



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – PGCITA



ROBERTA DE FREITAS LOPES

**POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO
DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Protium* sp.**

RIO BRANCO - ACRE

2016

ROBERTA DE FREITAS LOPES

**POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO
DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Protium* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre *Stricto Sensu* em Ciências, Inovação e Tecnologia para Amazônia.

Área de concentração: Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha

Co-orientador: Prof. Dr. Quintino Moura Dias Jr.

Rio Branco – Acre

2016

ROBERTA DE FREITAS LOPES

**POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO
DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Protium* sp.**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 15/07/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha
(Orientador – CCBN/UFAC)

Prof. Dr. Quintino Moura Dias Jr.
(Co-orientador – FIOCRUZ/PG-CITA)

Prof. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy
(Membro da Banca – ISCB/UECE)

Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto
(Membro da Banca - CCSD/UFAC)

Aos meus filhos João Gabriel, Raika e Bernardo, razões de minha alegria, dedicação e perseverança. Quero ser um exemplo de que os estudos nos abrem a mente e nos levam para bem mais perto de nossos sonhos.

Ao meu amor, amigo e companheiro Rosano, por me apoiar e incentivar, por ser meu porto seguro.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu alimento diário de fé, amor e perdão, pela benção da vida concedida a cada dia de luta, por nunca me desamparar e por tudo que destes a esta filha.

Ao meu marido e filhos, pela inspiração, incentivo e paciência em minhas muitas horas de ausência, obrigada pelo amor de vocês.

Aos meus pais Conceição e Reginaldo, meus irmãos Rafael e Raniele, meu sobrinho Pedro e minha cunhada Rebeca, pela disposição em sempre me ajudar, apoiar e cuidar de minha casa e de meus filhos em tantos momentos de minha ausência, obrigada por serem meu braço direito.

A minha vó, tios e tias, primos e primas, cunhados e cunhadas, pelas palavras de incentivo, vocês tornaram a caminhada mais intusiasmante.

A uma dúzia de amigos, pessoas que posso contar sempre, distantes ou perto, felizes ou tristes, obrigada.

Pessoas que não me conheciam, mas com todo carinho e cuidado acolheram-me, obrigada, vocês são pessoas especiais (família da Dinha).

Ao mestre Renildo Moura da Cunha, pela pessoa e profissional que é, pela acolhida e oportunidade como orientanda, pelos seus ensinamentos e contribuição para realização deste trabalho, serei eternamente grata pela confiança em mim depositada.

Ao professor Quintino Moura Dias Jr por seus ensinamentos e disposição em ajudar, obrigada por sua acolhida e realização de experimentos na FIOCRUZ-RO.

À Professora Ana Maria Sampaio e a Doutoranda Renata Moraes do laboratório de Fisiologia da Inflamação - LAFFIN do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da UECE, obrigado por me receber e pela importante realização dos experimentos na linha de inflamação.

Ao Professor Nilberto Robson Falcão do Nascimento, Professora Cláudia Ferreira Santos e aos alunos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular-LAFCAR da UECE, que me receberam com muita atenção e que contribuíram para meu aprendizado.

Aos colegas da turma PG CITA 2014, em especial à Maria Francineide, Tamires, Eduardo, Anderson e Kennedy, pelas conversas, estudo, ajuda e convivência.

Aos colegas de convívio diário e de muito trabalho do laboratório de pesquisa em Fisiologia da Universidade Federal do Acre, em especial a Nadyne,

Natiele, Juliana, Ana Paula e Igor, pela amizade, essencial ajuda na realização dos experimentos e nas atividades do laboratório, pelos divertidos momentos de convivência, me faltam palavras para agradecer.

Ao professor Dionatas pela ajuda nas análises fitoquímicas dos meus extratos.

Aos professores do Mestrado em Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia, pelos ensinamentos, em especial ao caro Professor Délcio Marques, pela sua contribuição científica que me deram base para minha pesquisa com a Família Burseracea.

Ao Douglas Daly do Botanic Garden de Nova York, pela contribuição com a identificação a nível de espécie da planta em estudo.

À Universidade Federal do Acre, ao PG-CITA pela minha formação.

Ao Márcio, secretário do PG-CITA, por toda sua presteza, atenção e paciência obrigada.

À Fundação de Tecnologia do Acre-FUNTAC no uso do Laboratório de Produtos Naturais para elaboração dos extratos e uma parte dos testes fitoquímicos.

Aos Técnicos do Laboratório de Produtos Naturais da FUNTAC, Cláudio e Raimunda, pela ajuda na coleta e processamento do material vegetal, obrigada.

Ao seu Manoel de Mâncio Lima pela ajuda e indicação da coleta, obrigada pelos seus sábios conhecimentos tradicionais.

Aos Professores Anselmo Ruiz e Fernando Escócio por disponibilizarem o laboratório de química para elaboração de uma parte dos extratos, em especial ao professor Anselmo, por ser também um amigo que sempre me incentivou e acredita em meu potencial, obrigada.

Ao Gabriel e Thalles da secretaria da PG-BIONORTE que deram suporte às atividades do Laboratório de Fisiofarmacologia da UFAC.

À CAPES, CNPq e FAPAC pelo apoio financeiro.

“O mais importante é nunca deixar de se perguntar. A curiosidade tem sua própria razão de existir.”

Albert Einstein

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta as mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Protium* sp.

Autora: Roberta de Freitas Lopes
Orientador: Renildo Moura da Cunha

A família Burseraceae representa um dos grandes táxons botânicos presentes na Floresta Amazônica, sendo o gênero *Protium* o maior representante, conhecido por seus exsudados e oleoresinas ricas em substâncias voláteis que são utilizadas para várias finalidades, inclusive para fins curativos. Os produtos naturais são fontes de grande variedade de substâncias com atividade biológica e estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente, especialmente oriundos de plantas, porém, poucas espécies foram objeto de estudos adequados. A proposta da pesquisa foi avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, do extrato hidroalcoólico da casca de *Protium* sp (EHCPsp) em camundongos *Swiss* albinos. A atividade antinociceptiva foi avaliada pelos testes da placa quente, imersão da cauda, contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e hipernocicepção mecânica, além disso, os animais foram submetidos aos testes de toxicidade aguda e desempenho motor. Para avaliação da atividade anti-inflamatória, foi realizado o teste de edema de pata induzido por carragenina, prostaglandina E2 e TNF- α . O EHCPsp foi administrado por via oral nas doses de 50, 100, 500 e 1000 mg/kg. O perfil fitoquímico do EHCPsp, foi investigado pela presença ou ausência dos seguintes metabólicos secundários: ácidos orgânicos, alcaloides, antraquinonas, cumarinas, fenóis, flavonoides, saponinas, triterpenos/esteroides e taninos. O EHCPsp não apresentou toxicidade até a dose de 5000mg/kg e não alterou o desempenho motor dos animais. O EHCPsp reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, o tempo de lambidas das patas na segunda fase do teste da formalina e a hipernocicepção induzida por carragenina, prostaglandina E2 e TNF- α . O EHCPsp inibiu significativamente o edema de pata induzida por carragenina, prostaglandina E2 e TNF- α . A triagem fitoquímica do EHCPsp indicou presença de cumarinas, flavonoides, saponinas, triterpenos e esteroides. Os resultados do presente estudo são promissores, a ação antinociceptiva, mediada por mecanismos periféricos que envolve a participação de mediadores inflamatórios e a resposta anti-inflamatória significativa, que pelo menos em parte, envolve vias da PGE₂ e do TNF- α , justificam a utilização dessas plantas, tradicionalmente usadas como anti-inflamatórios. Cumarinas, flavonoides, saponinas, triterpenos e esteroides, estão presentes na composição do EHCPsp. O EHCPsp apresenta baixa toxicidade, nas doses utilizadas não induz qualquer tipo de incoordenação motora, excluindo efeitos depressores, porém ainda a necessidade de estudo das substâncias isoladas, para a utilização eficaz e segura.

Palavras chaves: burseraceae; antinocicepção; anti-inflamatórios; produtos naturais; amazônia; bioprospecção; modelos experimentais.

ABSTRACT

ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF THE HYDROALCOOLIC EXTRACT OF *Protium* sp

Author: Roberta de Freitas Lopes

Advisor: Renildo Moura da Cunha

The Burseraceae family represents one of the great botanical taxa present in the Amazon Forest, the *Protium* genus being the largest representative, known for its exudates and oleoresins rich in volatile substances that are used for various purposes, including curative purposes. Natural products are sources of a wide variety of biologically active substances and it is estimated that approximately 40% of the currently available drugs were developed directly or indirectly, especially from plants, but few species have been the subject of adequate studies. The aim of this research was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory potential of the hydroalcoholic extract of the *Protium* sp. (EHCPsp) bark in Swiss albino mice. The antinociceptive activity was evaluated by the hot plate tests, tail immersion, abdominal contortions induced by acetic acid, formalin test and mechanical hypernociception. In addition, the animals were submitted to acute toxicity and motor performance tests. For evaluation of the anti-inflammatory activity, the paw edema test induced by carrageenan, prostaglandin E2 and TNF- α was performed. EHCPsp was administered orally at doses of 50, 100, 500 and 1000 mg / kg. The phytochemical profile of EHCPsp was investigated for the presence or absence of the following secondary metabolites: organic acids, alkaloids, anthraquinones, coumarins, phenols, flavonoids, saponins, triterpenes / steroids and tannins. EHCPsp showed no toxicity up to the dose of 5000mg / kg and did not alter the motor performance of the animals. EHCPsp reduced the number of abdominal writhes induced by acetic acid, the licking time of the legs in the second phase of the formalin test, and the carrageenan, prostaglandin E2 and TNF- α induced hypernociception. EHCPsp significantly inhibited carrageenan, prostaglandin E2 and TNF- α induced paw edema. Phytochemical screening of EHCPsp indicated the presence of coumarins, flavonoids, saponins, triterpenes and steroids. The results of the present study are promising, antinociceptive action mediated by peripheral mechanisms involving the involvement of inflammatory mediators and the significant anti-inflammatory response, which at least in part involves PGE2 and TNF- α pathways, justify the use of these plants, traditionally used as anti-inflammatories. Coumarins, flavonoids, saponins, triterpenes and steroids are present in the composition of EHCPsp. The EHCPsp presents low toxicity, at the doses used it does not induce any type of motor incoordination, excluding depressant effects, but still the need to study the isolated substances, for the effective and safe use.

Key words: burseraceae; antinociception; anti-inflammatories; natural products; amazônia; bioprospecting; experimental models.

LISTA DE ABREVIATURAS

OECD – Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (sigla em inglês)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAF – Fator de agregação plaquetária (sigla em inglês)

PGE₂ – Prostaglandina E2

PGF_{2α} – Prostaglandina F2 alfa

PGI₂ – Prostaciclina

s – Segundo

SG – Substância Gelatinosa

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa (sigla em inglês)

UTAL – Laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos

v.o. – Via oral

VR-1 – Receptor vanilóide do tipo 1

μL – Microlitro

AA – Ácido araquidônico

anti-PAF- Platelet activating factor (sigla em inglês)

ASC – Área sob a curva

Cg – Carragenina

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX – Ciclooxigenase

DBCA – Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos

E.P.M. – Erro padrão da média

EHCPsp – Extrato hidroalcoólico da casca de *Protium sp*

EHFPsp – Extrato hidroalcoólico da folha de *Protium sp*

EHeFPsp- Extrato hexânico da folha de *Protium sp*

EHeCPsp- Extrato hexânico da folha de *Protium sp*

ECFPsp- Extrato clorofórmico da folha de *Protium sp*

ECCPsp-Extrato clorofórmico da casca de *Protium sp*
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial (sigla em inglês)
g – grama
h – hora
HR1 – Receptor histaminérgico 1
HR2 – Receptor histaminérgico 2
IASP – International Association for the Study of Pain (sigla em inglês)
IL – Interleucina
iNOS – Inducible Nitric oxide synthases (sigla em inglês)
mg/kg – Miligrama por quilograma
min. – Minuto
mm – Milímetro
nNOS ou BNOS – Neuronal Nitric oxide synthases (sigla em inglês)
NO – Óxido nítrico (sigla em inglês)
NOS – Nitric oxide synthases (sigla em inglês)
OECD – Organization for Economic Co-operation and Development (sigla em inglês)
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAF – Platelet Activating Factor (sigla em inglês)
PKC -
PGE₂ – Prostaglandina E2
PGF_{2α} – Prostaglandina F2 alfa
PGI₂ – Prostaciclina
s – Segundo
SG – Substância Gelatinosa
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
SP – Substância P
TNF-α – Fator de necrose tumoral-alfa (sigla em inglês)
v.o. – Via oral
VR-1 – Receptor vanilóide do tipo 1

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 COLETA BOTÂNICA	18
3.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS	19
3.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	22
3.2.1 Ácidos Orgânicos	23
3.2.2 Alcaloides	23
3.3.3 Antraquinonas	23
3.3.4 Cumarinas	23
3.3.5 Fenóis	24
3.3.6 Flavonoides	24
3.3.7 Saponinas	24
3.3.8 Taninos	24
3.3.9 Terpenos e Esteroides	24
3.4 EXPERIMENTOS “ <i>in vivo</i> ”	25
3.4.2 Preparo e administração de fármacos e extratos	25
3.4.3 Avaliação da toxicidade aguda oral	26
3.4.4 Atividade locomotora (teste do Rotarod)	26
3.4.5 Atividade antinociceptiva	27
3.4.6 Atividade anti-inflamatória	30
3.4.7 Análise Estatísticas	31
4 RESULTADOS	32
4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO	32
4.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	33
4.3 COORDENAÇÃO MOTORA (TESTE DO ROTAROD)	33
4.4 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	33
4.4.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	33
4.4.2 Teste da placa quente	34
4.4.3 Teste de imersão da cauda	35
4.4.4 Teste da Formalina	36
4.4.5 Teste de hipernocicepção mecânica (analgésímetro eletrônico)	38
4.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	42
4.5.1 Edema de pata induzido por Carragenina	42
4.5.2 Edema de pata induzido por PGE ₂ e TNF- α	42
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

“... E o seu fruto servirá de alimento e a sua folha de remédio”

Velho Testamento - Ezequiel, 47:12.

O uso de plantas medicinais pelo homem acompanha a sua história. Registros arqueológicos indicam sua importância cultural desde 60.000 anos A.C. Povos antigos como os Egípcios, Gregos, Hindus, Persas e mais recentemente os povos da América Pré-colombiana, aplicavam extensamente tais recursos terapêuticos, contribuindo para a construção dos sistemas de Medicina Tradicional dispersos ao redor do mundo (ROCHA et al., 2015).

Antes da segunda guerra mundial, um expressivo número de produtos naturais, isolados de plantas superiores, tornam-se importantes agentes terapêuticos e muitos ainda são utilizados atualmente. Quinina isolada da casca da *Chinchona* em uso na clínica como antimalárico, morfina e codeína isoladas do látex do *Ópio* utilizada como analgésico, digoxina obtida das folhas de *Digitalis purpúrea* utilizada no tratamento de problemas cardíacos, atropina e hioscina isoladas de espécies da família *Solanaceae* utilizados como antiespasmódico. Da mesma forma, alguns antibióticos desenvolvidos a partir de substâncias isoladas dos gêneros *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces* produzidos durante a segunda guerra também continuam em uso (KONG et al., 2003).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade. Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (MS, 2006).

A investigação farmacológica de plantas medicinais para o tratamento de doenças tem sido considerada prioridade pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A adequada validação através de pesquisas trazem segurança no uso de plantas

medicinais, evitando que ocorra reações indesejáveis que comprometam a saúde de quem as utiliza (PONTE, 2009). Os produtos naturais são potenciais fontes de grande variedade de substâncias com atividade biológica e estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, especialmente oriundas de plantas (CALIXTO, 2001; WHO, 2011).

No Brasil existem aproximadamente 50.000 gêneros vegetais, cerca de 50% possui alguma propriedade farmacêutica, sendo que apenas 1% delas foi objeto de estudos adequados (MARTINS et al., 1998). Só a Amazônia dispõe de mais de 200.000 espécies de plantas (MING et al., 1997). Através dos produtos naturais foi possível a compreensão de diversos fenômenos fisiológicos complexos, bem como a identificação, isolamento e reprodução de substâncias e estruturas. Através disto, a indústria farmacêutica pode desenvolver fármacos mais seletivos e eficazes no tratamento de doenças mais complexas (CALIXTO, 2003). Assim, as plantas são fontes importantes de compostos naturais bioativos, que frequentemente se constituíram em modelos para síntese de grande número de fármacos (SIMÕES et al., 2010). A maior fonte de substâncias bioativas sintetizadas por plantas decorre da geração de metabólitos secundários que, por muito tempo foram considerados como produtos de excreção do vegetal. Entretanto, atualmente sabe-se que os metabólitos secundários são substâncias diretamente envolvidas nas funções biológicas do vegetal. Os metabólitos secundários são desenvolvidos principalmente a partir metabólitos primários, que são substâncias que na célula possuem papel estrutural e de fonte energética (SIMÕES et al., 2010), tal como proteínas, carboidratos e lipídios. Os metabólitos secundários podem atuar como mediadores químicos, intermediando entre a planta e o ambiente e desempenham um papel crucial na proteção da planta (TAIZ & ZEIGER, 2010).

Entre as plantas os metabólitos secundários produzidos podem se diferir em qualidade e quantidade, dependendo do local de ocorrência, diferença entre ciclo de cultivo, pois muitos deles têm sua síntese desencadeada por eventuais vicissitudes a que as plantas estão expostas (FERREIRA et al., 2000). Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, dos flavonoides e dos taninos condensados (SANTOS, 2003). A origem de todos os metabólitos secundários

pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários, o ácido chiquímico e o acetil-CoA (Figura 01).

