum*), popularly known as "asa de peixe", "asa de peixe branco", "cambará branco" or "cambará guaçu" with wide distribution in South America. This species is known by traditional communities for its healing powers in the form of teas, infusions and liquors, for the treatment of bacterial and fungal infections of the urinary and respiratory tract, bronchitis, kidney problems, inflammations and fever. However, none of these properties has been scientifically evaluated (Bezeira et al., 2018; Almeida et al., 2014; De Albuquerque et al., 2007; Moreira et al., 2002).

In this context, the objective of the present study was to evaluate the chemical composition and report for the first time the toxicity, antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities of the essential oil of *V. macrophylla*.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The plant material (leaves) of *V. macrophylla* was collected in the Montana Rainforest, located in the Mesoregion of Agreste Pernambuco in the municipality of Camocim de São Félix (geographic coordinates of 08° 21' 31" S and 35° 45' 43" W). An excise from the plant material was deposited at the Herbario Professor Vasconcelos Sobrinho (PEUFR), of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), under number 55.081.

2.2. Essential oil extraction

The essential oil of leaves of *V. macrophylla* was obtained by hydrodistillation (HD) in Clevenger apparatus for 3 h. The entire process was carried out in triplicate, using 500 g of leaves *V. macrophylla* in each extraction. After extraction, anhydrous sodium sulfate was used to dry the essential oil, which was then stored at 4 °C in amber flasks protected from light for further analysis.

2.3. Analysis of chemical composition of essential oil

The essential oil was characterized by a combination of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) according to De Veras et al., (2020). For qualitative analysis of the composition of the essential oil it was used a Gas Chromatograph 5975C series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with triple quadrupole detection system equipped with DB-5MS column Agilent Technologies (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) was used. An aliquot of 1 μ L was injected in split 1:50 of the essential oil. The identification of compounds was performed comparing their mass spectra using MassFinder software 4, NIST08 and Wiley Registry™ 9th Edition, integrated into the software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) and Retention Index to those of authentic standards available in the Adams (2017). For quantitative analysis of essential oil, gas chromatography was used with flame ionization detector (GC-FID), under the same

GC-MS running conditions, in triplicate for calculation of standard deviation of peak area percentage for each compound in the chromatogram.

2.4. Hemolytic assay

The hemolytic activity of the essential oil was measured by the determination of human red blood cells (hRBCs) provided by the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), using the methodology adapted from Ghosh et al. (2018). The fresh blood O- was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at 4°C to remove the plasma and the sediment containing the red blood cells (RBCs) was washed consecutively with PBS and then resuspended in PBS to obtain red blood cell suspension at 8% (v/v). Then 100 μL of this suspension was added in microtubules containing 100 μL containing dilutions of the essential oil, the mixtures being homogenized and incubated for 2, 4 and 8 h at 37°C . After incubation, the samples were centrifuged for 2 min at $1000 \times g$, with subsequent transfer of 200 μL of the mixtures to 96-well plates and measurement of absorbance at 540 nm. Triton X-100 and PBS were used as positive (PC) and negative (NC) controls, respectively. All experiments were carried out in triplicate.

2.5. Antimicrobial activity

2.5.1. Microbial strains

The essential oil was tested against seven microbial strains that cause respiratory and urinary tract infections. Strains of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) were obtained from American Type Culture Collection. Strains of clinical fungal isolates of *Candida albicans* URM-6366, *C. albicans* URM-6542 and *C. albicans* URM-5788 were ceded by the Department of Mycology of the Federal University of Pernambuco (UFPE).

2.5.2. Antibacterial and antifungal assay

The antibacterial activity was performed by microdilution in broth according to CLSI protocol M100 (CLSI, 2017) for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Initially, the dilution of the essential oil was obtained according to De Veras et al. (2020). Two-fold serial dilutions of each solution containing the essential oil (0.5–1024 $\mu\text{g/mL}$) were prepared in Mueller-Hinton broth and 10 μL of bacterial suspension (1×10^5 CFU/mL) was added. Samples were incubated at 37°C for 24 h. A resazurin solution (0.01% w/v) was used as an indicator of growth, being taken as the lowest concentration, in which there was no color change. Subsequently, 10 μL of the cultures were seeded on plates containing Muller Hinton Agar and incubated for 24 h at 37°C to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). As a positive control, it was used standard drug Amikacin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Each trial in this experiment was performed in triplicate.

Antifungal activity was performed according to CLSI protocol M27 (CLSI, 2008). Initially, the dilution of the essential oil was obtained according to Da Silva et al. (2020). Serial dilutions of solutions containing essential oil were performed in 96-well plates in RPM-1640 medium (buffered with MOPS) by adding 10 μL of the yeast suspension (1×10^6 CFU/mL). The samples were incubated at 30°C for 48 h. The MIC was determined by inhibiting 50% growth compared to the control well (medium and inoculum only). Subsequently, 10 μL of each well were seeded on plates containing Sabouraud Dextrose Agar medium and incubated for 48 h at 30°C to determine the minimum fungicidal concentration (MFC). As a positive control, it was used standard drug Fluconazole (Sigma Aldrich). Each trial in this experiment was performed in triplicate.

2.6. Acute toxicity, anti-inflammatory and antipyretic activities

2.6.1. Animals

The experiments were carried out using 108 mice Swiss albino (*Mus musculus*), male and female (10–12 weeks old, 25–20 g), kept in cages with a solid polypropylene bottom (size: 18 cm $\times$ 34 cm $\times$ 41 cm) with softwood shavings bed. They were kept under environmental conditions of temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), relative humidity (60–70%), 12 h light/dark cycle, with access to food and water *ad libitum*. The animals were randomly divided according to the evaluations to perform. All ethical procedures were carried out in accordance with the recommendations of the Council of International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) and Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Brasil (CONCEA), being previously approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of Federal University of Pernambuco, under n° 24/2020 CEUA/UFPE.

2.6.2. Acute toxicity and median lethal dose (LD₅₀)

The oral acute toxicity of essential oil was assessed according to the Test Guideline 425 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2008). First, mice female was divided into six groups (n = 3), and pre-treated orally (p.o.) by gavage with 100 μL of the essential oil diluted in saline (0.9% w/v) in the following doses: 10; 100; 1000; 1600; 2900 and 5000 mg/kg. The animals were observed for 24 h after oral treatment and daily for 14 days. Their weight and ingested food were recorded daily, as well as possible signs of alteration, such as tremors, convulsions, salivation, piloerection, hyperactivity, bleeding and symptoms of toxicity. The mortality was also assessed for 14 days and the LD₅₀ was calculated according to Ahmed and Azmat (2014).

2.6.3. Anti-inflammatory activities

2.6.3.1. Carrageenan-induced peritonitis. In this model, it was used an experimental protocol similar to that described by Zadeh-Ardabili and Rad (2019). The mice (male) was randomly distributed in five groups (n = 6), being deprived of food for 12 h. The orally treated (p.o.) by gavage with 100 μL with the following doses of essential oil diluted in saline (4, 40 and 400 mg/kg), control (saline 0.9% w/v) and dexamethasone in saline (20 mg/kg) were administered 1 h prior to the induction of peritonitis. After this period, 2% carrageenan (w/v) (750 $\mu\text{g/well}$) was injected into the intraperitoneal cavity (i.p.). Three hours after carrageenan-induced peritonitis, the animals were killed by cervical dislocation and peritoneal fluid was collected under aseptic conditions. The contents were centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at 4°C , the supernatant was stored at -70°C until further analysis. Peritoneal fluid aliquots of 100 μL were used to measure TNF- α and IL-1 β using mouse cytokines ELISA Kit, High Sensitivity in ELISA, Thermo Fisher (Waltham, EUA) according to manufactures instruction.

2.6.3.2. Ear edema induced by croton oil. To assess topical anti-inflammatory activity, Swiss albino (male) was randomly distributed in five groups (n = 6). Briefly, the mice had their right ears pre-treated topically (v.t.) with control (saline 0.9% w/v), dexamethasone (4 mg/mL) or essential oil (4, 40 and 400 mg/mL) in a volume of 20 μL (10 μL on each side of the ear). One hour after the treatments, the edema was induced by topical application of 20 μL of croton oil (Sigma-Aldrich) (5% v/v, diluted in acetone) in the right ear, and 20 μL of the vehicle (acetone) in the left ear, under the same conditions as the treatments. Ear edema was evaluated at 2, 4 and 6 h intervals after the application of croton oil, with the aid of a digital micrometer (Digimess), and the activity measured according to the methodology adapted of Martins et al. (2017).

2.6.4. Antipyretic activity

The antipyretic activity of the essential oil was carried out by the

yeast-induced pyrexia method according to the adapted methodology of Siddiqui et al. (2018). The mice (male) were used, randomly distributed into five groups (n = 6). Initially, the mice had their initial rectal temperature measured with the aid of a digital clinical thermometer, before the administration of beer yeast suspension subcutaneously 20 mL/kg (20% w/v). After 18 h, from the yeast administration, the rectal temperature was measured again and the animals that had an average basal rectal temperature between 37.2 and 39.5 °C were selected for the tests. The groups were pre-treated orally (p.o.) by gavage with 100 µL with the following doses of control (saline 0.9% w/v), essential oil diluted in saline (4, 40 and 400 mg/kg), or dipyrone in saline (100 mg/kg). The rectal temperatures were measured at intervals of 1, 2, 3 and 4 h after the administration of the samples, using a lubricated digital thermometer.

2.7. Statistical analysis

GraphPad Prism® Version 7.0 was used for data analyses. Data are presented as mean ± standard deviation (mean ± SD). All assays were performed in triplicate. Statistically significant differences were calculated by the application of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test after meeting the premises of normality and variance homogeneity. Values were considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of chemical composition of essential oil

The essential oil of the leaves of *V. macrophylla* extracted by hydrodistillation (HD) obtained a yield of $0.33 \pm 0.04\%$ (w/w), with the presence of 31 components representing 94% of its total composition (Table 1), this being mainly composed by sesquiterpenes (93.57%) with the major components being germacrene D ($25.5 \pm 0.18\%$), germacrene D-4-ol ($18.84 \pm 0.12\%$), bicyclogermacrene ($11.33 \pm 0.28\%$), (E)-caryophyllene ($9.88 \pm 0.04\%$) and δ -cadinene ($4.27 \pm 0.09\%$).

The essential oil of *V. macrophylla* was obtained for the first time by hydrodistillation (HD) by Bezerra et al. (2018). They identified germacrene D (37.3%), germacrene D-4-ol (17%), (E)-caryophyllene (5.9%), δ -cadinene (5.7%) and bicyclogermacrene (5.3%) as major components, the same components obtained in this study, however, in different levels. This fluctuation in the content of the components may be linked to environmental factors such as irradiation, soil and atmospheric precipitation to which the specimens may be subjected to, regardless of genetic load. However, these modifications should be evaluated by studies that verify the influence of environmental conditions, climatic variables, ecological conditions, seasonality, altitude, geographical distribution, water availability and genetic factors on the production of these compounds in this species (Marques et al., 2019; Fanouriou et al., 2018).

