



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM FARMÁCIA**

KAILANE LOURENÇO ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA FRAÇÃO *n*-BUTANÓLICA DAS FOLHAS
DE *Calotropis procera* (Aiton) W.T Aiton (Apocynaceae)**

**CAMPINA GRANDE – PB
2025**

KAILANE LOURENÇO ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA FRAÇÃO *n*-BUTANÓLICA DAS FOLHAS
DE *Calotropis procera* (Aiton) W.T Aiton (Apocynaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Farmácia da
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
BACHARELA EM FARMÁCIA.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Maria Fechine

Coorientador: Me. Natanael Teles Ramos de Lima

**CAMPINA GRANDE – PB
2025**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que, na reprodução, figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A663c Araújo, Kailane Lourenço.

Caracterização fitoquímica, avaliação da toxicidade e da atividade antinociceptiva da fração *n*-butanólica das folhas de *Calotropis procera* (Aiton) W.T Aiton (Apocynaceae) [manuscrito] / Kailane Lourenço Araújo. - 2025.
72 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2025.

"Orientação : Prof. Dra. Ivana Maria Fechine, Departamento de Farmácia - CCBS".

"Coorientação: Prof. Me. Natanael Teles Ramos de Lima, Universidade Federal da Paraíba".

1. *Calotropis procera*. 2. Algodão de seda. 3. Roseosídeo.
4. Toxicidade. 5. Antinocicepção. I. Título

21. ed. CDD 615

KAILANE LOURENCO ARAUJO

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA FRAÇÃO N-BUTANÓLICA DAS FOLHAS DE
CALOTROPIS PROCERA (AITON) W.T AITON (APOCYNACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de BACHARELA EM
FARMÁCIA

Aprovada em: 04/06/2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Ivana Maria Fachine** (***.026.084-**), em **12/06/2025 16:51:59** com chave **b39fdd9247c611f0bf1c2618257239a1**.
- **Emidio Vasconcelos Leitao da Cunha** (***.104.794-**), em **12/06/2025 17:06:02** com chave **aa5d096a47c811f0b9bf2618257239a1**.
- **Alisson Macário de Oliveira** (***.479.334-**), em **13/06/2025 13:49:52** com chave **6d53e490487611f0b6f41a7cc27eb1f9**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QrCode ao lado ou acesse https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/ e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Folha de Aprovação do Projeto Final

Data da Emissão: 13/06/2025

Código de Autenticação: 919d21



Ao meu pai (*in memoriam*), por ter acendido em mim a luzinha do estudo, que continua iluminando e guiando os meus caminhos. À minha mãe, que sempre lutou por mim e hoje caminha ao meu lado nessa jornada. E a todos que me motivam e apoiam, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha mãezinha Nossa Senhora Aparecida, por nunca me abandonarem, mesmo quando eu achava que as situações não tinham mais solução e por toda força, acolhimento e esperança nos dias mais difíceis.

Ao meu pai (*in memoriam*), que, ainda hoje, é uma das minhas fontes de inspiração. O homem mais íntegro, humilde e bondoso que já conheci, cujos ensinamentos continuo seguindo. Sei o quanto debes estar orgulhoso de mim, não tem uma única vez que eu sente pra estudar e não me lembre do senhor, serei eternamente grata. Obrigada por ser meu alicerce.

A minha mãe, meu exemplo de coragem, de alegria, de fé, de bondade e tantas outras qualidades, sempre me ensinando que há tempo de ganhar e tempo de perder, espero um dia aprender. Meu muito obrigada por tudo, por todo apoio, compreensão, atenção, risadas, preocupação e seu cuidado. Que um dia eu posso retribuir todo carinho.

A minha família, em especial a tia Socorro, a que deu meu primeiro jaleco. Obrigada por sempre acreditar em mim e por toda ajuda. Aos meus amigos de graduação, sobretudo, a Elizandro Oliveira, sou imensamente grata a Deus por te colocar na minha vida, não sei o que seria dessa etapa sem teu apoio e amizade

A minha orientadora, Dr^a. Ivana Fachine, pessoa gentil, humilde, compreensiva e atenciosa. Obrigada professora por todos os ensinamentos, confiança, ajuda, disponibilidade e por me apresentar essa área tão linda, que é a Fitoquímica. Ao meu coorientador, Me. Natanael Lima, pelas contribuições e por toda paciência ao me esclarecer os detalhes das técnicas e as minhas dúvidas. Agradeço também a banca avaliadora composta pelos professores Dr. Alisson Oliveira e Dr. Emídio Cunha, pela disponibilidade e pelas relevantes contribuições.

A todos os colegas do LAFIT, pelos aprendizados valiosos, conselhos, conversas e auxílio. Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) da UFPB, por toda a disponibilidade, análises químicas e confecção dos espectros e a UFPE pelos estudos hematológicos e bioquímicos.

A todos os professores do Departamento de Farmácia da UEPB, que tanto contribuíram para minha formação como farmacêutica generalista, em especial, aos professores, Dr^a. Lindomar Bélem, por me acolher e orientar durante os anos de monitoria e de extensão no CIM e ao Dr. Heronides Pereira, pelos ensinamentos valiosos durante o período de monitoria e de orientação no estágio em área específica, assim como ao seu quadro de funcionários.

A UEPB e ao CNPq por terem financiado esta pesquisa, viabilizando sua realização, bem como ao ensino superior público de qualidade, o qual me permitiu este tão sonhado título.

“Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico, ele também é uma criança colocada diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas.”

Marie Curie

RESUMO

Calotropis procera (Apocynaceae), popularmente conhecida como “Algodão de seda”, destaca-se por possuir variadas classes de compostos (flavonoides, terpenos, alcaloides), responsáveis por suas atividades e usos etnofarmacológicos. O trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química, avaliar a toxicidade e a atividade antinociceptiva da fração *n*-butanólica (FB) da espécie. As folhas foram coletadas em Cabedelo, Paraíba, e um espécime encontra-se catalogado em herbário e no SisGen (A9852FB). O extrato etanólico bruto (EEB) foi particionado com solventes em gradiente crescente de polaridade para obtenção da FB. Utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com ionização por Eletrospray (CLAE-IES-EM), no modo negativo, para anotação dos compostos. A FB foi submetida a cromatografia por extração em fase sólida e, deste modo, obtiveram-se 10 frações. A fração 3 (102,9 mg) foi estudada por CLAE analítico e a partir do método desenvolvido foi transposta para escala preparativa, o que resultou em 4 frações. Submeteu-se a fração 4 da CLAE preparativa à análise por RMN de ^1H e ^{13}C , conduzindo ao isolamento da substância CP-R (9 mg). Na avaliação das atividades *in vivo* (CEUA – Unifacisa 03.0001.2024/05.2024), o ensaio de toxicidade oral aguda foi realizado na dose única de 300 mg.kg⁻¹ da FB e os testes antinociceptivos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da formalina nas doses de 3,75, 7,5 e 15 mg.kg⁻¹. Com o estudo por CLAE-IES-EM foram anotadas 7 substâncias, correspondentes a compostos fenólicos e ao megastigmano roseosídeo, inédito na espécie. A partir da análise do perfil do cromatograma da FB, dados espectrais da fração 4, juntamente com as informações contidas na literatura, foi possível inferir que o composto CP-R se tratava do (6S, 9S) roseosídeo, comprovando os dados anotados. No modelo de toxicidade *in vivo* não ocorreram mortes, alterações na evolução absoluta, hematológicas e/ou bioquímicas. A FB (3,75, 7,5 e 15 mg.kg⁻¹) reduziu significativamente o número de contorções abdominais em 51,76, 73,38 e 91,46% e o tempo de lambida de pata em 14,59, 42,23 e 63,83%, na primeira fase do teste, e em 51,17, 81,68 e 91,73% na segunda etapa, respectivamente, quando comparados ao controle. Portanto, sugere-se a presença de 6 compostos fenólicos e do o (6S, 9S) roseosídeo, isolado pela primeira vez na espécie *C. procera*. A FB demonstrou efeito antinociceptivo em todas as doses testadas, com ausência de toxicidade oral, o que reforça a relevância da espécie perante seu uso etnomedicinal e como alternativa terapêutica para o desenvolvimento de fármacos relacionados a modulação da dor.

Palavras-chave: *Calotropis procera*; “algodão de seda”; roseosídeo; toxicidade; antinocicepção.

ABSTRACT

Calotropis procera (Apocynaceae), popularly known as "Algodão de seda" (Silk cotton), stands out for containing various classes of compounds (flavonoids, terpenes, alkaloids), which are responsible for its activities and ethnopharmacological uses. The objective of this study was to conduct the chemical characterization, as well as to evaluate the toxicity and antinociceptive activity of the n-butanol fraction (FB) of the species. Leaves were collected in Cabedelo, Paraíba, and a specimen is cataloged in a herbarium and in SisGen (A9852FB). The crude ethanolic extract (CEE) was partitioned using solvents in a gradient of progressively increasing polarity to obtain the FB. High Performance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS), in negative mode, was used for compound annotation. The FB was subjected to solid-phase extraction chromatography, yielding 10 fractions. Fraction 3 (102.9 mg) was analyzed using analytical HPLC, and the developed method was scaled up to preparative HPLC, resulting in 4 fractions. Fraction 4 from the preparative HPLC was analyzed using ^1H and ^{13}C NMR, leading to the isolation of compound CP-R (9 mg). In the *in vivo* activity evaluation (CEUA – Unifacisa 03.0001.2024/05.2024), an acute oral toxicity assay was performed using a single dose of 300 mg.kg^{-1} of FB. Antinociceptive tests included acetic acid-induced abdominal writhing and the formalin test at doses of 3.75, 7.5, and 15 mg.kg^{-1} . HPLC-ESI-MS analysis led to the annotation of 7 substances, corresponding to phenolic compounds and the megastigmane roseoside, reported for the first time in this species. Based on the FB chromatogram profile, spectral data from fraction 4, and literature comparisons, it was possible to infer that compound CP-R is (6S,9S)-roseoside, confirming the annotation data. No deaths or changes in body weight, hematological, and/or biochemical parameters were observed in the *in vivo* toxicity model. FB (3.75 , 7.5 , and 15 mg.kg^{-1}) significantly reduced the number of abdominal writhes by 51.76%, 73.38%, and 91.46%, and the paw-licking time by 14.59%, 42.23%, and 63.83% in the first phase of the formalin test, and by 51.17%, 81.68%, and 91.73% in the second phase, respectively, compared to the control. Therefore, the presence of six phenolic compounds and (6S,9S) roseoside, isolated for the first time from *C. procera*, is suggested. FB demonstrated antinociceptive effects at all tested doses, with no oral toxicity, reinforcing the relevance of the species in traditional medicine and its potential as a therapeutic alternative for drug development targeting pain modulation.

Keywords: *Calotropis procera*; "algodão de seda"; roseoside; toxicity; antinociception.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mapa da distribuição geográfica da família Apocynaceae.....	15
Figura 2 –	Estruturas botânicas de <i>C. gigantea</i>	17
Figura 3 –	Mapa da distribuição geográfica de <i>C. procera</i>	18
Figura 4 –	Espécie <i>C. procera</i>	18
Figura 5 –	Estruturas dos esqueletos dos flavonoides.....	21
Figura 6 –	Formação do megastigmano-3,9-diol e de 3-oxo- α -ionol.....	22
Figura 7 –	Mecanismo de ativação dos nociceptores.....	25
Figura 8 –	Vias e transmissão da nocicepção.....	26
Figura 9 –	Fluxograma do Fracionamento do EEB e obtenção da FB.....	31
Figura 10 –	Fluxograma do Fracionamento da FB.....	32
Figura 11 –	Cromatograma da FB de <i>C. procera</i> no comprimento de onda de 254 nm.....	33
Figura 12 –	Cromatograma da FB3 em CLAE preparativo.....	34
Figura 13 –	Esquema do Ensaio de Toxicidade Oral Aguda.....	36
Figura 14 –	Esquema do ensaio de contorções induzidas por ácido acético.....	38
Figura 15 –	Esquema do teste de formalina.....	39
Figura 16 –	Cromatograma de pico base da FB das folhas de <i>C. procera</i>	40
Figura 17 –	Proposta de compostos anotados da FB de <i>C. procera</i> por CLAE-IES-EM	42
Figura 18 –	Estrutura do (6S, 9S) roseosídeo.....	44
Figura 19 –	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de CP-R.....	46
Figura 20 –	Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de CP-R na região de 0,6 – 2,7 ppm.....	46
Figura 21 –	Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de CP-R na região de 2,7 – 4,8 ppm.....	47
Figura 22 –	Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de CP-R na região de 4,8 – 7,0 ppm.....	47
Figura 23 –	Espectro de RMN de ^{13}C -BB (100 MHz, DMSO- d_6) de CP-R.....	48
Figura 24 –	Mapa de contorno ^1H - ^{13}C - HSQC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de CP-R...	48
Figura 25 –	Mapa de contorno ^1H - ^{13}C – HMBC (400x100 MHz, DMSO- d_6) de CP-R.	49
Figura 26 –	Efeito antinociceptivo da FB no teste de contorções abdominais.....	53
Figura 27 –	Efeito antinociceptivo da FB no ensaio da formalina.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação dos compostos fenólicos pelos seus esqueletos carbônicos.....	20
Tabela 2 –	Dados do fracionamento da FB.....	32
Tabela 3 –	Dados do método de eluição da FB.....	33
Tabela 4 –	Dados do método de eluição da FB.....	34
Tabela 5 –	Perfil fitoquímico da FB das folhas de <i>C. procera</i> por CLAE-IES-EM ⁿ	41
Tabela 6 –	Dados de RMN (<i>J</i> em Hz e δ em ppm, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) de CP-R comparados com da literatura.....	45
Tabela 7 –	Dados de RMN bidimensional (<i>J</i> em Hz e δ em ppm, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) de CP-R comparados com dados da literatura.....	45
Tabela 8 –	Consumo dos animais submetidos ao teste de toxicidade, tratados com a FB por v.o	50
Tabela 9 –	Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com a FB por v.o.....	50
Tabela 10 –	Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com a FB por v.o.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BB	Broad Brand
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-IES-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massa com fonte de ionização por eletronspray
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EM	Espectrometria de Massas
EtOH	Etanol
FB	Fração <i>n</i> -butanólica
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IL-1 β /IL-6	Interleucina 1 β /6
Me	Metil
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PNs	Produtos Naturais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – α
TNF-R1	Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1
TRPA1	Receptor de Potencial Transiente 1
UFLC	Ultra Fast Liquid Chromatography
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UDP-glicose	Uridina Difosfato de Glicose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Família Apocynaceae.....	15
2.2	Gênero <i>Calotropis</i>	16
2.3	<i>Calotropis procera</i> (Aiton) W.T (Aiton).....	17
2.4	Compostos fenólicos.....	20
2.5	Megastigmanos.....	22
2.6	Estudos toxicológicos.....	23
2.7	Dor e Atividade Antinociceptiva.....	24
2.8	Atividade Antinociceptiva e o uso de produtos naturais.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos.....	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Material vegetal.....	30
4.2	Obtenção e Fracionamento por partição do EEB.....	30
4.3	Extração em fase sólida (SPE)	31
4.4	Desenvolvimento de metodologia por CLAE-IES-EM.....	32
4.5	Desenvolvimento de metodologia para isolamento de compostos e caracterização estrutural.....	33
4.6	Experimentos <i>in vivo</i>	35
4.6.1	<i>Procedimentos éticos e Animais experimentais</i>	35
4.6.2	<i>Preparo das substâncias</i>	35
4.6.3	<i>Ensaio de Toxicidade Oral Aguda</i>	36
4.6.4	<i>Avaliação da Atividade Antinociceptiva</i>	37
4.7	Análise de dados.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Caracterização química por CLAE-IES-EM da fração <i>n</i> -butanólica.....	40
5.2	Determinação estrutural do CP-R.....	43
5.3	Experimentos <i>in vivo</i>	49
5.3.1	<i>Ensaio de Toxicidade Oral Aguda</i>	49

5.3.2	<i>Avaliação da Atividade Antinociceptiva.....</i>	52
6	CONCLUSÃO	57
7	PERSPECTIVAS.....	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO RESUMO SOBRE A CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FB.....	69
	ANEXO B – CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA DO RESUMO...	69
	ANEXO C – APRESENTAÇÃO DO TRABALHO NO ENIC.....	70
	ANEXO D – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	71
	ANEXO E – TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL.....	72

1 INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos à base de plantas medicinais remonta a milhares de anos (Dogara Abdulrahman *et al.*, 2018). De acordo com Newman; Cragg (2020), no período de 1981 a 2019, os produtos naturais se destacaram como fonte promissora de compostos bioativos para produção de fármacos, objetivando o tratamento de inúmeras doenças, como as neoplasias e as parasitoses, sendo a terapia anti-infecciosa dependente destes produtos. Assim, a utilização de processos que visem o isolamento e a identificação mais rápida dos metabólitos secundários é de suma importância, uma vez que os estudos *in vitro* e *in vivo* se tornam mais céleres (Farang; Porzel; Wessjohann, 2012; Wolfender; Terreaux; Hostettmann, 2000).

Outrossim, técnicas analíticas, como cromatografia, espectrometria e espectroscopia possibilitam a obtenção e caracterização dos compostos advindos das espécies vegetais de maneira mais ágil. A integração e o aprimoramento de técnicas hífenadas, tais como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Espectrometria de Massas (EM) facilitam a busca de informações mais seletivas e sensíveis das substâncias, uma vez que os equipamentos usados são de alta capacidade (Pang *et al.*, 2016). Assim, facultam isolamentos em menores quantidades de compostos e os direciona para substâncias de interesse e para identificação de moléculas com estruturas mais complexas, por exemplo (Ganzera; Sturm, 2018).

A integração de estudos da etnobotânica, da química e da farmacologia são essenciais para subsidiar a produção de novos fármacos (Sganzerla *et al.*, 2021). Nesse ínterim, os medicamentos utilizados na terapêutica atual da analgesia são frequentemente associados a efeitos colaterais. Os opioides, os principais fármacos usados para o alívio da dor, podem acarretar potencial dependência, já os anti-inflamatórios não esteroides ou os corticoesteroides, também empregados no tratamento, são associados a problemas gastrointestinais e distúrbios no sistema imune (Khademi *et al.*, 2016). Assim, o desenvolvimento de novos analgésicos, por exemplo, advindos de fontes vegetais, que ofereçam determinada segurança se torna necessário, assim como o perfil de toxicidade destes deve ser avaliado antes do consumo (Mahmoodi; Mohammadi; Enayati, 2016; Nakakaawa *et al.*, 2023).

Nesse sentido, a família Apocynaceae apresenta significativa importância, visto que compreende um grupo de plantas com propriedades terapêuticas notórias. É empregada nos compêndios de medicina tradicional chinesa, indiana, unani e tailandesa, como também é comumente utilizada em pesquisas evolutivas e bioquímicas (de Souza *et al.*, 2024). Pertencente a essa família, evidencia-se a espécie *Calotropis procera* (Aiton) W.T Aiton. Esta se caracteriza por possuir importantes metabólitos secundários responsáveis por suas

propriedades farmacológicas, como a anti-inflamatória, anticancerígena, antimicrobiana, dentre outras (Wadhwani *et al.*, 2021). Contudo, estudos químicos e farmacológicos da fração *n*-butanólica da espécie, principalmente, em relação a atividade antinociceptiva são poucos na literatura, sendo mais avaliados os de extratos, desse modo, pesquisas mais aprofundadas devem ser realizadas para elucidação de novos compostos e testes biológicos.

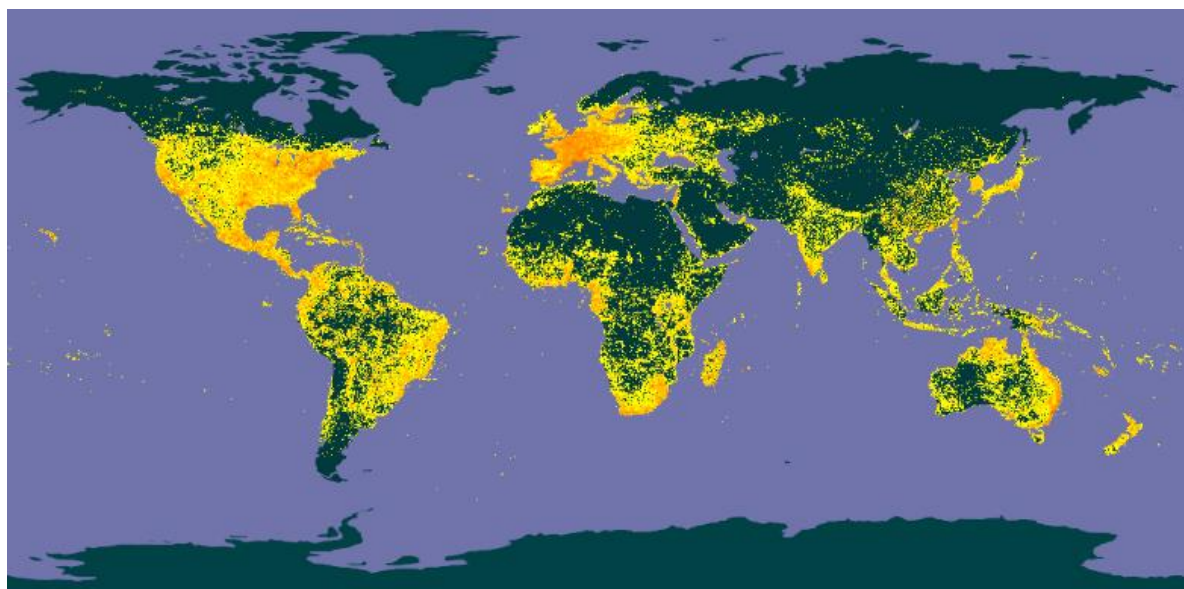
A busca por fármacos mais eficazes, potentes e com mínimos efeitos colaterais destaca a necessidade de novos estudos voltados à descoberta de amostras com potencial terapêutico (Bittencourt; Caponi; Maluf, 2013). Dessa maneira, o trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química da fração *n*-butanólica, obtida do particionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas da espécie *C. procera* (Apocynaceae), assim como avaliar sua toxicidade e atividade antinociceptiva, visando o desenvolvimento de novas opções farmacológicas para o tratamento da dor.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Apocynaceae

Apocynaceae é uma das maiores famílias do reino vegetal, tendo destaque representativo nas angiospermas. Pertence à ordem Gentianales, com cerca de 424 gêneros e mais de 4,600 espécies distribuídas em cinco subfamílias: Apocynoideae, Asclepiadoideae, Periplocoideae, Rauvolfioideae e Secamonoideae (de Souza *et al.*, 2024; Endress, 2014), com dispersão em todos os continentes, exceto na Antártica (Figura 1). No Brasil, são relatados 77 gêneros e 753 espécies, com ocorrência das três primeiras subfamílias supracitadas e sendo encontrada em todos os domínios fitogeográficos brasileiros. Já no Nordeste é visualizada nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe (Morokawa; Simões; Kinoshita, 2013; Zappi *et al.*, 2015).