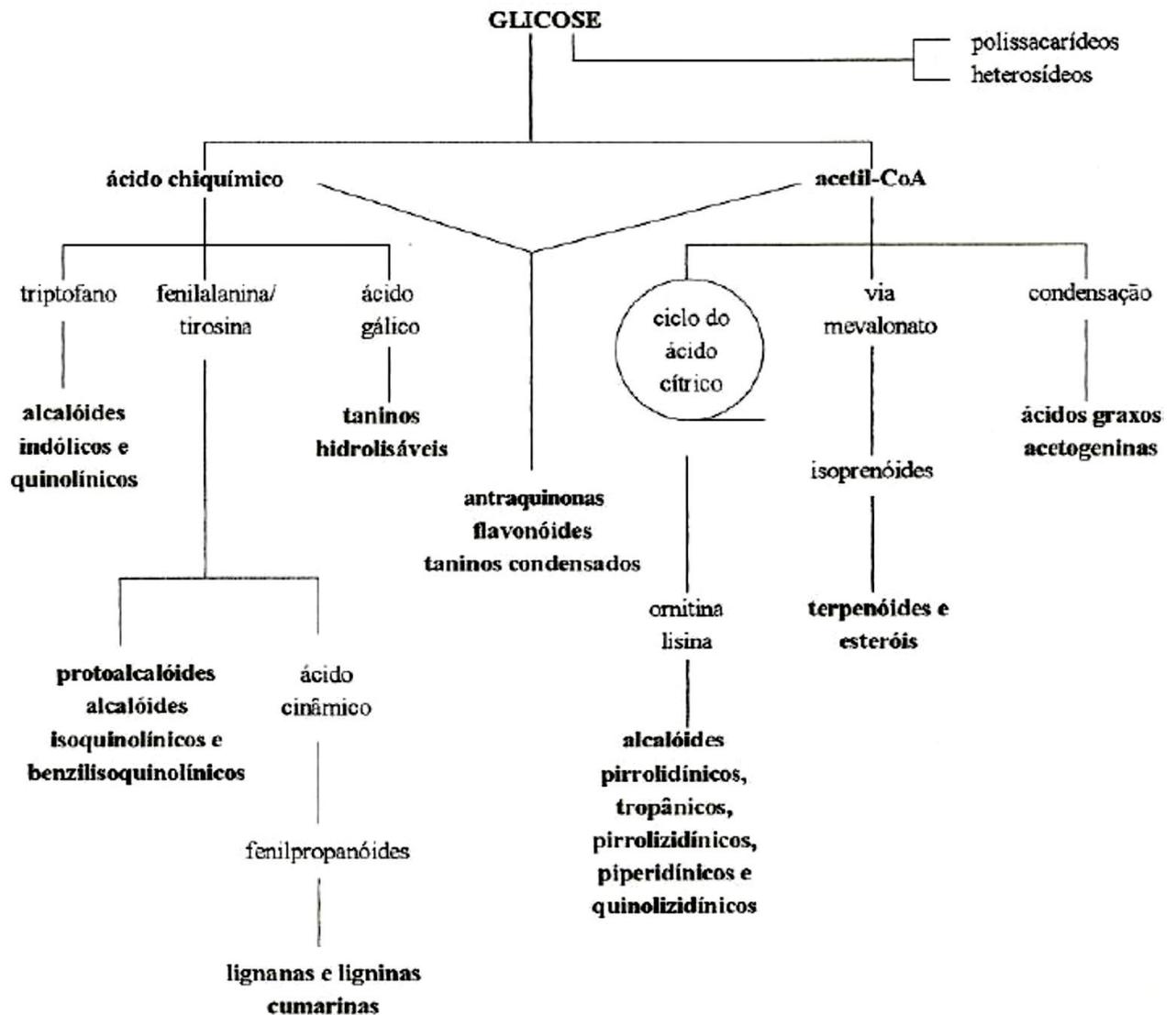


Figura 01 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Fonte: Adaptado de SANTOS, 2007).

Os flavonoides compreendem uma série de compostos secundários que ocorrem exclusivamente em plantas superiores, são amplamente distribuídos e representam um dos grupos mais importantes entre os produtos de origem vegetal (DI STASI, 1996; MACHADO et al., 2008). Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, tal como proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (MACHADO et al., 2008). Entre suas atividades farmacológicas destaca-se sua ação anti-PAF, indutora da formação de hemoglobina, antiespasmódica e anti-hepatotóxica. Os flavonoides também são utilizados na

produção de odores e sabores de alimentos e bebidas de origem vegetal (DI STASI, 1996).

Os terpenos constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (SIMÕES & SPITZER, 2003). Os compostos terpenóides apresentam a segunda classe com maior número de constituintes ativos e estão subdivididos em várias subclasses: monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), sesquiterpenos (25 carbonos), triterpenos (30 carbonos) e tetraterpenos (40 carbonos). Dentre suas atividades farmacológicas destaca-se sua ação antifúngica, anti-inflamatória, antimicótica, antiúlcera, citotóxica, tratamento de dores musculares, reumatismo, dentre outras (DI STASI, 1996).

Outro grupo de metabólitos secundários encontrado nas plantas são os esteroides. Estas substâncias constituem um grupo químico perfeitamente individualizado e de grande homogeneidade estrutural e farmacológica. Alguns esteroides de origem natural são caracterizados pela sua alta especificidade e poderosa ação que exercem no músculo cardíaco. Esses esteroides ocorrem como 24 glicosídeos esteroidais e devido a sua ação sobre o músculo cardíaco, são denominados de glicosídeos cardioativos ou cardíacos (SIMÕES et al., 2003).

Saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos. Essas substâncias possuem em sua estrutura química uma parte com característica lipofílica (terpeno ou esteroide) e outra com característica hidrofílica (açúcares) os quais conferem propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante (SCHENKEL et al., 2003). Ao longo do tempo, esse grupo de substâncias tem sido de interesse farmacêutico, seja como adjuvante em formulações, componentes ativos em drogas vegetais, ou ainda, como matéria-prima para a síntese de esteroides (ASCHENKEL et al., 2003).

Os metabólitos secundários atuam de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: interferindo na produção de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros); agindo sobre a produção ou ação de segundos mensageiros, tal como a guanosina monofosfato cíclica (GMPc), adenosina monofosfato cíclica (AMPc), proteínas quinases (PKs) etc., na expressão de fatores de transcrição como proteína ativadora-

1 (AP-1), fator nuclear κ B (NF- κ B) e proto oncogenes (cjun, c-fos e c-myc); inibindo ou ativando mediadores pró-inflamatórias como sintase do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenases (COX), citocinas (interleucina (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF- α) etc., neuropeptídeos e proteases (CALIXTO, 2005).

A família Burseraceae compreende 18 gêneros e 700 espécies divididos em três tribos: Protieae (três gêneros), Canarieae (oito gêneros) e Bursereae (sete gêneros) (WEEKS et al., 2005). Ela representa um dos grandes táxons botânicos presente na Floresta Amazônica e espalhados por todo o Brasil, sendo o gênero *Protium* o maior representante, com mais de 80% das espécies de Burseraceae (SIANI et al., 2004; SIQUEIRA, 1991). Essa família é bastante conhecida por seus exsudados e oleoresinas ricas em substâncias voláteis que são utilizadas para várias finalidades, como por exemplo na perfumaria (PONTES et al., 2007). Algumas plantas possuem grande importância histórica como a mirra (*Commiphora*) e o olíbano (*Boswellia*), que eram utilizadas em rituais religiosos (LANGENHEIM, 2003). Protieae por sua vez, está distribuída em quatro gêneros: *Garuga*, *Crepidosperrum*, *Tetragastris* e *Protium* (DALY, 1989). *Protium* Burm. f., conhecido vulgarmente como breu na Amazônia brasileira, destaca-se pela diversidade de espécies na Amazônia, com aproximadamente 146 espécies ocorrentes, sendo 42 endêmicas da região (MELO et al., 2007). Na região do Alto Juruá, município de Cruzeiro do Sul, Estado do Acre, foram registradas mais de 40 espécies do gênero *Protium*, conforme levantamento realizado pelo projeto da Flora do Acre (MARQUES, 2009). O gênero *Protium* é representado por árvores ou arbustos com canais produtores de resina aromática e são comumente denominadas como anine, Caraño, animecillo, copal, copalillo, almecega, almíscar, gálbano, breu, breu manda, breu branco, breu mescla, breu maxixe, breu vermelho, jauaricica, goma-limão ou brasileiro-elemi (LANGENHEIM, 2003).

O gênero *Protium* é utilizado na medicina popular como um importante agente terapêutico, na indústria artesanal de verniz, na calafetagem de pequenas embarcações e queimada como incenso em rituais religiosos (RIBEIRO et al., 1999; SIQUEIRA, 1991) e o óleo essencial utilizado para fins de perfumaria (RAMOS et al., 2000). Na medicina popular, a casca e folhas das plantas do gênero *Protium* são vastamente empregadas como agentes anti-inflamatórios, analgésicos, antitumorais, adstringentes e expectorantes e repelente de insetos (SUSUNAGA, 1996; BANDEIRA et al., 2001). Muitas dessas aplicações foram confirmadas experimentalmente

utilizando a resina de *Protium*, onde se verificou eficácia terapêutica anti-inflamatória, antinoceptiva, antineoplásica e gastro protetora (OLIVEIRA et al, 2004a, b, c.; SIANI et al., 1999a). Corroborando esses resultados, Aragão (2004) descreve efeito antinoceptivo, antiedematogênico, anti-inflamatório, sedativo e ansiolítico de uma mistura isomérica de alfa e beta-amirina isolada da *Protium heptaphyllum* Aubl. March. Estudos farmacológicos realizados com o óleo essencial obtido das resinas e isolados da folha de várias espécies do gênero *Protium*, *P. heptaphyllum*, *P. strumosum*, *P. lewellyni* e a *P. hebetatum* mostraram atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas (SIANI et al., 1999). Segundo Aragão et al. (2015), a atividade anticonvulsivante da mistura de alfa e beta amirina de *Protium heptaphyllum* está relacionado com o sistema GABAérgico e pode ser ligada com a inibição da cascata de sinalização da PKC, assim como a alterações no metabolismo dos aminoácidos. *Protium*, é popularmente usado como analgésico e agente anti-inflamatório. No entanto, seu mecanismo farmacológico permanece desconhecido (LIMA et al., 2014).

Os constituintes majoritários das resinas de *Protium* são triterpenos pentacíclicos α e β -amirina (DIAS et al., 2011) e breína (BANDEIRA et al., 2002). As misturas de cinamato de α e β -amirina, apresentam significativa atividade anti-inflamatória e, ainda, ação antiartrítica e analgésica. Todavia, estas atividades foram resultadas de ensaios biológicos feitos com estes triterpenos em mistura. Assim, o potencial biológico não foi estabelecido para estes derivados da α e β -amirina individualmente (DIAS et al., 2011). Três flavonoides foram identificados como: catequina¹⁷, quercetina¹⁸ e quercetina-3-O-ramnosil¹⁹, respectivamente (BANDEIRA et al., 2002).

Estudos fitoquímicos da resina, demonstraram a presença de lignanas na *Protium tenuifolium* e *Protium unifoliolatum*, cumarinas na *Protium opacum* e triterpenos como maniladiol e breína na *Protium heptaphyllum* (ZOGHBI et al., 1981; SIQUEIRA et al., 1995; SIANI et al., 1998).

Os óleos essenciais das folhas, frutas e resina de *Protium heptaphyllum* foram analisadas por GC/MS. Os principais constituintes identificados nas folhas foram: mono- e sesquiterpenos, tais como mirceno (18,6 %), β -cariofileno (18,5 %), enquanto que os óleos de resina e fruta continha principalmente monoterpenos tais como α -pineno (10,5 %), limoneno (16,9 %), α -felandreno (16,7 %) e terpinoleno (28,5 %) no óleo de resina, e α -pineno (71,2 %) do óleo dos frutos (BANDEIRA et al., 2001). Os óleos essenciais da resina obtiveram uma grande reatividade frente às reações de

metilação e acetilação, em decorrência de grupamentos alcoólicos e ácidos presentes em seus constituintes principais. O fracionamento da resina, por métodos cromatográficos e análise por RMN, permitiu o isolamento e identificação de sete constituintes triterpênicos, distribuídos em três misturas: α e β -amirina; breína e maniladiol; lupenona, α e β -amirinona. Além disso, foi possível verificar que este material se apresenta como uma fonte alternativa para a obtenção de α e β -amirina em quantidade significativa (VIEIRA JUNIOR et al., 2004).

Silva (2012) estudou o xilema secundário da *Protium altsonni* e identificou a presença majoritária dos sesquiterpenos: α -calacoreno e epi- α -muurolol. Machado et al. (2003) realizou um estudo sazonal das folhas e galhos da *Protium spruceanum* (Benth.) Engl., encontrando monoterpenos e sesquiterpenos nas amostras coletadas durante 12 meses, com grande variação dos monoterpenos durante esse ano. Silva et al. (2009), analisou o extrato hexânico de óleo-resinas das *Protium apiculatum*, *Protium grandifolium*, *Protium hebetatum*, *Protium heptaphyllum*, *Protium paniculatum*, *Protium strumosum* e *Protium tenuifolium* encontrando os seguintes grupos de substâncias: monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos e fenil-propanóides. Pela primeira vez MARQUES et al. (2010) relata a composição química do oleoresina de espécies de *Protium* coletadas no estado do Acre. No entanto, o óleo essencial a partir da resina de *P. heptaphyllum subsp. heptaphyllum* (PHH) mostra diferenças relevantes entre as três espécies estudadas de *Protium*, esta espécie foi a única que apresentou quatro hidrocarbonetos lineares com rendimento de 20,47%, sendo n-tretadecano (13,38%) o segundo componente mais concentrado.

Os óleos essenciais de *Protium hebetatum* demonstraram α -pineno como constituinte principal, com concentrações que variam de 21,9% para 51,9% e presença de uma elevada percentagem de sesquiterpenóides. Outros monoterpenos encontrados foram β -felandreno, α -felandreno, β -pineno, trans-di-hidro- α -terpineol, α -terpineol e α -terpineno (SILVIA et al., 2013). Estudos com o caule de *Protium hebetatum* identificaram e isolaram uma mistura de dois terpenoides (α e β -amirina), de três esteroides (campestrol, estigmasterol e sitosterol) (SILVA et al., 2009; COSTA et al 2012) e uma cumarina (escopoletina) (COSTA et al., 2012).

Os óleos de folhas e galhos de *Protium* mostraram predominância de α -copaeno (19,6 e 15,2%) e trans-cariofileno (16,4 e 10,1%), respectivamente, além espatulenol (13,9%), detectado no óleo das folhas. Os principais constituintes em folhas de *P. subs heptaphyllum ulei* foram α -copaeno (11,8%), trans-cariofileno

(16,9%) e germacreno B (12,8%). Os óleos de *P. pilosissimum* foram marcados pela presença de β -sesquiphellandrene (24,3%) nas folhas (CARVALHO et al., 2013).

A dor é definida segundo a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual potencial ou real, ou em termos que sugerem tal dano (BASBAUM; BUSHNELL, 2002). Desta forma, além da experiência emocional, a dor está associada a um componente sensorial, denominado sistema nociceptivo, o qual depende da ativação de receptores específicos, os nociceptores, e vias neuroanatômicas que fazem comunicação entre o sistema nervoso periférico e o sistema nervoso central (RUSSO; BROSE, 1998; JULIUS; BASBAUM, 2001; MENSE, 2009).

Fisiologicamente, a dor pode ser classificada em nociceptiva, neurogênica e psicogênica, como pode envolver mais de um destes três mecanismos. A dor nociceptiva é o resultado de um estímulo (p. ex., térmico, químico) nos receptores de dor, podendo ser somática, se sua origem for a pele, ossos ou músculos, ou pode ser visceral se for originada nos órgãos abdominais e torácicos, acompanhada de inflamação, a exemplo da dor pós-operatória e da queimadura. A dor neuropática resulta da lesão no sistema nervoso central ou periférico, e manifesta-se na ausência de agressões teciduais. Já a dor psicogênica é aquela em que o estímulo psíquico seria responsável por seu eliciar (BOWSHER, 1999; MILLAN, 1999; GALLUZZI, 2007; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; ALVES NETO, 2009).

Essas categorias de dor — fisiológica, inflamatória, neuropática e psíquica — são produzidas por vários mecanismos diferentes. A conduta ideal é a de que o tratamento seja direcionado mais para os mecanismos específicos do que para a supressão do sintoma da dor. Na atualidade, dispõe-se de diversos agentes farmacológicos para alívio da dor. Esses fármacos possuem mecanismos de ação que interferem na resposta dos neurônios aferentes primários a estímulos sensoriais somáticos ou viscerais, com transmissão da informação ao cérebro e resposta perceptual a um estímulo nociceptivo. A discussão que se segue sobre a dor e a farmacologia dos analgésicos começa com a descrição dos mecanismos pelos quais os estímulos nocivos levam à percepção da dor (LOESER; TREEDE, 2008).

As dores de origem inflamatórias e as neuropáticas são transtornos clínicos, que afetam pacientes e podem promover dores crônicas que permanecem ainda nos dias atuais sem uma terapia realmente eficiente na grande maioria dos casos. Ambos processos são caracterizados por estados de hipersensibilidade no foco ou gatilho da

lesão e na área adjacente (WOOLF; SALTER, 2000). Quando o sujeito experimental não pode definir verbalmente a resposta de dor, como no caso dos animais, torna-se preferível a utilização do termo “Resposta Nociceptiva” por englobar as respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor, dissociando-as do caráter cognitivo-afetivo da resposta. Dessa forma, apesar dos animais não apresentarem a capacidade de comunicar verbalmente a ocorrência da dor, quando são submetidos a um estímulo nociceptivo, eles exibem respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em humanos (LAPA et al., 2003).

Nociceção, no entanto, é o processo pelo qual estímulos nocivos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas especializadas, denominadas de nociceptores (BASBAUM et al., 2009). Os nociceptores são terminações neuronais livres dos neurônios de primeira ordem, que estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. Estruturas específicas responsáveis pela detecção do estímulo nociceptivo em nível periférico, cuja função é preservar a homeostasia tecidual, assinalando uma injúria potencial ou real (WILLIS; COGGESHALL, 2004; KLAUMANN et al., 2008). Estão descritos em quatro classes: os mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos. Os nociceptores mecânicos respondem a pressão intensa; os nociceptores térmicos respondem a temperaturas extremas, quentes ($> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou frias ($< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e possuem fibras A mielinizadas, em conjunto esses nociceptores de fibra A δ - β são denominados mecanotérmicos. Os nociceptores polimodais respondem aos estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. Os nociceptores silenciosos são ativados por estímulos químicos, mediadores inflamatórios, e respondem a estímulos mecânicos e térmicos somente depois de serem ativados (FEIN, 2011).