Although the hydrodistillation (HD) technique is the most used to obtain essential oils due to its simplicity and low cost (Ogunwande et al., 2018), it has been observed that the use of this methodology influences the chemical composition and oil yield, considering that some molecules may be decomposed at high temperatures (Damyeh et al., 2015). Although it was possible to obtain the essential oil of *V. macrophylla* by the technique of hydrodistillation (HD), different extraction techniques should be investigated aiming at a better oil yield, as well as checking possible changes in the chemical composition that may alter or influence on possible biological activities and applications of the obtained oil (Tunç and Koca, 2019).

Among the compounds found in the essential oil of *V. macrophylla*, which have several biological activities are the sesquiterpenes bicyclogermacrene and germacrene-D. These sesquiterpenes have been found in the oils of several species of *Verbesina* spp., such as *V. turbacensis* (Gualteri et al., 2005), *V. diversifolia* (Albuquerque et al., 2006) and *V.*

Table 1

Chemical composition of the essential oil of the leaves from *Verbesina macrophylla*, highlighting in bold the major components.

Peak	Compound	RI Cal	RI Lit	(%)	S.D.
1	α -Pinene	932	931	0.03	0.06
2	Camphene	945	945	0.01	0.17
3	β -Pinene	974	974	0.02	0.12
4	Myrcene	988	991	0.01	0.06
5	β -Phellandrene	1025	1028	0.02	0.58
6	(E)- β -Ocimene	1044	1049	0.12	0.13
7	Isobornyl formate	1235	1229	0.03	0.07
8	α -Cubebene	1348	1352	0.17	0.12
9	α -Copaene	1374	1379	2.33	0.10
10	β -Bourbonene	1387	1387	0.31	0.14
11	β -Elemene	1389	1394	2.94	0.04
12	α -Gurjunene	1409	1413	0.47	0.02
13	(E)-Caryophyllene	1417	1424	9.88	0.04
14	β -Copaene	1430	1432	0.57	0.06
15	cis-Muurolo-3,5-diene	1448	1448	0.10	0.02
16	α -Humulene	1452	1457	2.56	0.01
17	allo-Aromadendrene	1458	1464	0.63	0.03
18	Germacrene D	1480	1489	25.50	0.18
19	Bicyclogermacrene	1500	1503	11.33	0.28
20	Germacrene A	1508	1511	0.85	0.12
21	γ -Cadinene	1513	1519	1.46	0.04
22	δ-Cadinene	1522	1528	4.27	0.09
23	Trans-Cadina-1,4-diene	1533	1535	0.25	0.07
24	α -Cadinene	1537	1542	0.27	0.01
25	Germacrene B	1559	1561	0.67	0.04
26	Caryolan-8-ol	1571	1571	0.45	0.09
27	Germacrene D-4-ol	1574	1583	18.84	0.12
28	Ledol	1602	1608	0.37	0.02
29	epi- α -Muurolo	1640	1647	2.94	0.08
30	α -Cadinol	1652	1660	3.70	0.05
31	Shyobunol	1688	1696	2.90	0.02
Hydrocarbon monoterpenes (MH)				0.21	
Oxygenated monoterpenes (MO)				0.03	
Hydrocarbon sesquiterpenes (SH)				64.56	
Oxygenated sesquiterpenes (SO)				29.20	
TOTAL				94.00	

RICal- Experimental retention indexes relative and RILit- Literature retention indexes; S.D. Standard Deviation; (%)- Percentage content.

negrensis (Mora et al., 2015), pointing to a possible phytochemical signature of the genus, however, studies are needed to correlate the production of these compounds between species of the genus, regardless of their environmental condition. This hypothesis must be proven by the cultivation of *Verbesina* species under different environmental conditions (Danielli et al., 2019; Elshafie et al., 2019; Tadić et al., 2017).

Considered as one of the most common terpenes in plants and a precursor to several others, such as cadinenes, selenenes, muurolenes and bicyclogermacrenes, the germacrene has a significant share in the global market for flavors and fragrances that was valued at US\$ 20.75 billion in 2018 and presents annual growth rates of 4.7% (Grand View Research, 2019; Noge and Becerra, 2009; Bülow and König, 2000).

The potential for industrial application of essential oils that present germacrene D as a major constituent is related to the various biological activities that they may present, such as the essential oil of *Kundmannia sicula*, which contains 81.2% of germacrene D which showed potential for application against cancer as it exerts cytotoxic effect on various tumor cell types (Casiglia et al., 2017). The essential oil of *Achillea millefolium* has 12% germacrene D and has antioxidant and antimicrobial potential in the control of food spoilage microorganisms (El-Kalamouni et al., 2017). The essential oils of *Solidago canadensis* and *Artemisia annua* have antimicrobial activity against bacteria and fungi in the respiratory and urinary tract, containing values of 34.9 and 18.9% of this terpene, respectively (Elshafie et al., 2019; Bilal et al., 2014). In addition, the essential oil of *Santolina africana* (Asteraceae) presents germacrene D as the major compounds and has anti-inflammatory and antimicrobial activity (Malti et al., 2019).

Derived from germacrene dehydrogenation, bicyclogermacrene is

the sesquiterpene predominant in essential oil from the leaves of *Sideritis romana* (23.8%) and is reported to show antimicrobial activity (Tadić et al., 2017). Essential oils containing bicyclogermacrene at rates slightly higher than those found in the essential oil of *V. macrophylla* have been described as potent anti-inflammatories, as the essential oil of *Croton argyrophyllus*, which contains 14.6% of this compound in its composition (Ramos et al., 2013). The δ -cadinene which have various applications, such as combating tumour cells, inflammation and parasites (Hui et al., 2015). Essential oils that present δ -cadinene as major components have anti-inflammatory activity (Lorençoni et al., 2020), antitumor and antiparasitic activities such as the essential oil of *Cedrelopsis grevei* (Afoulous et al., 2013) as well as antipyretic activity, such as the essential oil of *Mikania cordata* (Siddiqui et al., 2018).

As the main compounds of the essential oil of *Nectandra megapotamica* bicyclogermacrene (22.0–36.7%) and germacrene D (10.9–19.2%) were reported as antichemotatic, antioxidant and antifungal activities (Danielli et al., 2019). Germacrene D-4-ol is predominantly present in the essential oil of *Varronia curassavica* (42%) and presents antiprotazoal activity (De Castro Nizio et al., 2018). Among the molecules found in this work, the isolated (E)-caryophyllene molecule is the most explored due to its heterologous activities reported as anti-leishmanial (Do Carmo et al., 2012), antibacterial (Freires et al., 2015), anticancer and analgesic properties (Fidy et al., 2016). (E)-caryophyllene is found in approximately 6.47% of essential oil from *Lippia gracilis* leaves capable to have antinociceptive and anti-inflammatory effects (Mendes et al., 2010). Being more prevalent, the essential oil of *Cordia africana* has 32% of (E)-caryophyllene which had its cytotoxicity action reported against human breast cancer cell line (Ashmawy et al., 2020).

The compounds found in the essential oil of the leaves of *V. macrophylla* are related to biological activities, indicating that it has numerous applications against several diseases such as cancer, inflammation, fever, bacterial, fungal and parasitic infections, demonstrating the medicinal potential of this species, which may become the basis for the development of drugs for these purposes through the evaluation and confirmation of these properties.

3.2. Hemolytic assay

The essential oil of *V. macrophylla* showed a low rate of hemolysis at all concentrations evaluated in hRBCs after incubation with blood cells for 2, 4 and 8 h, with the highest rate of hemolysis ($2.14 \pm 0.10\%$) at a concentration of 5000 $\mu\text{g/mL}$ in the incubation time (8 h) (Table 2).

Hemolysis is known as the erythrocyte rupture process through the destabilization of the cell membrane promoting the release of hemoglobin impairing the functioning of vital organs such as the kidneys, liver and heart (Rezende et al., 2017). Lipophilic molecules like those present in essential oils can interact with the red cell membrane increasing its fluidity. This kind of interaction can disrupt the membrane

resulting in a disorderly influx of ions and water causing the lysis of erythrocyte (Silva et al., 2017). The importance of determining the hemolytic activity of essential oil of *V. macrophylla* is related to the pharmacological potential, because it informs how the studied component interacts with human biological entities at the cellular level (erythrocytes) acting as an indicator of cytotoxicity. The use of potential biological activities of such compounds cannot fail to take into account their toxicologic effects, which is a principle that has prevented the application of many drugs in therapeutics (Ghosh et al., 2018; Silva et al., 2017).

Chemical compounds or mixtures have their applications unfeasible due to their toxicity, such as the essential oil of *Eupatorium ballotifolium* which has anti-cancer and antifungal activities in low concentrations, however, in these low concentrations there is also a 12.5% hemolysis rate (Antonio et al., 2016). Rodrigues et al. (2013) found that the essential oil *Eugenia uniflora* has a potential application in the control of leishmaniasis (*Leishmania amazonensis*), however, it presents high rates of hemolysis reaching 50% of destruction of red blood cells in concentrations of 50 $\mu\text{L/mL}$. The essential oil of *Lippia microphylla* has anti-cancer activity in low concentrations, however, it promotes hemolysis rates that can reach 100% in low concentrations (Xavier et al., 2015).

All of these studies demonstrate the importance that toxicological safety must overcome potential biological or pharmacological applications, with hemolytic activity being a potential indicator of the impossibility of its application. In all tested concentrations of essential oil of *V. macrophylla*, hemolysis was less than 5%, a favoring safety indicator for its use as drugs (Ni et al., 2019).

3.3. Antimicrobial activity

The antimicrobial activities of essential oil of *V. macrophylla* are being represented in Table 3. In the antibacterial activity, the essential oil showed MICs varying from 8 to 512 $\mu\text{g/mL}$, under *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027 and *K. pneumoniae* ATCC 700603, and in the antifungal activity with MICs ranging from 2 to 16 $\mu\text{g/mL}$, under different strains of *C. albicans*.

Notably, it was observed in the antibacterial activity that the essential oil of *V. macrophylla* showed lower MIC values for gram-negative bacteria, being superior to the antibiotic used as standard (amikacin) in *K. pneumoniae*. Differences between MIC values of essential oils have been observed in different studies, such as that observed in the essential oil of *Ocimum gratissimum* that showed antibacterial activity against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, with MIC values of 6, ≥ 24 and 0.75 $\mu\text{g/mL}$, respectively and these differences occurred even in bacteria with the same structural classification, such as gram-negative *E. coli* and *P. aeruginosa*. Such variations are related to intrinsic factors of the microorganisms, as well as their interactions with the compounds present in the essential oil (Hyldgaard et al., 2012).

Table 2

Haemolytic activity of essential oil of *V. macrophylla* on human red blood cells (hRBCs) at different concentrations and times.

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Time (h)		
	2	4	8
Hemolysis (%)			
Negative control	–	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01
Positive control	–	100 ± 0.01	100 ± 0.01
Essential Oil of <i>V. macrophylla</i>	125	1.41 ± 0.08	1.48 ± 0.01
	250	1.43 ± 0.12	1.41 ± 0.04
	500	1.48 ± 0.05	1.51 ± 0.06
	1000	1.52 ± 0.06	1.55 ± 0.07
	2500	1.68 ± 0.09	1.76 ± 0.04
	5000	1.81 ± 0.11	2.14 ± 0.10

Values represent mean $\pm$ S.D. (n = 3).

Table 3

Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Verbesina macrophylla*.