Figura 1 – Mapa da distribuição geográfica da família Apocynaceae



Fonte: Apocynaceae no Secretariado do GBIF (2023). Taxonomia do Backbone do GBIF. Conjunto de dados da lista de verificação <https://doi.org/10.15468/39omei> acessado via GBIF.org em 21/01/2025.

As plantas desta família apresentam características morfológicas distintas. Geralmente, são representadas por trepadeiras, mas o restante do grupo é formado por arbustos ou árvores de pequeno ou médio porte, entretanto, algumas podem crescer sob a forma de vida ereta ou lianescente (Lens *et al.*, 2009). Suas folhas são simples, opostas cruzadas, com corola perflorada, pólen disposto em mônades ou tétrades e caducas. Já as flores se caracterizam por serem actinomorfas, pequenas ou grandes, hermafroditas e tipicamente pentâmeras. O fruto é frequentemente desenvolvido, seco capsular, folicular ou drupáceo (Bhadane *et al.*, 2018)

Além disso, demonstra um importante valor econômico com os mais variados fins lucrativos. O látex produzido pelas espécies da família é comumente utilizado na produção de borracha, sua madeira é bastante aproveitada na área da construção, as flores para ornamentação de ambientes (Silva, 2024). A polpa da Mangabeira (*Hancornia speciosa*), espécie nativa do Brasil e pertencente à família Apocynaceae, é muito usado na produção de licores e no setor agroecológico (Nogueira *et al.*, 2024). Como também, pôr possuir altas concentrações de ácidos graxos saturados e óleo, *Cintanthe grandiflora* (Apocynaceae) se torna uma matéria prima interessante industrialmente e uma alternativa ao óleo convencional (Morais *et al.*, 2021)

Seguidamente, em uma revisão recente sobre a fitoquímica da família Apocynaceae observou-se que, ela se destaca por possuir uma gama de metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides, terpenos, glicosídeos cardenolídeos, esteroides, compostos fenólicos simples e liganas (Bhadane *et al.*, 2018). Assim, esses grupos de substâncias são responsáveis por sua diversidade farmacológica, a qual compreende propriedades, anti-inflamatórias, antimicrobianas, larvicidas, leishmanicidas, antioxidantes e citotóxicas (Noradina *et al.*, 2024). Desse modo, em decorrência desses potenciais econômico, químico e farmacológico a família evidencia-se como fonte promissora de novos compostos para o desenvolvimento de fármacos.

2.2 Gênero *Calotropis*

Calotropis é um pequeno gênero pertencente a subfamília Asclepiadoidea, subclasse Asteridae e constituído por 5 espécies: *C. acia* Buch.-Ham, *C. heterophylla* Parede., *C. spec* (Linnaeus, 1753) R. Br., *C. gigantea* (L.) R.. Br. e *C. procera*, sendo as duas últimas as principais. Estas são mais encontradas em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Malásia, Filipinas e Paquistão, sendo introduzidas na América do Sul e Central. O nome do gênero deriva do latim “*kalos*” que significa bonito e “*tropis*” com significado de quilha, o qual é atribuído as cinco partes que radiam da estrutura em pentágono central de cada flor (Oliveira; Souto, 2009).

É caracterizado por apresentar espécies arbustivas perenes, xerófitas ou pequenas árvores laticíferas de até 2,5 metros. Suas folhas são simples, opostas cruzadas e subsésseis, já suas flores exibem características parecidas, mas com coloração branca e roxa e não são perfumadas. O caule é simples, lenhoso, ramificado na base e coberto com cascas cortiça (Figura 2) (Joseph; George; Charles, 2013; Sharma *et al.*, 2016). Além disso, o gênero demonstra um potencial valor econômico, por exemplo a fibra advinda do caule e da casca da semente é muito usada na fabricação de polímeros compostos em substituição às fibras sintéticas, o que é interessante para aplicações industriais (Ramesh *et al.*, 2021).

Figura 2 – Estruturas botânicas de *C. gigantea*



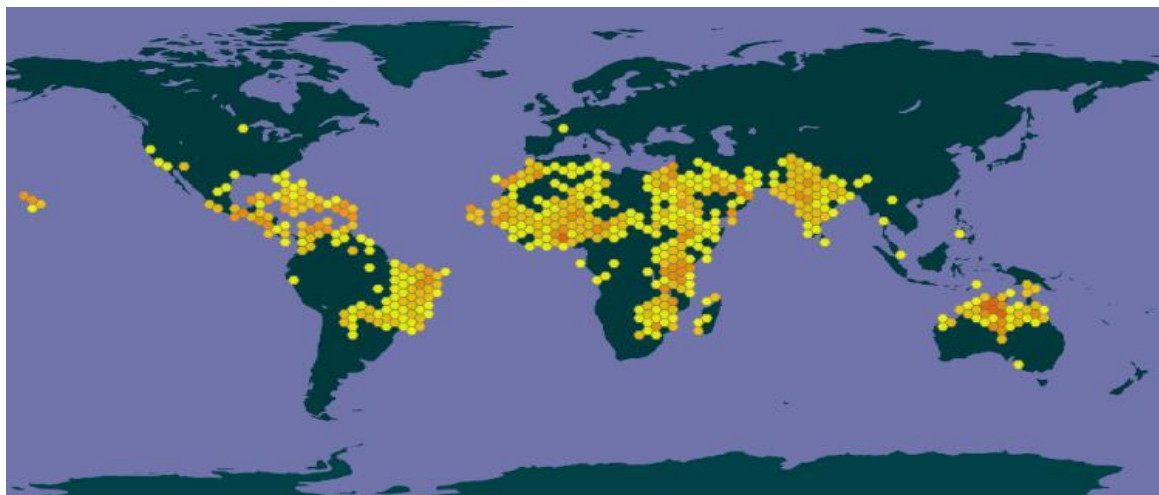
Fonte: adaptado de GBIF.org.

Ademais, o gênero *Calotropis* é bastante conhecido em diversos sistemas medicinais tradicionais, como a Ayurveda. Isso se deve à presença de fitoconstituintes como cardenolídeos (coroglaucigenina, calotropina), flavonoides (quercetina, isorhamnetina), terpenos (anidrosoforadiol-3acetato, caloreopiesterterpenol) nas mais variadas partes das plantas (folhas, flores, caule, raíz). Estes metabolitos garantem suas atividades biológicas, dentre elas, a antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antifúngica (Abeyasinghe, 2018; Ali-Seyed; Ayesha, 2020). Dessa maneira, o gênero se destaca por apresentar espécies com relevância de estudo nos âmbitos químico e farmacológico visando a descoberta de novas opções terapêuticas.

2.3 *Calotropis procera* (Aiton) W.T (Aiton)

C. procera, popularmente, conhecida popularmente como algodão de seda, flor de seda, ciumeira, é um arbusto perene pertencente à família Apocynaceae, sendo considerada nativa do norte da África, Península Arábica, Oriente Médio e sul da Ásia (Figura 3) (Al-Rowaily *et al.*, 2020). Não é endêmica no Brasil, apresentando-se em maior concentração na região Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), contudo pode ser encontrada também nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Goiás (Fabricante; Oliveira; Siqueira Filho, 2013).

Figura 3 – Mapa da distribuição geográfica de *C. procera*



Fonte: *Calotropis procera* (Aiton) W.T (Aiton) no Secretariado do GBIF (2023). Taxonomia do Backbone do GBIF. Conjunto de dados da lista de verificação <https://doi.org/10.15468/39omei> acessado via GBIF.org em 21/01/2025.

Foi introduzida no Brasil como planta ornamental, no entanto se disseminou para além das áreas cultivadas e colonizou diversos habitats com diferentes características ambientais, sendo uma planta invasora do bioma Caatinga (Al Sulaibi; Thiemann; Thiemann, 2020). É caracterizada por folhas grandes, opostas, verde-claras, suculentas e cobertas com cera cuticular ao longo do caule, suas flores são dispostas em cachos, umbeliformes, com cinco pétalas variando de coloração de branco, rosa ou roxa. O caule tem uma casca fissurada, sulcada e de coloração cinza, assim como a espécie apresenta um fluxo de seiva branca (látex) obtido quando o caule e as folhas são cortados, os frutos são elipsoides ou ovoides com pelos brancos (Figura 4) (Kaur *et al.*, 2021).

Figura 4 – Espécie *C. procera*



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Seu cultivo é realizado para inúmeras utilidades, sendo *C. procera* uma fonte emergente de fibra natural, a qual é renovável, com baixa densidade, alta resistência, capacidade de sorção de óleo bruto e características hidrofóbicas-oleofílicas (Raghu; Goud, 2020; Sobral Hilário *et al.*, 2019), o que é bastante solicitado pelas indústrias. Além disso, é utilizada como alternativa para forragem durante a escassez, como biocombustível, uma vez que produz hidrocarbonetos interessantes e também com fonte de corantes naturais para tecidos (Al Sulaibi; Thiemann; Thiemann, 2020; Batool *et al.*, 2020; Hussaan *et al.*, 2017). Desse maneira, se mostra como uma fonte imprescindível e versátil para a indústria e para a economia

A espécie apresenta relevância no âmbito farmacológico, uma vez que estudos mostram suas importantes atividades biológicas, como anti-helmínticas, hepatoprotetoras, antinociceptivas, anti-inflamatórias, antitumorais, antimicrobianas, antioxidantes, anticonvulsivantes e antidegenerativas (Mali; Rao; Jadhav, 2019; Obese *et al.*, 2018, 2021; Wadhwani *et al.*, 2021). Os fitocompostos, flavonoides, alcaloides, saponinas, terpenos, cardenólídeos e esteroides, presentes nas variadas partes da planta (raízes, folhas, flores, látex, caule) são considerados os responsáveis por tais propriedades supracitadas (Ali Esmail-Al-Snafi, 2015; Kumar *et al.*, 2019; Rabelo *et al.*, 2021).

Ademais, pesquisas acerca da toxicidade aguda *in vivo* realizadas com extratos aquosos das folhas e das raízes na dose de 3000 mg.kg⁻¹ não apresentaram nenhuma manifestação comportamental incomum e não sucederam relatos de mortalidades. Para o modelo experimental de toxicidade subaguda, resultados análogos foram observados, bem como não foram visualizadas descrições de alteração de peso em comparação ao grupo controle (Kinda *et al.*, 2019).

Singh; Bhushan; Agrahari, (2024) relataram em sua pesquisa que proteínas extraídas do caule e das raízes da espécie, nas doses de 1 e 5 mg.kg⁻¹, foram capazes de reduzir o processo inflamatório de modo dose dependente no modelo experimental edema de pata, assim como minimizaram os níveis do Fator de Necrose Tumoral - α (TNF- α) e de prostaglandinas, agentes pró-inflamatórios. Tour; Talele, (2011) afirmaram que a fração acetato de etila e butanólica, particionadas do extrato hexânico da casca do caule em uma dose de 20 mg.kg⁻¹ exibiram atividade frente à inflamação através do ensaio de indução do edema de pata por carragenina.

Logo, a espécie se apresenta como uma rica fonte biológica e com um elevado viés a ser estudado, principalmente em relação a atividade antinociceptiva que é pouco descrita na literatura, assim como para descoberta de novas moléculas com interesse farmacêutico, a partir, por exemplo, da fração em estudo.

2.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários formados por anéis aromáticos que possuem pelo menos um de seus hidrogênios substituídos por um grupo hidroxila. Podem ser encontrados na natureza na forma de glicosídeos (*O*-glicosídeos e *C*-glicosídeos) ou agliconas, matriz ou compostos de ligação livre e compreendem, principalmente, a estruturas polimerizadas ou monoméricas (Schafranski *et al.*, 2019), os que apresentam mais de um grupo fenólico são chamados de polifenóis (Das; Goud; Das, 2019).

De acordo com a estrutura química dos compostos fenólicos pode haver diferenças na sua biodisponibilidade e ações biológicas (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Esta classe é organizada com base em seus esqueletos principais que variam a partir do anel benzênico (C_6) e dos substituintes que podem apresentar n -átomos de carbono (C_n), como pode ser visto na Tabela 1 (Simões, 2007). Além disso, existem duas vias envolvidas na sua biossíntese a do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico, sendo a primeira a principal (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Classificação dos compostos fenólicos pelos seus esqueletos carbônicos

Esqueleto básico	Classe dos fenólicos
C_6	fenóis simples, benzoquinonas
C_6-C_1	ácidos fenólicos
C_6-C_2	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C_6-C_3	fenilpropanoides: ácido cinâmico e análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C_6-C_4	naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	xantonas
$C_6-C_2-C_6$	estilbenos e antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	flavonoides e isoflavonoides
$(C_6-C_3)_2$	lignananas
$(C_6-C_3-C_6)_2$	biflavonoides
$(C_6)_n$	melaninas vegetais
$(C_6-C_3)_n$	ligninas
$(C_6-C_1)_n$	taninos hidrolisáveis
$(C_6-C_3-C_6)_n$	taninos condensados

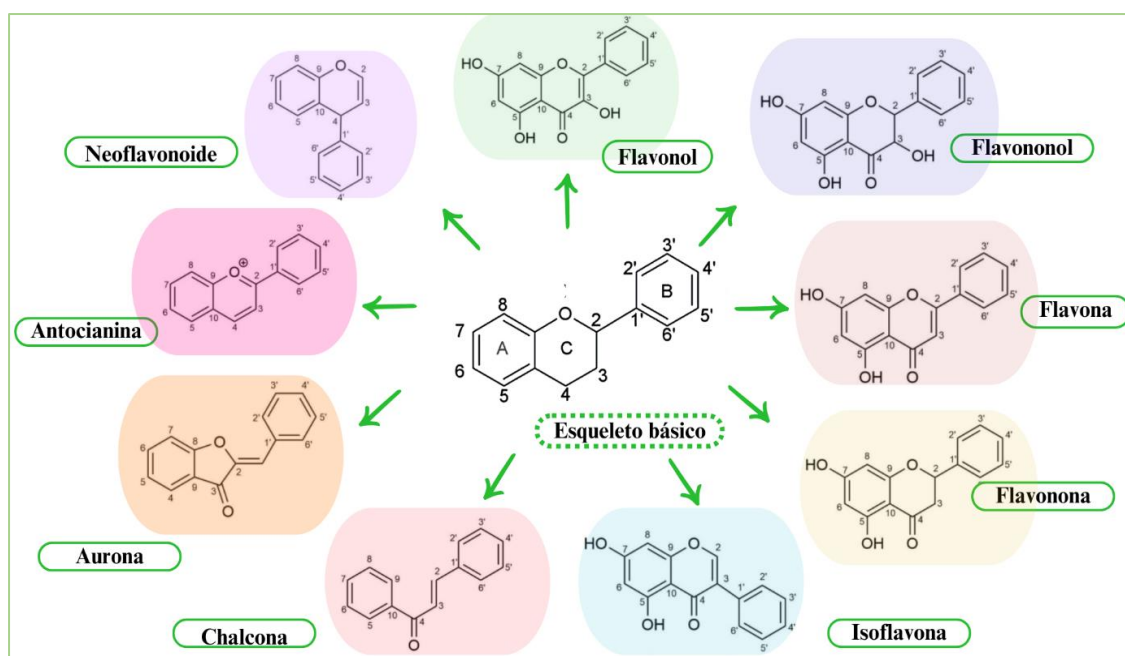
Fonte: Simões, 2007.

Ademais, levando em consideração a estrutura da aglicona podem ser divididos em não flavonoides e flavonoides. A exemplo dos não flavonoides se tem os ácidos fenólicos, que possuem um esqueleto carbônico C_6-C_1 . São classificados em hidroxibenzóicos, como os ácidos gálico, vanílico, siríngico e *p*-hidroxibenzóico, que apresentam a estrutura básica C_6-C_1 e ácidos

hidroxicinâmicos, como o cafeico, ferúlico, sinápico e *p*-cumárico, com o esqueleto C₆-C₃, assim como as cumarinas são derivadas dessa subclasse (Das; Goud; Das, 2019; Couto, 2003). Os ácidos fenólicos apresentam atividades biológicas interessantes, como a antioxidante, antinociceptiva (Soares, 2002).

Os flavonoides são os fenólicos mais abundantes na natureza, sendo constituídos por uma estrutura carbônica C₆-C₃-C₆, no qual a ponte C-3 entre os grupos fenil é geralmente ciclizada com o oxigênio. Diferentemente dos ácidos fenólicos, apresentam biossíntese mista, sendo o Anel A gerado a partir do metabolismo do chiquimato e o anel B da via do acetato-malonato, já o anel C sofre variações formando suas subclasses, as flavonas, flavononas, flavonóis, isoflavonas, auronas, chalconas, biflavonoides, neoflavonoides e antocianidinas (Figura 5) (Bravo, 2009; Ross; Kasum, 2002; Costa, 2003).

Figura 5 - Estruturas dos esqueletos dos flavonoides



Fonte: adaptado de Lima, 2020; Panche; Diwan; Chandra, 2016.

Seguidamente, esta classe pode estar na forma *O*-glicosilada ou *C*-glicosilada nas espécies vegetais. A unidade osídica usualmente é inserida com a substituição do grupo hidroxila nos carbonos 3 ou 7 nos *O*-glicosídeos e C-6 ou C-8 nos *C*-glicosídeos, a partir do nucleosídeo difosfato de açúcar, como a uridina difosfato de glicose (UDP-glicose) (Sandhar *et al.*, 2011). Os flavonoides demonstram importantes propriedades farmacológicas, como antioxidante (Zheng *et al.*, 2019), cardioprotetora, quimioprotetora e neuroprotetora (Williams; Spencer; Rice-Evans, 2004; Xie *et al.*, 2018) antifúngica, antimalárico e antidiabéticos (Ullah

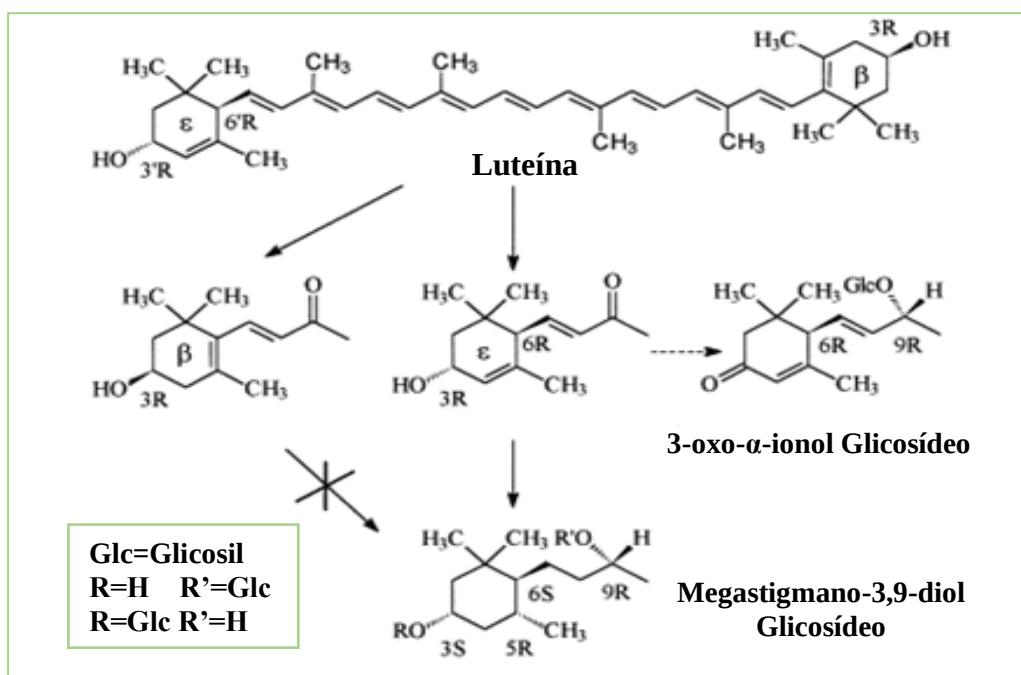
et al., 2020). Desse modo, o estudo fitoquímico e farmacêutico desse grupo de substâncias é cada vez mais crescente, uma vez que possuem esta riquíssima diversidade de propriedades.