Os nociceptores são responsáveis por transmitir o sinal nociceptivo da periferia para os neurônios secundários que estão localizados no corno dorsal da medula, estes que transmitem as informações para os centros integrativos do Sistema Nervoso Central (SNC) através de vias ascendentes da medula espinhal (RAJA; MEYER; CAMPBELL, 1988). As fibras são divididas em três categorias e possuem propriedades diferentes, o que lhes permitem transmitir tipos diferentes de informação sensorial, a primeira são as fibras sensoriais primárias $A\alpha$ e $A\beta$ de grandes calibres e altamente mielinizadas, permitindo-lhes, assim, conduzir rapidamente potenciais de ação, responsáveis pela informação proprioceptiva (toque leve e pressão na pele); na segunda estão os neurônios de corpos celulares de pequeno e médio diâmetro,

formados pelas fibras C amielinizadas de condução lenta, responsáveis por detectar estímulos dolorosos (dor lenta ou segunda dor), as terminações desse tipo de fibra são polimodais, termossensíveis ao calor e frio, sensíveis aos estímulos mecânicos e por substâncias químicas como acetilcolina, serotonina, histamina, bem como a capsaicina, e são consideradas fibras importantes no estudo da dor clínica e por fim, as fibras A δ pouco mielinizadas e menores em diâmetro que as torna mais lenta que A β , respondendo tanto a estímulos térmicos quanto a mecânicos (dor rápida ou primeira dor). Conjuntamente, as fibras A δ e C são denominadas de nociceptores, respondendo a estímulos nocivos, sejam eles mecânicos, térmicos ou químicos (BASBAUM et al., 2009; HUCHO; LEVINE, 2007; CARLINI; MENDES, 2011).

Estímulos nociceptivos de origem mecânica, térmica ou química podem ativar canais iônicos específicos presentes nos terminais periféricos de fibras aferentes nociceptivas, gerando correntes despolarizantes que, dependendo da intensidade, iniciam os disparos dos potenciais de ação por ativação de canais de sódio sensíveis à voltagem. Quando os nociceptores são ativados por algum tipo específico de estímulo esta sensação é transmitida por vias aferentes até o gânglio da raiz dorsal (RITTNER; BRACK; ESTEIN, 2008). Esses neurônios então fazem sinapses com os neurônios de segunda ordem na superfície do corno dorsal da medula espinhal. Neste processo o corno dorsal age como um filtro de informações dos sinais periféricos antes de enviá-los a sítios supraespinhais, como o tálamo, córtex somatossensorial, córtex insular e córtex cingulado, onde as informações transmitidas serão processadas no contexto nociceptivo (SCHMIDTKO; TEGEDER; GEISLINGER, 2009)

Sabe-se que uma vez ativadas, as fibras aferentes primárias liberam vários neurotransmissores (p. ex. glutamato, substância P), que por sua vez irão ativar neurônios de segunda ordem do tipo específicos, localizados em lâminas de Rexed na medula espinhal, especialmente as lâminas I, II e V. A organização citoarquitetônica da medula espinhal permite distinguir anatomicamente onde cada tipo de fibra aferente primária termina, sendo que as lâminas de I a VI fazem parte do corno dorsal, as lâminas VII, VIII e IX constituem o corno ventral e a lâmina X representa as células organizadas ao redor do canal medular (WILLIS; COGGESHALL, 1991; MILLAN, 1999; TODD; KOURBER, 2005; RIBEIRO-DA-SILVA; KONICK, 2008; MENSE, 2009).

A maioria dos neurônios presentes nas lâminas I, II e III possuem neurônios que permanecem na medula espinhal, realizando localmente conexões com os neurônios de projeção, estes são chamados de interneurônios, os quais podem ser

divididos em duas classes principais: excitatórios (glutamatérgicos) e inibitórios (GABAérgicos). Entretanto, existem sinapses diretas entre as vias aferentes primárias e as células de projeção, as quais utilizam, por exemplo, a substância P como transmissor (TODD et al., 2002; NAIM et al., 1997). O glutamato quando liberado pelas fibras aferentes primárias atua instantaneamente em receptores glutamatérgicos, estimulam a atividade de enzimas intracelulares e a produção de segundos mensageiros hiperalgésicos, tal como o NO (BEIRITH et al., 2002). Esta ação persiste somente por alguns milissegundos, gerando uma sensação de dor rápida. Já a substância P é liberada mais lentamente, tendo sua concentração aumentada em um período de segundos ou mesmo minutos, sugerindo uma sensação de dor mais duradoura (GUYTON & HALL, 2011). O CGRP juntamente com a substância P pode agir em outras células-alvo como mastócitos e músculo liso vascular, produzindo inflamação neurogênica com sintomas como rubor, edema e hipersensibilidade (RICHARDSON & VASKO, 2002).

A inflamação foi caracterizada clinicamente em 30 a.C. pelo médico romano Cornélio Celsus por quatro sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. Posteriormente, o patologista alemão Rudolf Virchow (1871) acrescentou a perda da função do membro afetado. A inflamação tem como objetivo levar a resolução do dano tecidual, contribuindo assim para o processo de homeostasia (GILROY et al., 2004).

O processo inflamatório é dividido em agudo e crônico por um critério temporal e por algumas diferenças nos mediadores inflamatórios presentes em cada condição. A inflamação aguda é subdividida em três fases: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração leucocitária, sendo cada uma dessas fases imprescindíveis para o surgimento da próxima (SCOTT; LAM; FERRELL, 1994). Dentre estas alterações, podemos destacar a migração de leucócitos para o foco inflamatório como uma estratégia fundamental na defesa do organismo contra infecções (MALECH & GALLIN, 1987).

As alterações no fluxo sanguíneo e no calibre vascular se iniciam logo após a lesão, na seguinte ordem: vasodilatação, induzida principalmente pela histamina, bradicinina e NO, responsável pelo calor e rubor; e extravasamento vascular de fluido rico em proteínas, responsável pelo edema (KUMAR et al., 2005). A vasodilatação e o extravasamento de fluidos são acompanhados pela marginação, rolamento, adesão e transmigração endotelial de leucócitos para a área lesada, sendo uma das características da resposta inflamatória associada a dor (SHERWOOD & TOLIVER-

KINSKY, 2004; GOSSLAU et al., 2011). Os leucócitos liberam substâncias algioênicas, dentre elas a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, substância P, PGE₂, leucotrienos, TNF- α , IL-1 β , e adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Essas substâncias sensibilizam os nociceptores que transmitem o impulso nervoso para o sistema nervoso central e também liberam a substância P no sítio da inflamação, um neuropeptídeo de primeira ordem que estimula a vasodilatação juntamente com a continuidade do próprio processo inflamatório, observe os mediadores envolvidos na ação no Quadro 01 (TAIWO & LEVINE, 1991; GUIEU et al., 1996; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000; CALIXTO et al., 2001; TEIXEIRA, 2001).

Quadro 01 Mediadores inflamatórios, tabela modificada de Pereira, 2006.

Mediador Inflamatório	Ação sobre os nociceptores	Características e Efeitos	Referências Bibliográficas
Substância P	Ativação e/ou sensibilização	Hiperalgisia direta e indireta por atuação em receptores NK-1, sinergismo com o glutamato	(Furst, 1999) (Lofgren et al., 1999) (Turnbach e Randich, 2002) (Carlton et al., 1998) (Teoh et al., 1996)
Prostaglandinas	Sensibilização e/ou Ativação	Hiperalgisia em modelos de dor inflamatória e neuropática sensível aos inibidores da ciclooxigenase	(Vane, 1971) (Malmberg e Yaksh, 1995) (Yang et al., 1996) (Hay et al., 1997) (Syriatowicz et al., 1999) (Tonai et al., 1999) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004)
NO	Sensibilização	Indução de analgesia ou hiperalgisia, dependente da concentração.	(Okuda et al., 2001) (Doursout et al., 2003) (Sousa e Prado, 2001)
Bradicinina	Ativação e/ou sensibilização	Hiperalgisia mediada por receptores B2 constitutivos e B1 induzidos, além do aumento da síntese de outros mediadores em modelos de dor aguda e crônica (neuropática). Sensibilização de receptores TRPV1	(Dray, 1997) (Steranka et al., 1988) (Lopes et al., 1995) (Lopes et al., 1993) (Andreeva e Rang, 1993) (Marceau et al., 1998) (Ni et al., 1998) (Dray e Bevan, 1993) (Mathis et al., 1996) (Austin et al., 1997) (Ferreira et al., 1993)
NGF (fator de crescimento neural)	Sensibilização	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1	(Winkelstein, 2004) (Marchand et al., 2005)
Citocinas pró-inflamatórias: interleucina IL-1β, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF-α)	Sensibilização	Hiperalgisia em modelos de dor aguda inflamatória e crônica (neuropática).	(Stein et al., 1988) (Cunha et al., 1991) (Fukuoka et al., 1994) (George et al., 2005) (Schafers et al., 2001) (Murphy et al., 1999)

O ácido araquidônico (AA) liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da enzima fosfolipase A₂ (ativada por diversos estímulos: químico, inflamatório, traumático ou mitogênico), possui um papel regulador na fisiologia celular e é fundamental na inflamação, uma vez que serve como substrato para diferentes enzimas produtoras de eicosanóides (BALSINDE et al., 1998; KUMMER & COELHO, 2002). Este ácido graxo é metabolizado por três sistemas enzimáticos principais: a ciclooxigenase (COX), responsável pela produção de prostaglandinas; a lipoxigenase (LOX), que produz leucotrienos; e as epoxigenases do citocromo P-450, que originam os ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) (SPECTOR et al., 2004; ROCHA et al., 2007).

As prostaglandinas, metabólitos derivados da ação das COXs sobre o AA, desenvolvem ações importantes nos processos fisiológicos normais e também nos processos patológicos, através de receptores EP1, EP2, EP3 e EP4 (KOBAYASHI & NARUMIYA, 2002). Os efeitos biológicos das prostaglandinas incluem a regulação da função vascular, modulação das funções neuronais e renais, o processo de ovulação, a proteção da mucosa gástrica, a dor e inflamação (SAMUELSSON et al., 2007; LEVY et al., 2001; ROCHA et al., 2007; WALLACE, 2008). Nos vasos, as prostaglandinas são responsáveis pela vasodilatação e pelo edema no processo inflamatório, e também age como um mediador lipídico importante no processamento dos sinais dolorosos periféricos ou centrais, uma vez que os receptores de PG são expressos nas fibras sensoriais (ZEILHOFER & BRUNE, 2006; VANEGAS & SCHAIBLE, 2001).

Os neutrófilos são os principais leucócitos que participam na defesa do organismo durante o processo inflamatório agudo (MALLECH & GALLIN, 1987). A migração destes leucócitos durante o processo inflamatório é decorrente da liberação de mediadores quimiotáticos, como os mediadores lipídicos (PGE₂), citocinas e quimiocinas, que promovem o aumento da adesão dos neutrófilos com as células endoteliais (MALLECH & GALLIN, 1987; DAL SECCO et al., 2006). Este processo ocorre inicialmente, através do rolamento dos neutrófilos sobre o endotélio venular, sendo este evento mediado por uma família de moléculas de adesão denominadas selectinas (L, P, E). A seguir, ocorre uma forte adesão entre os neutrófilos e as células endoteliais, mediada por integrinas (β 2-integrinas) e imunoglobulinas, tais como as moléculas de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1). Esta aderência permite, portanto, que os neutrófilos transmigrem para o foco inflamatório através das junções intercelulares (diapedese) presentes nas células endoteliais (BURKE-GAFFNEY &

HELLEWELL, 1996; SMITH, 1993; ZHANG et al., 2001; PÁNES et al., 1999; DINARELLO, 2000).

No entanto, apesar do recrutamento de neutrófilos ser uma resposta protetora do organismo, a ocorrência de uma resposta exacerbada gera efeitos indesejáveis o que pode levar a um progressivo dano tecidual no local inflamado, podendo este fenômeno ocorrer em diferentes doenças inflamatórias. Portanto, o bloqueio do tráfego de neutrófilos durante o processo inflamatório vem sendo um alvo promissor na descoberta de novos fármacos anti-inflamatórios (MALECH & GALLIN, 1987).

Associado ao processo inflamatório, na maioria das situações ocorre o aparecimento de dor. Descrita como dor inflamatória, este evento é decorrente da liberação de mediadores inflamatórios, que provocam ativação e/ou sensibilização dos nociceptores. No caso da sensibilização, ocorre uma diminuição do limiar de ativação do nociceptor, fazendo com o que o mesmo seja ativado por estímulos que em condições normais seriam inócuos (MILLAN, 1999; VERRI JR et al., 2006). Na inflamação, as prostaglandinas são reconhecidas como um dos principais mediadores responsáveis pela sensibilização dos nociceptores. Tal fato é compreensível, devido a ação analgésica dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), que inibem a síntese de prostaglandinas, conseqüentemente diminuindo a dor inflamatória. No entanto, devido aos muitos efeitos adversos, como por exemplo, problemas renais e gástricos atribuídos ao uso prolongado dos AINEs, o controle da dor inflamatória ainda é um desafio (VERRI JR et al., 2006).

Outro grupo de anti-inflamatórios são os glicocorticóides, hormônios esteróides, que possui em sua estrutura, um núcleo esteróide, formado por quatro anéis com 17 átomos de carbono, que remetem ao seu precursor, a molécula de colesterol (KRAEMER, 2007), eles estão entre os fármacos mais utilizados no mundo e são eficazes no tratamento de doenças inflamatórias e imunológicas, incluindo asma, dermatites, artrite reumatóide e alguns casos de câncer (DE BOSSCHER et al., 2010). Os órgãos classicamente responsáveis pela síntese dos glicocorticóides são as adrenais, ou supra-renais, que são glândulas endócrinas localizadas sobre os rins. Há evidências de que outros órgãos, incluindo pele, intestino, timo e coração, podem ser capazes de sintetizar glicocorticóides, uma vez que já foi detectada a presença de enzimas esteroidogênicas, bem como níveis significativos de glicocorticóides, mesmo após adrenalectomia, nestes órgãos (TAVES et al., 2011).

Dentre os recentes progressos dos estudos de dor inflamatória, destaca-se o papel das citocinas. Estudos têm mostrado que a liberação dos mediadores hipernociceptivos (como as prostaglandinas) durante o processo inflamatório, é decorrente de uma cascata de eventos iniciais, desencadeada por diferentes citocinas pró e anti-inflamatórias. Devido a este achado, estas moléculas se tornaram alvos na descoberta de novos fármacos analgésicos (VERRI JR et al., 2006; CUNHA et al., 2005). O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) é uma das principais citocinas que controlam o processo pró-inflamatória (ARSLAN; ERDUR; AYDIN, 2010), sintetizada como uma proteína transmembrana com massa molecular de 26 kDa (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010). O TNF- α sofre uma clivagem antes de ser liberada para a circulação como uma molécula solúvel, sendo a primeira a ser liberada após um estímulo inflamatório, levando a aumento da expressão da COX e produção de PGE₂ (WEI et al., 2007). Seus efeitos são mediados por dois receptores: TNFR1 e TNFR2, sendo que o primeiro está relacionado com apoptose, com a dor neuropática e com a dor inflamatória, e o segundo com o processo inflamatório (CUNHA et al., 2005; SOMMER; SCHMIDT; GEORGE, 1998).

A importância de avaliar a ação farmacológica de drogas vegetais, principalmente com informações restritas a dados etnofarmacológicos e ainda, considerando a importância do potencial farmacológico reportado ao gênero da espécie em estudo, o presente trabalho visou investigar preliminarmente o perfil fitoquímico, a segurança toxicológica, e as ações analgésicas e/ou anti-inflamatórias dos extratos de *Protium sp.*

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar o perfil fitoquímico e avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatória do extrato da planta *Protium sp.* em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar qualitativamente as classes de metabólicos secundários presentes nos extratos hidroalcoólicos da casca (EHCPsp) e folha (EHFPsp) de *Protium sp.*;
- Avaliar a toxicidade aguda dos EHCPsp e EHFPsp;
- Investigar o efeito do EHCPsp na performance motora dos animais através do teste de RotaRod;
- Avaliar o efeito do EHCPsp sobre a resposta nociceptiva nos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina, teste de imersão da cauda, teste da placa quente e hipernocicepção mecânica (Von Frey);
- Avaliar o efeito do EHCPsp sobre resposta inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina, prostaglandina e TNF- α .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA BOTÂNICA

As folhas e cascas da planta *Protium* sp. foram coletadas no município de Mâncio Lima - Acre, localização 18 UTM 723548 7439155643 471 (Figura 02), entre os meses de maio e novembro de 2014, autorizado pelo Sisbio/ICMBio número 45912-1.

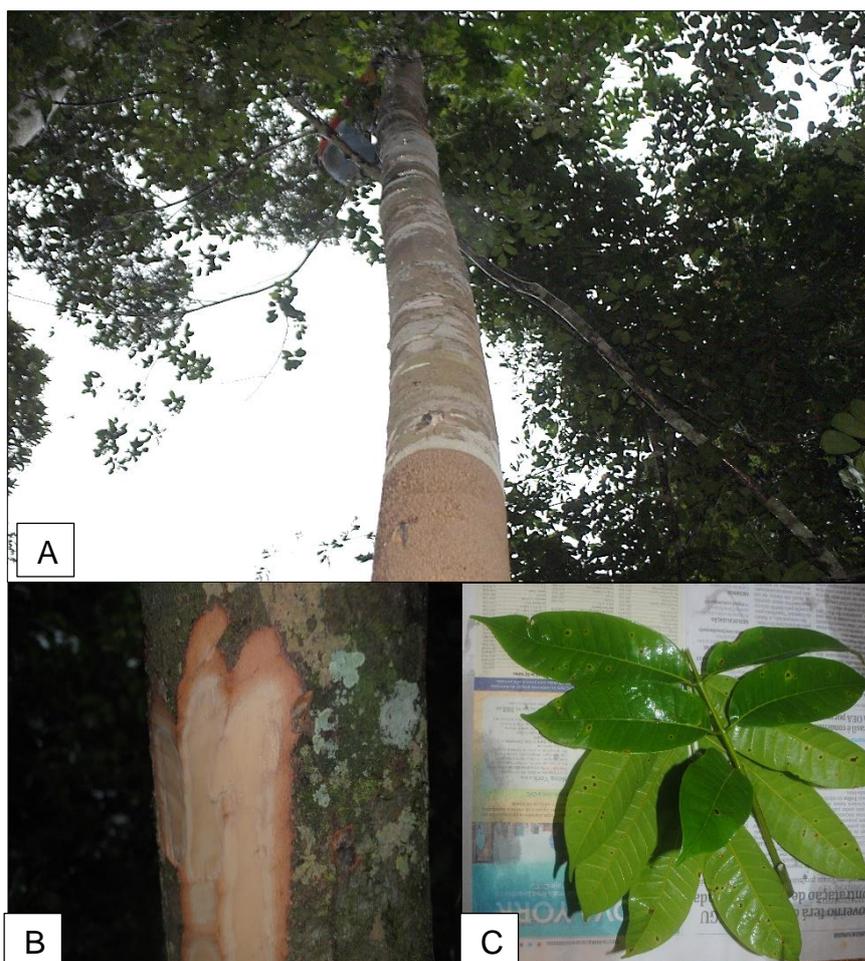


Figura 02 Coleta, detalhes de *Protium* sp. Tronco e copa (A); Tronco, após coleta da casca (B) e folhas destacadas, para preparo de exsicata (C). Foto – Roberta de F. Lopes.