Strains	Essential Oil of <i>V. macrophylla</i>		AMI		FLU	
	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC	MIC	MFC
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	512	1024	32	64	–	–
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	64	128	16	32	–	–
<i>E. coli</i> ATCC 8739	128	256	4	8	–	–
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	8	16	16	32	–	–
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6366	16	32	–	–	32	64
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 6542	4	8	–	–	8	16
<i>C. albicans</i> URM-UFPE 5788	2	4	–	–	8	16

AMI: Amikacin; FLU: Fluconazole; MIC: Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/mL}$); MBC: Minimum Bactericidal Concentration ($\mu\text{g/mL}$); MFC: Minimum Fungicidal Concentration ($\mu\text{g/mL}$).

Essential oils containing caryophyllene and germacrene D as the essential oil of the leaves of *Juniperus rigida* and *Hymenaea rubriflora* also have significant antibacterial activity against *K. pneumoniae* by damaging the cell wall and membrane morphology (Da Silva et al., 2020; Meng et al., 2016). Liolios et al. (2007) stated that β -caryophyllene alone did not show antibacterial activity for *K. pneumoniae*, unlike germacrene D isolated, which has already been reported with antibacterial potential for *K. pneumoniae* (Rather et al., 2012). As essential oils have several chemical constituents, it is possible that compounds such as β -caryophyllene and germacrene D act in synergism in antimicrobial activity, however, and should be evaluated together on strains such as *K. pneumoniae*, among others (Oladeji et al., 2020; Tariq et al., 2019; Chouhan et al., 2017).

The antifungal effect on *C. albicans* of essential oils containing germacrene D, bicyclogermacrene and caryophyllene (as in essential oil of *V. macrophylla*) has been reported, as the essential oils of *Santolina Africana* and *Artemisia annua* (Malti et al., 2019; Bilal et al., 2014). The essential oil of *Myrcianthes fragrans* had a MIC ranging from 62.5 to 250 μ g/mL (Armijos et al., 2018) whereas the essential oils of *Pinus eldarica* and *Zanthoxylum nyracanthum* showed activity with MIC of 125 and 128 μ g/mL, respectively (Ghaffari et al., 2019; Li et al., 2014). Variations in MICs values against *C. albicans* observed in essential oil of *V. macrophylla*, were also observed by Jafri and Ahmad (2019) which found that the essential oil of *Thymus vulgaris* has antifungal activity, with MICs ranging from 1.56 to 25 μ g/mL. This variation may be related to the sensitivity profile of the strains evaluated.

One of the main factors affecting the antimicrobial activity of essential oils is the cellular nature of microorganisms as in the case of Gram-positive bacteria, which are more resistant to essential oils and isolated compounds compared to Gram-negative bacteria, due to the fact that they present a thick peptidoglycan cell wall that makes it difficult for small molecules to penetrate and diffuse inside the cell, making it more resistant (Yu et al., 2020). In fact, the differences found in the MICs values of the essential oil of *V. macrophylla* in the different strains evaluated can be explained by the possible interactions that the compounds which compose the essential oil may have with the different microorganisms. It is known that the functional groups that make up essential oils can interact independently or synergistically between each other within microorganisms, and triggering antimicrobial activity with different intensities (Mahizan et al., 2019; Chouhan et al., 2017; Nazzaro et al., 2017).

Due to the antimicrobial activity in low concentrations, the essential oil of *V. macrophylla* may become a new strategic tool for microbial control and should be investigated in further studies on the mechanism of action of this activity (disruption of cell membranes, reduction of membrane potential via increased membrane permeability, reduction of intracellular ATP via decreased ATP synthesis and increased hydrolysis, inhibition of efflux pumps, suppression of bacterial biofilm development or inhibition of some virulence factors) (Mahizan et al., 2019; Vyas et al., 2019), as well as their possible synergistic effect with conventional antibiotics already used in clinical practice (Tariq et al., 2019).

3.4. Acute toxicity and median lethal dose (LD₅₀)

The animals treated orally with essential oil of *V. macrophylla* increasing doses (10; 100; 1000; 1600; 2900 and 5000 mg/kg of body weight) did not present opposite effects in the behavioral responses after 14 days of observation, with no mortality and other alterations being verified, indicating that the oil has an estimated LD₅₀ value greater than 5000 mg/kg and, being considered as a compound with low toxicity (Strickland et al., 2018; OECD, 2008).

Whenever an investigator administers a chemical into a biological system, different types of interactions can occur and result in a series of dose-related responses. In most cases, these responses are desired and useful, but there are several other effects that are not advantageous, effects that are harmful to individuals, with acute toxicity being a way of

measuring this casualty, being closely linked to the LD₅₀ estimate (dose lethal to 50% of the test group), thus determining ranges considered safe for chemical compounds (Strickland et al., 2018; Ahmed and Azmat, 2014).

The absence of toxicity found in the essential oil of *V. macrophylla* is premised on the absence of toxicity in its isolated chemical components (Oliveira et al., 2018; Ouyang et al., 2014; Belsito et al., 2008). Essential oils that have major chemical constituents compatible with essential oil of *V. macrophylla* have also been reported as toxicologically safe, such as the antinociceptive essential oil obtained from *Hyptis fruticosa* that has toxicological safety when administered up to 5000 mg/kg, with the major component bicyclogermacrene (Menezes et al., 2007). Nyambisa et al. (2017) found that several species of *Echinacea* spp. have analgesic activity and are considered toxicologically safe up to 5000 mg/kg, with germacrene D and (E)-caryophyllene as major components in oils. De Veras et al. (2020) evaluated the acute toxicity of the essential oil of *Hymenaea cangaceira* which showed antimicrobial activity in low concentrations, verifying absence of acute toxicity up to the concentration of 5000 mg/kg when administered orally, presenting germacrene D and (E)-caryophyllene as major constituents.

3.5. Anti-inflammatory activities

3.5.1. Carrageenan-induced peritonitis

The essential oil of *V. macrophylla* administered orally (p.o.) reduces the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α in 38.83%, 72.42% and 73.52% and IL-1 in 37.70%, 75.92% and 87.71% at concentrations of 4, 40 and 400 mg/kg, respectively, compared to control, showing the same statistical difference in the doses of 40 and 400 mg/kg of dexamethasone (Fig. 1A and B).

The Inflammation is characterized by a set of reactions of vascularized tissue in defense of the organism against harmful endogenous or exogenous stimuli, accompanied by various vascular events, such as vasodilation, accumulation of leukocytes in interstitial fluids, sensitization of nociceptive terminals, in addition to cellular events, such as synthesis and release of pro-inflammatory mediators that activate adaptive immunity, such as reactive oxygen species (ROS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferons (INF-), interleukins (IL-), prostaglandins (PGE), vasoactive amines (histamine and serotonin), among other factors (Kulkarni et al., 2016; Sá et al., 2014). These factors can be induced by compounds such as carrageenan that induces the migration of neutrophils and leukocytes to inflammatory exudate, cell proliferation and differentiation, release of prostaglandins, production of mediators of TNF- α , IL-1 β , IL-8 and nitric oxide (NO) and expression of adhesion molecules in endothelial cells, among others, causing fever, hyperalgesia, edema, among others (Chen et al., 2018; Branquinho et al., 2017; Barreto et al., 2016).

The essential oils or their constituents can act as immune-modulating of the inflammatory process under macrophages, natural killer cells (NK) and T and B lymphocytes, production of cytokines, chemokines and interleukins, among other mechanisms, becoming potential sources of new compounds treatments for regulation of persistent stimuli that can lead to autoimmune diseases, allergies, arthritis, cancers and atherosclerosis (Gandhi et al., 2019; Anastasiou and Buchbauer, 2017; Han et al., 2017).

Effects of anti-inflammatory potential with immune-modulation of the process can be observed in investigations such as a study with essential oil of *Nigella damascena* which presented anti-inflammatory activity by modulating the release of pro-inflammatory levels of TNF- α , IL-1 β , IL-8 (Sieniawska et al., 2019). The essential oil of *Artemisia princeps* and its main constituents eucalyptol and α -terpineol inhibit the expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and the nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B), in addition to increasing the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Trinh et al., 2011). The compounds 1,8-cineol, α -humulene and terpinen-4-ol

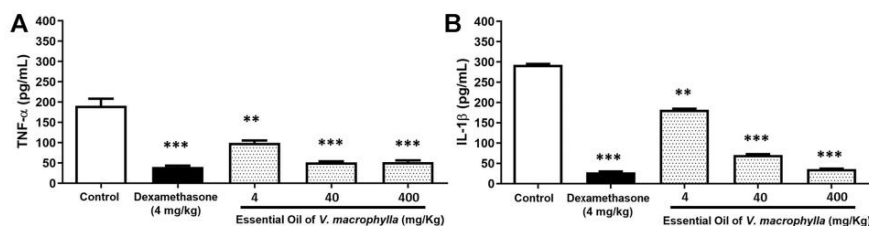


Fig. 1. Effects of essential oil of *V. macrophylla* and dexamethasone on TNF- α (A) and IL-1 β (B) levels. All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n = 6), analyzed by ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. **p < 0.05 and ***p < 0.001 versus control.

inhibit the production of TNF- α and IL-1 β in human lymphocytes and monocytes (Hirota et al., 2010). Bae et al. (2012) observed that the administration of α -pinene in rats with cerulein-induced acute pancreatitis reduces inflammation edema, as mechanisms for reducing the production of cytokines TNF- α and IL-1 β .

The results found in this study are in agreement with others that demonstrate the anti-inflammatory and immune-modulating potential of essential oils constituted by the same components found in the composition of the essential oil of *V. macrophylla*. The sesquiterpene β -caryophyllene has been shown to be a potent inhibitor of nitric oxide synthesis and expression of IL-1 β and TNF- α in murine cells and mice (Oliveira-Tintino et al., 2018; Dahham et al., 2015). The sesquiterpenes germacrene D and (E)-caryophyllene constitute the main compounds of the essential oil of *Leonurus sibiricus* which anti-inflammatory activity reduces the production of IL-1 β and TNF- α (Sitarek et al., 2017). The essential oil of *Stachys lavandulifolia* presents as major constituents bicyclogermacrene and δ -cadinene showing anti-inflammatory activity and reduction in the levels of TNF- α and IL-1 β in the model of pleurisy induction by carrageenan injection (Barreto et al., 2016).

3.5.2. Ear edema induced by croton oil

In the assessment of the topical anti-inflammatory activity of essential oil of *V. macrophylla*, a reduction in acute edema induced by croton oil (5%) was observed in all groups compared to the control in all evaluated time intervals (2, 4 and 6 h), with an average reduction of 49.53%, 85.04% and 94.39%, in concentrations of 4, 40 and 400 mg/kg of essential oil, respectively, with a statistical difference equal to the dexamethasone group (4 mg/kg) which reduced edema by an average of 87.85% (Table 4).