2.5 Megastigmanos

Os megastigmanos são os norisoprenoides produzidos por plantas mais abundantes na natureza. Tem sua formação baseada em um esqueleto com um anel de seis membros ligado a uma cadeia com quatro átomos de carbono na posição C-6. Nas posições C-5 pode haver substituição por um metil, C-1 por um dimetil e, geralmente, são formados por 13 átomos de carbono (Samra *et al.*, 2024). O primeiro megastigmano foi obtido de *Boronia megastigma* (Rutaceae) e seu glicosídeo de *Cantharantus roseus* (Apocynaceae), o roseosídeo (Otsuka; Tamaki, 2002)

A formação de C₁₃- norisoprenoides envolve a decomposição de carotenoides. Na primeira etapa das três que envolvem a rota biossintética, ocorre a degradação enzimática de carotenoides por oxidases, resultando em produtos C₁₃- com uma carbonila na cadeia lateral e que possuem um anel de 6 membros derivado do precursor. Na segunda etapa ocorre a mudança do grau de oxidação dos produtos primários por oxidases e redutases. Por último, sucede a glicosilação dos norisoprenóides possuindo o grupo hidroxila por glicosiltransferases (Baumes *et al.*, 2002) (Figura 6).

Figura 6 - Formação do megastigmano-3,9-diol e de 3-oxo- α -ionol



Fonte: Baumes *et al.*, 2002.

Para os glicosídeos, produtos da degradação dos carotenoides, desta classe de compostos, Samra *et al.*, (2024) ainda citam importantes atividades biológicas, como antialérgicas, antioxidantes, neuroprotetoras, anti-inflamatórias, antimelanogênicas, citotóxicas, antibacterianas, antivirais, dentre outras. Nesse sentido, é um grupo de substâncias com elevado interesse químico e farmacológico e dessa maneira reforça que a busca por novos compostos, atividades e elucidação de possíveis mecanismos podem ser um âmbito a ser estudado.

2.6 Estudos toxicológicos

Para investigar o perfil de segurança dos compostos químicos, os estudos de toxicidade são imprescindíveis (Dias, 2015). As alterações causadas por substâncias tóxicas no organismo podem ser reversíveis ou irreversíveis, a depender de como os eventos moleculares, celulares ou teciduais irão ocorrer, assim como as características do indivíduo (sexo, idade) podem influenciar (Deyno *et al.*, 2020). Desse modo, o estudo das consequências ou dos efeitos tóxicos é o foco principal da toxicologia, a qual busca compreender os riscos da exposição humana a estas substâncias em potencial e estabelecer suas condições seguras de uso (Ramalho, 2015).

À vista do exposto, tradicionalmente, a toxicidade associada às plantas medicinais é ignorada, uma vez que por acharem que é natural, os indivíduos presumem que as terapias são isentas de riscos (Dogara, 2023; Turolla; Nascimento, 2006). Entretanto, é visto na literatura que há efeitos adversos ocasionados por substâncias vegetais que atuam no tratamento da dor, por exemplo (Oliveira *et al.*, 2022), assim como tais compostos podem desencadear reações adversas, atribuídas a contaminantes ou a adulterantes presentes nas preparações naturais (Turolla; Nascimento, 2006). Nesse ínterim, fica evidenciada a importância dos estudos toxicológicos nesse âmbito posto que a validação do seu uso seguro pode resultar na ampliação de novas opções terapêuticas.

Agências regulatórias têm apresentado protocolos para a realização de testes toxicológicos, como a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Um dos ensaios preconizados pela OECD é o de toxicidade aguda, N° 423, neste tem-se níveis fixos de doses a serem escolhidas, sendo elas 5, 50, 300 e 2000 mg.kg⁻¹ de peso corporal. Para decidir qual será a inicial é aconselhável levar em consideração qual causará maior probabilidade de mortalidade nos animais dosados, a partir de estudos já relatados.

Ademais, quando estes são escassos ou não há informações sobre o extrato a ser analisado, por exemplo, é recomendada a dose de 300 mg.kg⁻¹, por segurança e bem estar do animal, caso a morte de nenhum deles ou apenas de um seja verificada, segue-se para maior

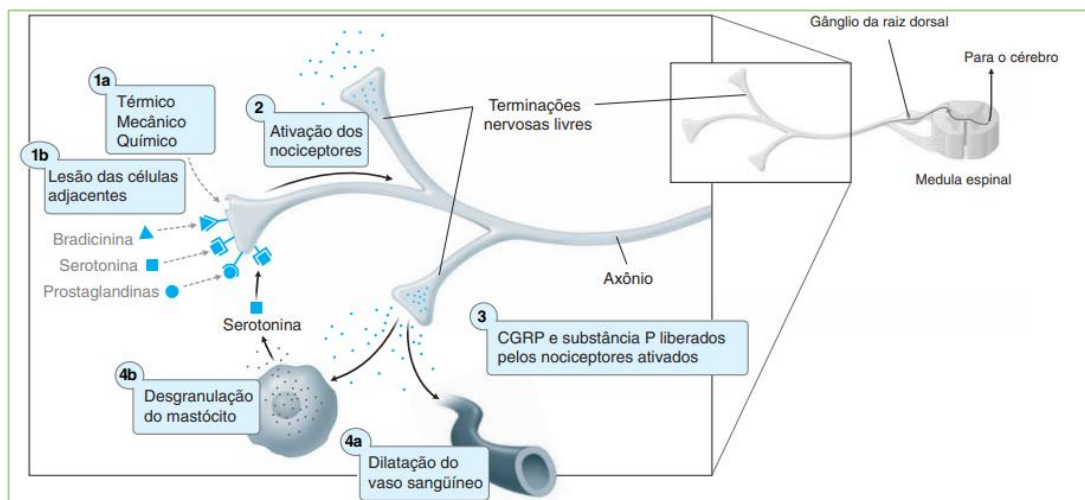
dose. Nesse contexto, os estudos toxicológicos reforçam a garantia de segurança do uso de determinada substância, estabelecendo limites seguros de aplicação e auxiliando no desenvolvimento de novos medicamentos (de Oliveira *et al.*, 2018).

2.7 Dor e Atividade Antinociceptiva

A dor é uma resposta direta decorrente a um evento indesejável, que pode estar associado a lesões teciduais ou cerebrais e apresenta um caráter subjetivo (Rang *et al.*, 2016). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (2020), ela resulta de uma experiência sensitiva e emocional desagradável acompanhada de uma lesão tecidual real ou potencial. Ao desempenhar um papel fisiológico fundamental, a dor é responsável por controlar a homeostasia do organismo, assim a sensação dolorosa é um relevante sinal clínico a qualquer fator ameaçador deste (Julius; Basbaum, 2001). Na população brasileira a prevalência de dor crônica (longa duração) é de 39 a 76%, sendo a principal causa de limitação, incapacidade e sofrimento (Kanematsu *et al.*, 2022).

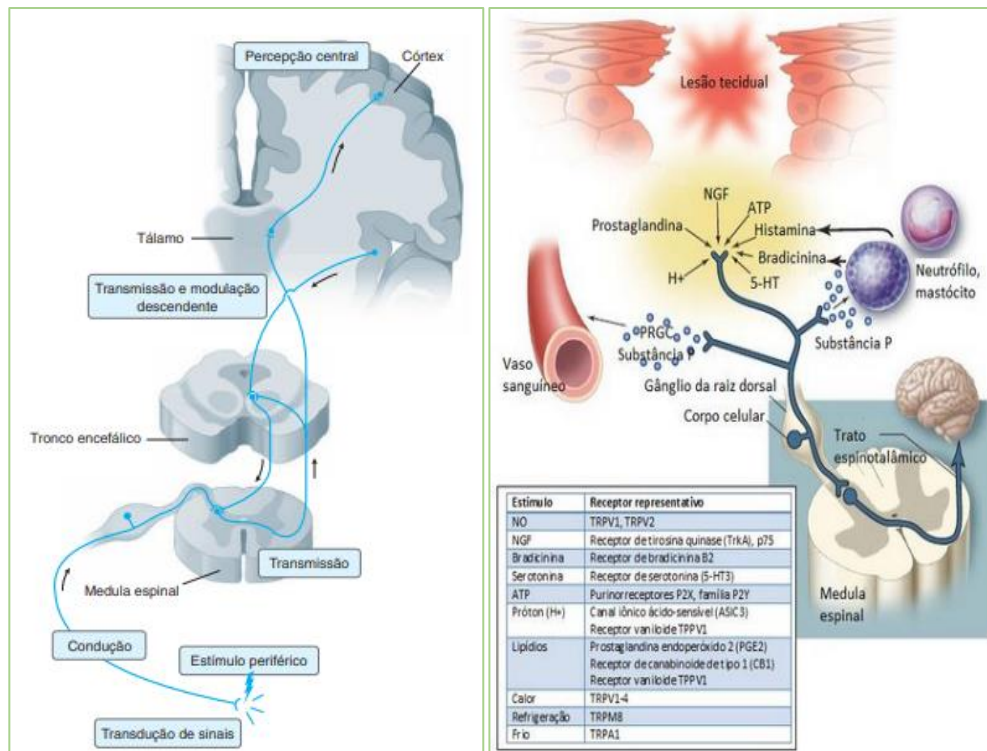
Dentre as várias classificações, a dor pode ser subdividida de acordo com sua origem em nociceptiva e inflamatória. A dor nociceptiva representa um mecanismo de sensibilização e consequentemente mudança na funcionalidade dos neurônios e das vias envolvidas na percepção da dor, ocasionada por uma hiperexcitabilidade da membrana e acomete quadros de dor neuropática, por exemplo (Ashmawi; Freire, 2016). Já a percepção da dor inflamatória ocorre através de um dano celular prejudicial após lesões cirúrgicas, traumáticas, teciduais. Esta é adaptativa e protetora resultante da ativação do sistema imunológico e há a liberação de mediadores químicos inflamatórios que sensibilizam os neurônios sensoriais periféricos, ocorre a sensibilização central e posteriormente, a sensação de dor (Finnerup; Kuner; Jensen, 2021).

A nocicepção ocorre mediante a percepção de estímulos nocivos, como os químicos, mecânicos e extremos de temperatura (Golan *et al.*, 2009). Os nociceptores são terminações nervosas primárias livres presentes no sistema nervoso periférico e se ativam ao detectar as alterações capazes de causar danos teciduais de modo seletivo, uma vez que é necessário atingir o limiar nocivo para que a excitação aconteça. Estes são distribuídos por variados tecidos e órgãos, como na pele e vísceras, sendo responsáveis por conduzir informações nocivas da periferia até os centros integrais centrais para que haja a resposta protetiva (Figura 7) (Basbaum *et al.*, 2009; Grubb; Pasvankas, 2019; Julius; Basbaum, 2001).

Figura 7 – Mecanismo de ativação dos nociceptores

Fonte: Golan *et al.*, 2009.

Ademais, o processamento neural dos estímulos nocivos que culminam no evento doloroso se dá por meio de uma sequência de mecanismos: transdução, transmissão, modulação e percepção (Figura 8). Ao ocorrer a lesão no tecido, por exemplo, substâncias como ácido araquidônico, histamina, serotonina, acetilcolina e substância P são liberadas (Kendroud *et al.*, 2017). Seguidamente, irão promover a ativação direta dos nociceptores que transmitem o estímulo periférico, oriundo do neurônio aferente à medula espinal (corno anterior), através dos potenciais de ação gerados na fibra, principalmente as do tipo C, que compreendem cerca de 70% dos nociceptores e a A δ . A modulação ocorre pelo recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão e liberação de opioides endógenos para minimizar a dor ao dano. Já a percepção resulta da interação de estruturas corticais para localizar o estímulo lesivo, reconhecê-lo como doloroso e enviar a resposta eferente apropriada para periferia (Grubb; Pasvankas, 2019).

Figura 8 – Vias e transmissão da nocicepção

Fonte: Golan *et al.*, 2009; Oaklander, 2014

Em resumo, como resposta a um trauma ou infecções, pode haver um processo inflamatório o qual gera respostas que resultam na migração de células imunes, liberação de citocinas, como o TNF- α , lipoxinas, prostaglandinas, leucotrienos que sensibilizam diretamente os nociceptores e ocasionam uma resposta dolorosa (Etienne; Pereira Dias Viegas; Viegas Jr., 2020). A exemplo, o TNF- α , durante o processo inflamatório ativa o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNF-R1), resultando na excreção das IL1- β e a IL-6. Os macrófagos, agora ativados, expressam a IL-1 β que sensibiliza as fibras nervosas dos neurônios sensoriais primários e culmina na hipersensibilidade à dor (Vitale; Ribeiro, 2007; Xiang *et al.*, 2019).

Assim sendo, dentre a gama de testes pré-clínicos *in vivo* utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva, os modelos experimentais de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste da formalina se destacam. O primeiro é um ensaio de triagem, não seletivo de dor inflamatória visceral, no qual há a liberação de mediadores inflamatórios que estimulam a nocicepção nos animais (Frias; Merighi, 2016; Pinheiro *et al.*, 2011a). No teste da formalina, o formaldeído injetado na pata posterior do animal produz estímulo direto dos nociceptores, caracterizado por lambidas e mordidas no local da injeção. Este é um modelo

válido, bifásico e de maior especificidade de percepção da nocicepção, sendo utilizado para o esclarecimento de possíveis mecanismos antinociceptivos (Hunnskaar; Hole, 1987).

2.8 Atividade Antinociceptiva e o uso de produtos naturais

Os produtos naturais são considerados a maior biblioteca de substâncias biologicamente ativas da terra (Newman; Cragg, 2020). Assim sendo, o uso de plantas, um dos principais exemplos de PNs, como agentes analgésicos na medicina tradicional é uma prática antiga, com uma estimativa de 70.000 espécies de plantas utilizadas etnomedicinalmente em todo o mundo (Jabbari; Zakaria; Mohammadi, 2025). Nesse contexto, estas se destacam por compor cerca de 25% de todos os medicamentos prescritos para uso clínico de modo global (Sen; Chakraborty, 2017). Nesse viés, se apresentam como uma importante fonte promissora no desenvolvimento de novas drogas.

Diante do exposto, no século XIX teve início a busca por moléculas com ação no SNC, voltadas para à modulação da dor e com propósitos terapêuticos, sendo muitas dessas substâncias originadas de PNs. A exemplo, os estudos sobre o alcaloide morfina da *Papaver somniferum* L. conduziram a identificação do sistema opioide, pesquisas com os canabinoides da *Cannabis sativa* L. possibilitaram a identificação dos receptores e do sistema endocanabinoide (Gomes *et al.*, 2009). Outrossim, em uma revisão recente foi constatado que existem diversos metabólitos secundários comprovadamente eficazes para o tratamento e alívio da dor, como a morfina, o canabidiol e o ácido acetilsalicílico (Oliveira *et al.*, 2022).

Não obstante, estudos revelam que importantes classes de metabólitos secundários atuam na regulação da dor: os flavonoides tem papel indubitável no controle dessa problemática devido a sua atividade antioxidante, inibição da lesão celular, diminuição do estresse oxidativo e pela modulação da proteína quinase C, assim modulando os mais diversos mecanismos; os terpenos atuam no SNC regulando neurotransmissores, com função na dor crônica, como a dor neuropática, assim como os alcaloides, em especial os indólicos (Rauf *et al.*, 2016). Dessa maneira, é imprescindível os estudos fitoquímicos e farmacológicos das espécies vegetais, uma vez que a química de produtos naturais representa uma alternativa indubitável e historicamente privilegiada para síntese e produção de novos fármacos.

Outrossim, compostos de origem vegetal têm sido reconhecidos por suas propriedades analgésicas consideráveis, apresentando poucos efeitos adversos (Franzotti *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2011b). A exemplo, muitos flavonoides estão se tornando candidatos a novos analgésicos naturais (Xiao *et al.*, 2016). Dessa maneira, são considerados substitutos terapêuticos para modular a nocicepção, uma vez que medicamentos analgésicos opioides, não

opioides apresentam elevados efeitos colaterais (Andrade *et al.*, 2021; Vella-Brincat; Macleod, 2004; Wolfe; Lichtenstein; Singh, 1999). Nesse sentido, estudar novas opções farmacológicas advindas de plantas medicinais é uma alternativa promissora (Mishra; Tiwari, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização química da fração *n*-butanólica, obtida do particionamento do extrato etanólico bruto (EEB), das folhas da espécie *C. procera* (Apocynaceae), assim como avaliar sua toxicidade e atividade antinociceptiva.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o EEB das folhas da espécie *C. procera*;
- Realizar particionamento do EEB, obter a fração *n*-butanólica e analisa-la por métodos cromatográficos;
- Desenvolver metodologia de CLAE-IES-EM para uma ampla caracterização dos constituintes químicos presentes na fração *n*-butanólica;
- Desenvolver metodologia analítica e preparativa para o isolamento de compostos advindos da fração;
- Realizar experimento de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos obtidos da fração *n*-butanólica;
- Avaliar a toxicidade oral aguda da fração *n*-butanólica *in vivo*;
- Investigar a atividade antinociceptiva da fração *n*-butanólica em camundongos.

4 METODOLOGIA

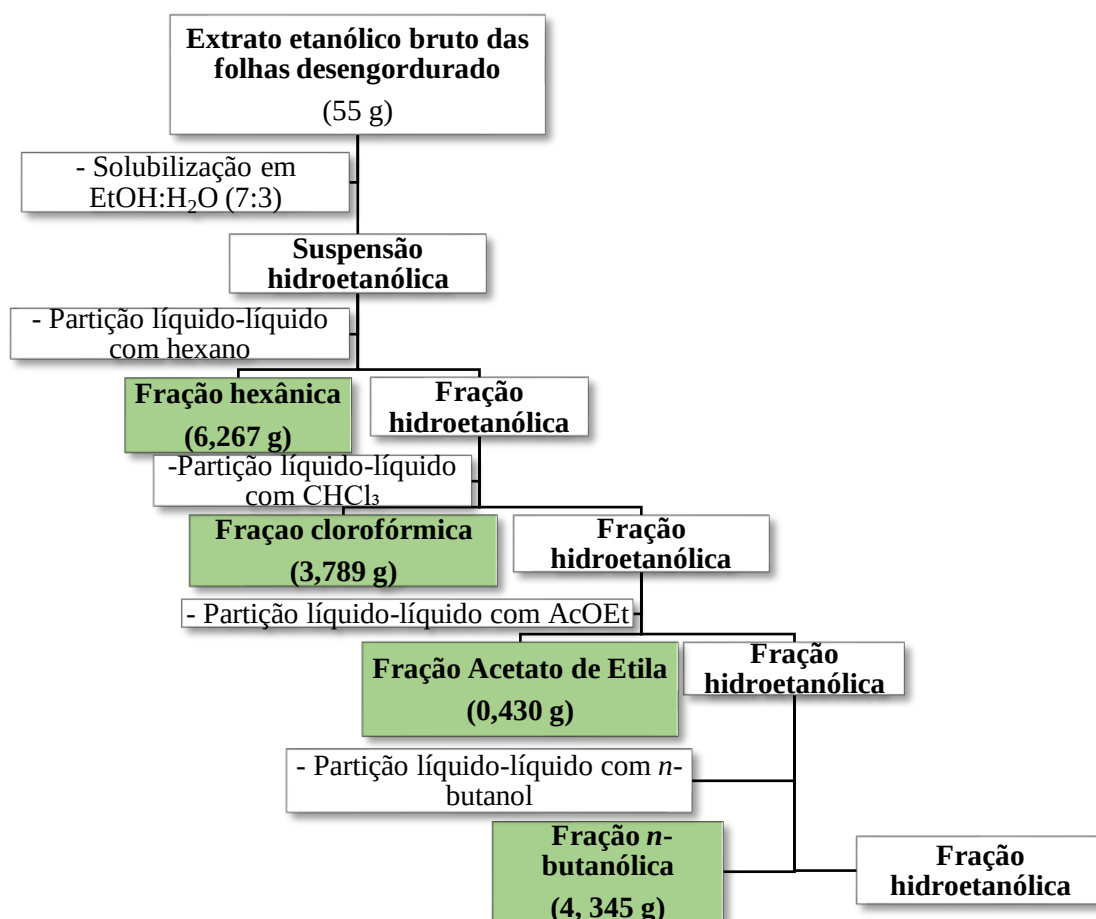
4.1 Material vegetal

A espécie *C. procera* (Apocynaceae) foi coletada em Janeiro de 2021, no litoral do município de Cabedelo, Paraíba – Brasil (7°03'13.1"S 34°50'35.2"W). A identificação botânica foi realizada com o auxílio do pesquisador César Alves Carneiro do Herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba, onde uma exsicata foi depositada sob o número de catálogo JPB0066233. A espécie selecionada e o projeto proposto foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen, sob código A9852FB.