A coleta de espécimes foi feita usando-se os procedimentos padrão de coleta e herborização (MARTINS-DA-SILVA, 2002; MARTIN, 1995; CUNNINGHAM, 2001). As árvores foram georreferenciadas, fotografadas e preenchido um questionário contendo informações de localização, principais características macroscópicas,

aspecto da árvore, local ao redor da árvore (seco, alagado, beira de rio), presença de flor ou fruto, características da casca, copa e tronco.

O material coletado foi acondicionado em uma prensa de madeira e levado para a estufa (SIMÕES et al., 2003) para secagem e, posteriormente, confecção de exsiccatas que foram encaminhadas para o Herbário da UFAC com o número de tombo 20410.

3.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS

Antes de cada procedimento todo o material foi pesado para cálculo do rendimento final do extrato seco (figura 03). As folhas e cascas foram secas em estufa (modelo Solab SL – 102) com temperatura controlada (35 °C para folhas e 40 °C para casca) e com circulação de ar durante quatro dias. Em seguida, o material foi triturado em moinho de facas (modelo Marcone MA – 340), pesado, identificado e armazenado para extração.



Figura 03 Preparo do Material Vegetal de *Protium* sp. Folhas em estufa - Secagem (A); Moinho-moagem do material (B) e o pó da planta submetido a pesagem (C). Foto – Roberta de F. Lopes.

Para obtenção dos extratos o material vegetal foi submetido à percolação exaustiva por 72 horas em temperatura ambiente. Os solventes utilizados foram: álcool 70%, hexano PA e clorofórmio PA, de acordo com as metodologias previamente descritas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2 ed. 1959; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 ed. 1988; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002; FOSTER, 1949; COSTA, 1972 b; COSTA, 1972 c). Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo-rotor vapor (modelo Fisatom), com temperatura controlada para eliminação quase que total dos solventes (Figura 04).

Por fim, os extratos hidroalcoólicos foram congelados por 24 horas e liofilizados em liofilizador modelo L-101 (Figura 04). Para os extratos hexânicos e clorofórmicos foi utilizado estufa a 40 °C para eliminação total dos solventes. As amostras foram pesadas, identificadas e armazenadas em geladeira, resultando em: (a) extrato seco hidroalcoólico da folha de *Protium sp* (EHFPsp), (b) extrato seco hexânico de folha da *Protium sp* (EHeFPsp), (c) extrato seco clorofórmico da folha de *Protium sp* (ECFPsp), (d) extrato seco hidroalcoólico da casca de *Protium sp* (EHCPsp), (e) extrato seco hexânico da casca de *Protium sp* (EHeFPsp) e (f) extrato seco clorofórmico da casca de *Protium sp* (EHFPsp).

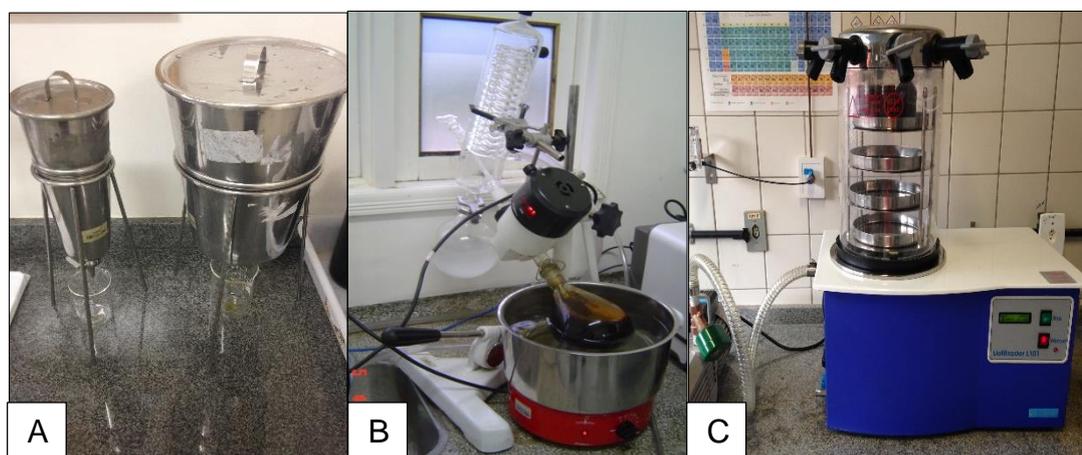


Figura 04 Processo de obtenção dos extratos de *Protium sp*. Percoladores (A), evaporador rotativo (B) e liofilizador (C). Foto - Roberta de F. Lopes.

Extratos secos são preparações sólidas obtidas pela evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Apresentam, no mínimo, 95% de resíduo seco, calculados como porcentagem de massa. Os extratos secos da folha apresentaram coloração verde e da casca coloração marrom. O rendimento médio do extrato foi

calculado em base seca, utilizando-se a seguinte fórmula: $\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{extrato seco (g)}}{\text{material vegetal (g)}} \times 100$ (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2010). O processo de obtenção dos extratos e rendimento estão representados nas figuras 05 e 06.

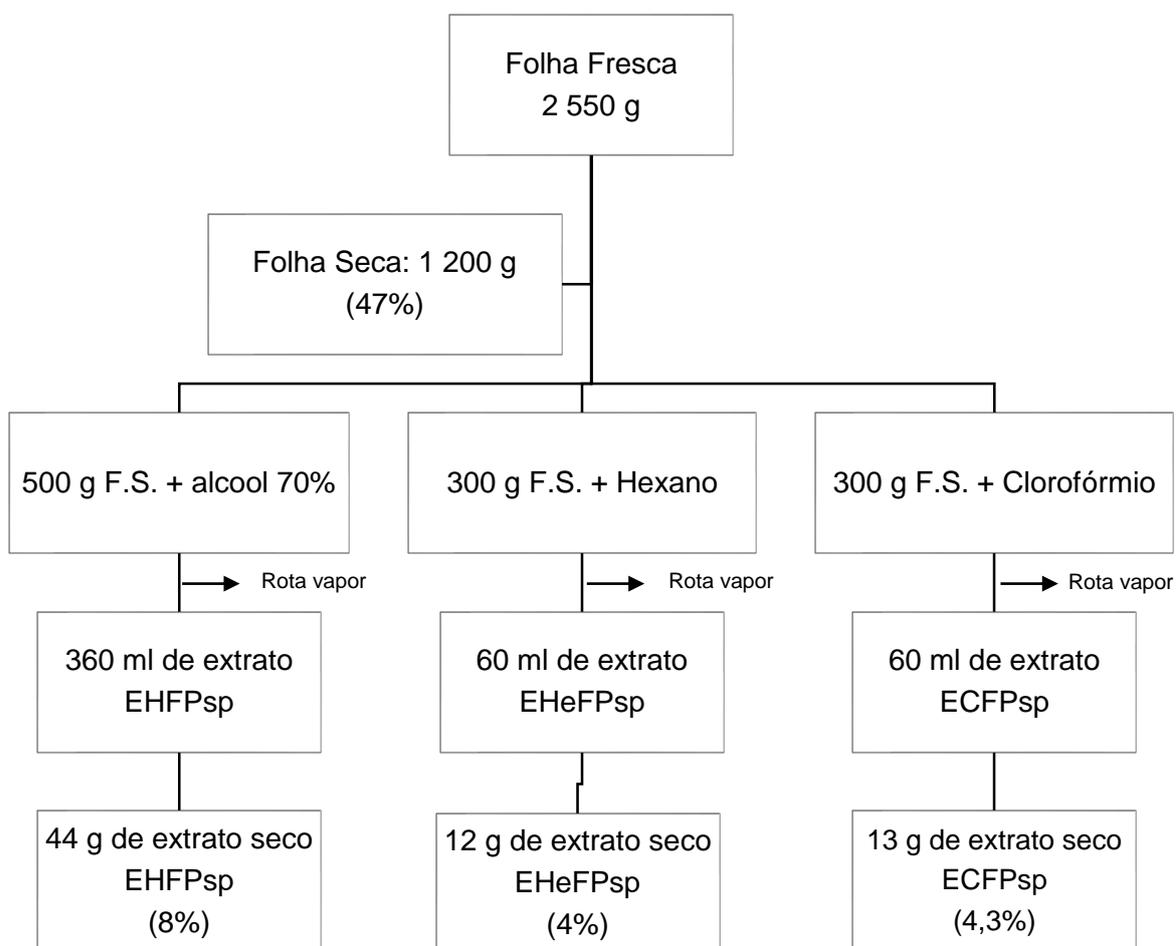


Figura 05 Esquema do processo utilizado para obtenção dos extratos secos da folha de *Protium sp.*

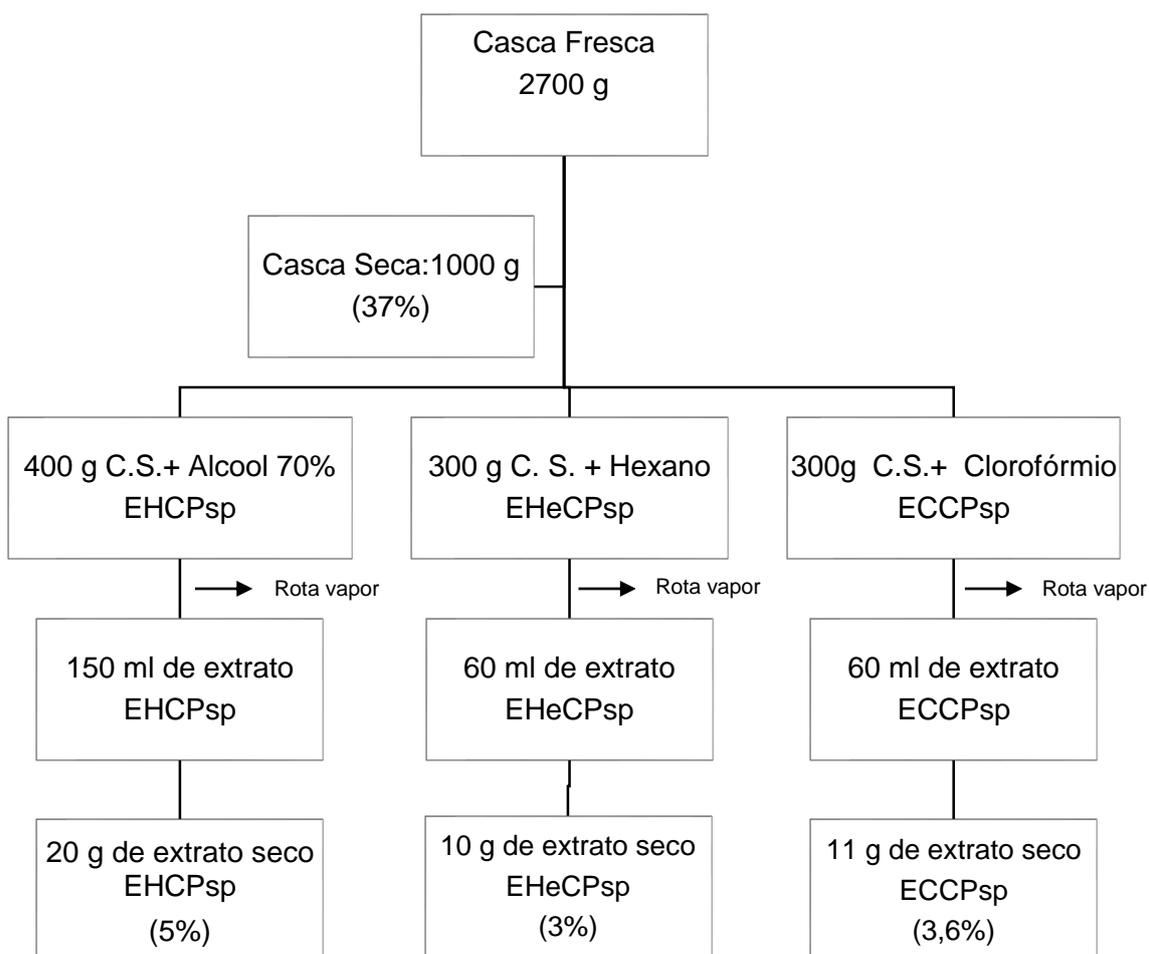


Figura 06 Esquema do processo utilizado para obtenção dos extratos secos da casca de *Protium sp.*

3.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

Para a caracterização fitoquímica, foi realizada uma prospecção fitoquímica de alíquotas dos extratos secos (EHFPsp e EHCPsp) para detecção qualitativa dos seguintes grupos de metabólitos secundários: Ácidos Orgânicos, alcaloides, antraquinonas, cumarinas, fenóis, flavonoides, saponinas, triterpenos/esteroides e taninos (SIMÕES et al., 2003; MATOS, 1997; AZEVEDO et al., 2014).

3.2.1 Ácidos Orgânicos

Foi realizada utilizando uma alíquota de 2 ml da fração aquosa do extrato, adicionando 18 (dezoito) gotas do reativo de Pascová A e em seguida 2 (duas) gotas do reativo de Pascová B. A descoloração do reativo representa reação positiva para ácidos orgânicos.

3.2.2 Alcaloides

Foram adicionados 2 mg do extrato etanólico em tubo de ensaio e, em seguida, adicionadas quinze gotas de hidróxido de sódio a 1% para alcalinização acrescidos de 2 ml de água e de 2 ml clorofórmio. A fração aquosa foi desprezada e a fração clorofórmica acrescida de quinze gotas de ácido clorídrico a 1% e extraída com 2 ml de água. A fração clorofórmica foi desprezada e os testes realizados com a fração aquosa ácida, acrescentando-se três gotas do reagente de Drangendorff, Mayer e Bouchardat para a verificação da presença de alcaloides.

3.3.3 Antraquinonas

A massa equivalente a 1 g de extrato seco foi agitada com 10 ml de éter etílico e a solução resultante filtrada no fim do processo. À solução etérea foi adicionado 1 ml de amônia diluída e agitada em seguida. A camada aquosa torna-se róseo caso positivo.

3.3.4 Cumarinas

A amostra foi gotejada em papel de filtro. Em seguida, 1 gota da solução de KOH 10% foi adicionada à amostra. A cor azul sob luz UV 365 nm indicaria a presença de cumarinas.

3.3.5 Fenóis

Foi realizada em tubo de ensaio contendo 5 ml de fração aquosa do extrato adicionando-se três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 e agitando fortemente a solução resultante. A coloração entre o azul e o vermelho é indicativo de presença de fenóis.

3.3.6 Flavonoides

Este resultado é observado pela reação de Shinoda ou Cloreto de Cianidina. Foram dissolvidos 2 mg das frações em 5 ml de Metanol e 1 ml de Ácido Clorídrico concentrado com a presença de 1 cm de fita de Magnésio.

3.3.7 Saponinas

Em um tubo de ensaio foi adicionado uma alíquota de 5 ml da solução mãe aquosa (4 g de extrato seco e 8 ml de água destilada), em seguida foi adicionado 15 ml da água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por dois minutos e colocado em repouso por 30 min. O aparecimento de uma espuma persistente neste intervalo indicaria a presença de saponinas.

3.3.8 Taninos

Foi realizada em tubo de ensaio contendo 5 ml de solução mãe, adicionando-se três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 e agitando fortemente a solução resultante. Precipitado de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos e tonalidade verde indica a presença de taninos flobabênicos.

3.3.9 Terpenos e Esteroides

A presença de terpeno e esteroides foi detectada utilizando a reação de Lieberman-Bourchard. Em um tubo de ensaio uma pequena quantidade do material vegetal foi solubilizada em 3 ml de Clorofórmio, filtrada, foi adicionado 1 ml de anidrido acético e algumas gotas de Ácido Sulfúrico concentrado. Após leve agitação, caso a

solução apresente coloração azul seguida de verde permanente, seria indicado a presença de esteroides, e caso a solução apresente uma coloração entre pardo e vermelho seria indicado a presença de terpenos.

3.4 EXPERIMENTOS “*in vivo*”

3.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) linhagem *Swiss*, machos, adultos, de 4 a 5 semanas, com peso variando de 25 a 35 gramas, mantidos sob temperatura controlada ($22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) em ciclo claro-escuro de 12 horas, tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo biotério da UNIFOR (Universidade de Fortaleza) e pelo biotério de criação da Fiocruz - Rondônia.

Os animais foram divididos em grupos de 6 a 8 indivíduos, submetidos a jejum sólido e ambientados de 12 horas antes dos experimentos. Na realização dos testes, foi assegurado a ausência de fatores que possam interferir na resposta comportamental tais como flutuações da temperatura ambiente, flutuações de ruídos e diferentes horários de experimentação (TJØLSEN et al., 1992).

Todos os procedimentos usados no presente estudo foram conduzidos de acordo com as orientações éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, seguindo a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos - DBCA dos Princípios éticos de experimentação animal. Os animais foram manipulados de acordo com os padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Acre (UFAC - nº de processo 23107.014897/2014-70).

3.4.2 Preparo e administração de fármacos e extratos

- Extrato hidroalcoólico da casca de *Protium sp* (EHCPsp): foram diluídos em solução salina (solução fisiológica) 0,9% nas doses de 50, 100, 500, 1000 mg/kg, administrados por gavagem (v.o.), através de sonda orogástrica nas proporções 0,1 ml/10g de peso do animal. Como controle administrou-se solução salina 0,9% (v.o.).

- λ -carragenina, solução de formaldeído 37%, PGE₂, indometacina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (todos da Sigma-Aldrich®), morfina (cristália), ácido

acético glacial (Vetec). As soluções de ácido acético 0,8%, formalina 1%, carragenana 1%, PGE₂ e TNF- α foram preparadas em solução salina 0,9%. A indometacina foi dissolvida em solução de bicarbonato de sódio 5%.

- As doses para cada agente foi: Ácido acético 0,8% (10 ml/kg via intraperitoneal), Carragenina 1% (300 μ g/pata), TNF- α (5 ng/pata) e PGE₂ (30 nmol/pata) (0,05 ml via subcutânea intraplantar na pata posterior direita), indometacina (10 mg/Kg via intraperitoneal), morfina (dose de 0,01 ml a cada 20 g de massa corporal por via intraperitoneal), formalina 1% (0,025 ml via subcutânea intraplantar no dorso da pata posterior direita).