Considered as the largest organ in the body, the skin plays a crucial role in the immune defences of individuals, where an inappropriate or poorly targeted immune activity is implicated in the pathogenesis of various inflammatory diseases (Kupper and Fuhlbrigge, 2004). The croton oil is a phlogistic agent that, when applied to the epidermis, triggers an inflammatory response by actions of phorbol esters compounds such as TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) that releases several mediators such as vasoactive amines (histamine and serotonin) and cyclooxygenase products acting by activating the arachidonic acid

cascade, via cyclooxygenase and lipoxygenase, resulting in the activation of pathways such as MAPK via protein kinase C, and activation of transcription factors, such as NF- κ B and AP-1, which play a central role in the regulation of several pro-inflammatory proteins, such as some cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), pro-inflammatory enzymes as COX-2 and iNOS and adhesion molecules (Martins et al., 2017; Murakawa et al., 2006).

The mechanisms of action of topical anti-inflammatory activity among essential oils and constituents vary depending on their chemical composition. The essential oil of *Croton cordifolius* presents as major compound 1,8-cineole that showed topical anti-inflammatory activity similar to dexamethasone, acting on lipocortin-1, COX-2, iNOS and cytokines (IL-1 β , IL-2 and TNF- α) (Martins et al., 2017). The essential oil obtained from *Artemisia argyi* has topical anti-inflammatory activity (consisting in the majority of 1,8-cineole and camphor) which is linked to COX-2 inhibition (Ge et al., 2016). The essential oil of *Chamaecyparis obtusa* mostly composed of sabineno and elemol, has anti-inflammatory effects regulating the production of the enzyme PGE2 in the blood and the gene expression of TNF- α , by inhibiting the expression of COX-2 (An et al., 2013). The eugenol present in different oils such as *Melaleuca armillaris* (Siddique et al., 2017) and *Ocimum basilicum* (Zlotek et al., 2016) exerts inhibitory effect on production of prostaglandins (PG) and leukotrienes (LT) and cytokines such as TNF- α . The anethole has the ability to inhibit myeloperoxidase (MPO) by preventing the formation of inflammatory edema (Domiciano et al., 2013).

In fact, the chemical constituents of essential oil of *V. macrophylla* have the ability to inhibit the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , capacity that is associated with topical anti-inflammatory activity by reducing acute edema. However, other mechanisms that may be associated with this activity should be investigated later (Brandenburg et al., 2020; Rocha et al., 2020).

3.6. Antipyretic activity

The results of the antipyretic activity of the essential oil are shown in Table 5. The administration of yeast in mice produced a significant increase in rectal temperature 18 h after the transdermal injection, which was menstruating for 1, 2, 3 and 4 h after the treatments. The groups

Table 4

Topical effect of essential oil from *Verbesina macrophylla* and dexamethasone on croton oil-induced ear edema at different times (h).

Treatment	Dose (mg/mL/v.t.)	Edema formation (mm)				Average edema formation (mm)	Inhibition (%) average
		0 h	2 h	4 h	6 h		
Control	–	0.006 $\pm$ 0.002	0.139 $\pm$ 0.017	0.140 $\pm$ 0.013	0.142 $\pm$ 0.007	0.107 $\pm$ 0.006	–
Dexamethasone	4	0.005 $\pm$ 0.001	0.025 $\pm$ 0.014***	0.013 $\pm$ 0.005***	0.010 $\pm$ 0.006***	0.013 $\pm$ 0.007***	87.85
Essential Oil of <i>V. macrophylla</i>	4	0.004 $\pm$ 0.001	0.078 $\pm$ 0.015***	0.065 $\pm$ 0.014***	0.070 $\pm$ 0.013***	0.054 $\pm$ 0.003**	49.53
	40	0.005 $\pm$ 0.002	0.028 $\pm$ 0.007***	0.020 $\pm$ 0.003***	0.011 $\pm$ 0.002***	0.016 $\pm$ 0.010***	85.04
	400	0.004 $\pm$ 0.002	0.008 $\pm$ 0.001***	0.006 $\pm$ 0.000***	0.006 $\pm$ 0.001***	0.006 $\pm$ 0.001***	94.39

All results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) (n = 6), analyzed by ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with control, by the Tukey's test.

Table 5

Antipyretic activity of essential oil of *Verbesina macrophylla* and dipyrone on brewer's yeast-induced pyrexia at different times (h).

Treatment	Dose (mg/kg; p.o.)	Rectal temperature (°C) at hours					
		Before treatment		After treatment			
		18 h	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Control	–	36.47 ± 0.16	39.34 ± 0.07	39.12 ± 0.02	39.12 ± 0.02	39.14 ± 0.03	39.04 ± 0.15
Dipyrone	100	36.45 ± 0.11	39.12 ± 0.11	37.41 ± 0.02***	37.01 ± 0.08***	36.79 ± 0.01***	36.52 ± 0.02**
Essential Oil of <i>V. macrophylla</i>	4	36.62 ± 0.22	39.19 ± 0.12	37.95 ± 0.04***	37.52 ± 0.09***	36.97 ± 0.03***	36.57 ± 0.06***
	40	36.52 ± 0.17	39.17 ± 0.14	37.72 ± 0.03***	37.34 ± 0.06***	36.85 ± 0.01***	36.48 ± 0.02**
	400	36.39 ± 0.19	39.14 ± 0.01	37.57 ± 0.15 ***	37.19 ± 0.10***	36.54 ± 0.05***	36.46 ± 0.01***

All results were expressed as the mean ± standard deviation (SD) (n = 6), analyzed by ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. ***P < 0.001 compared with control, by the Tukey's test.

treated with 4, 40 and 400 mg/kg; p.o. of essential oil of *V. macrophylla* showed a significant reduction in rectal temperature when compared to the control group, in all time intervals and concentrations, with P < 0.001, similar to dipyrone (100 mg/kg; p.o.) that showed activity in all time intervals with P < 0.001.

The fever induced by pathogens or yeast presents an economical and adequate method to investigate new antipyretic drugs (Zhang et al., 2019). Fever manifests itself as a secondary impact of infection or tissue damage which results in the synthesis of pro-inflammatory mediators or cytokines, such as interleukins (IL-1β and IL-6) and the tumor necrosis factor TNF-α, resulting in an increase of the production of prostaglandin E2 (PGE2) that sends signals to the hypothalamus to raise body temperature (Zhang et al., 2019; Siddiqui et al., 2018).

The essential oils or their isolated constituents with anti-inflammatory activity have been described as antipyretic, with activity similar to that of essential oil of *V. macrophylla*. The essential oil of *Mikania cordata* has antipyretic activity at concentrations of 12.5, 25 and 50 mg/kg, similar to paracetamol (100 mg/kg) (Siddiqui et al., 2018). The terpene cinnamaldehyde has antipyretic activity alone, through the reduction of IL-1β-induced COX-2 activity and IL-1β induced PGE2 production (Guo et al., 2006). The essential oil of *Araucaria heterophylla* presents as the major compound germacrene D (10.25%), which shows antipyretic activity (similar to paracetamol) presenting as mechanism of action the reduction in the synthesis of cytokines TNF-α, IL-1 β and IL-6 (Elshamy et al., 2020).

The antipyretic activity of essential oil of *V. macrophylla* can be correlated with the inhibition of biosynthesis of the inflammatory mediators IL-1β and TNF-α. However, further studies should be carried out to evaluate the participation of other cytokines, as well as other mechanisms involved in activity of essential oil.

4. Conclusions

The data presented in this work validate the ethnopharmacological properties of *V. macrophylla*, with antimicrobial activity, anti-inflammatory and antipyretic effects found with toxicological safety. The essential oil obtained has antimicrobial activity against fungi and bacteria, being superior to commercial drugs, and the mechanisms involved in this activity should be further investigated. The anti-inflammatory and antipyretic activities obtained were equal to or higher than commercial drugs, being associated with inhibition of the synthesis of the pro-inflammatory mediators TNF-α and IL-1β. Nevertheless, new studies must be carried out to evaluate the participation of other mechanisms in these activities. These findings suggest that essential oil of *V. macrophylla* has the potential to give rise to phyto-medicines for the treatment of infections, inflammations and fever.

Author's contributions

Bruno Oliveira de Veras, Maria Betânia Melo de Oliveira, Márcia Vanusa da Silva and Ana Catarina de Souza Lopes were responsible for coordinating the research and writing the manuscript. Bruno Oliveira de

Veras was responsible for supervising and monitoring all rehearsals, and writing the manuscript. Jorge Irapuan de Souza Barbosa and Maria Rita Cabral Sales de Melo were responsible for collecting and identifying the plant. João Ricardis Satumino de Oliveira and Vera Lúcia de Menezes Lima were responsible for the *in vivo* analyzes and experiments. Geovanna Maria de Medeiros Moura was responsible for carrying out the antimicrobial activity and writing the manuscript. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro and Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar were responsible for the characterization of the essential oil. José Wellington da Silva and Krystyna Gorlach-Lira made significant suggestions for carrying out the study, and assisted in the analysis and writing of the manuscript. Caio Rodrigo Dias de Assis provided valuable suggestions for this study and revised the manuscript. Priscilla Anne Castro de Assis contributes with reagents/materials/analytical tools, in addition to providing valuable suggestions for this study. All authors reviewed the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest to disclosure.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Brazilian agency CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for their financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248>.

References

- Adams, R.P., 2017. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 5 ed. Texensis Publishing, Gruver, TX USA.
- Afoulous, S., Ferhout, H., Raouison, E.G., Valentin, A., Moukharzel, B., Couderc, F., Bouajila, J., 2013. Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. Food Chem. Toxicol. 56, 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.008>.
- Ahmed, M., Azmat, A., 2014. Acute toxicity (lethal dose 50 calculation) and histopathological effects of methanolic extract of *Berberis vulgaris* in mice. World J. Pharmacol. 3, 1439–1448.
- Albuquerque, M.R.J.R., Canuto, K.M., Pessoa, O.D.L., Nunes, E.P., Nascimento, R.F., Silveira, E.R., 2006. Essential oil composition of *Verbesina diversifolia* DC. Flavour Fragrance J. 21, 634–636. <https://doi.org/10.1002/ffj.1632>.
- Almeida, M.Z., Leão, P.H.O., Silva, M.Q.O.R., Da Pinto, A., Lisboa, M., Guedes, M.L.M.L., Peixoto, A.L., 2014. Species with medicinal and mystical-religious uses in São Francisco do Conde, Bahia, Brazil: a contribution to the selection of species for introduction into the local Unified Health System. Rev. Bras. Farmacogn. 24 (2), 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.04.006>.
- Al-Oqail, M.M., Siddiqui, M.A., Al-Sheddi, E.S., Saquib, Q., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A., Farshori, N.N., 2016. *Verbesina encodioides*: cytotoxicity, cell cycle arrest, and oxidative DNA damage in human liver cancer (HepG2) cell line. BMC Compl. Alternative Med. 16, 126. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1106-0>.