4.2 Obtenção e Fracionamento por partição do EEB

O material botânico foi desidratado em estufa de circulação de ar à 45 °C por 72 horas. Em seguida, foi processado em moinho mecânico para obtenção de 629,25 g droga vegetal seca e triturada, que foi submetida ao processo de maceração com etanol (EtOH) a 95%, durante 72 horas. A solução extrativa resultante foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo (IKA RV 3 Eco) a 55 °C para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB).

O EEB foi desengordurado com hexano, no qual este solvente foi adicionado ao extrato e em seguida, a solução foi levada a um agitador mecânico e, por fim, filtrada. Seguidamente, 55 g do extrato desengordurado foi solubilizado em uma solução etanol/água (7:3 v/v), a fim de adquirir a solução hidroalcóolica. Esta foi submetida a uma partição líquido-líquido com a utilização de solventes em gradiente crescente de polaridade por três vezes. As soluções extrativas das frações foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão para obtenção das frações: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica (FB) (Figura 9).

Figura 9 – Fluxograma do fracionamento do EEB e obtenção da FB

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

4.3 Extração em fase sólida (SPE)

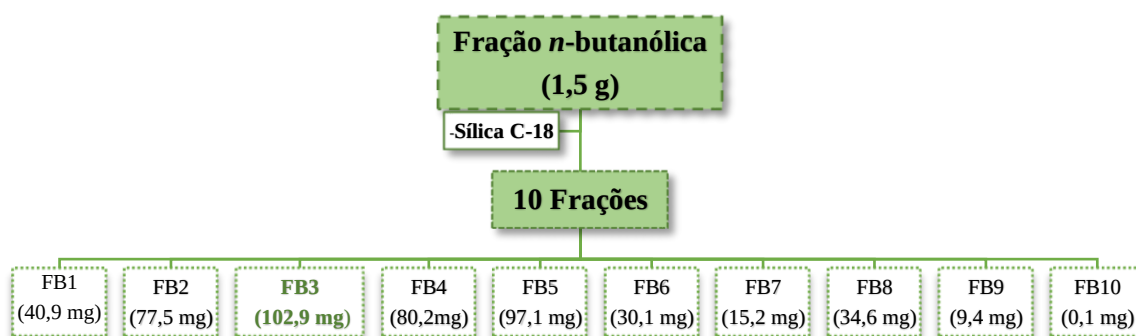
Realizou-se a extração em fase sólida de 1,5 g da FB, a qual foi suspensa em água/metanol, centrifugada (ROTINA – 380 R) por 20 minutos a 5000 rpm e filtrada (filtro de seringa PTFE 13 mm x 0,22 µm). Para o processo cromatográfico foi utilizado um cartucho de polipropileno contendo o adsorvente, sílica gel C-18 (Strata – C18-E), condicionado com metanol e água destilada (1:9). A amostra foi colocada no topo do cartucho e para eluição empregou-se uma mistura binária de solventes orgânicos aspirados com auxílio de uma bomba à vácuo (TECNAL – TE – 0581) operando em 600 mmHg, iniciando com 95% de água destilada e indo até MeOH 100%, conforme pode ser visualizado na tabela abaixo.

Tabela 2 – Dados do fracionamento da FB

Frações	Sistema eluente
FB1	Água destilada:MeOH (9,5:0,5)
FB2	Água destilada:MeOH (8:2)
FB3	Água destilada:MeOH (6:4)
FB4	Água destilada:MeOH (5,5:4,5)
FB5	Água destilada:MeOH (1:1)
FB6	Água destilada:MeOH (4,5:5,5)
FB7	Água destilada:MeOH (4:6)
FB8	Água destilada:MeOH (2:8)
FB9	Metanol
FB10	Metanol

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

As 10 frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo e seus respectivos pesos podem ser vistos no fluxograma abaixo.

Figura 10 – Fluxograma dos dados do fracionamento da FB

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

4.4 Desenvolvimento de metodologia por CLAE-IES-EM

Para análise de IES-EMⁿ no modo negativo, foi preparada, inicialmente, uma solução da amostra na concentração de 1 mg.mL⁻¹, sendo esta injetada em um UFLC (Shimadzu) com duas bombas LC20AD, um auto amostrador SIL20AHT e um controlador de sistema CBM20A, acoplado a um espectrômetro de massas Ion-Trap (AmaZon X). Os parâmetros de Ion-Trap foram: tensão capilar ajustada para 4,5 kV, temperatura ajustada para 200°C; taxa de fluxo do gás de secagem (N₂) de 8 mL.min⁻¹ e pressão do nebulizador de 58,02 psi. A fragmentação por

CID foi realizada no modo auto EM/EM utilizando o modo de resolução avançada para o modo EM e EM/EM e os espectros (m/z 50 – 1500) foram registrados a cada 2s.

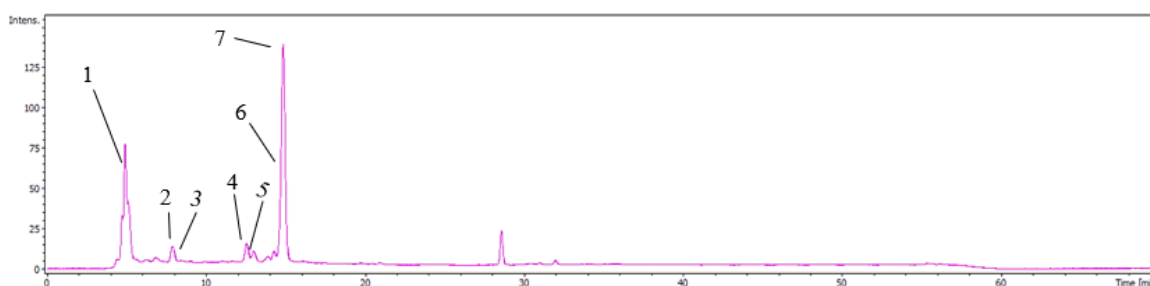
No sistema de cromatografia líquida foi utilizada uma coluna YMC-Triart C-18 (250 mm x 4,6 mm e partículas de 5 μ m) e, água acidificada ultrapura (0,1% de ácido fórmico) e metanol grau cromatográfico como fases móveis A e B, respectivamente. O seguinte método de eluição foi empregado, numa vazão de 0,6 mL.min⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados do método de eluição da FB

Tempo (min.)	% de MeOH (Solvente B)
0,01 - 60	5-100
60-80	100-100
80-85	100-5

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 11 - Cromatograma da FB de *C. procera* no comprimento de onda de 254 nm



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Os compostos foram tentativamente anotados por meio da comparação dos padrões de fragmentação correspondentes (MS² e MS³) com dados relatados na literatura científica.

4.5 Desenvolvimento de metodologia para isolamento de compostos e caracterização estrutural

A FB3 (102,9 mg), advinda da extração em fase sólida, foi previamente analisada por CLAE analítico para desenvolvimento do método cromatográfico. Inicialmente, foi preparada uma solução em metanol grau cromatográfico, na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Por CLAE analítica foi possível chegar ao método mais eficiente para isolamento das substâncias, sendo: solvente A = água acidificada (ácido fórmico 0,1%); solvente B = metanol grau cromatográfico, numa vazão de 0,6 mL.min⁻¹ (Tabela 4).

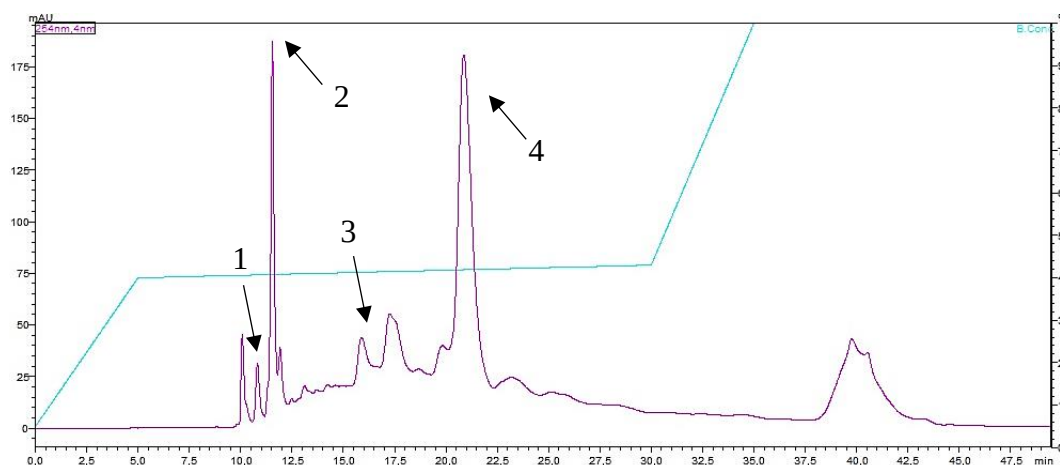
Tabela 4 – Dados do método de eluição da FB

Tempo (min.)	% de MeOH (Solvente B)
0,01 - 5	5 - 40
5 - 30,0	40 - 43
30,0 - 35,0	43 - 100
35,0 - 55,0	100 - 100
55,0 - 60,0	100 - 5
60,0 - 80,0	5 - 5

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Em escala preparativa, a amostra FB3 foi solubilizada em 1,0 mL metanol grau cromatográfico. O mesmo método desenvolvido na fase analítica foi utilizado em escala preparativa, com distinção na vazão empregada, sendo essa em escala preparativa de 8 mL.min⁻¹. As frações coletadas foram concentradas sob pressão reduzida a uma temperatura de 40°C em um rotaevaporador (IKA RV 3 Eco).

Para cromatografia em escala preparativa, a amostra solubilizada foi levada à centrífuga com 7000 rotações por minuto durante 5 minutos, o sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa PTFE (13 mm x 0,22 µm) e o filtrado foi usado na corrida para isolamento dos compostos. Foram realizadas dez injeções com o loop de 100 µL e coletadas 4 frações (Figura 12).

Figura 12 - Cromatograma de FB3 em CLAE preparativo

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Os espectros de RMN da fração **4** codificada como **CP-R** foram registrados nos equipamentos Bruker Ascend operando a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C), localizados no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da

Paraíba - UFPB. Para dissolução das amostras foi utilizado o solvente deuterado (Dimetilsufóxido – DMSO- d_6). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento J em Hz, utilizando-se as convenções s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplete de duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete) para indicar as multiplicidades dos sinais de 1H .

4.6 Experimentos *in vivo*

4.6.1 Procedimentos éticos e Animais experimentais

Os protocolos experimentais foram aprovados pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário - UNIFACISA sob o número de aprovação 03.0001.2024/05.2024 com as normas aprovadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Para os testes farmacológicos foram utilizados camundongos albinos *Swiss* (*Mus musculus*), adultos, machos e fêmeas, peso entre 25-35g, com 6 a 8 semanas. Os animais foram mantidos sob as seguintes condições: temperatura controladas e constantes de 23,0 °C ($\pm 1,0$), umidade relativa de 40 a 60%, com ventilação e exaustão de ar diretamente nas gaiolas microisoladoras com grade, tampa e sistema de válvulas para insuflamento e exaustão de ar, medindo 435 cm² que acomodará um número máximo de 4 animais por gaiola. A alimentação dos animais, composta por ração da marca Quintia[®], foi esterilizada por radiação gama, servida até 6 horas antes do tratamento coma FB. A água disponibilizada foi filtrada com carvão ativado de 5 micras, esterilizada por autoclavação a 121°C por 20 minutos, *ad libitum*. Para a forração da gaiola foi utilizado maravalha de pinus, esterilizada por radiação gama. Os animais foram eutanasiados por excesso de associação de anestésico cetamina 10% (300 mg.kg⁻¹) e xilazina 2% (30 mg.kg⁻¹) via intraperitoneal como recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA de 2018.

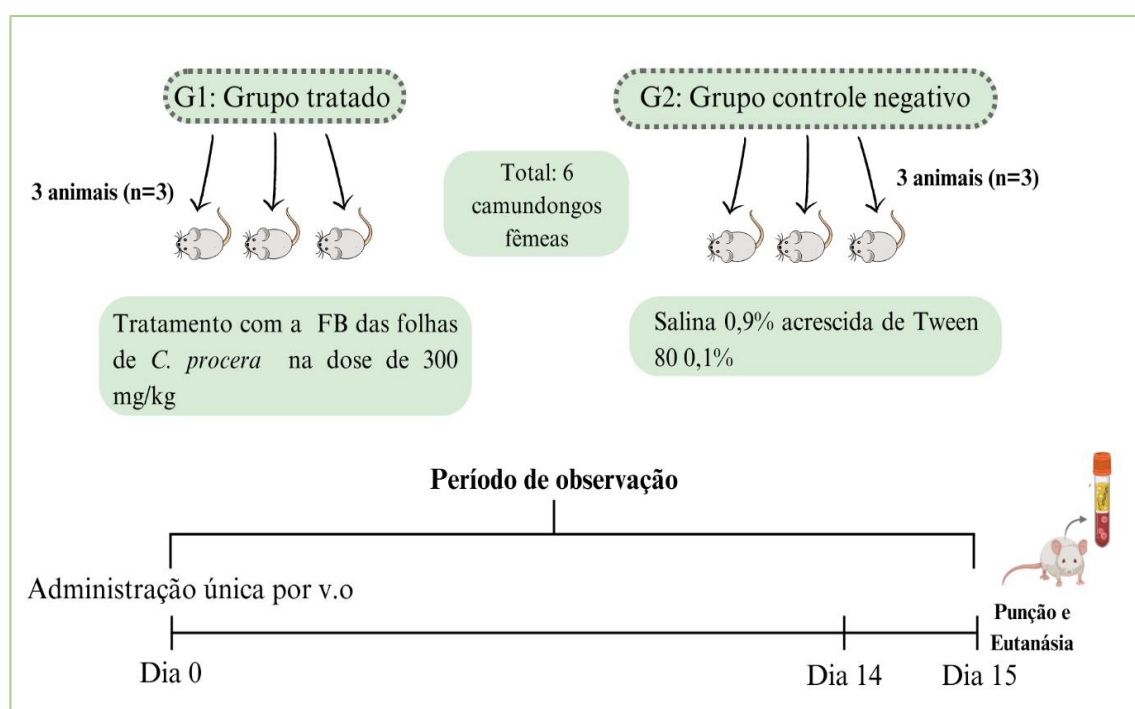
4.6.2 Preparo das substâncias

Para realização dos testes farmacológicos, a FB foi dissolvida em solução salina acrescida de Tween[®] 80 (0,1%), antes da utilização e administrada de acordo com a via requerida no procedimento realizado.

4.6.3 Ensaio de Toxicidade Oral Aguda

O ensaio de toxicidade pré-clínica aguda em camundongos foi realizado de acordo com a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), nº 423 (OECD, 2001). Para o ensaio de toxicidade foi escolhido um grupo com $n=3$, composto por camundongos Swiss fêmeas, o qual, foi administrada a dose de 300 mg.kg^{-1} , da FB, por via oral. Ao grupo controle negativo (Grupo 2, $n=3$) foi administrado apenas o veículo de dissolução das substâncias teste (Figura 13).

Figura 13 – Esquema do Ensaio de Toxicidade Oral Aguda



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Com o intuito de mapear possíveis alterações comportamentais sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após a administração da FB, foi realizada a observação cuidadosa dos efeitos da substância para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos de 30 minutos, 1,2,3 e 4 horas no primeiro dia e, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, nos 13 dias seguintes, com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais (Almeida *et al.*, 1999). Além disso, diariamente foram observados parâmetros como o consumo de água, a ingestão de alimentos e a evolução ponderal semanal. Após o décimo quarto dia, os animais foram pesados e anestesiados (xilazina 5 mg.kg^{-1} e cetamina 100 mg.kg^{-1}) para a coleta de punção cardíaca para análise hematológica e bioquímica utilizando kits específicos e em seguida submetidos a eutanásia.

- **Avaliação dos parâmetros hematológicos**

As análises foram realizadas após a coleta de sangue, utilizando um analisador hematológico automático (Coulter STKS, Beckman Coulter, Miami, FL, EUA) e microscopia óptica. Foram adicionadas as contagens de hemácias (RBC), leucócitos (WBC), hemoglobina (HB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), intervalo de distribuição de hemácias (RDW) e contagem diferencial de leucócitos (segmentados (SEG), linfócitos (LIN), monócitos (MON), basófilos (BASO) e eosinófilos (EOS)) (de Oliveira *et al.*, 2018).

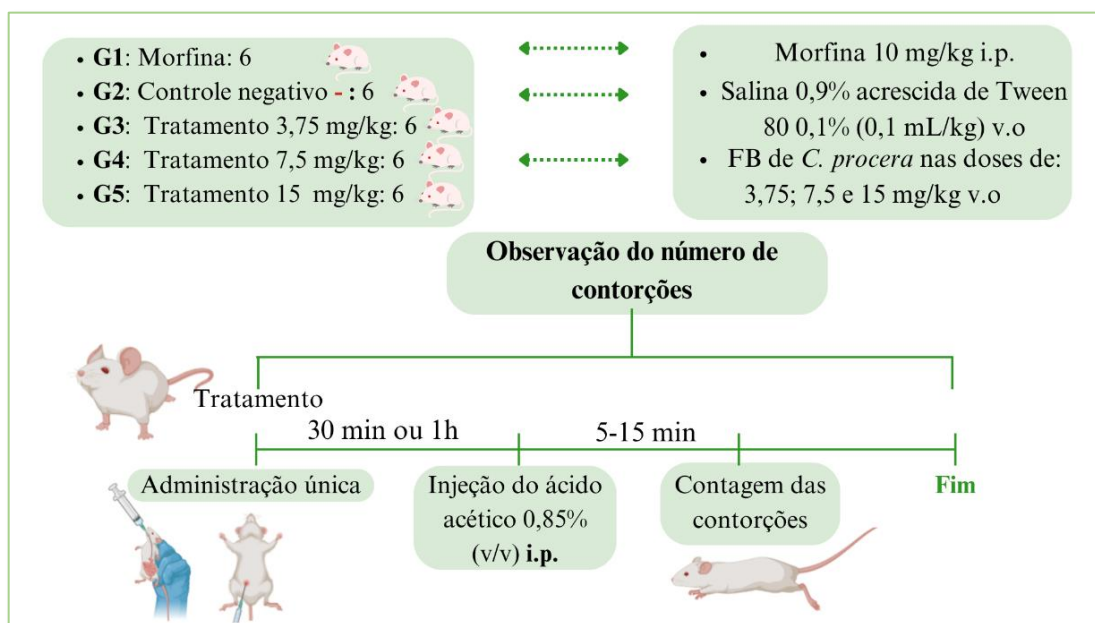
- **Avaliação dos parâmetros bioquímicos**

O sangue foi centrifugado para avaliação bioquímica de albumina (ALB), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina (BIL), gama-glutamil transferase (GGT), proteína total (PT), ureia (UR) e creatinina (CRE). Esses marcadores foram medidos utilizando kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) e um analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basileia, Suíça) (de Oliveira *et al.*, 2018).

4.6.4 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

- **Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético**

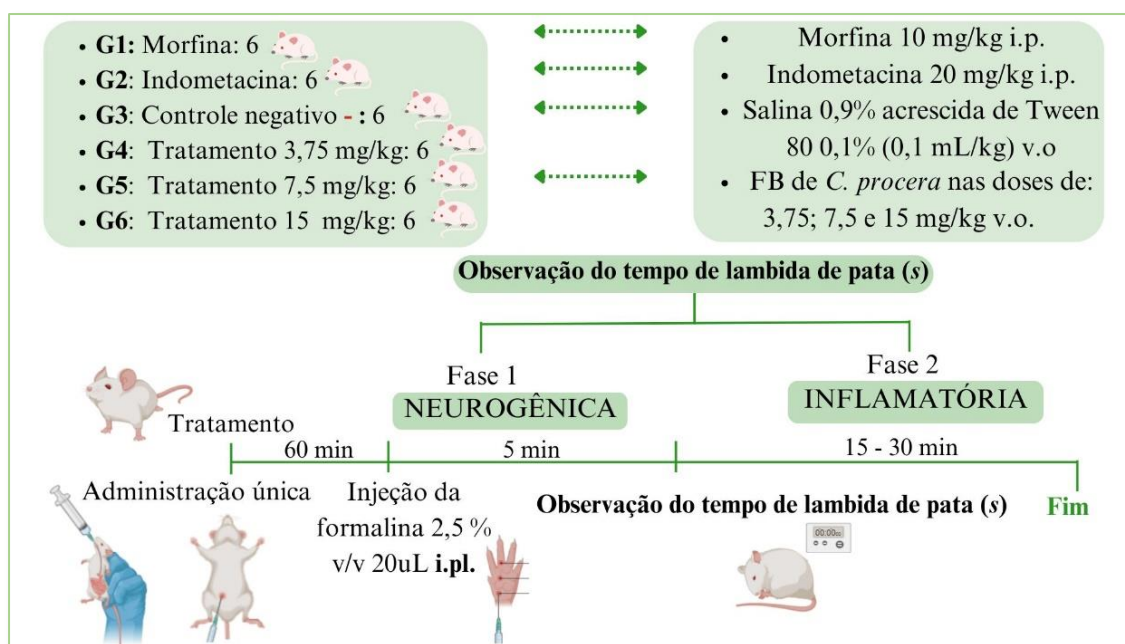
Camundongos machos foram separados em 5 grupos, cada grupo contendo 6 animais (n=6), desse modo totalizando 30 animais, e tratados com solução salina oral, 0,9% acrescida de Tween[®] 80 0,1% (controle), FB (3,75, 7,5 ou 15 mg.kg⁻¹ v.o), indometacina (10 mg.kg⁻¹, v.o) (Figura 14). Cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal (0,1 mL/10g) de ácido acético 0,85% (v/v) em solução salina e será colocado em uma caixa de polietileno para registrar o número de contorções no intervalo correspondente a 5-15 min após a injeção de ácido acético (Oliveira *et al.*, 2018).