3.4.3 Avaliação da toxicidade aguda oral

A avaliação da toxicidade aguda oral foi realizada pelo método descrito por VALADARES, 2006; OECD, 2001. Foi administrado por via oral, doses dos extratos da casca e efolha de *Protium* sp de 2000 mg/kg e na ausência de letalidade ou toxicidade, foi administrada a dose de 5000 mg/kg. O grupo controle recebeu solução salina 0,9% (v.o.). Os animais foram observados durante os primeiros 180 minutos. Após as três horas de observação, os animais voltaram a receber ração e água e foram observados a cada 12 h durante 3 dias. Os parâmetros comportamentais observados foram: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, sedação, micção, diarreia, convulsão, coma e morte, descritos por ALMEIDA et al., 1999). No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose tóxica de anestésico.

3.4.4 Atividade locomotora (teste do RotaRod)

O teste do RotaRod foi empregado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio dos animais (CARTER et al., 2012) identificando possíveis efeitos sobre a função motora ou efeitos sedativos dos extratos de *Protium* sp. Foi utilizado para o teste, Rotarod para camundongos (modelo EFF 412 Insight) com barra giratória diâmetro de 3,175 cm, com sistema de cronometragem de permanência do animal na barra, detecção de queda do animal através de impacto e contagem de quedas do animal.

Os animais foram previamente treinados na barra giratória, com rotação fixa de 9-10 rpm em 1 minuto de permanência, por um período de 5 dias. No dia do experimento, os animais foram tratados com extrato de *Protium sp* nas doses: 100 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg v.o. e grupo controle 0,1 ml/10 g (salina) v.o. Os animais foram submetidos ao teste nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-gavagem, avaliando-se tempo, em segundos, de permanência na barra giratória (Figura 7). No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose tóxica de anestésico.

3.4.5 Atividade antinociceptiva

3.4.5.1 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

O Teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético é um modelo de dor visceral induzido por substância química irritante que se baseia na contagem dos comportamentos de contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção de ácido acético 0,8% (KOSTER et al., 1959).

Após 60 minutos da administração dos extratos de *Protium sp* (tratamento) ou de solução fisiológica, cada animal recebeu ácido acético 0,8% por via intraperitoneal. Após 10 minutos inicia-se a contagem do número de contorções, durante 20 minutos. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose tóxica de anestésico.

3.4.5.2 Teste da placa quente

O teste da placa quente foi empregado para avaliar se os extratos de *Protium sp* possuem atividade analgésica central a nível de encéfalo. Neste teste avalia-se o tempo necessário para que o animal exiba resposta comportamental em resposta à exposição ao estímulo térmico nociceptivo (YU et al., 2012). A resposta comportamental é caracterizada pelo comportamento de saltar, levantar ou lambear as patas, considerado indicativo de resposta nociceptiva (WOOLFE e MACDONALD, 1944). Foi utilizado um aparelho do modelo EFF 361 Insight, constituído de placa

aquecedora, cronômetro, controle remoto e caixa de acrílico com aproximadamente 280 mm acoplada à placa.

Os animais foram pré selecionados 24 h antes do teste, sendo considerados aptos aqueles que exibiram resposta nociceptiva no intervalo entre 8 a 16 segundos sobre a placa aquecida ($53\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para se evitar lesões teciduais, os animais foram mantidos na placa quente por tempo máximo de 25 s. No dia do teste, os animais selecionados o foram pré-tratados com diferentes doses de extrato ou veículo e submetidos ao teste nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-tratamento. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose tóxica de anestésico.

3.4.5.3 Teste de imersão da cauda

O teste de imersão da cauda é um teste de nocicepção térmica que consiste em avaliar a latência necessário para que o camundongo exiba resposta reflexa de retirada da cauda em resposta a imersão do terço distal da cauda em banho com aquecido à $54\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D'AMOUR; SMITH, 1941). Esse modelo de nocicepção térmica permite identificar substâncias com propriedades analgésicas de ação central a nível medular (arco reflexo). Para o estudo, empregou-se um banho-maria (modelo digital Sieger Stern 6) com cuba em aço inox de 6 litros capacidade com aquecimento eletronicamente controlado.

Para a realização do teste, obteve-se inicialmente a latência basal média de 3 medidas basais consecutivas com 5 segundos de intervalo entre elas. Institui-se 10 segundos como tempo máximo de exposição do animal para evitar possíveis danos teciduais na cauda. Após a obtenção das medidas basais, os animais foram pré-tratados com extrato de *Protium* sp por gavagem e, em seguida, a latência de retirada da cauda foram verificadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos pós-tratamento. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose tóxica de anestésico.

3.4.5.4 Teste da Formalina

O teste da formalina é um modelo de dor persistente do tipo inflamatório em que se avalia o comportamento nociceptivo de sacudir, lambes e/ou elevar a pata em resposta à injeção intraplantar de formalina na pata direita traseira de camundongo (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Este teste é caracterizado pelo desenvolvimento de duas fases de respostas comportamentais: a 1ª fase, que se desenvolve imediatamente em resposta à estimulação direta dos nociceptores pela formalina; e a 2ª fase, na resposta ao desenvolvimento de processo inflamatório local.

Para a realização do experimento, os animais foram pré-tratados com extratos de *Protium sp* ou salina administrados por gavagem e, após 60 minutos, cada animal recebeu injeção subcutânea de 0,025 ml de formalina a 1%. Imediatamente após à administração os animais foram colocados individualmente no aparato de observação dos comportamentos nociceptivos. O aparato triangular é constituído de 3 paredes 25 cm de altura unidas em ângulo de 45°, sendo duas das paredes laterais de espelho e uma parede frontal de vidro transparente, possibilitando ao observador um maior campo de visão. Foram registrados os comportamentos nociceptivos (elevação, sacudida e/ou lambida de pata injuriada) a cada 5 minutos durante 60 minutos. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose tóxica de anestésico.

3.4.5.5 Teste de hipernocicepção mecânica (Von Frey)

Este modelo é empregado para quantificar a hipernocicepção produzida por mediadores inflamatórios (CUNHA et al., 2004), avaliada como a resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico. Para tal, foi utilizado analgesímetro digital (modelo EFF 301 Insight). Para o experimento, os camundongos foram colocados individualmente em caixas de acrílico com assoalho de rede de malha não maleável através do qual é aplicada no centro da planta da pata posterior uma pressão (força em gramas) com um ponteira plástica flexível até o animal exibir resposta de retirada da pata estimulada. No presente estudo avaliou-se o efeito do pré-tratamento com extrato de *Protium sp* administrados por gavagem na resposta mecânica hiperalgésica em resposta à injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata), TNF-α (5 ng/pata) e PGE₂ (30 nmol/pata). Para tal, cada animal foi pré-tratado com diferentes doses de

EHCPsp v.o. e, após 1 hora, recebeu injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata), TNF-α (5 ng/pata) ou PGE2 (30 nmol/pata). Em seguida, o animal foi colocado no aparato de teste e a resposta de retirada da pata foi avaliada no tempo zero, 60 e 180 minutos após a injeção dos estímulos.

3.4.6 Atividade anti-inflamatória

3.4.6.1 Edema de pata

A atividade antiedematogênica do extrato hidroalcoólico obtido da casca de *Protium* sp (EHCPsp) foi estudada no modelo de edema de pata induzido por agentes flogísticos. Neste teste avaliou-se a variação do volume da pata por meio do aparelho pletismômetro (modelo LE 7500) (WINTER et al., 1962).

3.4.6.1.1 Edema de pata induzido por carragenana

Após 60 minutos do pré-tratamento com doses do EHCPsp (50, 100, 500 e 100mg/kg) e grupo controle v.o, cada animal recebeu injeção subcutânea na pata de 0,05 ml de carragenina a 1% (300µg) como agente edematogênico e solução salina como controle. O volume das patas foi registrado 1, 2, 3, 4, 5 horas após a aplicação da carragenana e foi expresso pela diferença de volume deslocado entre as patas nos diversos tempos avaliados e o tempo zero.

3.4.6.1.2 Edema de pata induzido por prostaglandina E2

Neste teste foi escolhido a dose de maior eficácia inibitória do ECHPsp (500 mg/kg) no teste da carragenina, cada animal recebeu na pata 0,05 ml de prostaglandina E2 (30nmol/pata) agente edematogênico e solução salina como controle. O volume das patas foi registrado 1, 2, 3, 4 horas após a aplicação da prostaglandina e foi expresso pela diferença de volume deslocado entre as patas nos diversos tempos avaliados e o tempo zero.

3.4.6.1.3 Edema de pata induzido por TNF-α

Neste teste foi escolhido a dose de maior eficácia inibitória do ECHPsp (500 mg/kg) no teste da carragenina, cada animal recebeu na pata 0,05 ml de TNF-α (5 ng/pata) agente edematogênico e solução salina como controle. O volume das patas foi registrado 1, 2, 3, 4 horas após a aplicação do TNF α e foi expresso pela diferença de volume deslocado entre as patas nos diversos tempos avaliados e o tempo zero.

3.4.7 Análise Estatísticas

Os dados foram representados como média \pm EPM (erro padrão da média). A influência dos diversos tratamentos sobre as variáveis estudadas, em função do tempo, foram estatisticamente analisadas através de análise multivariada de variância de dois fatores com medidas repetidas, quando for o caso, para comparar os grupos durante todo o tempo do experimento. Os fatores a serem analisados foram tratamento, tempo e a interação tratamento x tempo. Nos casos em que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos foram realizado teste post hoc de Tukey. Todas as análises estatísticas serão realizadas no programa estatístico graphpad prism 6, e o nível de significância foi fixado em 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

A triagem fitoquímica da espécie *Protium sp*, foi realizada na fração etanólica dos EHFPsp e EHCPsp, através de reações químicas cromogênicas ou de precipitação. Indicaram presença de flavonoides, saponinas, triterpenos e esteroides no EHFPsp (Tabela 1).

TABELA 1 Resultados da triagem fitoquímica qualitativa do extrato hidroalcoólico da folha de *Protium sp* (EHFPsp).

Classes de constituintes químicos	Resultados <u>a</u>
Ácidos Orgânicos	-
Alcaloides	-
Antraquinonas	-
Cumarinas	-
Esteroides	+
Fenóis	-
Flavonoides	+
Saponinas	+
Taninos	-
Triterpenos	+

^a presença (+) ou ausência (-)

A triagem fitoquímica do EHCPsp indicou presença de cumarinas, flavonoides, saponinas, triterpenos e esteroides conforme tabela 2.

TABELA 2 Resultados da triagem fitoquímica qualitativa do extrato hidroalcoólico da casca de *Protium sp* (EHCPsp).

Classes de constituintes químicos	Resultados ^a
Ácidos Orgânicos	-
Alcaloides	-
Antraquinonas	-
Cumarinas	+
Esteroides	+
Fenóis	-
Flavonoides	+
Saponinas	+
Taninos	-
Triterpenos	+

^a presença (+) ou ausência (-)

4.2 TOXICIDADE AGUDA

Os extratos hidroalcoólicos da folha e da casca de *Protium sp* EHFPsp e EHCPsp administrado por via oral na dose de 2000 mg/kg não apresentaram nenhum sinal de toxicidade evidente e não provocaram morte dos animais avaliados durante o teste. Em virtude de não ter apresentado sinal de toxicidade e nem ocorrido morte em decorrência da administração na dose de 2000 mg/kg, foi avaliada a dose de 5000 mg/kg. Para esta dose (5000 mg/kg) administrado por via oral, os EHFPsp e EHCPsp não apresentaram sinal de toxicidade evidente e não provocaram morte dos animais durante o teste.

4.3 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.3.1 O EHCPsp apresenta atividade antinociceptiva no teste das contorções abdominais

A administração do EHCPsp nas doses de 100 e 500 mg/kg do EHCPsp nos animais tratados v.o., reduziram as contorções induzidas por ácido acético, comparado ao grupo controle, os dados mostram diferença significativa quanto ao tratamento ($F_{4, 25} = 20,5$; $P < 0,0001$) (Figura 07).

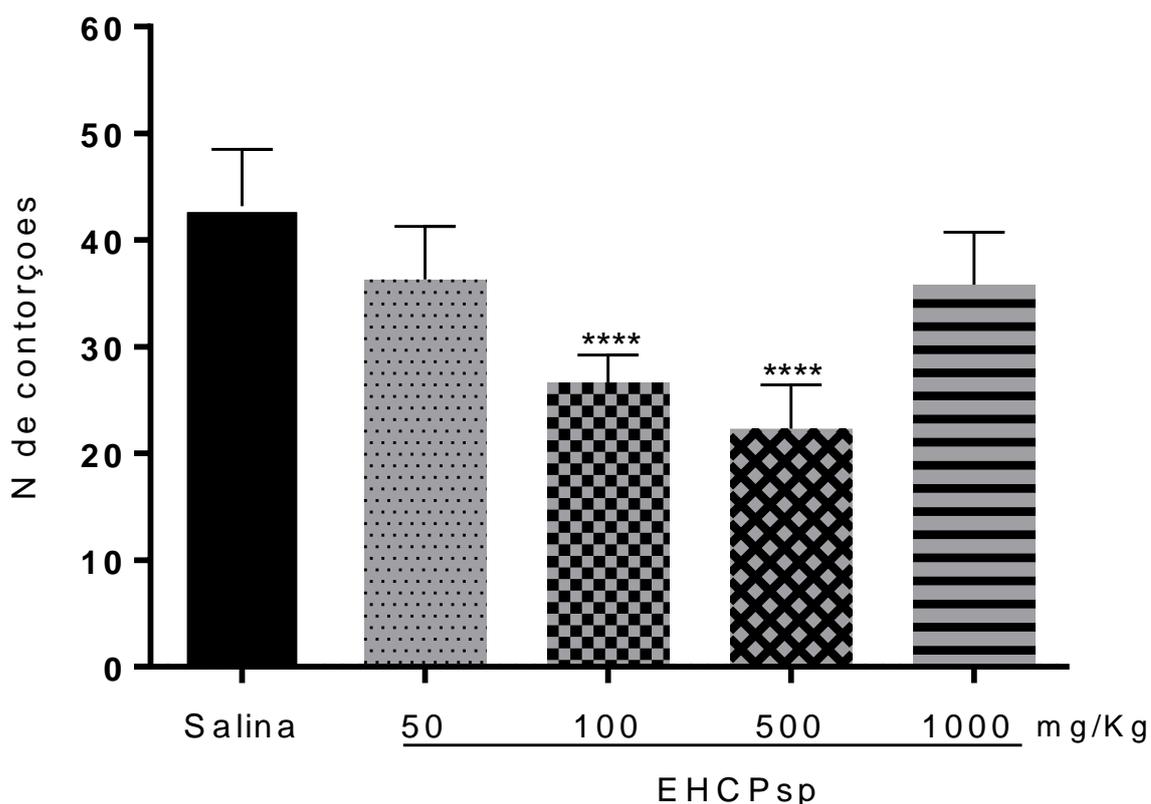


Figura 07 Efeito do pré-tratamento com extrato hidroalcoólico de casca de *Protium sp* (EHCPsp) sobre as contorções induzidas por ácido acético. O extrato foi administrado (v.o.) nas doses 100, 500 e 1000 mg/kg e salina (v.o.) como controle. Foi utilizado one-way Anova seguido por teste Tukey. **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle. Os dados foram representados como média \pm EPM ($n = 6$).

4.3.2 Influência do EHCPsp em camudongos no teste da placa quente

Os resultados obtidos mostram que o extrato hidroalcoólico de *Protium sp*, administrado por via oral, apresenta efeito antinociceptivo quando avaliado no teste da placa quente. O efeito foi observado nas doses de 500 e 1000 mg/ Kg, mas não com a dose de 50 e 100 mg/ Kg. Na dose de 500 mg/ Kg, o EHCPsp foi efetivo em

reduzir a nocicepção nos tempos 60 e 120 minutos após sua administração. Já na dose de 1000 mg/ Kg, apenas no tempo 120 minutos, $F(4, 25) = 20,57$; $P < 0,0001$ (Figura 08).

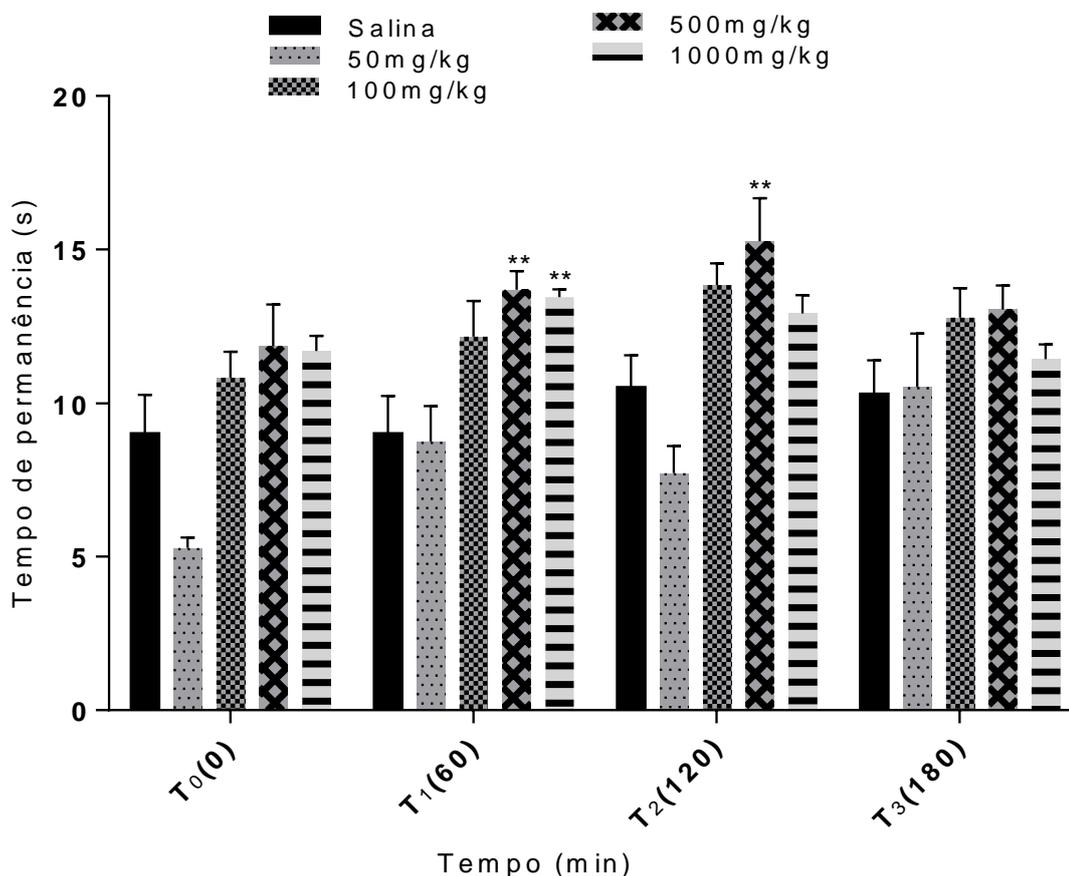


Figura 08 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta nociceptiva no teste da placa quente. O extrato foi administrado (v. o.) nas doses de 50, 100, 500 e 1000 mg/kg e salina (v.o.) como controle. ** $p < 0,01$ para as doses 500 e 1000mg/kg em relação a salina no tempo T₁(60) ** $p < 0,01$ para a dose de 500 mg/kg em relação a salina no tempo T₂(120). Foi utilizado two-way Anova seguido por teste de Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM (n= 6).