- An, B.-S., Kang, J.-H., Yang, H., Jung, E.-M., Kang, H.-S., Choi, I.-G., Park, M.-Jin, Jeung, E.-B., 2013. Anti-inflammatory effects of essential oils from *Chamaecyparis obtusa* via the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Mol. Med. Rep.* 8 (1), 255–259. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.145>.
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., Lakhssassi, N., 2019. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites* 9 (11), 258. <https://doi.org/10.3390/metabo9110258>.
- Anastasiou, C., Buchbauer, G., 2017. Essential oils as immunomodulators: some examples. *Open Chem.* 15 (1), 352–370. <https://doi.org/10.1515/chem-2017-0037>.
- Antonio, C.N.S., Ehanan, B.S., Marcos, F.G.R., Maria, R.J.R.A., Paulo, N.B., Hescuticchio, S.S.R.P., Seleno, M.M., Raquel, O.S.F., Carolina, S.P.C., 2016. Cytotoxicity, antifungal and antioxidant activities of the essential oil from *Eupatorium ballatofolium* Kunth (Asteraceae). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 10, 346–355. <https://doi.org/10.5897/ajpp2016.4537>.
- Armijos, C., Valarezo, E., Cartuche, L., Zaragoza, T., Finzi, P.V., Mellerio, G.G., Vidari, G., 2018. Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrcianthes fragrans* essential oil, a natural aromatizer of the traditional Ecuadorian beverage colada morada. *J. Ethnopharmacol.* 225, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.018>.
- Ashmawy, A.M., Ayoub, I.M., Eldahshan, O.A., 2020. Chemical composition, cytotoxicity and molecular profiling of *Cordia africana* Lam. on human breast cancer cell line. *Nat. Prod. Res.* 1–6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1736064>, 0.
- Bae, G.S., Park, K.C., Choi, S.B., Jo, J.J., Choi, M.O., Hong, S.H., Song, K., Song, H.J., Park, S.J., 2012. Protective effects of alpha-pinene in mice with cerulein-induced acute pancreatitis. *Life Sci.* 91, 866–871. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.035>.
- Barreto, R.S.S., Quintans, J.G.S., Amarante, R.K.L., Nascimento, T.S., Amarante, R.S., Barreto, A.S., Pereira, E.W.M., Duarte, M.C., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Zengin, G., Aktumsek, A., Quintans-Junior, L.J., 2016. Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys levodulfolia* Vahl (Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. *J. Ethnopharmacol.* 191, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.022>.
- Belaito, D., Bickler, D., Bruze, M., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.H., Sipes, I.G., Tagami, H., 2008. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 46 (11), S1–S71. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.085>.
- Bezerra, L.D.A., Mangabeira, P.A.O., de Oliveira, R.A., Costa, L.C.D.B., Da Cunha, M., 2018. Leaf blade secretion of *Verbesina macrophylla* (Cass.) F. S. Blake (Asteraceae): ontogeny, duct secretion mechanism and essential oil composition. *Plant Biol. (Stuttg)* 20 (3), 433–443. <https://doi.org/10.1111/plb.12700>.
- Billia, A.R., Santonaro, F., Sacco, C., Bergonzi, M.C., Donato, R., 2014. Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Evid. base Compl. Alternative Med.* <https://doi.org/10.1155/2014/159819>, 2014.
- Botta, B., Carmignani, M., Volpe, A., Botta, M., Corelli, F., Monache, G., 2003. Novel hypotensive agents from *Verbesina caracasana*: structure, synthesis and pharmacology. *Curr. Med. Chem.* 10 (18), 1845–1862. <https://doi.org/10.2174/0929867033456990>.
- Brandenburg, M.M., Rocha, F.G., Pavloski, P.L., da Silva Soley, B., Rockenbach, A., Scharf, D.R., Heiden, G., Ascari, J., Cabrin, D.A., Otuki, M.F., 2020. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil displays anti-inflammatory activity in models of skin inflammation. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112840>, 112840.
- Branquinho, L.S., Santos, J.A., Cardoso, C.A.L., Mota, J., da, S., Junior, U.L., Kassuya, C. A.L., Arena, A.C., 2017. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 198, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.008>.
- Bulow, N., König, W.A., 2000. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry* 55 (2), 141–168. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00266-1).
- Casiglia, S., Bruno, M., Bramucci, M., Quassinti, L., Lupidi, G., Fiorini, D., Maggi, F., 2017. *Kundmannia sicula* (L.) DC: a rich source of germacrene D. *J. Essent. Oil Res.* 29 (6), 437–442. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.133625>.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L., 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.
- Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S., 2017. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines* 4 (3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017. In: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (27th Ed) Wayne: M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. In: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts* (3rd Ed) Wayne: M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Da Silva, G.C., de Veras, B.O., de Assis, C.R.D., Navarro, D.M. do A.F., Diniz, D.L.V., Brayner Dos Santos, F.A., de Aguiar, J.C.R. de O.F., da Silva, M.V., Dos Santos Correia, M.T., 2020. Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic effects with conventional antibiotics under clinical isolates by essential oil of *Hymenaea rubriflora* Ducke (FABACEAE). *Nat. Prod. Res.* 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1729150>.
- Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Ahamed, M.B.K., Majid, A.M.S.A., 2015. In vivo anti-inflammatory activity of β -caryophyllene, evaluated by molecular imaging. *Mol. Med. Chem.* 1, 1–6. <https://doi.org/10.14800/mmc.1001>.
- Danyeh, M.S., Niakousari, M., Golmakani, M.T., Saharkhiz, M.J., 2015. Microwave and ohmic heating impact on the in situ hydrodistillation and selective extraction of *Satureja macrospira* essential oil. *J. Food Process. Preserv.* 40, 647–656. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12644>.
- Danielli, L.J., Souza, T.J.T.D., Maciel, A.J., Ferrão, M.F., Fuentefria, A.M., Apel, M.A., 2019. Influence of monoterpenes in biological activities of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez essential oils. *Biomolecules* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3390/biom9030112>.
- De Albuquerque, U.P., de Medeiros, P.M., de Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., de Freitas Lins Neto, E.M., de Melo, J.G., Dos Santos, J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* 114 (3), 325–354. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017>.
- De Castro Nizio, D.A., Fujimoto, R.Y., Maria, A.N., Carneiro, P.C.F., França, C.C.S., da Costa Sousa, N., de Andrade Brito, F., Sampaio, T.S., de Fátima Arrigoni-Blank, M., Blank, A.F., 2018. Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. *Parasitol. Res.* 117, 97–105. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5673-x>.
- De Veras, B.O., Oliveira, M.B.M., Oliveira, F.G.S., Santos, Y.Q., Oliveira, J.R.S., Lima, V. L.M., Almeida, J.R.G., Navarro, D.M.A.F., Aguiar, J.C.R.O., Aguiar, J.S., Gorlach-Lira, K., Assis, C.R.O.F., Silva, M.V., Lopes, A.C.S., 2020. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: a natural medicine. *J. Ethnopharmacol.* 247. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265>, 112265.
- Do Carmo, D.F.M., Amaral, A.C.F., MacHado, G.M.C., Leon, L.L., De Andrade Silva, J.R., 2012. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of *Piper* species. *Molecules* 17, 1819–1829. <https://doi.org/10.3390/molecules17021819>.
- Domiciiano, T.P., Dalallo, M.M.O., Silva, E.L., Ritter, A.M.V., Esteve-Silva, C.F., Ramos, F., Capurro-Assef, S.M., Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A., 2013. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 386, 331–338. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0820-5>.
- El-Kalamouni, C., Venskutonis, P., Zebib, B., Merah, O., Raynaud, C., Talou, T., 2017. Antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Achillea millefolium* L. grown in France. *Medicines* 4, 30. <https://doi.org/10.3390/medicines4020030>.
- Elshafie, H.S., Grul'ová, D., Baranová, B., Caputo, L., De Martino, L., Sedláč, V., Camele, I., De Feo, V., 2019. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil extracted from *Solidago canadensis* L. Growing wild in Slovakia. *Molecules* 24, 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules24071206>.
- Elshamy, A.I., Ammar, N.M., Hassan, H.A., Al-Rowaily, S.L., Ragab, T.I., El Gendy, A.E.-N.G., Abd-ElGawad, A.M., 2020. Essential oil and its nanoemulsion of *Araucaria heterophylla* resin: chemical characterization, anti-inflammatory, and antipyretic activities. *Ind. Crop. Prod.* 148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112272>, 112272.
- Ezzat, S.M., Salama, M.M., Mahrous, E.A., Maes, L., Pan, C.-H., Abdel-Sattar, E., 2016. Antiprotozoal activity of major constituents from the bioactive fraction of *Verbesina encelioides*. *Nat. Prod. Res.* 31 (6), 676–680. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1180604>.
- Fanouriou, E., Kalivas, D., Daferera, D., Taranitis, P., Trigkas, P., Vahamidis, P., Economou, G., 2018. Hippocratic medicinal flora on the Greek Island of Kos: spatial distribution, assessment of soil conditions, essential oil content and chemotype analysis. *J. Appl. Res. Med. Aromatic Plants* 9, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.03.003>.
- Fidyit, K., Fiedorowicz, A., Strzadala, L., Szumny, A., 2016. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Canc. Med.* 5, 3007–3017. <https://doi.org/10.1002/cam4.816>.
- Freires, I.A., Denny, C., Benso, B., De Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2015. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules* 20, 7329–7358. <https://doi.org/10.3390/molecules20047329>.
- Gandhi, G.R., Vasconcelos, A.B.S., Haran, G.H., da Silva Calisto, V.K., Jothi, G., Quintans, J.D.S.S., Gurgel, R.Q., 2019. Essential oils and its bioactive compounds modulating cytokines: a systematic review on anti-asthmatic and immunomodulatory properties. *Phytomedicine* 152854. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152854>.
- Ge, Y., Wang, Z., Xiong, Y., Huang, X., Mei, Z., Hong, Z., 2016. Anti-inflammatory and blood stasis activities of essential oil extracted from *Artemisia argyi* leaf in animals. *J. Nat. Med.* 70 (3), 531–538. <https://doi.org/10.1007/s11418-016-0972-6>.
- Ghaffari, T., Kafil, H.S., Amanshahi, S., Farajnia, S., Delazar, A., Baek, S.C., Hamishehkar, H., Kim, K.H., 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from the aerial parts of *Pinus eldarica* grown in Northwestern Iran. *Molecules* 24, 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules24173203>.
- Ghosh, T., Biswas, M.K., Chatterjee, S., Roy, P., 2018. In-vitro study on the hemolytic activity of different extracts of Indian medicinal plant *Ocrotan bonplandianum* with phytochemical estimation: a new era in drug development. *J. Drug Deliv. Therapeut.* 8, 155–160. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i4.1747>.
- Grand View Research, 2019. *Flavors and Fragrances Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Natural, Aroma), by Application (Flavors, Fragrances), by Region, and Segment Forecasts, 2019 – 2025*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/flavors-fragrances-market>. (Accessed 28 June 2020).
- Gualteri, M., Araque, M., Morales, A., Rondon, M., Rojas, L., Araujo, L., Villalta, C., 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Verbesina turbaensis* Kunth. *HBK. Rev. Latinoam. Quim.* 33, 128–131.