Figura 14 – Esquema do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

• Teste da formalina

Camundongos machos foram separados em 6 grupos, cada grupo contendo 6 animais ($n=6$), receberam a FB (3,75, 7,5 ou 15 mg.kg⁻¹ v.o), morfina (10 mg.kg⁻¹ i.p.), indometacina (20 mg.kg⁻¹ v.o.) ou veículo de dissolução das substâncias teste (v.o) (Figura 15). Após 60 min, 20 µL de formalina 2,5% (v/v) em solução salina foram injetados na região subplantar da pata traseira direita de cada animal. O tempo gasto pelo camundongo lambendo a pata foi registrado durante os primeiros 5 minutos após a injeção de formalina (primeira fase: dor neurogênica), bem como 15 a 30 minutos após a injeção (segunda fase: dor inflamatória) (de Oliveira *et al.*, 2018; Hunskaar; Hole, 1987).

Figura 15 – Esquema do teste de formalina

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

4.7 Análise de dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para análise dos dados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda foi realizado o teste “t” de Student não pareado para comparação de 2 grupos. Para os demais protocolos experimentais foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo pós teste de Tukey para múltiplas comparações. Valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

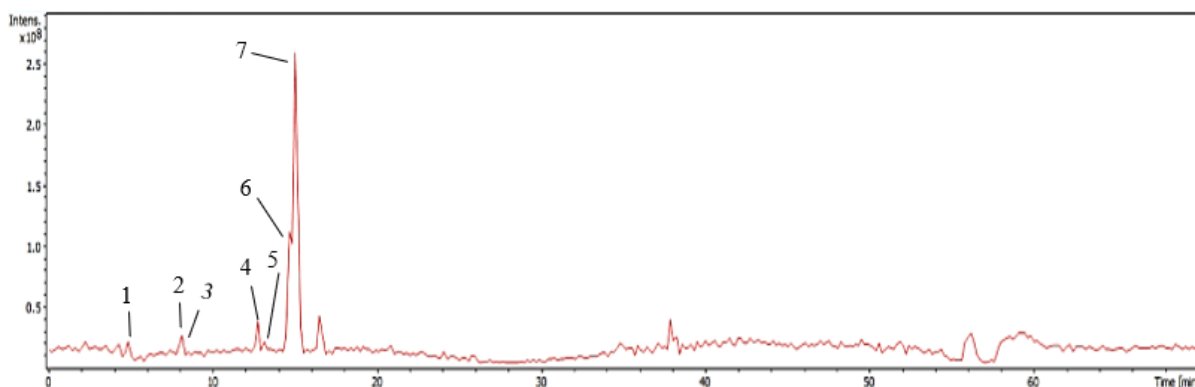
5.1 Caracterização química por CLAE-IES-EM da fração *n*-butanólica

A utilização de processos que visem o isolamento e a identificação mais rápida dos metabólitos secundários é de suma importância, pois otimizam a descoberta de novos fármacos. Assim, técnicas analíticas, como a cromatografia, a espectrometria e espectroscopia possibilitam a obtenção e caracterização dos compostos advindos das espécies vegetais de maneira mais ágil.

A FB foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, com o objetivo de anotar os compostos presentes nesta e, consequentemente, contribuir com a quimiotaxonomia do gênero. O gradiente de eluição usado nas análises cromatográficas foi capaz de separar compostos pertencentes a classes de metabólitos secundários, como ácidos fenólicos, flavonoides, seus derivados glicosilados e uma substância da classe dos megastigmanos. A anotação de todos os compostos foi baseada no seu perfil de fragmentação em comparação com os dados da literatura

Com isso, foram anotados 7 picos no cromatograma de pico base da fração (Figura 16) e os compostos tentativamente identificados podem ser vistos na Tabela 5, assim como a proposta de estrutura química destes na Figura 17. Entre os ácidos fenólicos, flavonoides e seus derivados glicosilados, destacam-se: o ácido cafeico (179 *m/z*), o seu glicosídeo ácido cafeico-*O*-hexosídeo (377 *m/z* (341-*H*+Cl)), quercetina-*O*-rutinosídeo (609 *m/z*), canferol-*O*-rutinosídeo (593 *m/z*), isorhamnetina-*O*-rutinosídeo (623 *m/z*) e a metilaidzeína (276 *m/z*), respectivamente, e o megastigmano 6*S*, 9*S* roseosídeo (431 *m/z* (385-*H*+Formiato)), ainda não isolado na espécie.

Figura 16 - Cromatograma do pico base FB das folhas de *C. procera*

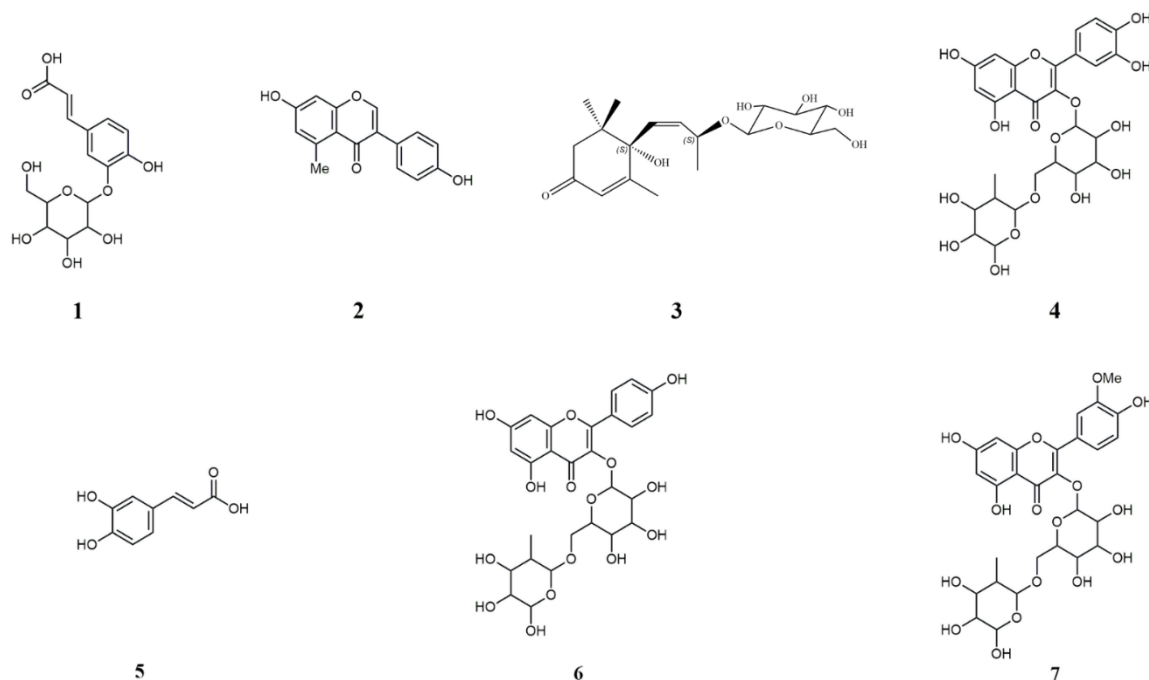


Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Tabela 5 - Perfil fitoquímico da FB das folhas de *C. procera* por CLAE-IES-EMⁿ

Pico	T. r. (min)	UV λ _{max} (nm)	Peso molecular	[M-H] ⁻ m/z	MS ² /MS ³	Anotação	Ref.
1	4,9	258	378	377 (341-H+Cl)	MS ² [377]: 341 (100)/MS ³ [377→341]: 281 (11,35); 251 (16,78); 179 (100); 161 (25,79)	Ácido cafeico-O-hexosídeo (Aduto de cloro)	(Li <i>et al.</i> , 2017)
2	7,8	-	268	267	MS ² [267]: 223 (100); 211 (94,92)/MS ³ [267→223]: 281 (11,35); 251 (16,78); 179 (100); 161 (25,79)	Metil-daidezina	(Ye <i>et al.</i> , 2012)
3	8,2	237, 324	432	431 (385-H+Formiato)	MS ² [431]: 385 (100)/MS ³ [431→385]: 223 (96,48); 205 (100); 179 (7,08); 153 (73,71)	6S, 9S roseosídeo	(Jiménez-López <i>et al.</i> , 2017; Liu; Lin, 2024; Panighel <i>et al.</i> , 2022)
4	12,8	256, 350	610	609	MS ² [609]: 343 (8,64); 301 (100); 271 (11,12); 255 (6,81)/MS ³ [609→301]: 271 (100); 255 (59,75); 243 (10,72); 179 (91,80); 151 (71,09)	Quercetina-O-rutinosídeo	(Li <i>et al.</i> , 2016)
5	13,0	-	180	179	MS ² [179]: 135 (100)/MS ³ [179→135]: 91 (100)	Ácido cafeico	(Kang <i>et al.</i> , 2016)
6	14,7	255, 353	594	593	MS ² [593]: 327 (5,23); 285 (100); 257 (6,03); 255 (5,59)/MS ³ [593→285]: 267 (68,95); 257 (100); 255 (34,03); 241 (34,11); 229 (43,36); 213 (34,12); 197 (29,46); 163 (19,16); 151 (5,33)	Canferol-O-rutinosídeo	(Llorent-Martínez <i>et al.</i> , 2015)
7	15,0	254, 355	624	623	MS ² [623]: 315 (100); 300 (40,18); 271 (21,70); 255 (12,45); 243 (3,32)/MS ³ [623→315]: 301 (20,58); 299 (100); 287 (5,74); 272 (13,35); 255 (5,60)	Isorhamnetina-O-rutinosídeo	(Spínola; Pinto; Castilho, 2015)

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 17 - Proposta de compostos anotados da FB de *C. procera* por CLAE-IES-EMⁿ

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: Números (1-7) referentes aos picos presentes na **Tabela 5**.

De maneira análoga, a partir do extrato metanólico das folhas de *C. procera* foi possível o isolamento da quercetina, quercetina-*O*-rutinosídeo, isoquercetina, isorhamnetina-*O*-rutinosídeo, canferol-*O*-rutinosídeo, luteolina (Mohamed *et al.*, 2011; Wadhwani *et al.*, 2021). Ainda do extrato metanólico das folhas, foram anotados a rutina, isorhamnetina-robnosídeo, isorhamnetina-rutinosídeo, canferol-rutinosídeo, canferol-hexosídeo, quercetina e o afrosídeo, semelhantemente ao perfil químico encontrado na FB das folhas da espécie no presente estudo. Ademais, foram relatados no extrato aquoso das folhas compostos como, catequina, rutina, ácido *p*-cumárico e o canferol, sendo a concentração do ácido *p*-cumárico a mais elevada (Ahmad Nejhad *et al.*, 2023).

O ácido cafeico e seu derivado glicosilado são responsáveis por atividades biológicas, como a antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Pavlíková, 2022). Além disso, os flavonoides quercetina-*O*-rutinosídeo, canferol-*O*-rutinosídeo, isorhamnetina-*O*-rutinosídeo são reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, por exemplo (Chen *et al.*, 2023). Já a isoflavona metildaizeína, é amplamente explorada por sua ação estrogênica (Dias, 2018). O megastigmano 6*S*, 9*S* roseosídeo, inédito na espécie, se destaca por suas ações anti-inflamatórias (Qiu *et al.*, 2008).

Ademais, segundo Gindri, (2012), frações butanólicas, normalmente, apresentam compostos com uma polaridade mais elevada, como os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e

seus glicosídeos, o que corrobora os dados supracitados. Nesse ínterim, estes achados reforçam a riqueza de moléculas de diferentes classes presentes na FB da espécie em estudo, com efeitos farmacológicos já descritos, evidenciando seu potencial como objeto para novos achados químicos e biológicos.

5.2 Determinação estrutural do CP-R

Com a CLAE preparativa foi possível isolar o composto 4 da fração FB3, o qual apresentou-se como um sólido amorfo marrom, pesando 9 mg. O espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) mostrou a presença de hidrogênios diasterotópicos [δ_{H} 2,07 (1H, *d*, J = 16,8) e 2,41 (1H, *d*, J = 16,8)], sinais em δ_{H} 5,76 (1H, *s*, H-4), δ_{H} 5,77 (1H, *d*, J = 5,2, H-7) e δ_{H} 5,78 (1H, *t*, H-8) correspondentes a hidrogênios oleofínicos (Tabela 6), estes dois últimos (H-7 e H-8) referentes a uma ligação oleofínica *cis* exocíclica; e singletos integrando para 3H, sugestivos de 3 metilas (Me), com deslocamentos químicos em δ_{H} 0,92 (H-12), δ_{H} 0,93 (H-11) e δ_{H} 1,81 (H-13). Além disso, um dubleto sugestivo de hidrogênio anomérico foi evidenciado em δ_{H} 4,16 (1H, *d*, J = 7,8), integrando para 1H, o que sugere a presença de um açúcar na estrutura.

O espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz), obtido pela técnica de Broad-Band (BB), corrobora os dados obtidos anteriormente, o qual sugere a presença das metilas [δ_{C} 24,1 (C-12), 23,1 (C-11), 18,9 (C-13)], em que juntamente com deslocamento químico do H-13, indicaram que a Me-13 está ligada a um carbono oleofínico, bem como foi visto um dubleto integrando para 3H atribuído ao δ_{H} 1,10 (H-10) e um sinal em δ_{C} 20,9 (C-10), correspondendo a Me-10. Observou-se também, em δ_{C} 197,5 (C-3) um sinal sugestivo de uma carbonila α,β -insaturada.

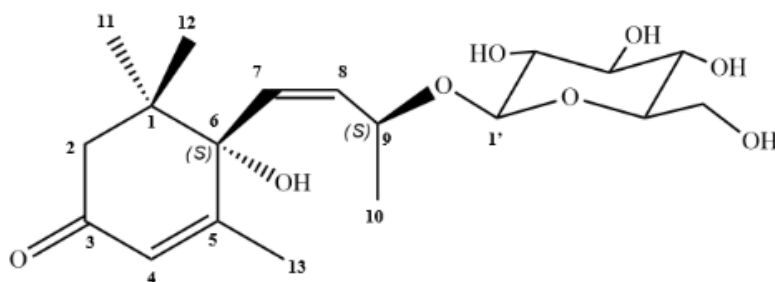
A análise através dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear direta (HSQC) possibilitou a atribuição de deslocamentos químicos relacionados a carbonos hidrogenados. Desse modo, revelou correlações entre o C-11 (δ_{C} 23,1) e o H-11 (δ_{H} 0,93), C-12 (δ_{C} 24,1) com H-12 (δ_{H} 0,92), C-13 (δ_{C} 18,9) correlacionando com H-13 (δ_{H} 1,81) e C-9 (δ_{C} 73,7) com o H-9 (δ_{H} 4,32), semelhantemente ao observado na literatura (Nascimento, 2019; Wang *et al.*, 2022).

Os dados do mapa de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMBC) demonstram a correlação dos hidrogênios diasterotópicos (H-2a e H-2b) com o C-3, desse modo determinando a posição da carbonila no carbono 3. As Me-11 e Me-12 apresentaram correlações com os carbonos C-1 (δ_{C} 40,96), C-2 (δ_{C} 49,39) e C-6 (δ_{C} 77,9), comprovando sua ligação ao C-1, já as Me-10 e Me-13 se correlacionam com o C-8, C-9 e C-

3, C-4, C5 e C-6, respectivamente (Tabela 7). O hidrogênio anomérico exibiu correlação no espectro de HMBC com o C-9, evidenciando a localização do açúcar nesta. Os dados corroboram estudos presentes na literatura (Nascimento, 2019; Wang *et al.*, 2022). Dessa maneira, tais sinais indicam a presença de um esqueleto megastigmano glicosilado, com a presença de substituições no anel ciclohexano e uma cadeia alifática insaturada com 4 átomos de carbono (Silva, 2012).

Ademais, este composto possui dois centros estereogênicos em C-6 e C-9, no qual através de dados na literatura pode-se inferir a configuração relativa que, quando há um deslocamento químico em, aproximadamente, $\delta_C 74,7$ tem-se o isômero na configuração *S* (Kalegari, 2014), o que é visto neste estudo. Entretanto, para o C-6 os deslocamentos são semelhantes. Assim, levando em consideração os dados disponíveis de espectros com técnicas 1D e 2D presentes no meio científico e comparando com os obtidos (Figuras 19-25) (Tsopmo; Muir, 2010), foi possível inferir que o CP-R, isolado de maneira inédita para a espécie *C. procera*, é o (6*S*, 9*S*) roseosídeo (Figura 18), corroborando os dados da caracterização por CLAE-IES-EM.

Figura 18 – Estrutura do (6*S*, 9*S*) roseosídeo isolado de *C. procera*



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

O (6*S*, 9*S*) roseosídeo ($C_{19}H_{30}O_8$), já foi isolado das folhas de espécies como, *Corchorus olitorius* L. (Malvaceae), *Piper crocatum* (Piperaceae), *Antidesma bunius* (L.) Spreng (Phyllanthaceae), *Ficus callosa* (Moraceae), *Euodia meliaefolia* (Rutaceae), do caule de *Kandelia candel* (Rhizophoraceae) e partes áreas de *Gynura bicolor* (Willd.) DC (Asteraceae) e *Sauropus androgynus* (Phyllanthaceae) (Samra *et al.*, 2024). Entretanto, é pela primeira vez isolado na espécie *C. procera*.

Tabela 6 - Dados de RMN (J em Hz e δ em ppm, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6) de CP-R comparados com da literatura (Tsopmo, 2010)

Posição	CP-R		Tsopmo, 2010*	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	40,96	-	42,4
2a	2,05 (1H, d , $J = 16,8$)	49,39	2,50 (1H, d , $J = 17,0$)	50,7
2b	2,41 (1H, d , $J = 16,8$)		2,12 (1H, d , $J = 17,0$)	
3	-	197,5	-	201,2
4	5,76 (1H, s)	125,7	5,85 (1H, s)	127,1
5	-	164,1	-	167,3
6	-	77,9	-	80,7
7	5,74 (1H, d , $J = 5,2$)**	130,3	5,83 (1H, d , $J = 4,2$)**	131,5
8	5,78 (1H, t)	133,3	5,82 (1H, d , $J = 4,2$)	135,2
9	4,32 (1H, q , $J = 6,4$)	73,7	4,39 (1H, m)	76,8
10	1,18 (3H, d , $J = 6,4$)	20,9	1,27 (3H, d , $J = 7,0$)	21,1
11	0,93 (3H, s)	23,1	1,03 (3H, s)	23,4
12	0,92 (3H, s)	24,1	1,03 (3H, s)	24,7
13	1,81 (3H, s)	18,9	1,91 (3H, s)	19,5
1'	4,16 (1H, d , $J = 7,8$)	100,9	4,37 (t , $J = 8,7$)	101,2
2'	2,90 – 4,0 (m)	74,6	3,91 (1H, d , 1,2)	79,2
3'	2,90 – 4,0 (m)	76,8	-	78,6
4'	2,90 – 4,0 (m)	70,0	4,01 (1H, d , $J = 10,5$)	71,7
5'	2,90 – 4,0 (m)	76,8	3,61 (2H, d , $J = 2,2$)	77,9
6'	2,90 – 4,0 (m)	61,1	-	62,8

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

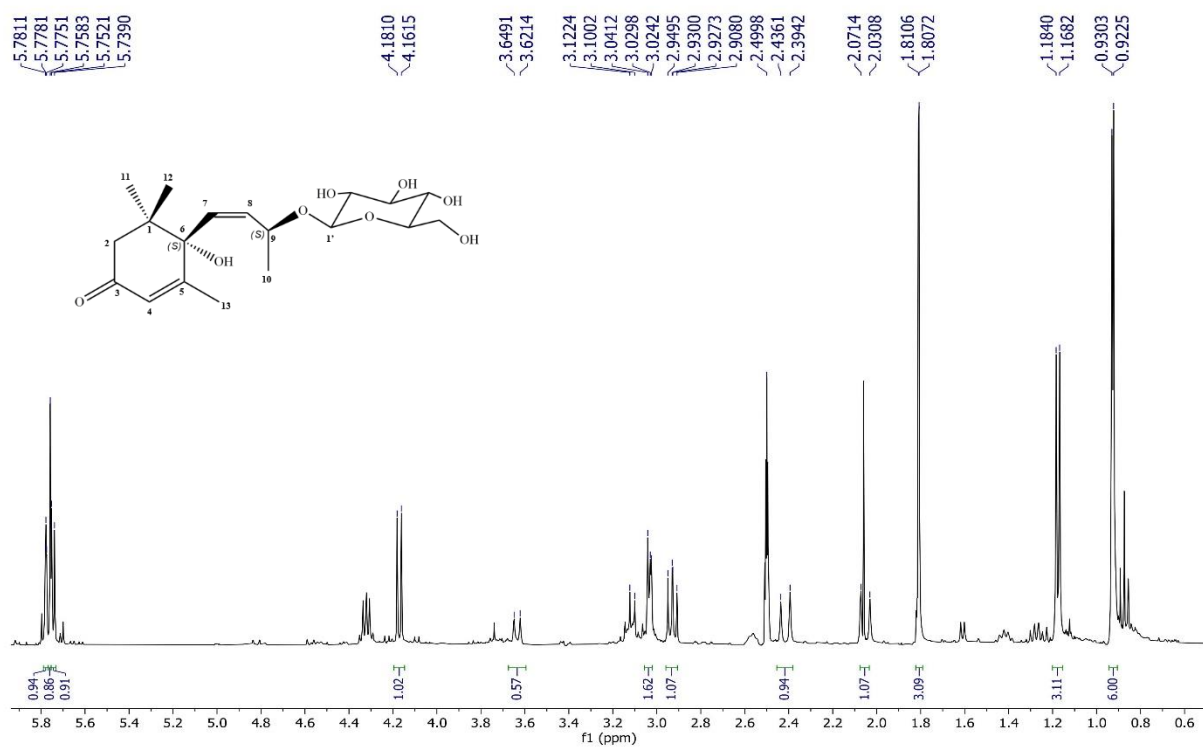
Legenda: *500 MHz, CD₃OD. **Segunda constante de acoplamento não obtida devido à sobreposição.