4.3.3 Influência do EHCPsp em camundongos no teste de imersão da cauda

A administração do EHCPsp nas doses 50, 100, 500 e 1000mg/, não inibiram a nocicepção térmica no teste de imersão da calda. $F(5, 20) = 0,8084$; $P = 0,5572$ (Figura 09).

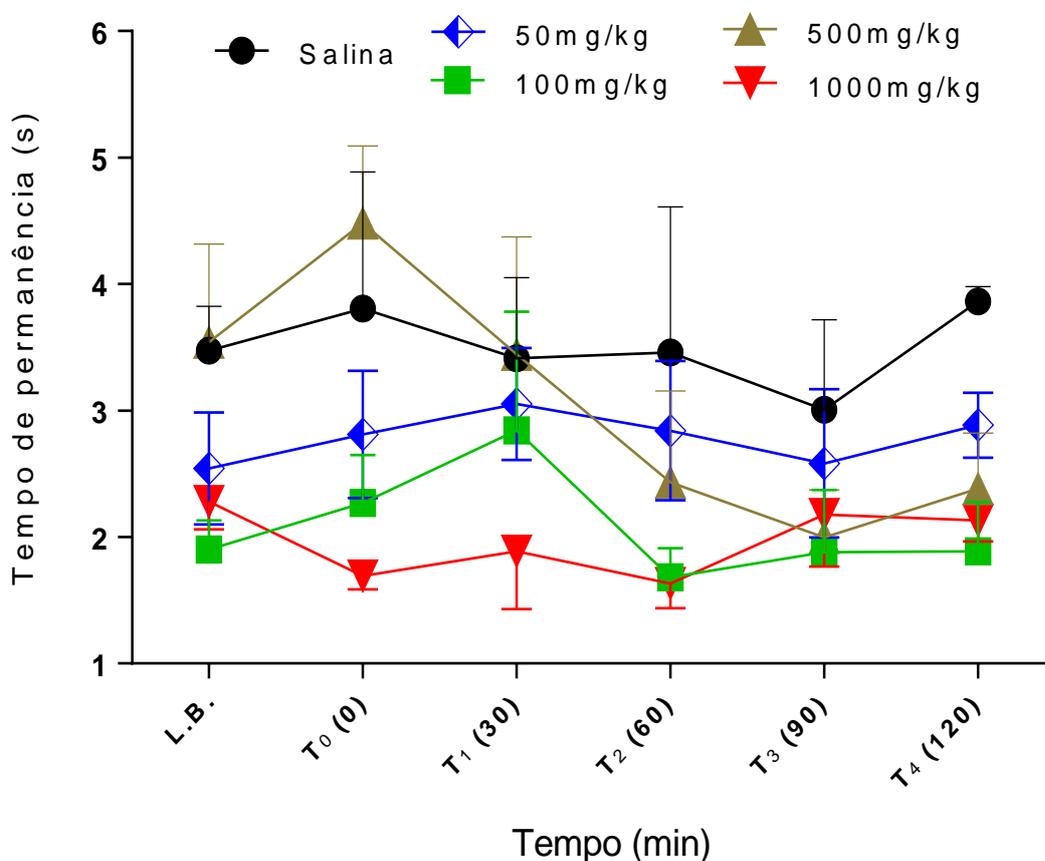
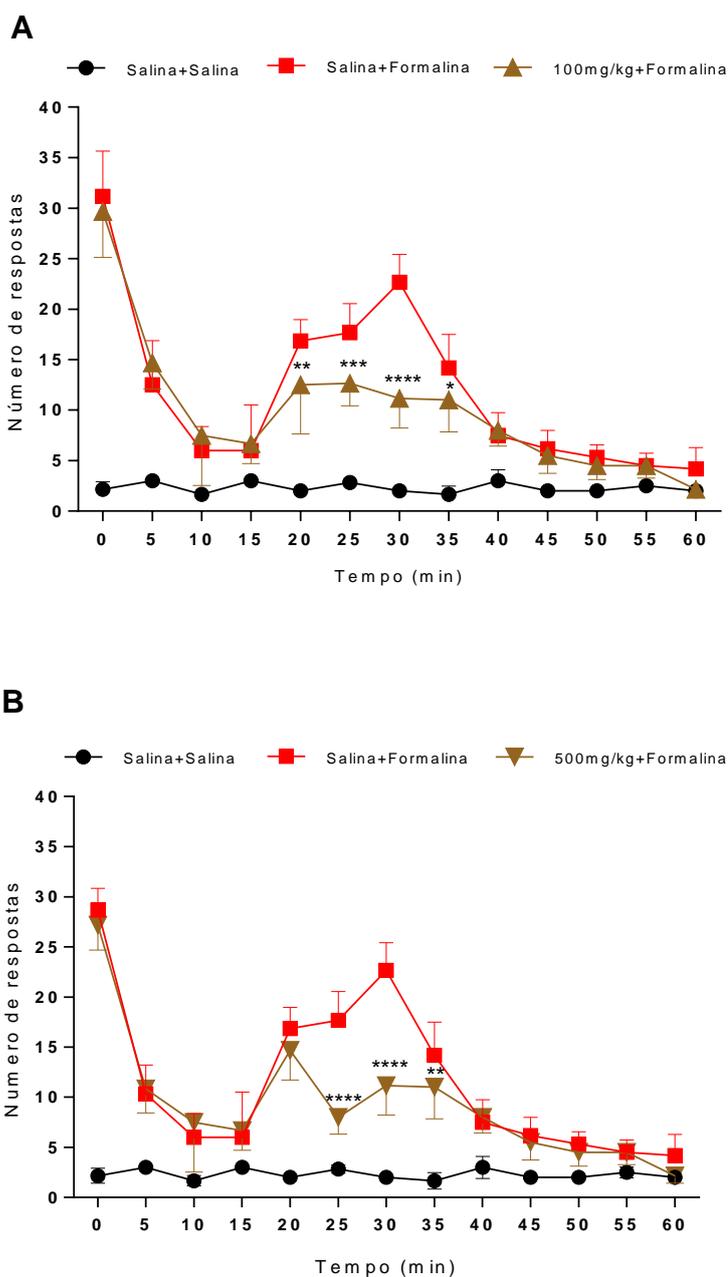


Figura 09 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta nociceptiva no teste da retirada da cauda. O extrato foi administrado (v.o.) nas doses 50, 100, 500 e 1000mg/kg e salina (v.o.) como controle. Foi utilizado two-way Anova seguido por teste de Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM (n= 6).

4.3.4 O EHCPsp apresenta atividade antinociceptiva na segunda fase do teste da formalina

O EHCPsp demonstrou na primeira fase do teste da formalina, chamada de fase neurogênica da dor, que não houve diferença significativa para nenhuma das doses administradas. Observou-se uma redução significativa no número de respostas para a segunda fase do teste, que corresponde a fase inflamatória, em todas as doses administradas, nos intervalos de tempo de 20 a 35 minutos. Os dados da primeira fase não são significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3, 20} = 39,25$; $p=0,230$). Os dados da segunda fase para a dose de 100mg/kg são significativamente diferentes

quanto ao tempo ($F_{12, 60} = 72,38$; $P < 0,0001$), tratamento ($F_{2, 10} = 202,4$; $P < 0,0001$) e quanto ao tempo versus tratamento ($F_{24, 120} = 27,40$; $P < 0,0001$); para a dose de 500mg/kg são significativamente diferentes quanto ao tempo ($F_{12, 60} = 98,99$; $P < 0,0001$), tratamento ($F_{2, 10} = 158,8$; $P < 0,0001$) e quanto ao tempo versus tratamento ($F_{24, 120} = 35,20$; $P < 0,0001$) (Figura 10).



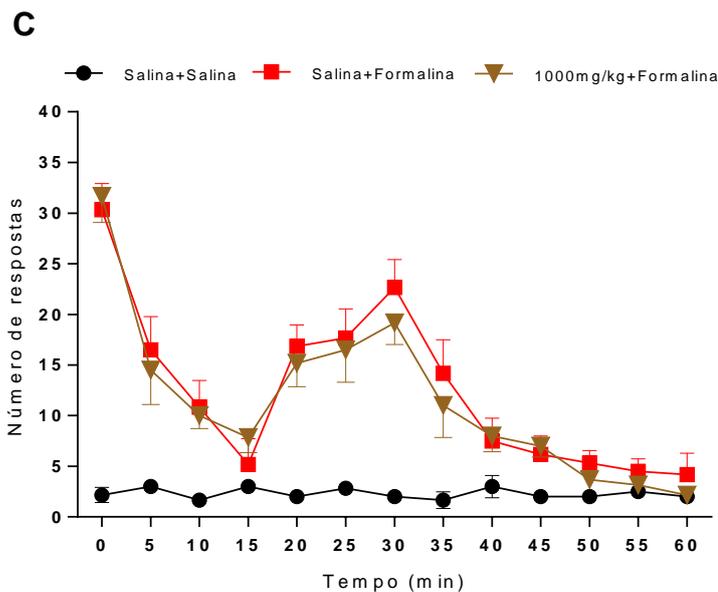


Figura 10 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta nociceptiva no teste da formalina. O extrato foi administrado (v.o.) nas doses 100 (A), 500 (B), 1000mg/kg (C), salina+salina como controle (v.o. + p. d.) e salina+formalina (v.o. + p. d.) com controle. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ e * $p < 0,05$ para a dose 100mg/kg (A), em relação a salina+formalina nos tempos 20, 25, 30 e 35 respectivamente. **** $p < 0,0001$, **** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,01$ para a dose 500mg/kg (B) em relação a salina+formalina nos tempos 25, 30 e 35 respectivamente. Foi utilizado Anova two-way seguido por teste Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM ($n = 6$).

4.3.5 Efeito do EHCPsp sobre a hipernocicepção induzida por carragenina, PGE2 e TNF- α .

O EHCPsp nas doses de 50, 100 e 500 mg/kg, reduziram o efeito hipernociceptivo induzido pela Carragenina 60 e 180 min em relação a salina, sendo a dose de 500 mg/kg mais efetiva. Os resultados foram significativamente diferentes quanto ao tempo ($F_{2, 14} = 61,29$; $P < 0,0001$), quanto ao tratamento ($F_{4, 28} = 18,66$; $P < 0,0001$) e tempo versus tratamento ($F_{8,56} = 7,65$; $P < 0,0001$) (Figura 11).

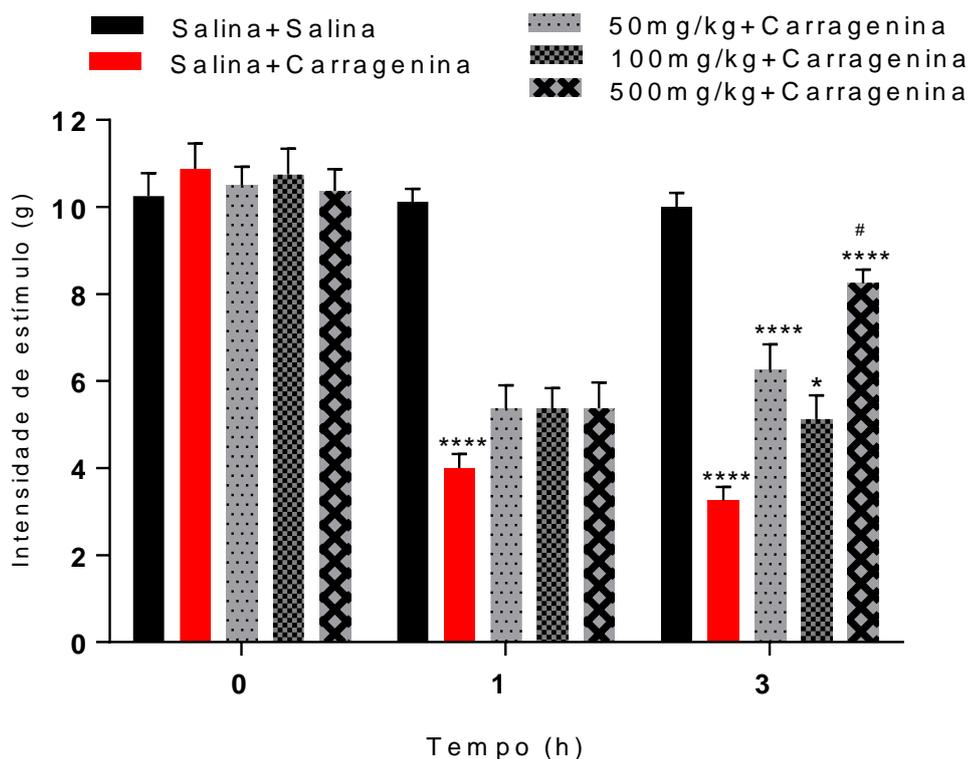


Figura 11 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta hipernociceptiva no teste Von Frey. O extrato foi administrado (v.o.) nas doses de 50, 500, 1000mg/kg, salina+salina (v.o. + p. d.) como controle e salina+carragenina (v.o. + p. d.) como controle. **** $p < 0,0001$ em relação a salina+salina no tempo 1, **** $p < 0,0001$ para as doses 50 e 500mg/kg e* $p < 0,05$ para a dose 100mg/kg quando comparadas ao grupo salina+carragenina no tempo 3, # $p < 0,05$ na dose de 500mg/kg em relação ao grupo salina+salina no tempo 3. Foi utilizado Anova two-way seguido por teste Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM ($n = 8$).

O estudo também avaliou o efeito do EHCPsp na dose de 500 mg/kg sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PGE₂ e TNF- α . O EHCPsp nesta dose reduziu significativamente o efeito hipernociceptivo induzido pela PGE₂ e TNF- α aos 60min (1) e 180min (2) quando comparados com os grupos salina+salina, salina+PgE₂ e salina+TNF- α . Os resultados foram significativamente diferentes quanto ao tempo ($F_{2,14} = 61,29$; $P < 0,0001$), quanto ao tratamento ($F_{4,28} = 18,66$; $P < 0,0001$) e tempo versus tratamento ($F_{8,56} = 7,65$; $P < 0,0001$) (Figuras 12 e 13).

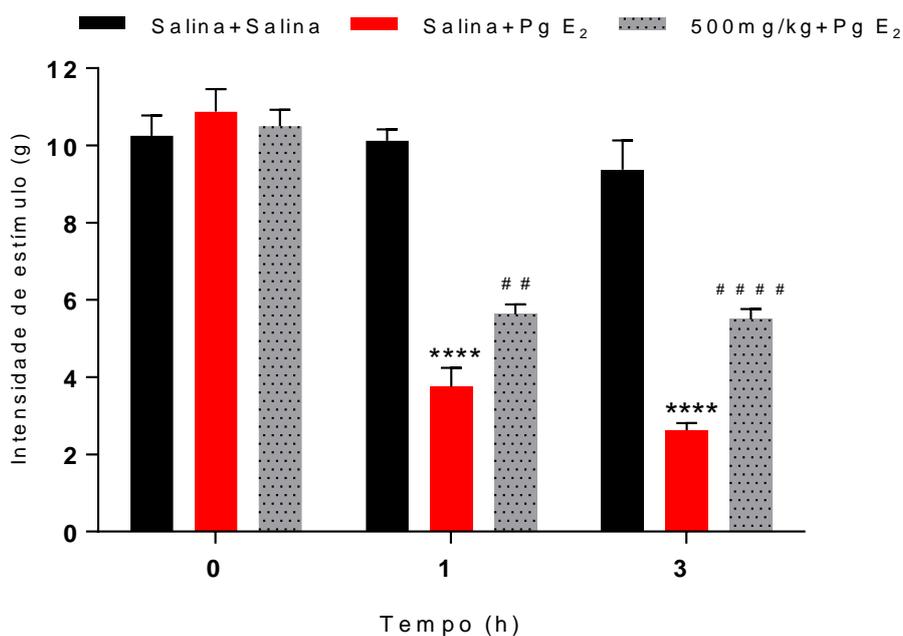


Figura 12 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta hipernociceptiva no teste Von Frey. O extrato foi administrado (v.o.) na dose de 500 mg/kg, salina+salina (v.o. + p. d.) como controle e salina+PGE₂ (v.o. + p. d.) como controle. **** $p < 0,0001$ em relação a salina+salina nos tempos 1 e 3, ## $p < 0,01$ e ##### $p < 0,0001$ em relação a salina+ PGE₂ nos tempos 1 e 3. Foi utilizado Anova two-way seguido por teste Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM (n= 8).

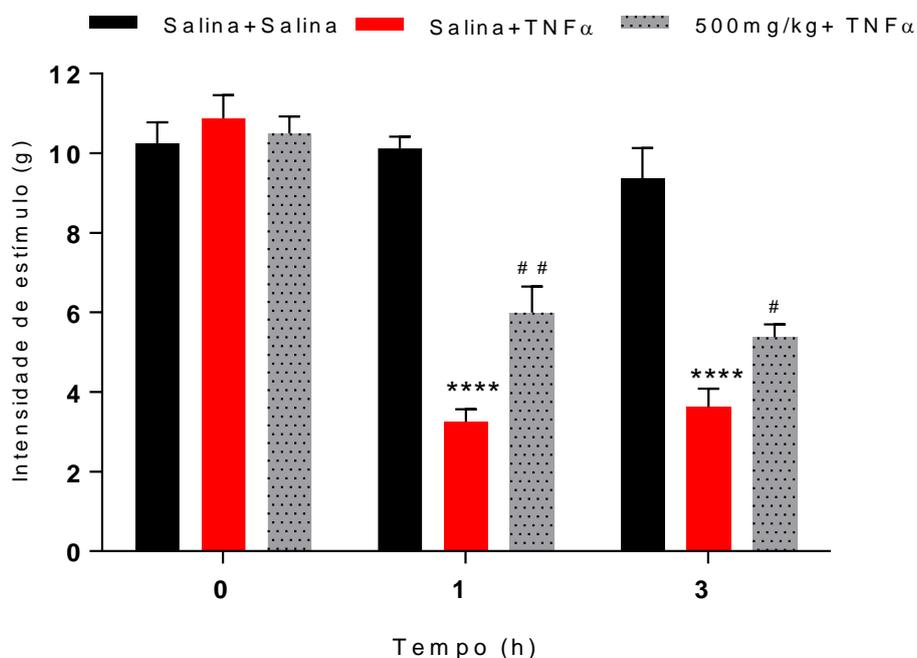


Figura 13 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta hipernociceptiva no teste Von Frey. O extrato foi administrado (v.o.) na dose de 500 mg/kg, salina+salina (v.o. + p. d.)

como controle e salina+TNF α 2 (v.o. + p. d.) como controle. **** $p < 0,0001$ em relação a salina+salina nos tempos 1 e 3, ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ em relação a salina+ TNF- α nos tempo 1 e 3 Foi utilizado Anova two-way seguido por teste Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM de 8 animais.