- Guo, J.Y., Huo, H.R., Zhao, B.S., Liu, H.B., Li, L.F., Ma, Y.Y., Guo, S.Y., Jiang, T.L., 2006. Cinnamaldehyde reduces IL-1 β -induced cyclooxygenase-2 activity in rat cerebral microvascular endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 537, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.002>.
- Han, X., Parker, T.L., Dorsett, J., 2017. An essential oil blend significantly modulates immune responses and the cell cycle in human cell cultures. *Cogent Biol.* 3 (1) <https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1340112>.
- Hirota, R., Roger, N.N., Nakamura, H., Song, H.-S., Sawamura, M., Suganuma, M., 2010. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos* Tanaka) essential oil on eosinophils. *J. Food Sci.* 75 (3), H87–H92. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01541.x>.
- Hui, L.M., Zhao, G.D., Zhao, J.J., 2015. δ -Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 6046–6056.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.
- Jafri, H., Ahmad, I., 2019. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Mycol. Med.* 30 <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100911>.
- Kulkarni, O.P., Lichtneert, J., Anders, H.-J., Mulay, S.R., 2016. The immune system in tissue environments regaining homeostasis after injury: is “inflammation” always inflammation? *Mediat. Inflamm.* 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/2856213>.
- Kupper, T.S., Fuhlbrigge, R.C., 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* 4 (3), 211–222. <https://doi.org/10.1038/nri1310>.
- Lí, R., Yang, J.J., Shi, Y.X., Zhao, M., Ji, K.L., Zhang, P., Xu, Y.K., Hu, H. Bin, 2014. Chemical composition, antimicrobial and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Macraia (Zanthoxylum myriacanthum* var. pubescens) in Xishuangbanna, SW China. *J. Ethnopharmacol.* 158, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.006>.
- Liolios, C., Laouer, H., Boulacheb, N., Gortzi, O., Chinou, I., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Algerian Phlomis* bovei de Noé subsp. bovei. *Molecules* 12, 772–781. <https://doi.org/10.3390/12040772>.
- Lobitz, G.O., Heilmann, J., Zschecke, S., Tamayo-Castillo, G., Bauer, R., Merfort, I., 1998. Bornyl cinnamate derivatives with anti-inflammatory activity from *Verbena turbanensis*. *Pharmaceut. Pharmacol. Lett.* 8, 115–118.
- Lorenconi, M.F., Figueira, M.M., Toledo e Silva, M.V., Pimentel Schmitt, E.F., Endringer, D.C., Scherer, R., Barth, T., Bertolucci, S.K.V., Fronza, M., 2020. Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomancia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. *J. Ethnopharmacol.* 112562 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112562>.
- Mahizan, N.A., Yang, S.K., Moo, C.-L., Song, A.A.-L., Chong, C.-M., Chong, C.-W., Abushehla, A., Lim, S.-H.E., Lai, K.-S., 2019. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. *Molecules* 24 (14), 2631. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>.
- Mali, C.E.W., Baccetti, C., Mariani, M., Hassani, F., Babali, B., Atik-Bekkara, F., Paoli, M., Maury, J., Tomi, F., Bekhechi, C., 2019. Biological activities and chemical composition of *Santolina africana* Jord. et Four. aerial part essential oil from Algeria: occurrence of polyacetylene derivatives. *Molecules* 24, 204. <https://doi.org/10.3390/molecules24010204>.
- Marques, A.P., Bonfim, F.P.G., Dantas, W.F.C., Puppi, R.J., Marques, M.O.M., 2019. Chemical composition of essential oil from *Varronia curassavica* Jacq. accessions in different seasons of the year. *Ind. Crop. Prod.* 140 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111656>.
- Martins, A.O.B.P.B., Rodrigues, L.B., Cesário, F.R.A.S., De Oliveira, M.R.C., Tintino, C.D. M., Castro, F.F., Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Júnior, L.J.Q., Araújo, A.A.S., Silva, M.S.A., Albuquerque, T.R., Fernandes, M.N.M., Alcântara, I.S., Wanderley, A. G., 2017. Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1,8-cineole (eucalyptol). *Biomed. Pharmacother.* 96, 384–395. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.005>.
- Mendes, S.S., Bonfim, R.R., Jesus, H.C.R., Alves, P.B., Blank, A.F., Estevam, C.S., Antoniolli, A.R., Thomazzi, S.M., 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 129, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.005>.
- Menezes, I.A.C., Marques, M.S., Santos, T.C., Dias, K.S., Silva, A.B.L., Mello, I.C.M., et al., 2007. Anti-nociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis frutescens* in mice. *Fitoterapia* 78 (3), 192–195. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.11.020>.
- Meng, X., Li, D., Zhou, D., Wang, D., Liu, Q., Fan, S., 2016. Chemical composition, antibacterial activity and related mechanism of the essential oil from the leaves of *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Ethnopharmacol.* 194, 698–705. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.050>.
- Mora, F.D., Alpan, L., McCracken, V.J., Nieto, M., 2013. Chemical and biological aspects of the genus *Verbesina*. *Nat. Prod. J.* 3, 140–150. <https://doi.org/10.2174/221031551303020009>.
- Mora, F.D., Rojasa, Y.L., González, V., Velasco, J., Díaz, T., Ríos, N., Rojas-Ferním, L.B., Carmona, J., Silva, B., Nieto, M., 2015. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Verbesina negensis* from the Venezuelan Andes, 10, 1309–1310. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000743>.
- Moreira, R.C.T., Costa, L.C.B., Costa, R.C.S., Rocha, E.A., 2002. Abordagem Etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 21, 205–211.
- Murakawa, M., Yamaoka, K., Tanaka, Y., Fukuda, Y., 2006. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem. Pharmacol.* 71 (9), 1331–1336. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.01.005>.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Feo, V.D., 2017. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals* 10 (4), 86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>.
- Ni, J., Mahdavi, B., Ghez, S., 2019. Chemical composition, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative activity of essential oils from *Ephedra intermedia* Schrenk & meyer. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* 22, 1562–1570. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1707717>.
- Noge, K., Becerra, J.X., 2009. Germacrene D, A common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Bursaceae). *Molecules* 14, 5289–5297. <https://doi.org/10.3390/molecules14125289>.
- Nyalambisa, M., Oyemitan, I.A., Matewu, R., Oyediji, O.O., Oluwafemi, O.S., Songca, S. P., Nkeh-Chungu, B.N., Oyediji, A.O., 2017. Volatile constituents and biological activities of the leaf and root of *Echinacea* species from South Africa. *Saudi Pharmaceut. J.* 25 (3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.sjps.2016.09.010>.
- OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, 2008. Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Modified Up-And-Down Procedure.
- Ogunwande, I.A., Avoese, O.N., Olasunkami, K.N., Lawal, O.A., Ascrizzi, R., Guido, F., 2018. Chemical composition, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of *Bougainvillea glabra*. *J. Ethnopharmacol.* 232, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.017>.
- Oladeji, O.S., Adelowo, F.E., Oluyori, A.P., Bankole, D.T., 2020. Ethnobotanical description and biological activities of *Senna alata*. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 2020, 12. <https://doi.org/10.1155/2020/2580259>.
- Oliveira, G.L.D.S., Machado, K.C., Machado, K.C., Da Silva, A.P.D.S.C.L., Feitosa, C.M., De Castro Almeida, F.R., 2018. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: absence of adverse effects in female Swiss mice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 92, 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.013>.
- Oliveira-Tintino, C.D.D.M., Pessoa, R.T., Fernandes, M.N.M., Alcântara, I.S., Da Silva, B. A.F., De Oliveira, M.R.C., De Menezes, I.R.A., 2018. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton compactus* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in vivo models. *Phytomedicine* 41, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.02.004>.
- Ouyang, C.-B., Liu, X.-M., Liu, Q., Bai, J., Li, H.-Y., Li, Y., Guo, M.-X., 2014. Toxicity assessment of cadinene sesquiterpenes from *Eupatorium adenophorum* in mice. *Nat. Prod. and Bioprospecting* 5 (1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s13659-014-0050-2>.
- Panero, J.L., Crozier, B.S., 2016. Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 99, 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.007>.
- Postu, P.A., Sadiki, F.Z., El Idrissi, M., Cioanca, O., Trifan, A., Hancianu, M., Hritcu, L., 2019. *Pinus halepensis* essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomed. Pharmacother.* 112, 108673. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108673>.
- Ramos, J.M.O., Santos, C.A., Santana, D.G., Santos, D.A., Alves, P.B., Thomazzi, S.M., 2013. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophylus*. *Braz. J. Pharmacogn.* 23, 644–650. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000045>.
- Rather, M.A., Dar, B.A., Dar, M.Y., Wani, B.A., Shah, W.A., Bhat, B.A., Ganai, B.A., Bhat, K.A., Anand, R., Qurishi, M.A., 2012. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine* 19, 1185–1190. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.018>.
- Rezende, D., Cardoso, M., Souza, R.V., Teixeira, M.L., Brandão, R.M., Ferreira, V.R.F., Nogueira, J.O., Magalhães, M.L., Marcussi, S., Nelson, D.L., 2017. Essential oils from *Menha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Peumus boldus* and *Foeniculum vulgare*: inhibition of phospholipase A2 and cytotoxicity to human erythrocytes. *Am. J. Plant Sci.* 8, 2196–2207. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.89147>.
- Rocha, F.G., de Mello Brandenburg, M., Pawloski, P.L., da Silva Soley, B., Angelim Costa, S.C., Meinerz, C.C., Barreto, I.P., Cabrini, D.A., 2020. Preclinical study of the topical anti-inflammatory activity of *Cyperus rotundus* L. extract (Cyperaceae) in models of skin inflammation. *J. Ethnopharmacol.* 112709, 254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112709>.
- Rodrigues, K.A.F., Amorim, L.V., Oliveira, J.M.G., Dias, C.N., Moraes, D.F.C., Andrade, E. H.A., Maia, J.G.S., Carneiro, S.M.P., Carvalho, F.A.A., 2013. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-leishmaniasis agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/279726>.
- Sá, R.C.S., Andrade, L., Oliveira, R., Sousa, D., 2014. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules* 19, 1459–1480. <https://doi.org/10.3390/molecules19021459>.
- Siddique, S., Parveen, Z., Firdaus-e-Bareen, Chaudhary, M.N., Mazhar, S., Nawaz, S., 2017. The essential oil of *Malaleuca amuraris* (Sol. ex Gaertn.) Sm. leaves from Pakistan: a potential source of eugenol methyl ether. *Ind. Crop. Prod.* 109, 912–917. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.048>.
- Siddiqui, S.A., Rahman, A., Olur Rahman, M., Akbar, M.A., Shamsur Rouf, A.S., Ali, M. A., Al-Hemaid, F.M.A., Farah, M.A., 2018. Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory and antipyretic potential of *Mikania cordata* (Burm. f.) Robinson in experimental animal model. *Saudi J. Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.01.009>.
- Sienkawska, E., Michel, P., Mroczek, T., Granica, S., Skalik-Woźniak, K., 2019. *Nigella damascena* L. essential oil and its main constituents, damascenine and β -elemene