Tabela 7 - Dados de RMN bidimensional (J em Hz e δ em ppm, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6) de CP-R comparados com da literatura (Nascimento, 2019; Wang *et al.*, 2022)

Posição	HMBC	Nascimento, 2019	Wang <i>et al.</i> , 2022
	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{C}}$
2	C-3	C-3	C-4, C-6
7	C-6, C-9	-	-
8	C-6, C-9	-	-
9	C-7, C-8, C-1'	-	C-7, C-1'
10	C-8, C-9	C-8, C-9	-
11	C-1, C-2, C-6	C-1, C-2, C-6	C-1, C-2, C-6
12	C-1, C-2, C-6	C-1, C-2, C-6	C-1, C-2, C-6
13	C-3, C-4, C-5, C-6	C-4, C-5, C-6	C-4, C-5, C-6
1'	C-9, C-3', C-4'	C-9	C-9

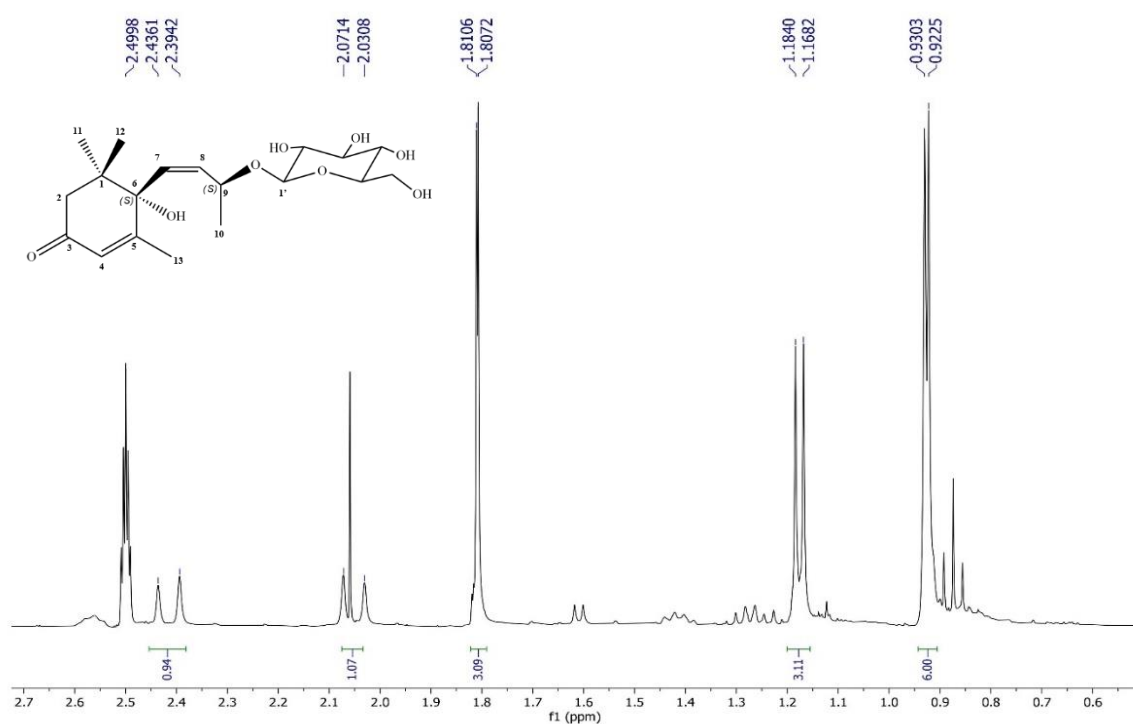
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de CP-R



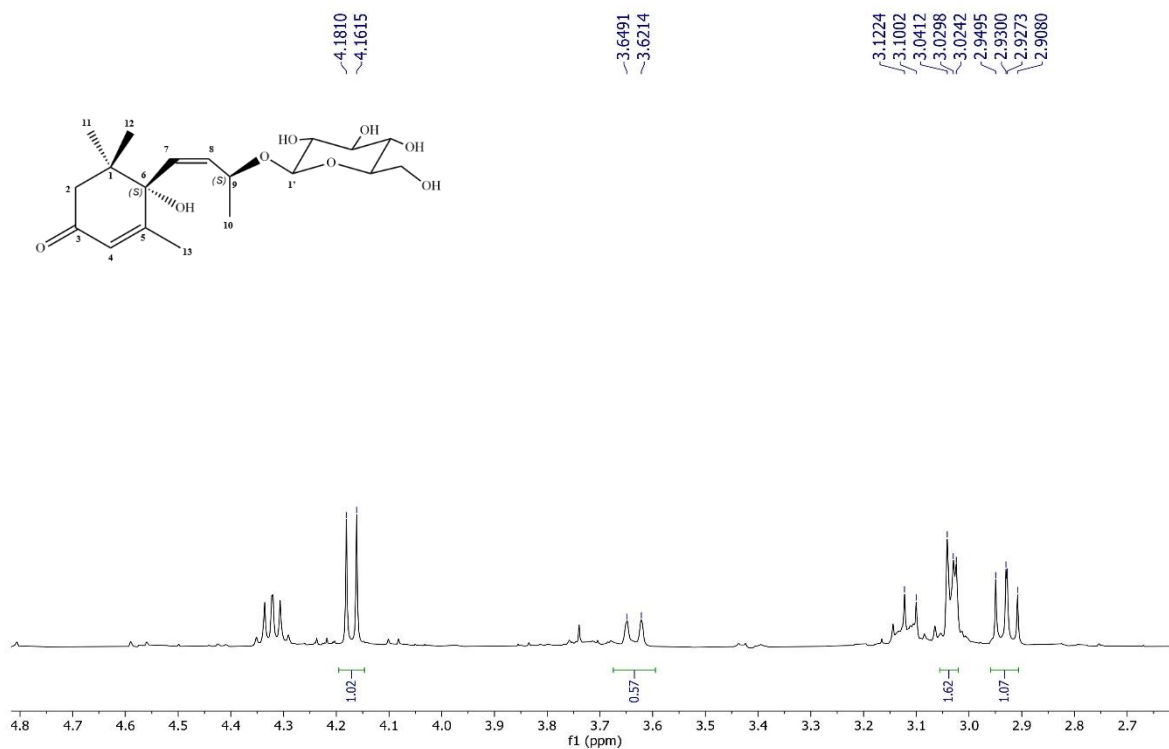
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de CP-R na região de 0,6 – 2,7 ppm



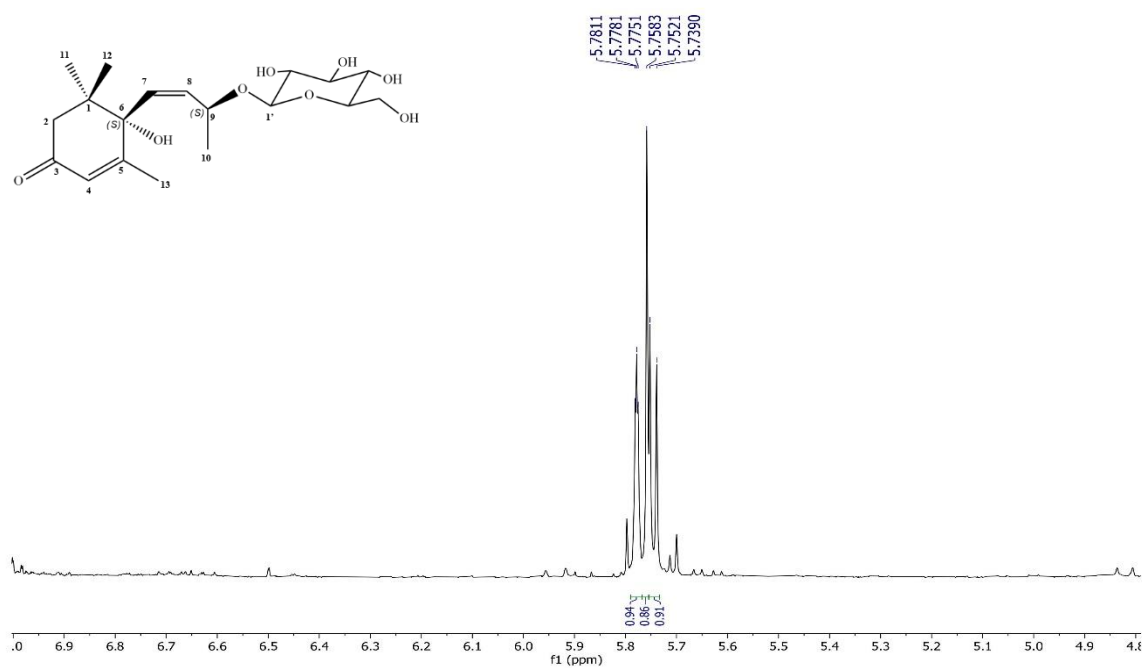
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de CP-R na região de 2,7 – 4,8 ppm



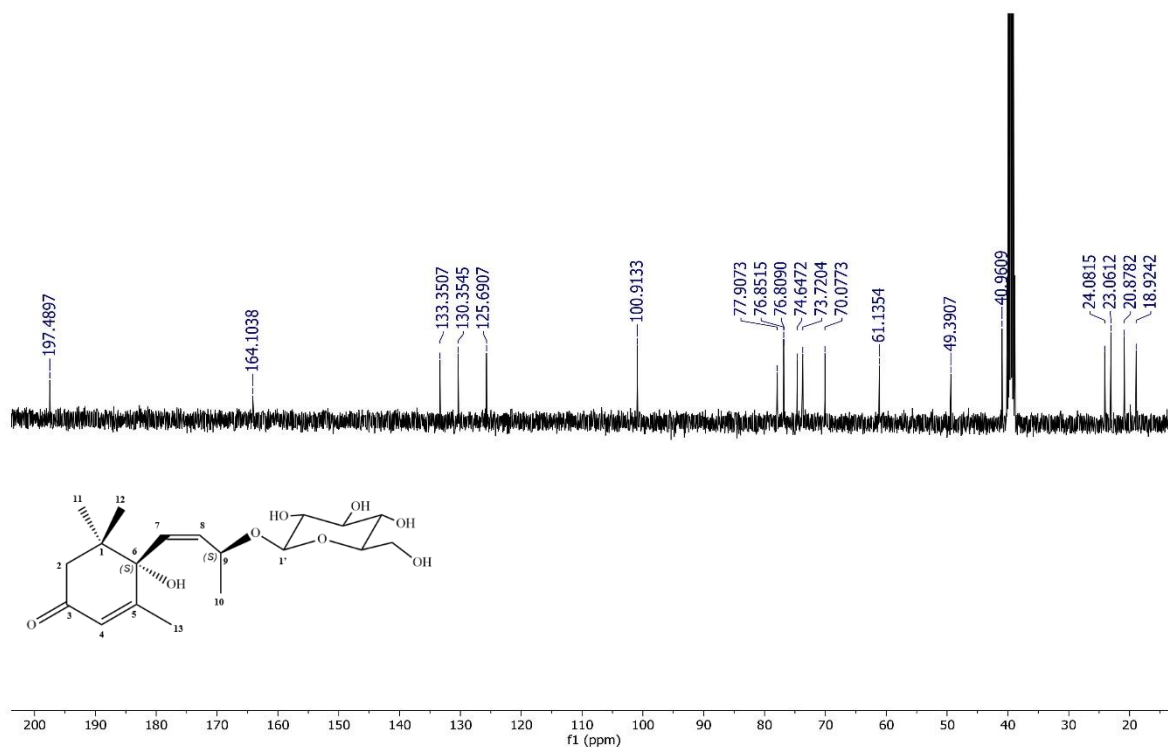
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 22 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de CP-R na região de 4,8 – 7,0 ppm



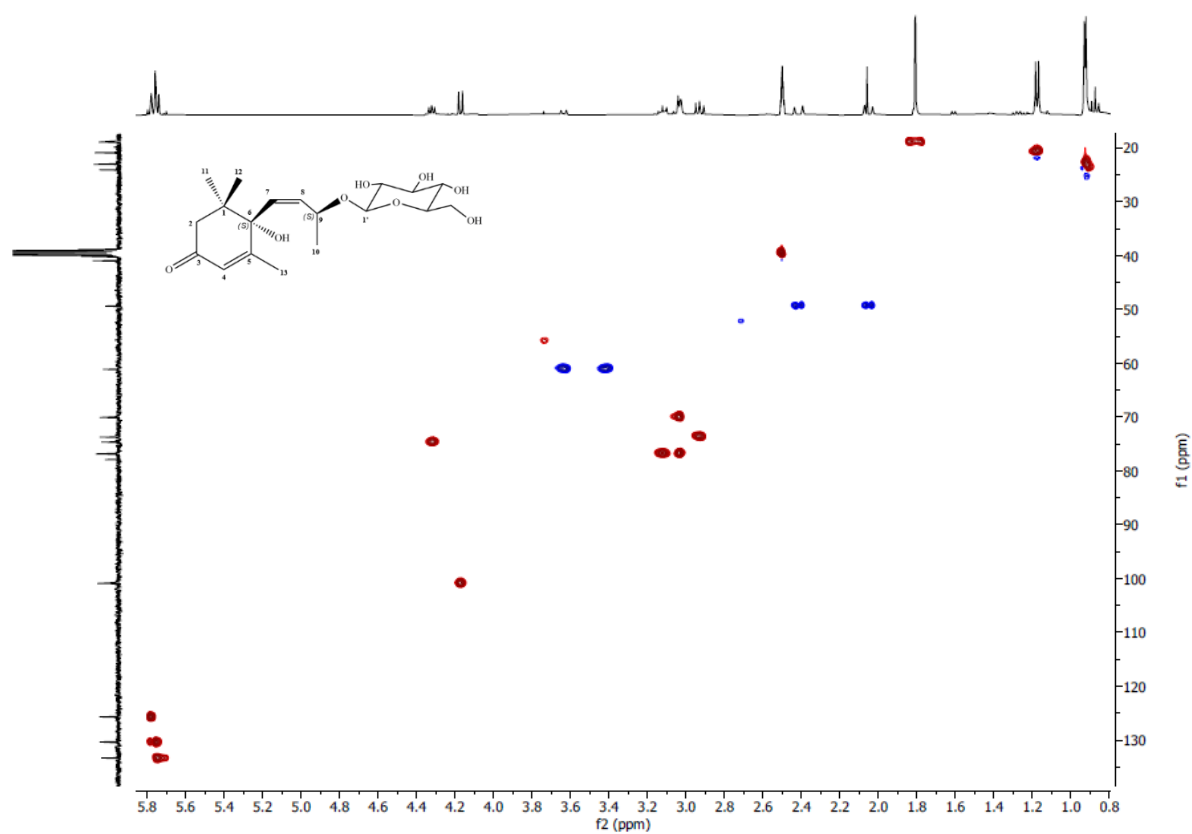
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C -BB (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de CP-R



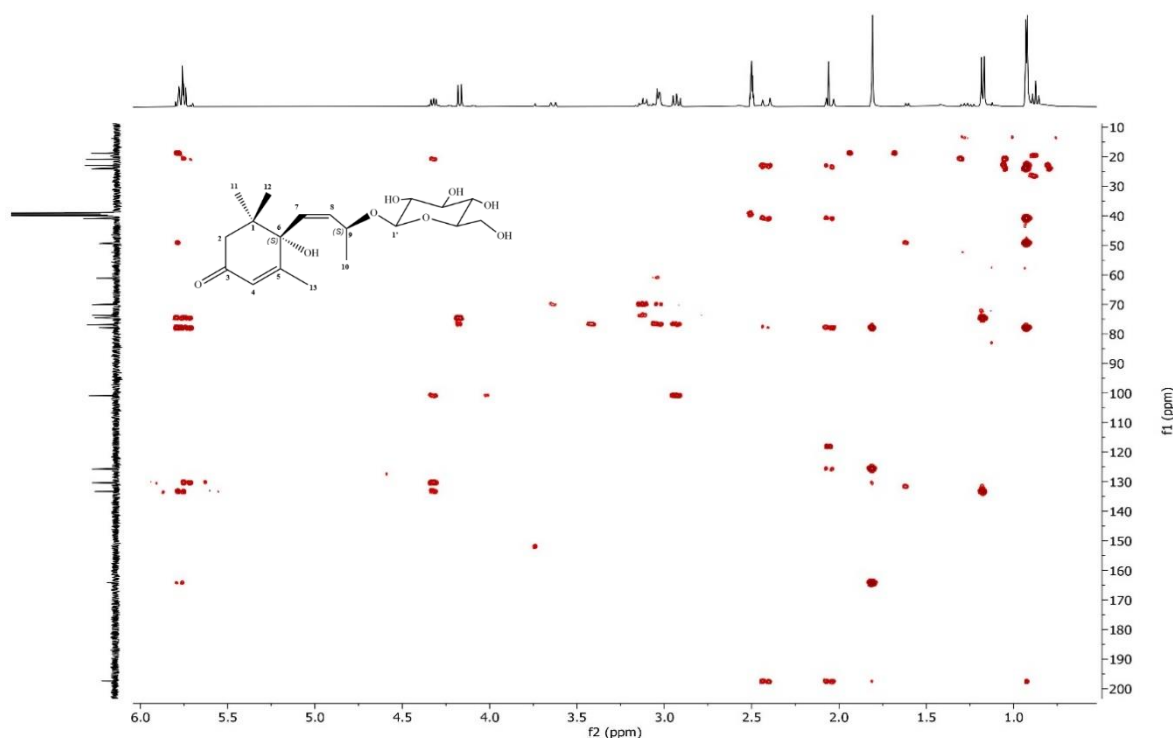
Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 24 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C - HSQC (400x100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de CP-R



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 25 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C – HMBC (400x100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de CP-R



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

5. 3 Experimentos *in vivo*

5.3.1 Ensaio de Toxicidade Oral Aguda

O teste de toxicidade oral aguda tem como objetivo analisar a segurança de compostos naturais e sintéticos, fornecendo embasamento para a identificação e avaliação dos riscos à saúde decorrentes de sua exposição. Nesse ínterim, a dose única de 300 mg.kg^{-1} administrada por via oral da FB das folhas de *C. procera* não provocou nenhuma morte. A triagem farmacológica evidenciou um aumento de ambulação e fuga nos primeiros 15 minutos, após este tempo não foram verificadas alterações comportamentais.

Com relação aos consumos de ração e de água, evolução absoluta e dados hematológicos e bioquímicos não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o grupo tratado e o grupo controle, os resultados estão expostos nas tabelas abaixo. Segundo Mukinda; Eagles, (2010), a redução da ingestão de água, de ração e do desenvolvimento ponderal são indicativos de toxicidade sistêmica. Como também, de acordo com Dahham et al., (2016), a análise sanguínea de parâmetros bioquímicos e hematológicos pode revelar processos de dano tecidual que ainda não sofreram expressão morfológica em órgãos e, posteriormente, serão observadas de maneira mais sistêmica.

Tabela 8 - Consumo dos animais submetidos ao teste de toxicidade tratados com a FB por v.o

Parâmetros	Tratamento	
	Controle	FB (300 mg.kg ⁻¹)
Consumo de ração (g)	14,93 ± 0,77	17,43 ± 0,56
Consumo de água (mL)	24,00 ± 1,00	26,57 ± 1,07
Média do peso (g)	27,98 ± 0,37	30,50 ± 0,27

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: Os valores representam a média ± EPM (n=3/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) em comparação ao grupo controle.