Neste teste verificamos o efeito anti-hipernociceptivo do EHCPsp, inibindo a hipernociceção induzida pela carragenina, e pelos mediadores TNF- α e PGE2, onde a melhor dose foi de 500mg/kg, sugerindo atividade anti-inflamatória.

4.4 O EHCPsp não altera a performance motora dos animais no teste do Rota-Rod

Para as doses 100 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg, adotadas do EHCPsp, não foi observado alterações significativas sobre a coordenação motora dos animais submetidos ao teste de Rotarod quando comparadas ao controle (Figura 07). Não houve diferença significativa quanto ao tempo ($F_{4, 20} = 1,445$; $P = 0,2562$), quanto ao tratamento ($F_{3, 15} = 2,615$; $P = 0,0894$ e quanto a interação tempo *versus* tratamento ($F_{12, 60} = 0,4760$; $P = 0,9210$) (Figura 14).

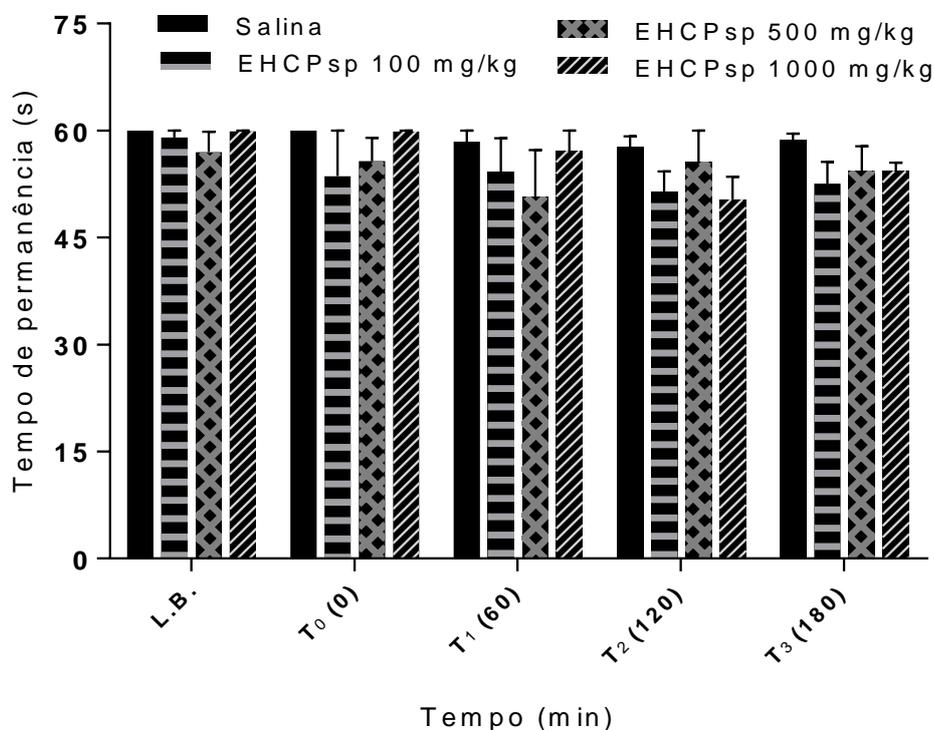


Figura 14 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta motora no teste do Rota-rod. O extrato foi administrado (v.o.) nas doses de 100, 500 e 1000mg/kg e salina como controle. Foi utilizado Anova two-way seguido por teste Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM (n= 6).

4.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.5.1 O EHCPsp apresenta atividade anti-inflamatória no teste edema de pata induzido por carragenina

O EHCPsp em todas as doses inibiu significativamente o edema na pata dos camundongos induzido pela carragenina na 3, 4 e 5 horas após a administração (Figura 15). Os dados são diferentes quanto ao tempo ($F_{5, 35} = 668,9$; $p < 0,0001$), quanto ao tratamento ($F_{3, 35} = 369,3$; $p < 0,0001$) e tempo x tratamento ($F_{25, 175} = 31,50$; $p < 0,0001$).

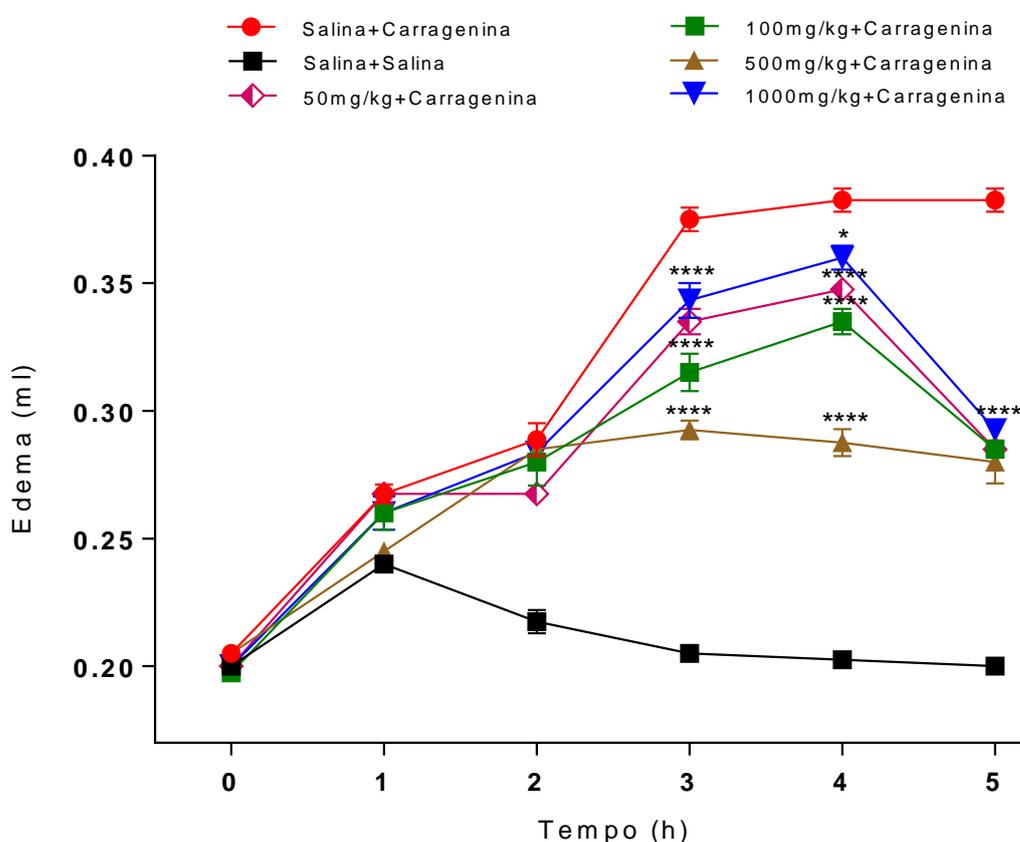


Figura 15 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta anti-inflamatória no teste de edema de pata. O extrato foi administrado (v.o.) nas doses de 50, 100, 500, 1000mg/kg, salina+salina (v.o. + p. d.) como controle e salina+carragenina (v.o. + p. d.) como controle. **** $p < 0,0001$ para todas as doses administradas em relação a salina+carragenina nos tempos 3, 4 e 5. Foi utilizado Anova two-way seguido por teste Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM ($n = 8$).

4.5.2 O EHCPsp apresenta atividade anti-inflamatória no teste edema de pata induzido por PGE₂ e TNF- α

O EHCPsp na dose de 500mg/kg inibiu significativamente o edema na pata dos camundongos induzido por PGE₂. Na 1, 2, 3 e 4 horas da administração da dose de 500mg/kg do EHCPsp houve diferença significativa na redução do edema induzido por PGE₂ quando comparado com controle (Figura 16). Os dados são diferentes quanto ao tempo ($F_{4, 28} = 241,0$; $p < 0,0001$), quanto ao tratamento ($F_{2, 14} = 52,57$; $p < 0,0001$) e tempo x tratamento ($F_{8, 56} = 15,65$; $p < 0,0001$).

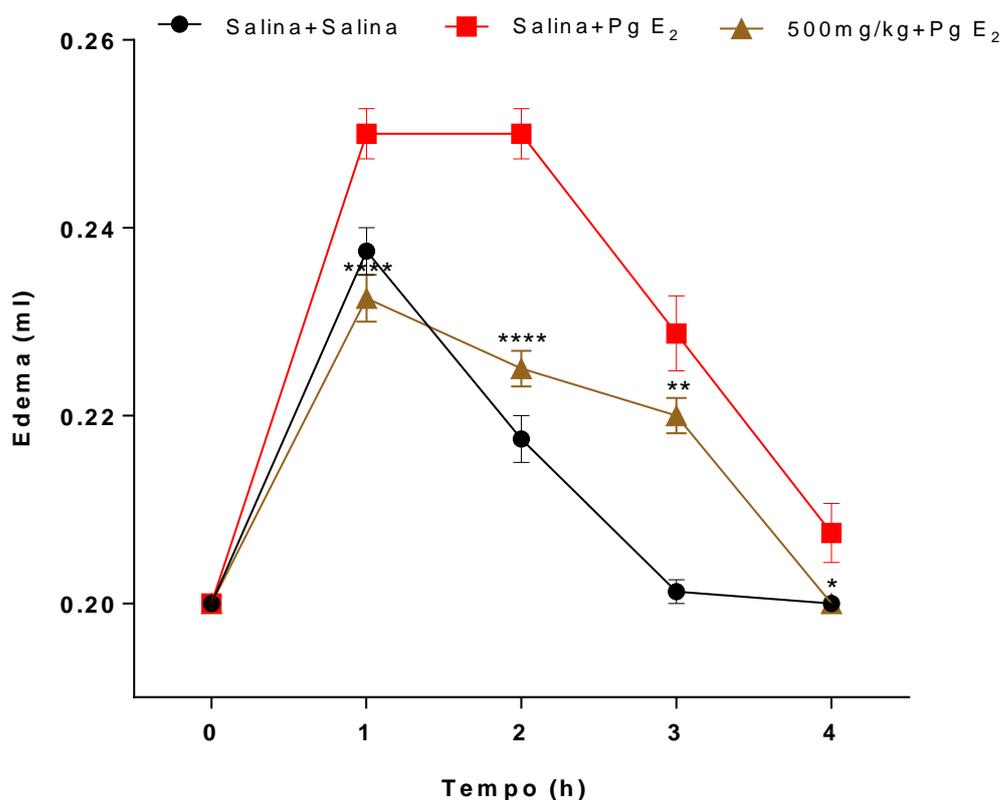


Figura 16 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta anti-inflamatória no teste de edema de pata. O extrato foi administrado (v.o.) na dose de 500mg/kg, salina+salina (v.o. + p. d.) como controle e salina+PGE₂ (v.o. + p. d.) como controle. **** $p < 0,0001$ em relação a salina+ PGE₂ nos tempos 1 e 2, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ nos tempos 3 e 4 respectivamente. Foi utilizado Anova two-way seguido por teste Tukey. Os dados foram representados como média \pm EPM (n= 8).

O EHCPsp na dose de 500mg/kg diminui significativamente o edema na pata dos camundongos induzido por TNF- α . Na 1, 2, 3 e 4 horas da administração da dose de 500mg/kg do EHCPsp houve diferença significativa na redução do edema quando

comparado ao grupo controle (Figura 17). Os dados são diferentes quanto ao tempo ($F_{4, 28} = 110,4$; $p < 0,0001$), quanto ao tratamento ($F_{2, 14} = 72,89$; $p < 0,0001$) e tempo x tratamento ($F_{8, 56} = 19,92$; $p < 0,0001$).

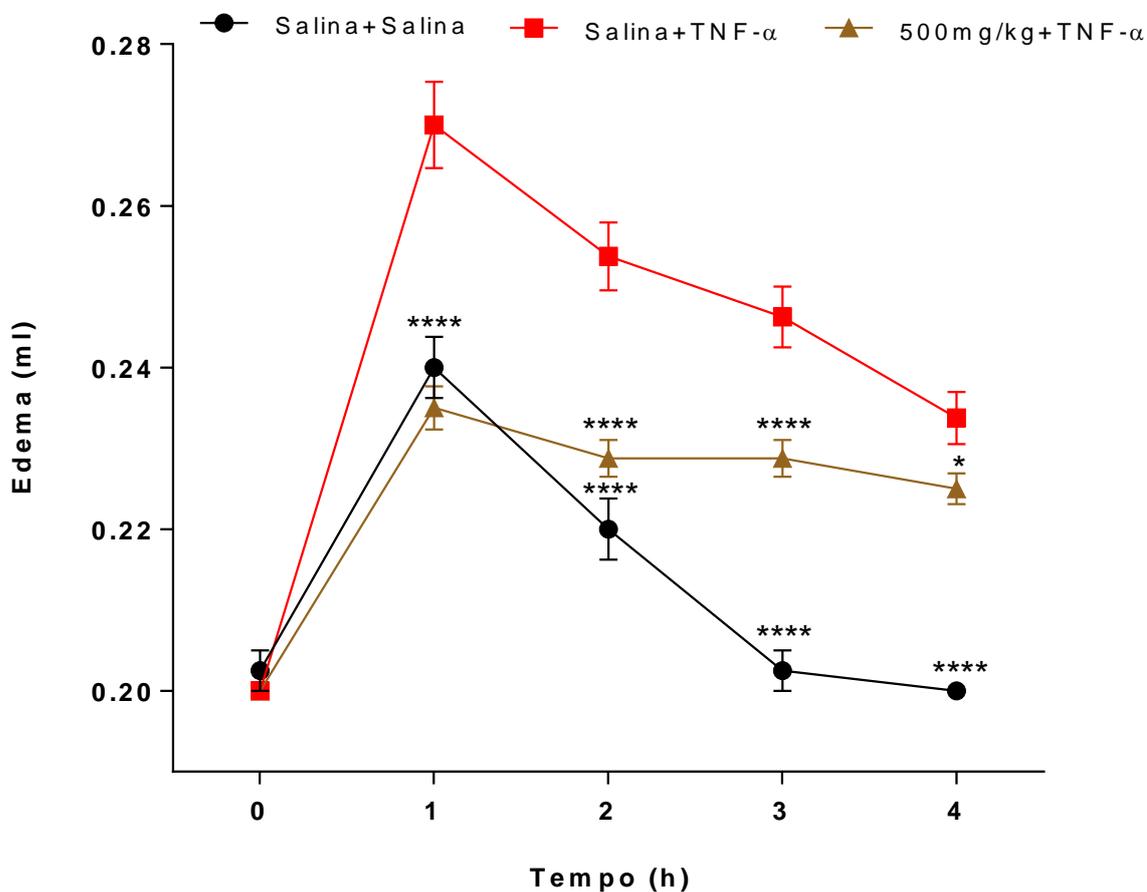


Figura 17 Efeito do pré-tratamento com EHCPsp sobre a resposta anti-inflamatória no teste de edema de pata. O extrato foi administrado (v.o.) na dose de 500mg/kg, salina+salina (v.o. + p. d.) como controle e salina+ TNF-α (v.o. + p. d.) como controle. **** $p < 0,0001$ em relação a salina+ TNF-α nos tempos 1, 2 e 3. Foi utilizado Anova two-way seguido por teste Tukey. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$. Os dados foram representados como média \pm EPM ($n = 8$).

5 DISCUSSÃO

Estudos com plantas do gênero *Protium*, em sua maioria demonstram a presença de terpenos, triterpenos e sesquiterpenos (MACHADO et al., 2003; SILVA et al., 2009; SILVA, 2012). Rudiger e colaboradores (2007) identificaram terpenóides, esteroides, cumarinas, flavonoides e lignanas, corroborando os resultados encontrados no presente trabalho para os extratos desse gênero. O efeito sinérgico dos compostos existentes nos extratos, muitas vezes química e farmacologicamente distintas, supera a atividade biológica do princípio ativo isolado. Por exemplo, o extrato bruto de *K. pinnata* mostrou-se mais ativo que os flavonoides testados isoladamente (MUZITANO et al., 2009). Além disso, a combinação de plantas medicinais e ervas com objetivos terapêuticos é uma prática milenar da medicina chinesa, embora na maioria dos casos não haja comprovação científica desse benefício. Quanto a baixa toxicidade, substâncias ativas se apresentam em concentrações reduzidas nas plantas, sendo os riscos de efeitos adversos menores. Algumas plantas podem causar efeitos tóxicos, especialmente com doses acima das recomendadas; com relação ao investimento em pesquisa, o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico poderia ser obtido com custo muito menor, quando comparado às altíssimas quantias envolvidas no desenvolvimento de fármacos sintéticos (CHE et al., 2013).

No caso do Brasil, o desenvolvimento de um anti-inflamatório fitoterápico fruto de uma parceria entre a iniciativa privada e um grupo de pesquisa de uma universidade pública, custou cerca de 7,5 milhões de dólares, levando sete anos. Isso demonstra uma franca oportunidade de mercado, além de ser uma alternativa à crise de inovação enfrentada pelo setor (ALEXANDRE et al., 2008).

As plantas medicinais podem produzir várias atividades biológicas em seres humanos, porém, pouco se conhece sobre a toxicidade de algumas espécies de uso na medicina tradicional. Nesse sentido, o principal critério para uso de plantas medicinais deve ser a segurança (MUKINDA; SYCE, 2007).

Estudo da toxicidade aguda de extratos de *Protium spruceannum*, não apresentou alteração em camundongos e não causou morte dos animais, até a dose de 6000 mg/kg, sugerindo baixa toxicidade (RODRIGUES, 2010).