- modulate inflammatory response of human neutrophils ex vivo. Food Chem. Toxicol. 125, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.057>.
- Silva, L.F., Cardoso, M., das, G., Preté, P.S.C., Teixeira, M.L., Nelson, D.L., Magalhães, M. L., Ferreira, V.R.F., Souza, R.V., Soares, L.L., Marcussi, S., 2017. Essential oils from *Mentha viridis* (L.) L. And *Mentha pulegium* L.: cytogenotoxic effects on human cells. Am. J. Plant Sci. 1423–1437. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.86097>, 08.
- Sitarek, P., Rijo, P., Garcia, C., Skala, E., Kalemba, D., Bialas, A.J., Wyzokińska, H., Śliwiński, T., 2017. Antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, and antiproliferative properties of essential oils from hairy and normal roots of *Leonurus sibiricus* L. And their chemical composition. Oxid. Med. Cell. Longev. 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/7384061>.
- Strickland, J., Glippinger, A.J., Brown, J., Allen, D., Jacobs, A., Matheson, J., Casey, W., 2018. Status of acute systemic toxicity testing requirements and data uses by U.S. regulatory agencies. Regul. Toxicol. Pharmacol. 94, 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.01.022>.
- Tadić, V., Oliva, A., Božović, M., Cipolla, A., De Angelis, M., Vullo, V., Garzoli, S., Ragno, R., 2017. Chemical and antimicrobial analyses of *Sideritis romana* L. subsp. *purpurea* (Tal. ex Benth.) Heywood, an endemic of the Western Balkan. Molecules 22, 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules22091395>.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Bhat, M.A., Prabhakar, A., Shalla, A.H., Rather, M.A., 2019. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microb. Pathog. 103580 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>.
- Trinh, H.T., Lee, I.A., Hyun, Y.J., Kim, D.H., 2011. *Artemisia princeps* Pamp. essential oil and its constituents eucalyptol and α -terpineol ameliorate bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting bacterial growth and NF- κ B activation. Planta Med. 77, 1996–2011. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280094>.
- Tunça, M.T., Koca, I., 2019. Ohmic heating assisted hydrodistillation of clove essential oil. Ind. Crop. Prod. 141 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111763>, 111763.
- Vyas, S., Kothari, S.L., Kachhwaha, S., 2019. Nootropic medicinal plants: therapeutic alternatives for alzheimer's disease. J. Herb. Med. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100291>, 100291.
- Xavier, A.L., Pita, J.C.L.R., Brito, M.T., Meireles, D.R.P., Tavares, J.F., Silva, M.S., Maia, J.G.S., Andrade, E.H.A., Diniz, M.F.F.M., Silva, T.G., Pessoa, H.L.F., Sobral, M. V., 2015. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Leptia microphylla*. Z. Naturforsch. Sect. C J. Biosci. 70, 129–137. <https://doi.org/10.1515/znc-2014-4135>.
- Yu, Z., Tang, J., Khare, T., Kumar, V., 2020. The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: can essential oils come to the rescue? Fitoterapia 140, 104433. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104433>.
- Zadeh-Ardabili, P.M., Rad, S.K., 2019. Anti-pain and anti-inflammation like effects of Neptune krill oil and fish oil against carrageenan induced inflammation in mice models: current status and pilot study. Biotechnol. Rep. 22, e00341 <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00341>.
- Zhang, X., Wang, Y., Li, S., Dai, Y., Li, X., Wang, Q., Zhang, C., 2019. The potential antipyretic mechanism of *Gardenia fructus* and its heat-processed products with plasma metabolomics using rats with yeast-induced fever. Front. Pharmacol. 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00491>.
- Zlotek, U., Michalak-Majewska, M., Szymanowska, U., 2016. Effect of jasmonic acid elicitation on the yield, chemical composition, and antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oil of lettuce leaf basil (*Ocimum basilicum* L.). Food Chem. 213, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.052>.

APÊNDICE F – PRODUÇÃO OBTIDA DURANTE O DOUTORADO



Research Article

Antioxidant and Antiulcerogenic Activity of the Dry Extract of Pods of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. (Fabaceae)

Lady D. K. T. Prazeres¹, Ticiana P. Aragão², Samara A. Brito³, Cynthia L. F. Almeida⁴, Amanda D. Silva¹, Mirella M. F. de Paula⁵, Juliane S. Farias⁵, Leucio D. Vieira⁵, Bolívar P. G. L. Damasceno⁶, Larissa A. Rolim⁷, Bruno O. Veras⁸, Ismael G. Rocha⁹, Jacinto C. Silva Neto⁹, Milena L. F. Bittencourt¹⁰, Rita de Cássia R. Gonçalves¹⁰, Rodrigo R. Kitagawa¹⁰ and Almir G. Wanderley^{1,5}

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-521, Brazil

²Department of Nutrition, Universidade de Pernambuco, Petrolina 56328-903, Brazil

³Santa Maria College, Cajazeiras 58900-000, Brazil

⁴Collegiate of Nursing, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina 56304-205, Brazil

⁵Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil

⁶Department of Pharmacy, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-600, Brazil

⁷Drugs, Medicines and Food Analysis Center, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina 56304-917, Brazil

⁸Department of Tropical Medicine, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil

⁹Department of Histology and Embryology, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-420, Brazil

¹⁰Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória 29047-105, Brazil

Pharmacogn Rev. 2019;13(26):45-49

A multifaceted peer-reviewed journal in the field of Pharmacognosy and Natural Products.
www.phcogrev.com | www.phcog.net

Review Article

Medicinal Plants with Acetylcholinesterase Inhibitory Activity: Therapeutic Potential of Brazilian Plants for the Treatment of Alzheimer's Disease

Fernanda Granja da Silva Oliveira¹, Bruno de Oliveira Veras², Juliane Maria Dos Santos Silva³, Deyzi Caroline da Silva Barbosa³, Tayane de Cássia Dias Mendes Silva³, Luciclaudio Cassimiro de Amorim³, Caio Rodrigo Dias de Assis³, Elisabete Regina Fernandes Ramos Ribeiro⁴, Alexandre Gomes da Silva⁴, Márcia Vanusa da Silva⁴, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida¹

Fernanda Granja da Silva Oliveira¹, Bruno de Oliveira Veras², Juliane Maria Dos Santos Silva³, Deyzi Caroline da Silva Barbosa³, Tayane de Cássia Dias Mendes Silva³, Luciclaudio Cassimiro de Amorim³, Caio Rodrigo Dias de Assis³, Elisabete Regina Fernandes Ramos Ribeiro⁴, Alexandre Gomes da Silva⁴, Márcia Vanusa da Silva⁴, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida¹

¹Federal University of San Francisco Valley, Center for Studies and Research of Medicinal Plants, Petrolina, BRAZIL.

²Post-Graduation in Tropical Medicine, BRAZIL.

³Department of Antibiotics, Laboratory of Microbiology, Federal University of Pernambuco, BRAZIL.

⁴Department of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, BRAZIL

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by persistent impairment of cognitive and psychomotor functions, resulting in reduced short-term memory. In current pharmacotherapy, some available acetylcholinesterase inhibitors (AChEi) have side effects, such as hepatotoxicity. Hence, it is necessary to investigate other sources to obtain compounds inhibiting AChE. In this context, the objective of this study was to review the main publications involving plants collected in Brazil tested for the inhibition of AChE, which may lead to new phytotherapeutic inhibitors. This review was carried out by searching the PubMed, Scopus, and Science Direct databases during September 2018, using several combinations of the following keywords: extract, AChE, Brazil and Alzheimer's. Inclusion criteria were articles with plant studies collected in Brazil for the inhibition of AChE (*in vivo* and/or *in vitro*), with keywords in the title, abstract, or full text. Articles with studies of purified, synthetic, or semi-synthetic compounds were excluded. In this research, 298 articles were identified and 31 articles were selected. More than forty species of the families *Fabaceae*, *Anacardiaceae*, *Annonaceae*, *Malvaceae*, *Myrtaceae*, *Arecaceae* and *Lauraceae* were found, and the most cited substances were the phenolic compounds and flavonoids. Alkaloids and steroids were also found in some active plants. The relevance and importance of this work lies in the review of new potential herbal drugs for the treatment of AD, and this survey could collaborate for the development of new medicinal alternatives for this and other neurodegenerative problems related to cerebral availability of acetylcholine.

Key words: Acetylcholinesterase, Alzheimer, Medicinal plants.

INTRODUCTION

One of the major neurodegenerative dementias, Alzheimer's disease (AD), is characterized by persistent damage to cognitive and psychomotor functions,

increased enzymatic activity of AChE, which causes a decrease in the rates of ACh in the brain.^[1]

ACh is a molecule which has an ester group and a



Research article

Biosurfactant produced by *Candida utilis* UFPEDA1009 with potential application in cookie formulation

Beatriz Galdino Ribeiro ^a, Bruno Oliveira de Veras ^b, Jaciana dos Santos Aguiar ^b, Jenyffer Medeiros Campos Guerra ^c, Leonie Asfora Sarubbo ^{d, e}

Pharmacogn. Res.

A multidisciplinary peer-reviewed journal in the field of Pharmacognosy and Natural Products
www.pharmacogn.com | www.phocog.net

ORIGINAL ARTICLE

Natural Gastroprotective Remedy from the Branches of *Spondias tuberosa* Arruda

Amanda Dias de Araújo ^{1,2}, George Souza Feitoza ¹, Fernanda Granja da Silva Oliveira ³, Bruno Oliveira de Veras ^{1,4}, Francinete Francis Lacerda ⁵, Nicácio Henrique da Silva ¹, Wolfgang Harand ^{1,2}, Silvana T. Paz ⁶, Mário Ribeiro de Melo-Júnior ⁶, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida ⁷, Marcia Vanusa da Silva ^{1,2}, Maria Tereza dos Santos Correia ¹

¹Departments of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, ²National Institute of Semi-arid/Ministry of Science, Technology and Innovation (INSA/MCTI), Paraíba, Brazil, ³Center for Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, Pernambuco, Brazil, ⁴Post-Graduation in Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Brazil, ⁵Agronomic Institute of Pernambuco - IPA, Brazil, ⁶Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Brazil

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 241 (2021) 108953



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc

Hexane extract from *SpoSudias mombin* L. (Anacardiaceae) prevents behavioral and oxidative status changes on model of Parkinson's disease in zebrafish

Glauca Dal Santo ^a, Bruno Oliveira de Veras ^b, Eduardo Rico ^c, Jacir Dal Magro ^d, Jotele Fontana Agostini ^a, Leucio Duarte Vieira ^e, Jean Felipe Fossá Calisto ^d, Ricieri Mocellin ^c, Vitória de Sá Fonseca ^{a,c}, Almir Gonçalves Wanderley ^{a,f,g}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

^c Laboratório de Neurologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

^d Área de Ciências Ambientais, Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Unochapecó), Chapecó, SC, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 31 (2021) 101879



Contents lists available at ScienceDirect

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/bab>

Bioactivity and cytotoxicity of quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles

Marcela Sarmiento Valencia ^a, Maurício Franco da Silva Júnior ^{a,b}, Francisco Humberto Xavier Júnior ^c, Bruno de Oliveira Veras ^a, Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba ^d, Teresinha Gonçalves da Silva ^e, Viviane Lansky Xavier ^b, Marthyna Pessoa de Souza ^{e,f,g}, Maria das Graças Carneiro-da-Cunha ^{a,h,i}

Chemodiversity and antibacterial activity of the essential oil of leaves of *Croton argyrophyllus* Kunth

Lidiane Gomes de Araújo,^a Germano Veras,^a João Victor de Oliveira Alves,^b
Bruno Oliveira de Veras,^b Márcia Vanusa da Silva,^b José Filipe Bacalhau
 Rodrigues,^c Marcus Vinicius Lia Fook,^c Solomon Kweku Sagoe Amoah,^c
 Maria da Conceição de Menezes Torres^{a*}



ISSN 1981-6723
Online version



SCIENTIFIC NOTE

Phenolic profiles of faveleira (*Cnidocolus quercifolius* Pohl) seed and press cake extracts: potential for a new trend in functional food