Os compostos tóxicos influenciam o processo da hematopoiese, sendo o sistema hematopoiético o mais sensível a tais substâncias (Oliveira *et al.*, 2019). Como também, os índices hematológicos são indicadores interessantes para o monitoramento e prevenção de efeitos adversos a medicamentos e demais substâncias químicas (Ugbogu *et al.*, 2024). Outrossim, a análise realizada de toxicidade aguda da dose de 300 mg.kg⁻¹ da FB de *C. procera* não revelou mudanças relacionadas à série vermelha (hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM) e nem na contagem dos leucócitos (segmentados, monócitos, basófilos e eosinófilos) e linfócitos (Tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com a FB por v.o

Parâmetros	Tratamento	
	Controle	FB (300 mg.kg ⁻¹)
RBC	5,78 ± 0,36	5,95 ± 0,48
HCT	34,19 ± 3,66	35,28 ± 3,29
HBG	13,97 ± 0,42	13,67 ± 0,68
VCM	42,15 ± 4,11	45,07 ± 3,73
HCM	15,03 ± 0,72	15,21 ± 0,84
CHCM	34,16 ± 3,85	32,16 ± 3,24
WBC	7,55 ± 0,92	7,15 ± 0,66
SEG	60,09 ± 5,75	57,17 ± 5,54
LIN	37,10 ± 3,02	39,84 ± 3,24
MON	2,19 ± 0,24	2,21 ± 0,26
BASO	0,16 ± 0,04	0,19 ± 0,04
EOS	0,54 ± 0,07	0,59 ± 0,04

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: RBC: Glóbulos vermelhos (10⁶/mm³); HCT: Hematócrito (%); HBG: Hemoglobina (g/dL); VCM: Volume Corpuscular Médio (%); HCM: Hemoglobina Corpuscular Média (%); CHCM: Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular (%); WBC: Glóbulos brancos (10³/mm³); SEG: Segmentados (%); LIN: Linfócitos (%); MON: Monócitos (%); BASO: Basófilos; EOS: Eosinófilos. Os valores representam a média ± EPM (n=3/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) em comparação ao grupo controle.

Da mesma forma, biomarcadores hepáticos enzimáticos são usados para avaliar a integridade do fígado, em que níveis elevados de AST, ALT indicam danos celulares e aumentos de AST, ALT, GGT, albumina sugerem lesão hepática (Ugbogu *et al.*, 2024). Assim, os parâmetros bioquímicos enzimáticos (AST, ALT, GGT, ALP, albumina) permaneceram inalterados em comparação ao grupo controle (Tabela 10). Além disso, a condição renal é outro fator observado principalmente através da creatinina e ureia, as quais também não evidenciaram alterações significativas. Desse modo, indica que não houveram alterações sanguíneas, nem danos ao fígado e aos rins.

Tabela 10 - Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com a FB por v.o

Parâmetros	Tratamento	
	Controle	FB (300 mg.kg ⁻¹)
ALB	3,09 ± 0,41	3,70 ± 0,37
ALP	67,01 ± 5,55	70,24 ± 6,11
AST	74,05 ± 6,13	70,21 ± 7,08
ALT	44,87 ± 4,01	47,05 ± 4,32
BIL	0,62 ± 0,09	0,66 ± 0,05
GGT	19,04 ± 1,22	21,83 ± 1,87
PT	7,32 ± 0,73	6,91 ± 0,84
UR	35,64 ± 2,14	33,77 ± 2,43
CRE	0,93 ± 0,11	0,88 ± 0,14

Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: ALB: Albumina (g/dL); ALT: Alanina aminotransferase (U/L); AST: Aspartato aminotransferase (U/L); ALP: Fosfatase alcalina (U/L); BIL: Bilirrubina (mg/dL); GGT: Gama Glutamil Transferase; PT: Proteína total (g/dL); UR: Ureia sanguínea (mg/dL); CRE: Creatinina (mg/dL). Os valores representam a média ± EPM (n=3/grupo). Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) em comparação ao grupo controle.

Semelhantemente, Kumar *et al.*, (2022) avaliaram a toxicidade aguda e subaguda do extrato etanólico das flores para o uso da espécie como tratamento seguro e eficaz. Nesse contexto, foi observado que durante o estudo de 14 dias não houve mortalidade, nenhuma anormalidade comportamental e alterações hematológicas e bioquímicas referente a dose única de 2000 mg.kg⁻¹. No ensaio subagudo as doses de 300, 1000 e 2000 mg.kg⁻¹ do extrato também não evidenciaram mortes e os parâmetros hematológicos e bioquímicos permaneceram dentro da faixa normal esperada quando comparados ao grupo controle.

À vista do exposto, infere-se que a dose única de 300 mg.kg⁻¹ administrada por via oral da FB das folhas de *C. procera* apresenta segurança e baixa toxicidade para o uso perante as condições metodológicas testadas, pois não revelou sinais clínicos relevantes na avaliação comportamental, alterações de consumo, hematológicas, bioquímicas e ausência de mortes

durante o período de observação experimental. Além disso, pelo método de classificação seguindo o protocolo N°423 da OECD, a FB enquadra-se na classe 4, ou seja, substância com DI_{50} superior a 300 mg.kg⁻¹ e inferior a 2000 mg.kg⁻¹.

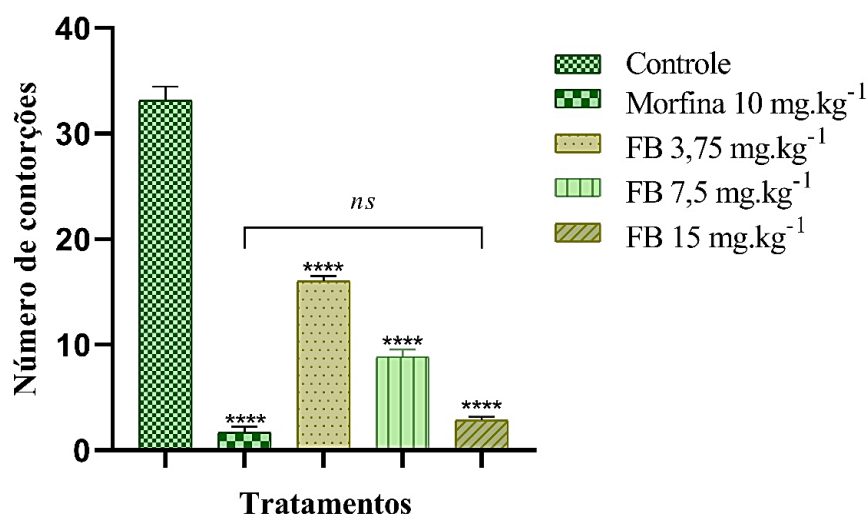
5.3.2 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

- **Teste de contorções induzidas por ácido acético**

A partir do teste de contorções abdominais é possível avaliar a ação nociceptiva de substâncias de modo não específico, uma vez que compostos anti-histamínicos, narcóticos e ansiolíticos podem ser ativos neste ensaio (Dzoyem *et al.*, 2017; Gawade, 2012). O ácido acético ao ser administrado provoca a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, leucotrienos, prostaglandinas, substância P e bradicinina, o que leva o animal apresentar um comportamento nociceptivo motor a partir da ativação de nociceptores viscerais e somáticos no peritônio (Pinheiro *et al.*, 2011a). Dessa maneira, compostos que possam inibir tais mediadores tem efeito neste modelo (Martins, 2018).

A administração por via oral da FB das folhas de *C. procera* nas doses de 3,75, 7,5 e 15 mg.kg⁻¹ reduziu significativamente ($p < 0,001$), de modo dose dependente, o comportamento nociceptivo dos animais. Assim sendo, foi observada a diminuição do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético com percentuais de 51,76, 73,38 e 91,46% para as doses supracitadas, respectivamente, já o grupo tratado com morfina 10 mg.kg⁻¹, por via oral, apresentou uma inibição em 94,97%, quando comparado ao grupo controle, o qual recebeu apenas o veículo de dissolução teste (Figura 26). Ressalta-se que, o tratamento com a maior dose da FB (15 mg.kg⁻¹) não resultou em diferença estatística no número de contorções em analogia a morfina, droga padrão utilizada, o que reforça o potencial da espécie frente à esta atividade.

Figura 26 – Efeito antinociceptivo da FB no teste de contorções abdominais



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: As barras representam o número médio de contorções abdominais $\pm$ EPM. (****) indica diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao controle. (ns) indica ausência de diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a morfina, análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

De maneira análoga, um estudo de Soares *et al.*, 2005 mostrou que a fração proteica do látex de *C. procera* apresenta atividade antinociceptiva dose dependente, frente ao modelo de contorções induzidas por ácido acético, com a redução em 67,9, 85 e 99,5%, referente as doses de 12,5, 25 e 50 mg.kg⁻¹, respectivamente. Obese *et al.* (2021), atestaram que o extrato hidroetanólico das folhas de *C. procera* nas doses de 30, 100 e 300 mg.kg⁻¹ diminuíram significativamente o número de contorções nos animais utilizados no experimento com um $p < 0,0001$, o que corrobora os dados pesquisados e mostra o potencial antinociceptivo da espécie, com a inibição significativa da nocicepção.

Similarmente, foi observado que o extrato metanólico das folhas de *C. procera*, na dose de 200 mg.kg⁻¹ revelou potente ação analgésica inibindo em 74,48% as contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. Como também, o extrato etanólico das folhas apresentou potencial de reduzir a nocicepção em camundongos com a contagem de $16,60 \pm 8,81$, $40,40 \pm 4,09$ e $23,30 \pm 9,88$ contorções, em comparação ao controle que apresentou $48,0 \pm 4,60$, nas doses de 100, 200 e 400 mg.kg⁻¹, respectivamente (Karale *et al.*, 2021).

Ademais, esta capacidade inibitória do estímulo doloroso induzido pelo ácido acético pode ser explicada pela presença dos flavonoides e dos ácidos fenólicos na FB. Por exemplo, a quercetina pode modular a excitabilidade neuronal no sistema nervoso, o que inclui a transmissão sensorial nociceptiva por meio da inibição da cascata de sinalização periférica da ciclooxygenase 2 (COX-2), dos canais iônicos dependentes de voltagem, bem como reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α), as quais apresentam significativa

importância no processo inflamatório e na geração de hipersensibilidade à dor (Itou; Toyota; Takeda, 2022; Coutinho; Muzitano; Costa, 2009).

Ao analisar o efeito da quercetina e da isorhamnetina na expressão gênica inflamatória em macrófagos murinos estimulados com lipopolissacarídeos (LPS), foi demonstrado que estas são eficazes na redução do TNF- α , IL-1B e IL-6 (Boesch-Saadatmandi *et al.*, 2011). Além disso, o ácido cafeico tem efeitos antinociceptivos significativos através das vias opioides, vaniloides, com inibição parcial do receptor TRPV-1, bem como no teste da formalina reduziu a dor nas duas fases experimentais (Pessoa *et al.*, 2024). Assim sendo, tais compostos bioativos podem exercer influência nos resultados da atividade antinociceptiva nas regiões central e periférica.

- **Teste da Formalina**

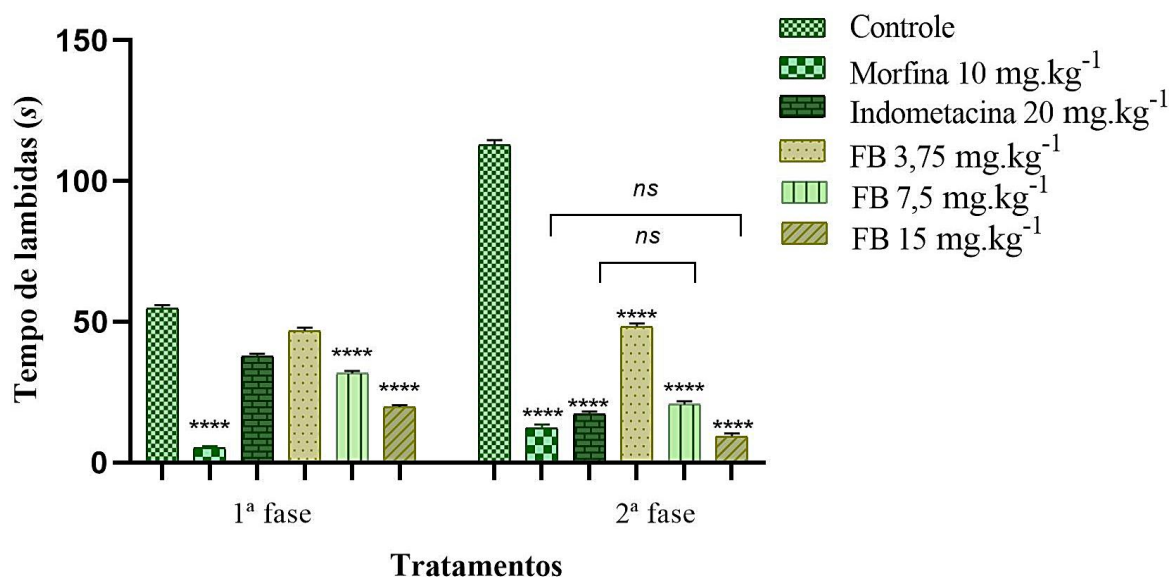
O teste da formalina é um modelo bifásico de avaliação da nocicepção. Na primeira fase ocorre a estimulação direta dos nociceptores periféricos, como o TRPA1, que estão presentes nas fibras aferentes primárias, principalmente as do tipo C e estas liberam a substância P e o glutamato; a inibição desta fase é indicativa de drogas analgésicas centrais, como opioides e narcóticos (Yam *et al.*, 2020). Seguidamente, tem-se um período interfase que dura 10 minutos e corresponde a ativação dos mecanismos inibitórios da dor. A segunda fase resulta da liberação de mediadores inflamatórios e estimulação de nociceptores, sua inibição é realizada por drogas que agem a nível periférico, como inibidores da COX (Dzoyem *et al.*, 2017; Hunskaar; Hole, 1987; Parada *et al.*, 2001)

No teste da formalina o tratamento por via oral da FB das folhas de *C. procera* demonstrou potencial de inibição da nocicepção nas fases neurogênica e inflamatória, todavia com um resultado mais significativo na segunda fase. Dessa maneira, na primeira fase, as doses de 3,75, 7,5 e 15 mg.kg⁻¹ reduziram o tempo de lambida da pata traseira em 14,59, 42,23 e 63,83%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle, que recebeu apenas o veículo de dissolução teste (solução salina 0,9% + Tween[®] 80 0,1%). Os fármacos de referência, morfina (10 mg.kg⁻¹) e indometacina (20 mg.kg⁻¹), suprimiram o tempo de lambida em 90,57 e 31,00%, nesta ordem.

Na segunda fase do teste, as doses de 3,75, 7,5 e 15 mg.kg⁻¹ reduziram em percentuais de 51,17, 81,68 e 91,73%, respectivamente, o tempo que os animais passaram lambendo a pata, em comparação, também, ao grupo controle, o qual foi veiculado por via oral salina (0,9%) acrescida de Tween[®] 80 (0,1%). Além disso, foi verificada a ausência de diferença estatística

entre a morfina e a dose de 15 mg.kg⁻¹, bem como entre indometacina e a dose de 7,5 mg.kg⁻¹. As drogas padrão, morfina (10 mg.kg⁻¹) e indometacina (20 mg.kg⁻¹), inibiram em 89,07 e 84,79% a nocicepção, a morfina foi ativa nas duas fases, enquanto a indometacina suprimiu melhor a resposta inflamatória. Os resultados revelam efeito da FB em ambas as fases, com uma ação mais acentuada na 2, o que indica, possivelmente, um mecanismo central e periférico de dor (Figura 27).

Figura 27 – Efeito antinociceptivo da FB no ensaio da formalina



Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Legenda: As barras representam o tempo médio gasto pelos camundongos lambendo suas patas $\pm$ EPM. (****) indica diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao controle. (sn) indica ausência de diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a morfina ou indometacina, análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

De maneira semelhante, é descrito na literatura que proteínas extraídas do látex de *C. procera*, nas doses de 25 e 50 mg.kg⁻¹, são capazes de apresentar efeito analgésico na 1ª e na 2ª fase. Assim, demonstraram inibição de 39,8,42 e 66,6, 99,3%, respectivamente, no tempo de lambadura da pata, em comparação ao controle (Soares *et al.*, 2005). Obese *et al.* (2021) avaliaram o extrato hidroalcolico das folhas de *C. procera*, nas doses de 30, 300 e 100 mg.kg⁻¹ e constataram que este foi capaz de bloquear ambas as fases de dor induzidas pela formalina, de maneira significativa ($p < 0,001$). Logo, tais dados reforçam o potencial antinociceptivo tão pouco estudado da fração *n*-butanólica, que é tão pouco estudado, assim como os dados pesquisados elencados anteriormente.

Além disso, a espécie *Calotropis gigantea* (Apocynaceae) possui propriedades analgésicas e anti-inflamatórias visto que na sua composição química tem elevada quantidade de flavonoides, como a quercetina e ácidos fenólicos, assim como pode ser observado neste

estudo (Maulani *et al.*, 2023). Em outra pesquisa o extrato da raiz de *C. gigantea* demonstrou elevada ação antinocipetiva e anti-inflamatória ($p < 0,001$) através dos ensaios de contorções abdominais, formalina e edema de pata induzido por carragenina. Isso se deve aos fitoconstituintes presentes nessa matriz vegetal como, glicosídeos, triterpenos flavonoides e ácidos fenólicos, os quais atuam causando a inibição da COX, eliminação de radicais livres e pela regulação negativa do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) (Maiti *et al.*, 2017).

O canferol, outro composto presente na FB, através dos testes de contorções induzidas por ácido acético, da formalina e movimento de cauda para avaliação da atividade antinociceptiva, demonstrou reduzir significativamente a dor aguda, apresentando ação central ao inibir os receptores TRPV-1 (Zarei; Abdolmaleki; Shahidi, 2022). Além disso, mediante a análises *in silico* foi possível visualizar que a quercetina e o canferol reduzem a expressão do TNF- α e do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), os quais atuam por feedback positivo na expressão de ácido araquidônico, importante molécula do processo inflamatório (Shaheen *et al.*, 2022). Desse modo, estes dois flavonoides auxiliam na redução da dor central e da dor desencadeada pela cascata inflamatória.

Outrossim, o roseosídeo, composto isolado da FB de *C. procera*, apresenta atividade anti-inflamatória significativa. Nesse sentido, a capacidade de ação da amostra teste nas duas fases do experimento, sendo a fase 2 mais representativa, pode ser atribuída também aos flavonoides e aos ácidos fenólicos supracitados que atuam tanto a nível central quando periférico, bem como a esta substância, a qual tem o efeito de combate a inflamação mediado pela inibição da produção de NO por macrófagos e na liberação de leucotrienos pelos mastócitos, assim como elevado efeito contra a produção de IL-6 e moderada ação frente ao TNF – α (Qiu *et al.*, 2008; Yajima *et al.*, 2009). Além do mais, esse composto anti-inflamatório pode estar associado ao efeito antinociceptivo observado no teste de contorções induzidas por ácido acético, posto que há uma relação intrínseca entre a dor e a inflamação.

Portanto, com base no perfil fitoquímico e nos dados farmacológicos da FB, que demonstraram ausência de toxicidade nos ensaios experimentais utilizados e um elevado potencial antinociceptivo, ela revelou-se promissora para aplicações farmacológicas. Observou-se que, mesmo em doses inferiores às descritas na literatura, a FB promoveu uma inibição significativa das contorções abdominais e do tempo de lambida da pata em camundongos, sugerindo um mecanismo de ação envolvendo, possivelmente, tanto as vias centrais quanto periféricas da dor. Esses resultados indicam que a FB é um alvo relevante para o desenvolvimento de novas formulações e pode representar uma alternativa terapêutica na modulação da dor.

6 CONCLUSÃO

- Ao investigar o perfil fitoquímico da FB das folhas de *C. procera* foi possível verificar a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e isolar, ineditamente, o 6S, 9S roseosídeo na espécie *C. procera*;
- Quando administrada, oralmente em dose única, a FB demonstrou ser segura na dose de 300 mg.kg⁻¹;
- A FB revelou um forte efeito antinociceptivo, principalmente relacionado a dor inflamatória, com possível envolvimento dos metabólitos encontrados em sua composição;
- Este estudo fornece dados para futuras investigações acerca do isolamento de compostos bioativos de *C. procera*, viabiliza novas pesquisas para analisar seu efeito inibitório intrínseco a nocicepção, o qual ainda é pouco discutido na literatura, bem como possíveis mecanismos de ação;
- Por fim, reforça seu potencial etnofarmacológico, como alternativa terapêutica no tratamento de modulação da dor e como fonte de desenvolvimento de novos fármacos relacionados a esta propriedade.

7 PERSPECTIVAS

- Quantificar e padronizar os metabólitos presentes na fração *n*-butanólica;
- Realizar as análises histopatológicas para corroborar os achados positivos intrínsecos aos parâmetros hematológicos e bioquímicos do teste de toxicidade oral aguda;
- Testar a FB frente ao modelo de toxicidade em doses repetidas (toxicidade sub-aguda), protocolo N° 407 da OECD;
- Efetuar experimentos *in vivo* para a possível confirmação do mecanismo de ação antinociceptivo, por meio da investigação do envolvimento das vias opíoides;
- Executar ensaios de Modelagem molecular (*Docking* molecular) para avaliar possíveis mecanismos de ação dos compostos anotados e do roseosídeo frente a alvos relacionados a dor e inflamação;
- Implementar mais modelos experimentais de antinocicepção, como o da placa quente e, a depender do resultado, testes anti-inflamatórios;
- Desenvolver formulações farmacêuticas visando o tratamento de patologias relacionadas a tais atividades;
- Contribuir com a literatura da espécie em estudo, através da elaboração de trabalhos, apresentações em eventos e artigos científicos com os resultados obtidos na pesquisa;
- Depositar patentes com os produtos advindos desta.