Perfil fenólico dos extratos da torta e da semente de faveleira (Cnidocolus quercifolius Pohl): potencial para nova tendência em alimento funcional

Penha Patrícia Cabral Ribeiro¹ , Francisco Canindé de Sousa Júnior² ,
 Cristiane Fernandes de Assis² , Bruno Oliveira de Veras³ ,
 Carlos Eduardo de Araújo Padilha⁴ , Thayza Christina Montenegro Stamford⁵ ,
 Karla Suzanne Florentino da Silva Chaves Damasceno^{6*}

NATURAL PRODUCT RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1837805>



SHORT COMMUNICATION



First report on the chemical composition of leaf essential oil of *Myrciaria pilosa* Sobral & Couto and its antimicrobial and antivirulence activities against *Staphylococcus aureus*

Wêndeo Kennedy Costa^a , Nandara Ohana da Costa Gomes^a, Bruno Souza dos Santos^a, Clóvis Macêdo Bezerra Filho^a , Alisson Macário de Oliveira^a ,
 Graziela Cláudia da Silva^a, Bruno Oliveira de Veras^b , Fernanda Granja da Silva
 Oliveira^a , Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^c , Daniela Maria
 do Amaral Ferraz Navarro^c , Maria Tereza dos Santos Correia^a and
 Márcia Vanusa da Silva^a

K. CHOJNACKA¹, D. SOSNOWSKA², D. POLKA², K. OWCZAREK¹, K. GORLACH-LIRA³,
B. OLIVEIRA DE VERAS⁴, U. LEWANDOWSKA¹

COMPARISON OF PHENOLIC COMPOUNDS, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF EXTRACTS PREPARED FROM JAPANESE QUINCE (*CHAENOMELES JAPONICA* L.) LEAVES

¹Medical University of Lodz, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Lodz, Poland;
²Lodz University of Technology, Institute of Molecular and Industrial Biotechnology,
 Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Lodz, Poland; ³Federal University of Paraiba, Department of Molecular Biology,
 Laboratory of Biology of Microorganisms, Joao Pessoa, Paraiba, Brazil; ⁴Federal University of Pernambuco,
 Post-graduation in Tropical Medicine, Laboratory of Microbiology, Recife, Pernambuco, Brazil

NATURAL PRODUCT RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1729150>



SHORT COMMUNICATION



Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic effects with conventional antibiotics under clinical isolates by essential oil of *Hymenaea rubriflora* Ducke (FABACEAE)

Graziela Claudia da Silva^a, Bruno Oliveira de Veras^{a,b},
 Caio Rodrigo Dias de Assis^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^c ,
 Dyana Leal Veras Diniz^{d,e}, Fábio André Brayner dos Santos^{d,e},
 Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^c, Márcia Vanusa da Silva^a and
 Maria Tereza dos Santos Correia^a

^aDepartment of Biochemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of Pernambuco,
 Recife, Pernambuco, Brazil; ^bPost-graduation in Tropical Medicine, Laboratory of Microbiology,
 Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; ^cDepartment of Fundamental
 Chemistry, Center for Exact and Nature Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife,
 Pernambuco, Brazil; ^dDepartment of Parasitology, Aggeu Magalhães Research Institute/
 CPqAM-FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil; ^eElectronic Microscopy Sector of the Laboratory of
 Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco - LIKA, UFPE, Recife,
 Pernambuco, Brazil



Biotechnology & Biotechnological Equipment



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/doi/tbq20>

Photoprotective activity and HPLC-MS-ESI-IT profile of flavonoids from the barks of *Hymenaea* *martiana* Hayne (Fabaceae): development of topical formulations containing the hydroalcoholic extract

Fernanda Granja da Silva Oliveira, Bruno Oliveira de Veras, Ana Paula
 Sant'Anna da Silva, Amanda Dias de Araújo, Deyzi Caroline da Silva Barbosa,
 Tayane de Cássia Mendes Silva, Elisabete Regina Fernandes Ramos Ribeiro,
 Marta Melissa Leite Maia, Umberto Pereira Souza Júnior, Vera Lúcia de
 Menezes Lima, Márcia Vanusa da Silva, Norberto Pepporine Lopes, Larissa
 Araújo Rolim & Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

Article

Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using a Biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 as Stabilizing Agent and Its Application as an Antifungal Agent

Italo José Batista Durval ^{1,2}, Hugo Morais Meira ^{2,3}, Bruno Oliveira de Veras ⁴, Raquel Diniz Rufino ^{2,5}, Attilio Converti ^{2,6,*} and Leonie Asfora Sarubbo ^{2,3,*}

Carbohydrate Polymer Technologies and Applications 2 (2021) 100119



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymer Technologies and Applications

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/carbohydrate-polymer-technologies-and-applications



Characterization of curcumin-loaded lecithin-chitosan bioactive nanoparticles

Marcela Sarmiento Valencia ^a, Maurício Franco da Silva Júnior ^a, Francisco Humberto Xavier-Júnior ^{b,c}, Bruno de Oliveira Veras ^a, Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque ^{a,c,d}, Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba ^e, Teresinha Gonçalves da Silva ^e, Viviane Lansky Xavier ^{a,f}, Marthyna Pessoa de Souza ^{a,g,*}, Maria das Graças Carneiro-da-Cunha ^{a,g,*}

Food and Chemical Toxicology 156 (2021) 112492



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



Tannic acid is a gastroprotective that regulates inflammation and oxidative stress

Bruno Oliveira de Veras ^{a,b,*}, Márcia Vanusa da Silva ^b, Penha Patricia Cabral Ribeiro ^c

^a Post-graduation in Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Department of Biochemistry, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

Food Chemistry 337 (2021) 127771



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Chemical and biological activities of faveleira (*Cnidococcus quercifolius* Pohl) seed oil for potential health applications

Penha Patricia Cabral Ribeiro ^{a,*}, Karla Suzanne Florentino da Silva Chaves Damasceno ^b, Bruno Oliveira de Veras ^{c,d}, João Ricardhis Saturnino de Oliveira ^d, Vera Lúcia de Menezes Lima ^d, Caio Rodrigo Dias de Assis ^a, Marcia Vanusa da Silva ^d, Francisco Canindé de Sousa Júnior ^c, Cristiane Fernandes de Assis ^e, Carlos Eduardo de Araújo Padilha ^f, Thayza Christina Montenegro Stamford ^c

^a Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Department of Nutrition, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Lagoa Nova, 59078-970 Natal, RN, Brazil

^c Area of Tropical Medicine, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^d Department of Biochemistry, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^e Department of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Petrópolis, 59012-570 Natal, RN, Brazil

^f Department of Chemical Engineering, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Lagoa Nova, 59078-970 Natal, RN, Brazil



Active Biodegradable Film Based on Chitosan and *Cenostigma Nordestinum* Extracts for Use in the Food Industry

Jéssica Maria Alexandre Soares¹ · Elenildo Dário da Silva Júnior² · Bruno Oliveira de Veras² · Ricardo Yara³ · Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque⁴ · Marthyna Pessoa de Souza¹

DOI 10.15517/rbt.v69i2.40809

Antimicrobial activity of bacteria isolated from tissue of the coral *Palythoa caribaeorum* (Zoantharia: Sphenopidae) from Paraíba, Brazil coastal reefs

Jalcinês C. Pereira¹
 Krystyna Gorlach-Lira^{2*}
 Bruno O. de Veras³

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 252 (2021) 119511



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa



Impact on cholinesterase-inhibition and *in silico* investigations of sesquiterpenoids from Amazonian *Siparuna guianensis* Aubl.



Regildo M.G. Martins^{a,b}, Francisco H. Xavier-Júnior^c, Marcela R. Barros^d, Thaís M. Menezes^d, Caio R.D. de Assis^{e,f}, Ana Cristina G.R. de Melo^g, Bruno O. Veras^h, Vany P. Ferrazⁱ, Antonio A.M. Filho^g, Gilvan T. Yogui^f, Ranielson S. Bezerra^c, Gustavo M. Seabra^{d,j}, Jorge L. Neves^d, Wanderli P. Tadei^{b,*}

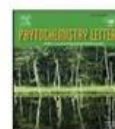
Phytochemistry Letters 41 (2021) 186–192



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol



Bioactivity flavonoids from roots of *Euphorbia tirucalli* L.



Maria de Fátima Rocha de Lima^a, Luziene A. Cavalcante^a, Emily Cintia Tossi de Araújo Costa^d, Bruno Oliveira de Veras^b, Márcia Vanusa da Silva^c, Lívia Nunes Cavalcanti^a, Renata Mendonça Araújo^{a,*}



<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200217>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 32, No. 3, 626–637, 2021
 Printed in Brazil - ©2021 Sociedade Brasileira de Química

Article

Synthesis of Hydroxybenzodiazepines with Potential Antioxidant and Antifungal Action

Elizeu C. Caiana,^a Bruno O. de Veras^b, Antônia L. de Souza^a and Neide Queiroz^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

^bDepartamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife-PE, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

South African Journal of Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sajb

Chemical composition of *Libidibia ferrea* var. *ferrea* aqueous extract for antimicrobial purpose and cytogenotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells



Mychely S. Melo Luna^{a,1}, Raísa Ferreira Costa^{a,1}, Silvany de Sousa Araújo^a, José Rafael da Silva Araújo^a, Paulo Henrique Oliveira de Miranda^{b,*}, Bruno Oliveira de Veras^c, Fernanda Granja da Silva Oliveira^a, Wolfgang Harand^d, Carlos Eduardo Santos da Silva^a, Maria Eduarda Torres de Carvalho^a, Márcia Vanusa da Silva^a, Ana Christina Brasileiro-Vidal^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a

^a Centre of Biosciences, Biochemistry Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50670-420, Brazil

^b Federal University of Pernambuco, Post-graduation in Biological Sciences, Recife, PE 50670-420, Brazil

^c Federal University of Pernambuco, Post-graduation in Tropical Medicine, Recife, PE 50670-420, Brazil

^d National Institute of Semi-Arid (Instituto Nacional do Semiárido - INSA), Campina Grande, PB 50670-420, Brazil

NATURAL PRODUCT RESEARCH

2022, AHEAD-OF-PRINT, 1-5

<https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2101050>Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of essential oils extracted from Caatinga Myrtaceae species and chemical composition of *Eugenia pohlana* DC.

Saulo Almeida de Menezes^{a,b,#}, Giulia Bongiorno Galego^{b,#}, Graziela de Vargas Rigo^b, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^c, Bruno de Oliveira Veras^a, Lilian Cortez Sombra Vandesmet^a, Cícero Ramon Bezerra dos Santos^a, Mariana Gomes Vidal Sampaio^a, Clécia de Carvalho Marques^a, Vilmar Luiz Lermen^d, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^c, Márcia Vanusa da Silva^{a,e}, Maria Tereza dos Santos Correia^{a,e}, and Tiana Tasca^b

NEW DEVELOPMENTS IN MEDICAL RESEARCH



Antimicrobial Potential of Essential Oils

Bruno Oliveira de Veras
Yago Queiroz dos Santos
Fernanda Granja da Silva Oliveira
Marcia Vanusa da Silva
Jackson Roberto Guedes da Silva
Maria Tereza dos Santos Correia
Editors



NOVA

Complimentary Contributor Copy