REFERÊNCIAS

- ABEYSINGHE, P. D. Review article on *Calotropis* (Wara): Is it a miracle shrub or just a plant? **Journal of the University of Ruhuna**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 55–60, 2018.
- AHMAD NEJHAD, A. *et al.* Identification of phytochemical, antioxidant, anticancer and antimicrobial potential of *Calotropis procera* leaf aqueous extract. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 14716, 2023.
- AL SULAIBI, M. A. M.; THIEMANN, C.; THIEMANN, T. Chemical Constituents and Uses of *Calotropis Procera* and *Calotropis Gigantea* – A Review (Part I – The Plants as Material and Energy Resources). **Open Chemistry Journal**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–15, 2020.
- ALI ESMAIL-AL-SNAFI. **The constituents and pharmacological properties of *Calotropis procera*-an overview**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: www.ijpr.com. .
- ALI-SEYED, M.; AYESHA, S. *Calotropis* - A multi-potential plant to humankind: Special focus on its wound healing efficacy. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 28, p. 101725, 2020.
- ALMEIDA, R. N. *et al.* **Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais**. [S. l.: s. n.], 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/285685053>. .
- AL-ROWAILY, S. L. *et al.* Essential Oil of *Calotropis procera*: Comparative Chemical Profiles, Antimicrobial Activity, and Allelopathic Potential on Weeds. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 21, p. 5203, 2020.
- ANDRADE, A. de *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of cellular and extracellular extracts from microalga *Chlamydomonas pumilioniformis* on mice. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, [s. l.], v. 43, p. e52889, 2021.
- ASHMAWI, H. A.; FREIRE, G. M. G. Peripheral and central sensitization. **Revista Dor**, [s. l.], v. 17, 2016.
- BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.
- BATOOL, H. *et al.* A review on *Calotropis procera* its phytochemistry and traditional uses. **Big Data In Agriculture**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 56–58, 2020.
- BAUMES, R. *et al.* Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 458, n. 1, p. 3–14, 2002.
- BHADANE, B. S. *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 1181–1210, 2018.

BITTENCOURT, S. C.; CAPONI, S.; MALUF, S. Farmacologia no século XX: a ciência dos medicamentos a partir da análise do livro de Goodman e Gilman. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 499–520, 2013.

BOESCH-SAADATMANDI, C. *et al.* Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 293–299, 2011.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 56, n. 11, p. 317–333, 2009.

CHEN, S. *et al.* A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 13, p. 4982, 2023.

COUTINHO, M. A. S. ; MUZITANO, M. F. ; COSTA, S. S. **Virtual Quim. [Vol 1] [No. 3] [241-256] Rev. Virtual Quim.** [S. l.: s. n.], 2009. Disponível em: <http://www.uff.br/rvq>. .

DAHAM, S. S. *et al.* In vivo toxicity and antitumor activity of essential oils extract from agarwood (*Aquilaria crassna*). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 236, 2016.

DAS, A. B.; GOUD, V. V.; DAS, C. Phenolic Compounds as Functional Ingredients in Beverages. In: VALUE-ADDED INGREDIENTS AND ENRICHMENTS OF BEVERAGES. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 285–323.

DE OLIVEIRA, A. M. *et al.* Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 95, p. 289–297, 2018.

DE SOUZA, T. A. *et al.* Asclepiadoideae subfamily (Apocynaceae): ethnopharmacology, biological activities and chemophenetics based on pregnane glycosides. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11101-024-09914-2>.

DEYNO, S. *et al.* Acute and sub-acute toxicity of *Echinops kebericho* decoction in rats. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 2, 2020.

DIAS, G. E. N. . **Avaliação da toxicidade não-clínica do extrato etanólico bruto de Pilosocereus gounellei (FAC Weber)** . 2015. 85 f. [s. l.], 2015.

DOGARA, A. M. A systematic review on the biological evaluation of *Calotropis procera* (Aiton) Dryand. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 16, 2023.

DOGARA ABDULRAHMAN, M. *et al.* **Traditional medicinal knowledge of Malays in Terengganu, Peninsular Malaysia Article in MalayanNature Journal.** [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/327664670>. .

DZOYEM, J. P. *et al.* Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In: MEDICINAL SPICES AND VEGETABLES FROM AFRICA. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 239–270.

- ENDRESS, M. E. An updated classification for Apocynaceae. **Phytotaxa**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 175, 2014.
- ETIENNE, R.; PEREIRA DIAS VIEGAS, F.; VIEGAS JR., C. Pathophysiological Aspects of Inflammation and Drug Design: an Updated Overview. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 167–191, 2020.
- FABRICANTE, J. R.; OLIVEIRA, M. N. A. de; SIQUEIRA FILHO, J. A. de. Aspectos da ecologia de *Calotropis procera* (Apocynaceae) em uma área de Caatinga alterada pelas obras do Projeto de Integração do Rio São Francisco em Mauriti, CE. **Rodriguésia**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 647–654, 2013.
- FARAG, M. A.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC–MS, LC–MS and 1D NMR techniques. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 76, p. 60–72, 2012.
- FINNERUP, N. B.; KUNER, R.; JENSEN, T. S. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 259–301, 2021.
- FRANZOTTI, E. M. *et al.* Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 273–277, 2000.
- FRIAS, B.; MERIGHI, A. Capsaicin, Nociception and Pain. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 797, 2016.
- GANZERA, M.; STURM, S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 147, p. 211–233, 2018.
- GAWADE, S. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 348, 2012.
- GINDRI, A. L. **Análise fitoquímica das raízes e folhas, e morfo-anatomia dos caules e folhas de *Urera baccifera* Gaudich.** 2012. Universidade Federal de Santa Maria, 2012.
- GOLAN, E. D. *et al.* **Princípios de Farmacologia.** [S. l.: s. n.], 2009.
- GOMES, N. G. M. *et al.* Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1372–1389, 2009.
- GRUBB, S.; PASVANKAS, G. W. Anatomy and Physiology: Mechanisms of Nociceptive Transmission. In: **ACADEMIC PAIN MEDICINE.** Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 1–7.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 103–114, 1987.

HUSSAAN, M. *et al.* Microwave-assisted enhancement of milkweed (*Calotropis procera* L.) leaves as an eco-friendly source of natural colorants for textile. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 5089–5094, 2017.

ITOU, H.; TOYOTA, R.; TAKEDA, M. Phytochemical quercetin alleviates hyperexcitability of trigeminal nociceptive neurons associated with inflammatory hyperalgesia comparable to NSAIDs. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 18, 2022.

JABBARI, S.; ZAKARIA, Z. A.; MOHAMMADI, S. Antinociceptive and antineuropathic effects of *Trifolium resupinatum* L. on formalin-induced nociception and cervical spinal cord hemi-contusion: Underlying Mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 337, p. 118913, 2025.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. *et al.* *Rosa rubiginosa* and *Fraxinus oxycarpa* herbal teas: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of the antioxidant activity. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 41, n. 15, p. 7681–7688, 2017.

JOSEPH, B.; GEORGE, J.; CHARLES, S. Pharmacological And Biological Overview On *Calotropis Gigantea*: A Comprehensive Review. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 219–223, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/312320554>.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, [s. l.], v. 413, n. 6852, p. 203–210, 2001.

KALEGARI, M. **Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica, antimicrobiana e toxicológica de *Rourea induta* planch. (Connaraceae)**. 2014. 209 f. [s. l.], 2014.

KANEMATSU, J. dos S. *et al.* Impacto da dor na qualidade de vida do paciente com dor crônica. **Revista de Medicina**, [s. l.], v. 101, n. 3, 2022.

KANG, J. *et al.* Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 211, p. 215–226, 2016.

KARALE, P. *et al.* Effect of *Calotropis procera* leaf extracts and partitioned fractions on anti-inflammatory and analgesic activity. **International Journal of Botany Studies**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 862–867, 2021.

KAUR, A. *et al.* An Overview of the Characteristics and Potential of *Calotropis procera* From Botanical, Ecological, and Economic Perspectives. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, 2021.

KENDROUD, S. *et al.* Physiology, Nociceptive Pathways. **StatPearls**, [s. l.], 2017.

KHADEMI, H. *et al.* Opioid Therapy and its Side Effects: A Review. **Archives of Iranian Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 12, 2016.

KINDA, P. *et al.* Toxicological characterization and central nervous system effects of *Calotropis procera* Ait. aqueous extracts in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 329, 2019.

KUMAR, V. L. *et al.* Protection afforded by methanol extract of *Calotropis procera* latex in experimental model of colitis is mediated through inhibition of oxidative stress and pro-inflammatory signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 109, p. 1602–1609, 2019.

LENS, F. *et al.* Vessel grouping patterns in subfamilies Apocynoideae and Periplocoideae confirm phylogenetic value of wood structure within Apocynaceae. **American Journal of Botany**, [s. l.], v. 96, n. 12, p. 2168–2183, 2009.

LI, X.-N. *et al.* Profiling hydroxycinnamic acid glycosides, iridoid glycosides, and phenylethanoid glycosides in baobab fruit pulp (*Adansonia digitata*). **Food Research International**, [s. l.], v. 99, p. 755–761, 2017.

LI, Z.-H. *et al.* Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS–MS. **Journal of Chromatographic Science**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 805–810, 2016.

LIMA, N. T. R. **Contribuição ao conhecimento fitoquímico de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae)**. 2020. - Universidade Federal da Paraíba, [s. l.], 2020.

LIU, T.; LIN, S. Comprehensive characterization of the chemical constituents of *Lianhua qingwen* capsule by ultra high performance liquid chromatography coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e27352, 2024.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. *et al.* HPLC-ESI-MSⁿ characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 69, p. 80–90, 2015.

MAHMOODI, M.; MOHAMMADI, S.; ENAYATI, F. Evaluation of the Antinociceptive Effect of Hydroalcoholic Extract of *Potentilla Reptans* L. in the Adult Male Rat. **SSU_Journals**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 201–210, 2016. Disponível em: <https://jssu.ssu.ac.ir/article-1-3153-en.html>. Acesso em: 4 jun. 2025.

MAITI, P. P. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of methanol extract of *Calotropis gigantea* root. **International Journal of Green Pharmacy**, [s. l.], 2017.

MALI, R. P.; RAO, P. S.; JADHAV, R. S. A Review on Pharmacological Activities of *Calotropis procera*. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, [s. l.], v. 9, n. 3-s, p. 947–951, 2019.

MARTINS, A. O. B. P. B. **Efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* Pax. & K. Hoffm e do complexo de inclusão (OEFC / β -CD) em modelos animais**. 2018. Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

MAULANI, C. *et al.* Pembuatan dan pengujian sistem aplikasi pakar menggunakan diagnosis penyakit periodontal klasifikasi tahun 2017 berbasis android: Studi pre-eksperimental. **Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 119, 2023.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 2011.

MOHAMED, M. A. *et al.* Antioxidant and Cytotoxic Flavonols from *Calotropis procera*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, [s. l.], v. 66, n. 11–12, p. 547–554, 2011.

MORAIS, S. *et al.* Gênero *Cryptostegia*: fitoquímica, atividades biológicas e aplicações industriais. **Química Nova**, [s. l.], 2021.

MOROKAWA, R.; SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S. Apocynaceae s. str. do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 179–199, 2013.

MUKINDA, James. T.; EAGLES, Peter. F. K. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 236–240, 2010.

NAKAKAAWA, L. *et al.* Oral acute, sub-acute toxicity and phytochemical profile of *Brassica carinata* A. Braun microgreens ethanolic extract in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 305, p. 116121, 2023.

NASCIMENTO, Y. M. do. **Zornia brasiliensis: estudo de desreplicação, isolamento e atividade biológica de constituintes químicos**. 2019. - Universidade Federal da Paraíba, [s. l.], 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

OAKLANDER, A. L. **Neuropatic Itch**. [S. l.: s. n.], 2014.

OBESE, E. *et al.* Antinociceptive effect of the hydroethanolic leaf extract of *Calotropis procera* (Ait) R. Br. (Apocynaceae): Possible involvement of glutamatergic, cytokines, opioidergic and adenosinergic pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 278, p. 114261, 2021.

OBESE, E. *et al.* Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory Properties of the Hydroethanolic Leaf Extract of *Calotropis procera* (Ait). R. Br. (Apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Research International**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–11, 2018.

OLIVEIRA, A. C. da S. de *et al.* Espécies vegetais de uso popular no tratamento da dor: uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. e22511225608, 2022.

OLIVEIRA, V. M.; SOUTO, J. S. Estimativa da produção de biomassa de *Calotropis procera*, Ait, R. Br., e avaliação de sua composição química no estado da Paraíba. *Revista Verde de*

Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. . **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2009.

OTSUKA, H.; TAMAKI, A. Platanionosides D—J: Megastigmane Glycosides from the Leaves of *Alangium platanifolium* (SIEB. et ZUCC.) HARMS var. *platanifolium* SIEB. et ZUCC. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 390–394, 2002.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, [s. l.], v. 5, p. e47, 2016.

PANG, B. *et al.* The Applications and Features of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Traditional Chinese Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2016, n. 1, 2016.

PANIGHEL, G. *et al.* Investigating the in vitro mode of action of okra (*Abelmoschus esculentus*) as hypocholesterolemic, anti-inflammatory, and antioxidant food. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, [s. l.], v. 5, p. 100126, 2022.

PARADA, C. A. *et al.* The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 937–944, 2001.

PESSOA, R. T. *et al.* Antinociceptive Potential of *Ximenia americana* L. Bark Extract and Caffeic Acid: Insights into Pain Modulation Pathways. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1671, 2024.

PINHEIRO, B. G. *et al.* Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 138, n. 2, p. 479–486, 2011a.

PINHEIRO, B. G. *et al.* Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 138, n. 2, p. 479–486, 2011b.

QIU, L. *et al.* Two New Megastigmane Glycosides, Physanosides A and B, from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*, and Their Effect on NO Release in Macrophages. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 758–763, 2008.

RABELO, A. C. *et al.* *Calotropis procera* (Aiton) Dryand (Apocynaceae) as an anti-cancer agent against canine mammary tumor and osteosarcoma cells. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 138, p. 79–89, 2021.

RAGHU, M. J.; GOUD, G. Effect of surface treatment on mechanical properties of *Calotropis procera* natural fiber reinforced epoxy polymer composites. In: , 2020. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2020. p. 030031.

RAMALHO, J. do A. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica do extrato etanólico bruto da casca da raiz de *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth.** 2015. - Universidade Federal da Paraíba, [s. l.], 2015.

RAMESH, M. *et al.* Influence of fiber surface treatment on the tribological properties of <scp>*Calotropis gigantea* </scp> plant fiber reinforced polymer composites. **Polymer Composites**, [s. l.], v. 42, n. 9, p. 4308–4317, 2021.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 8^aed. [S. l.: s. n.], 2016.

RAUF, A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. **Complementary Therapies in Medicine**, [s. l.], v. 25, p. 132–138, 2016.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 19–34, 2002.

SAMRA, R. M. *et al.* Comprehensive review on megastigmane glycosides: Sources, bioactivities, and ¹³C NMR spectroscopic data. **Phytochemistry Letters**, [s. l.], v. 60, p. 19–89, 2024.

SCHAFRANSKI, K. *et al.* Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) utilizando planejamento experimental. **Química Nova**, [s. l.], 2019.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R. Revival, modernization and integration of Indian traditional herbal medicine in clinical practice: Importance, challenges and future. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 234–244, 2017.

SGANZERLA, C. M. *et al.* Revisão integrativa aplicada a levantamentos etnobotânicos de plantas medicinais no Brasil. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 01–16, 2021.

SHAHEEN, N. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activities of black cumin (BC, *Nigella sativa* L.) extracts in in vivo model systems. **Bulletin of the National Research Centre**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 26, 2022.

SHARMA, N. *et al.* A Preliminary Phyto-Pharmacognostical evaluation of *Calotropis gigantea*(L.) R. Br. (Alarka or Mandara) Root. **International Journal of Ayurvedic Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2016.

SILVA, A. S. G. **Avaliação dos compostos voláteis e fenólicos ao longo da vinificação**. 2012. - Universidade de Aveiro, [s. l.], 2012.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia - Da Planta Ao Medicamento**. 6^aed. [S. l.: s. n.], 2007.

SINGH, N. K.; BHUSHAN, B.; AGRAHARI, Y. An overview on the phytochemical and therapeutic potential of *Calotropis procera*. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, [s. l.], v. 11, p. 100441, 2024.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOARES, P. M. *et al.* Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 125–129, 2005.

SOBRAL HILÁRIO, L. *et al.* Evaluation of Thermally Treated *Calotropis procera* Fiber for the Removal of Crude Oil on the Water Surface. **Materials**, [s. l.], v. 12, n. 23, p. 3894, 2019.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 173, p. 14–30, 2015.

TOUR, N.; TALELE, G. Anti-inflammatory and gastromucosal protective effects of *Calotropis procera*(Asclepiadaceae) stem bark. **Journal of Natural Medicines**, [s. l.], v. 65, n. 3–4, p. 598–605, 2011.

TSOPMO, A.; MUIR, A. D. Chemical Profiling of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Cultivars and Isolation of Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 15, p. 8715–8721, 2010.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006.

UGBOGU, E. A. *et al.* Phytochemical characterization, anti-diarrhoeal, analgesic, anti-inflammatory activities and toxicity profile of *Ananas comosus* (L.) Merr (pineapple) leaf in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 319, p. 117224, 2024. Disponível em: Acesso em: 21 jan. 2025.

ULLAH, A. *et al.* Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 22, p. 5243, 2020.

VELLA-BRINCAT, J.; MACLEOD, A. D. (Sandy). Haloperidol in palliative care. **Palliative Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 195–201, 2004.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. de A. Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 123–127, 2007.

WADHWANI, B. D. *et al.* A review on phytochemical constituents and pharmacological potential of *Calotropis procera*. **RSC Advances**, [s. l.], v. 11, n. 57, p. 35854–35878, 2021.

WANG, Y.-F. *et al.* Three new compounds from the leaves of *Castanopsis tibetana* Hance. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 36, n. 19, p. 4906–4910, 2022.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 838–849, 2004.

WOLFE, M. M.; LICHTENSTEIN, D. R.; SINGH, G. Gastrointestinal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 340, n. 24, p. 1888–1899, 1999.

WOLFENDER, J.-L.; TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, K. The Importance Of LC-MS And LC-NMR In The Discovery Of New Lead Compounds From Plants. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 38, n. sup1, p. 41–54, 2000.

XIANG, H.-C. *et al.* AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 34, 2019.

XIAO, X. *et al.* Natural Flavonoids as Promising Analgesic Candidates: A Systematic Review. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 1427–1440, 2016.

XIE, J. *et al.* Recent advances and effective strategies in the discovery and applications of natural products. **RSC Advances**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 812–824, 2018.

YAJIMA, A. *et al.* A simple synthesis of four stereoisomers of roseoside and their inhibitory activity on leukotriene release from mice bone marrow-derived cultured mast cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 189–194, 2009.

YAM, M. F. *et al.* Overview of Neurological Mechanism of Pain Profile Used for Animal “Pain-Like” Behavioral Study with Proposed Analgesic Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 4355, 2020.

YE, M. *et al.* Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var . *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MS n. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 35–42, 2012.

ZAPPI, D. C. *et al.* Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

ZAREI, M. M.; ABDOLMALEKI, Z.; SHAHIDI, S. Bioflavonoid exerts analgesic and anti-inflammatory effects via transient receptor potential 1 channel in a rat model. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 80, n. 09, p. 900–907, 2022.

ZHENG, J. *et al.* Identification of flavonoids in *Plumula nelumbinis* and evaluation of their antioxidant properties from different habitats. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 127, p. 36–45, 2019.

ANEXO A – Certificado de apresentação de resumo sobre a Caracterização química e Atividade antibacteriana da FB



ANEXO B – Certificado de Menção Honrosa do resumo



ANEXO D – Autorização do Comitê de Ética



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da pesquisa: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA IN VIVO DO EXTRATO E FASES DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Calotropis procera* (AITON) W.T. AITON (APOCYNACEAE)

Pesquisador (a) responsável: Prof. Dr. Alisson Macário de Oliveira

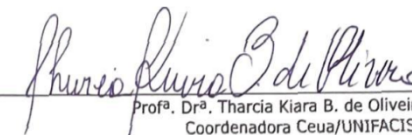
Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA IN VIVO DO EXTRATO E FASES DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Calotropis procera* (AITON) W.T. AITON (APOCYNACEAE)", registrada com o nº **03.0001.2024/05.2024**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alisson Macário de Oliveira, que envolve o uso de material biológico animal, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 05 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da unifacisa.

Finalidade	Pesquisa
Material Biológico	—
Animais	262 Camundongos
Sexo	Machos e Fêmeas

Informação ao pesquisador:

Campina Grande 06 de agosto de 2024


Prof.ª. Dr.ª. Tharcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora Ceua/UNIFACISA

Av. Senador Agostinho de Figueiredo, 1901 - Itareia - CEP: 58411-020 | Campina Grande - PB
Fone: (83) 2101.8877 | e-mail: ceua@uepb.edu.br | CNPJ: 02.108.023/0001-40



ANEXO E - Triagem farmacológica comportamental

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	Até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso da das vibrissas					
Outras					
b - Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação / Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Resposta ao reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – outros comportamentos					
Ambulação	+				
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar / Escalar	+				
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 – SNA					
Diarreia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
3 - MORTE					
Informações complementares					

Fonte: adaptado de Almeida *et al.*, 1999.