Uma característica importante da resina do *Protium heptaphyllum* é a baixa toxicidade, em testes com ratos, verificou que a dose oleoresina de 5 g/kg, não

apresentou toxicidade e não foi possível estabelecer a DL50 oral. Os resultados podem ajudar a fornecer uma base científica para o seu uso popular como um anti-inflamatório e agente anti-úlcero-gênico (OLIVEIRA et al., 2004a).

Um indicador para não utilização de substâncias analgésicas é a alteração no desempenho motor produzidas por algumas substâncias, que pode ser erroneamente avaliada como ação analgésica, uma vez que a maioria dos modelos experimentais utilizados avalia uma alteração no comportamento motor (elevação da pata, lambidas nas patas, retirada da pata, contorções) produzindo resultados falso-positivos. Sendo assim, a maior fonte de erros em estudos sobre substâncias que interferem na transmissão nociceptiva tanto periféricamente como centralmente é a modificação no desempenho motor do animal (VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; RABOISSON; DALLEL, 2004).

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético não é um modelo específico, mas as contorções involuntárias do abdômen podem ser de interesse devido sua similaridade com algumas das dores viscerais conhecidas e, através desse teste, pode-se identificar drogas, com efeito, antinociceptivo, especialmente aquelas de ação periférica (LE BARS et al., 2001; ADEBIYI et al., 2006).

Estudos demonstraram que o ácido acético promove a liberação de substâncias endógenas (cininas, prostanoídes, óxido nítrico, substância P, TNF- α , IL-1 β e IL-8) pelos mastócitos e macrófagos residentes na cavidade peritoneal, os quais estimulam os neurônios sensoriais primários e induzem a resposta comportamental típica caracterizada pela contorção abdominal dos animais. A injeção intraperitoneal de ácido acético induz também aumento da concentração de glutamato e aspartato no líquido cerebrospinal (IKEDA et al., 2001; FENG et al., 2003).

Oliveira et al., 2005 verificou que a resina de *Protium* (400 mg/kg) e o ácido acetilsalicílico (250 mg/kg), inibiram significativa o aumento de permeabilidade vascular induzido pela ácido acético intraperitoneal em camundongos em 52 e 80 %, respectivamente. No entanto, a resina 200 mg/kg não apresentou influência significativa sobre a permeabilidade vascular (OLIVEIRA et al., 2005). A mistura do alfa e beta-amirina (10 e 50 mg/kg, i.p) de *Protium heptaphyllum* tem atividade antinociceptiva, demonstrado em testes de contorções abdominais induzidos por ácido acético em camundongos, com redução de 73 e 94%, respectivamente (ARAGAO et al., 2008). A diminuição das contorções abdominais observada para o

EHCPsp nas doses de 100 e 500 mg/kg podem ser justificadas pela inibição da síntese de prostaglandinas, com ação, sobre os mecanismos nociceptivos de processamento ou de liberação de metabolitos do ácido araquidônico através da COX (GUIMARÃES et al., 2010).

Na tentativa de investigar a presença ou não de efeito analgésico de ação no sistema nervoso central, o teste clássico da placa quente é um ensaio largamente empregado para testar drogas analgésicas que interferem na nocicepção através do sistema nervoso central (VENANCIO et al., 2011). O modelo da placa quente caracteriza-se por produzir resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação de nociceptores (fibras C e A Delta). As fibras nociceptivas são ativadas após a ativação dos receptores vanilóides, que são responsáveis pela resposta ao aumento da temperatura.

A mistura de alpha e beta amirina de *Protium* (50mg/kg, i.p) foi significativamente diferente no teste da placa quente, aumentando o tempo de permanência ao estímulo térmico, após 30 e 60 minutos, em 62 e 71% respectivamente quando comparados ao grupo controle (ARAGÃO, 2004). Rodrigues et al., 2013 apresentou resultado positivo para dose de 400mg/kg de extrato de *Protium spruceanum* Benth após 60 minutos de tratamento, aumentando significativamente o tempo de permanência na placa. Apesar de resultado positivo obtido para o EHCPsp nas doses de 500 e 1000 mg/kg, há a necessidade de investigação sobre o mecanismo de ação para verificação se o extrato age pela via dos opióides.

O teste de imersão da cauda é um método de nocicepção térmica, o qual é sensível para identificar a atividade de substâncias cujos mecanismos sejam semelhantes aos promovidos pelos analgésicos opióides (OLIVEIRA et al., 2008). O efeitos do EHCPsp parece não estar relacionado a liberação de opióides de acordo com estudos de Rodrigues et al. (2013).

O formaldeído diluído (1-8%), administrado por via subcutânea, produz um comportamento nociceptivo que consiste em uma resposta bifásica: uma resposta nociceptiva inicial de curta duração, que ocorre nos 5 primeiros minutos após a injeção da formalina designada por fase precoce, fase I ou ainda fase neurogênica e uma fase mais longa, também conhecida como fase tardia, fase II causada por um processo inflamatório, fase inflamatória (LUCCARINI et al., 2006; SOLDI et al., 2008). O componente bifásico da nocicepção induzida pela formalina reflete diferentes

mecanismos subjacentes. A primeira fase parece estar relacionada à estimulação química direta de terminações nervosas livres nociceptivas, provavelmente um resultado direto da estimulação na pata, refletindo a dor centralmente mediada com a liberação de substância P (RABOISSON; DALLEL, 2004), enquanto a segunda fase depende de uma combinação de entradas contínuas de aferentes nociceptivos, devido à liberação de aminoácidos excitatórios como, PGE₂, óxido nítrico (NO) e de taquicininas, cininas, entre outros peptídeos (OKUSE, 2007; CAPUANO et al., 2009).

Uma mistura de alfa e beta amirina inibiu a segunda fase da resposta nociceptiva em camundongos no teste da formalina (37 e 51; e 60 e 73% de inibição da 1ª e 2ª fases, respectivamente). Naloxona, um antagonista opióide, não reverteu o efeito antinociceptivo (ARAGAO et al., 2008). O mesmo foi observado por Holanda Pinto e colaboradores (2008) que o pré-tratamento com a alfa e beta amirina produziu pronunciado efeito antinociceptivo na segunda fase da formalina. Esse efeito analgésico pode estar relacionado com a liberação de mediadores da nociceptivos como neuropeptídios e prostaglandinas (HOLANDA PINTO et al., 2008).

A maioria das drogas capazes de reduzir a excitabilidade de neurônios da medula espinhal, incluindo os opióides, atuam em ambas das fases da formalina, entretanto, aqueles de ação periférica, como drogas anti-inflamatórias, que atuam na inibição da ciclooxigenase (COX), tem ação somente na segunda fase do teste da formalina (TJØLSEN et al., 1992; ROSELAND et al., 1990). Os resultados da primeira fase no teste da formalina corroboram com as pesquisas de Rodrigues et al. (2010) que sugere que uma fração hexânica da espécie *Protium spruceanum*, rica em alfa e beta amirina, não possui ação analgésica central.

Os resultados obtidos na segunda fase da formalina e no teste contorção por ácido acético, indicam que o EHCPsp apresenta atividade analgésica periférica.

A carragenina tem sido amplamente utilizada para verificar ação de substâncias sobre a hiperalgesia em camundongos e ratos (LEVINE; REICHLING, 2000). A injeção de carragenina provoca uma lesão tecidual na qual há o envolvimento de diversos mediadores químicos como óxido nítrico, serotonina e histamina que podem atuar em combinação, produzindo alterações que resultam na alodínia ou hiperalgesia (COUTAUX et al., 2005; MORRIS, 2003).

Testes mecânicos, como o analgesímetro eletrônico, nos permite avaliar o aumento da sensibilidade tecidual à estímulos álgicos induzida por agentes inflamatórios, onde há não somente a ativação dos mecanorreceptores, mas também

sensibilidade dos nociceptores (fibras A δ e fibras C) (LE BARS; GOZARIU; CADDEN et al., 2001) em decorrência de um processo inflamatório ligado à hipernocicepção, fazendo com que esse modelo seja útil para avaliar atividade anti-hipernociceptiva de diferentes substâncias (HENRIQUES et al., 1987)

Existem dois fenômenos em que pode ser dividida a hipernocicepção após a lesão cutânea: a hipernocicepção primária, caracterizada por aumento da sensibilização por estímulos mecânicos e térmicos e a hipernocicepção secundária, caracterizada por aumento da sensibilização a estímulo mecânico único. A primeira ocorre no local da lesão e a segunda ocorre fora do local da lesão. A Hiperalgisia nos processos inflamatórios corresponde a hiperalgisia primária (TREEDE et al., 1992).

As carrageninas são polissacarídeos sulfatados, provenientes de algas marinhas dos gêneros *Chondrus*, *Euclima*, *Gigartina* e *Iridaeana* (DE RUISE E RUDOLPH) que produzem efeitos pró-inflamatórios, geralmente caracterizados por acúmulo de exsudado, intensa migração de células inflamatórias, desenvolvimento de edema e Hiperalgisia (LI et al., 2011). O edema de pata induzido por carragenina é muito usado como modelo experimental *in vivo* para a avaliação do potencial anti-inflamatório de extratos de plantas, sendo um modelo padrão para a avaliação de inflamação aguda (PERIANAYAGAM et al., 2006). Além disso, esse modelo é muito sensível à ação de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (MORRIS, 2003).

A injeção intraplantar de carragenina resulta em uma resposta inflamatória caracterizada pelo aparecimento de edema de pata tempo-dependente, infiltração de neutrófilos, aumento nos níveis de diversos mediadores no exsudato da pata e pelo desenvolvimento de hiperalgisia a estímulos térmicos e mecânicos (MORRIS, 2003). Esse modelo é composto por duas fases, sendo a primeira avaliada entre 1 ou 1,5 horas após a injeção de carragenina, enquanto que a segunda fase 2-5 h após a injeção, sendo caracterizada por um aumento da formação do edema, que permanece por até 5 horas (KHAN et al., 2009). A primeira fase é resultante da ação sequencial e integrada de vários mediadores inflamatórios, como a histamina, serotonina, bradicinina, PAF, substância P nas primeiras 1 -1,5 horas, logo após a segunda fase é mantida pela liberação de prostaglandinas, atingindo o pico entre 4-6 horas, a continuidade entre as duas fases é mediada por cininas (LAPA et al., 2003; GOYAL et al., 2011).

A dose que melhor reduziu o edema de pata induzido pela carragenina foi a dose de 500 mg/kg, na 3^o e 4^o horas, sugerindo que o EHCPsp participa de

mediadores inflamatórios de segunda fase. Desta forma foi realizada o edema de pata induzido por prostaglandina e o TNF- α , a fim investigar a participação desses mediadores.

Acetato de α -amirina, a 100 mg/kg mostraram aumentos significativos ($p < 0,05$) de inibição do edema da pata induzida por albumina do ovo com 40% de inibição na 5ª hora. A administração oral de até 100 mg/kg não produziu ($p > 0,01$) a irritação da mucosa gástrica significativa, enquanto ulceração significativa ($p < 0,01$) foi registada para a indometacina 40 mg/kg em comparação com o controlo negativo. A 100 $\mu\text{g/mL}$, tanto β -amirina e α -amirina de etilo inibiu a hemólise induzida pelo calor, tanto para 47,2 e 61,5%, respectivamente, enquanto que o diclofenaco de sódio (100 $\mu\text{g/mL}$) inibiu apenas 40,5% de inibição. Beta-amirina e acetato de α -amirina mostram intensa atividade anti-inflamatória (OKOYE et al., 2014).

A mistura de alfa e beta amirina de *Protium heptaphyllum* teve efeito significativo sobre o edema da pata induzido por carragenina em camundongos. O volume da pata diminuiu de forma significativa e dependente da dose, 39,42 e 53%, três horas após a administração de 10, 25 e 50 mg/kg doses, i.p, respectivamente. A mistura (10 e 25 mg/kg, i.p) foi igualmente eficaz no edema da pata induzido por dextran (efeito preventivo), reduzindo o volume da pata de 50 e 60% na segunda hora, e em 63 e 73% na terceira hora pós-dose. A mistura também (50 mg/kg, i.p) reverteu o edema já formado após a injeção de dextrano (efeito curativo), indicando a ação anti-inflamatória potente (ARAGÃO et al., 2008).

As Prostaglandinas (PGs) são eicosanóides derivados do ácido araquidônico (AA), este é metabolizado basicamente por duas vias, a da lipoxigenase que conduz à formação dos leucotrienos e lipoxinas, e a via da ciclooxigenase (COX) que promove a formação dos tromboxanos e prostaglandinas. Existem três isoformas de COX – Uma é constitutiva (COX-1), desempenha papel de anti-agregante e regulador da perfusão renal e protetor da mucosa gástrica. A outra (COX-2) é induzível por citocinas e fatores de crescimento, em tecidos inflamatórios se encontra em grandes quantidades. Já a COX-3 é uma variante da COX-1 (LEGLER et al., 2010; ROBAK et al., 2002).

O principal mecanismo de ação dos AINEs é a inibição da COX, e conseqüentemente das prostaglandinas. Estas provocam vasodilatação, eritema e hiperalgesia quando liberadas em resposta ao trauma. O eritema e o edema resultam da propriedade vasodilatadora da PGE2 e da PGI2, principais produtos da COX-2 do

macrófago e do endotélio vascular, os efeitos anti-inflamatórios decorrem da inibição da COX-2 e da síntese de PGE2 e PGI2 pelos macrófagos e pelo endotélio vascular (SAKATA, 2008).

Dentre os recentes progressos dos estudos de dor inflamatória, destaca-se o papel das citocinas. Estudos têm mostrado que a liberação dos mediadores hipernociceptivos (como as prostaglandinas) durante o processo inflamatório, é decorrente de uma cascata de eventos iniciais, desencadeada por diferentes citocinas pró e anti-inflamatórias. Devido a este achado, estas moléculas se tornaram alvos na descoberta de novos fármacos analgésicos (VERRI JR et al., 2006; CUNHA et al., 2005).

O TNF- α induz a migração de neutrófilos para o local da injúria por mecanismos indiretos, como a indução de liberação de fatores quimiotáticos para neutrófilos por estimulação de macrófagos residentes (FACCIOLI et al., 1990). Além disso, esta citocina induz a migração de neutrófilos por estimulação da via dos leucotrienos. No entanto, é estabelecido que o TNF- α está relacionado na sinalização do óxido nítrico, inibindo indiretamente a expressão de moléculas de adesão (CANETTI et al., 2001; TAVARES-MURTA; CUNHA; FERREIRA, 1998; MORELAND et al., 1999).

Galic e colaboradores (2010), em uma revisão de literatura, ampliaram a gama de mecanismos que envolvem o TNF-alfa, como a resistência à ação da insulina, aumento da expressão de citocinas supressoras da sinalização 3 (SOCS3) e redução da oxidação de ácidos graxos em hepatócitos e músculos esqueléticos por meio de efeitos mediados pela indução da proteína fosfatase 2C e supressão da quinase ativada por AMP (AMPK). As taxas reduzidas de oxidação dos ácidos graxos são acompanhadas por acúmulo de lipídios bioativos (GALIC et al., 2010).

Uma investigação recente confirmou que uma dieta hiperlipídica aumenta a expressão de TNF-alfa, I κ B e outros fatores que caracterizam o aumento do processo inflamatório no tecido adiposo de camundongos. Além disso, demonstra também que o aumento no processo inflamatório está associado a aumentos concomitantes nos níveis de insulina, leptina e glicose, reforçando a relação do processo inflamatório crônico de baixa intensidade com a resistência insulínica (BRADLEY et al., 2007). Em humanos também se demonstrou que o excesso de peso (IMC > 27 kg/m²) contribui para o aumento dos níveis séricos de TNF-alfa, apresentando correlação inversa entre o aumento desta citocina e o metabolismo da glicose (WINKLER et al., 2003).

Santos et al., (2012) demonstraram que a mistura de α e β -amirina de *Protium heptaphyllum*, triterpene pentacíclico, melhora hiperglicemia e dislipidemia, reduz fator de risco aterogênico e melhora tolerância a glicose em camundongos, possivelmente por seus efeitos anti-inflamatória e antioxidantes. No entanto, o mecanismo molecular (s) subjacente a estes efeitos de α , β -amirina precisam ser estabelecidos.

Os resultados do presente estudo são promissores e mostra o potencial biotecnológico do EHCPsp, a ação antinociceptiva, mediada por mecanismos periféricos que envolve a participação de mediadores inflamatórios e a resposta anti-inflamatória significativa, que pelo menos em parte, envolve vias da PGE₂ e do TNF- α , justificam a utilização dessas plantas, tradicionalmente usadas como anti-inflamatórios. Porém ainda a necessidade de estudo das substâncias isoladas, para a utilização eficaz e segura.

6 CONCLUSÃO

- Cumarinas, flavonoides, saponinas, triterpenos e esteroides, estão presentes na composição do EHCPsp;
- EHCPsp administrado v.o., apresenta toxicidade significativamente baixa;
- As doses utilizadas do EHCPsp, não foram capazes de induzir alterações na coordenação motora dos animais submetidos aos testes, excluindo efeitos depressores;
- O EHCPsp apresentou atividade antinociceptiva, mediada por mecanismos periféricos e participação de mediadores inflamatórios;
- EHCPsp apresenta efeito anti-inflamatório significativo que, pelo menos em parte, envolve vias da PGE₂ e do TNF- α .

7 REFERÊNCIAS

ADEBIYI, A. P.; ADEBIYI, A. O.; OGAWA, T. & MURAMOTO, K. Purification and characterisation of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates. **International Journal of Food Science Technology**, 4, 2009.

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 117-126, 2008.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. T.; JÚNIOR, L. J. Q.; POLARI, R. M. P.; FILHO, J. M. B.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALVES NETO, O. **DOR: Princípios e prática**. 1. ed. Porto Alegre: Arttmed, 2009.

ARAGÃO, G.F.; Atividade anti-inflamatória, antiagregante plaquetária e efeitos centrais de alfa e beta amirina isolada de *Protium heptaphyllum* Aubl March. **Dissertação** (Mestrado acadêmico em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, 2004.

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M.; JUNIOR, A. P., A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March, **Pharmacol. Biochem. Behav** 85, 827–34. (2006).

ARAGÃO, G.F.; PINHEIRO, M. C. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G. & VIANA, G. S. B., Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Isomeric Mixture of Alpha- and Beta-Amyrin from *Protium heptaphyllum*(Aubl.) March. pages 31-47. **Journal of Herbal Pharmacotherapy** Volume 7, Issue 2, 2008.

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M.; ROTA-JUNIOR, A.P.; BANDEIRA, P. N.; DE LEMOS, T. L.; VIANA, G.S., Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*. **Pharm Biol.**;53(3):407-13, 2015.

ARSLAN N, ERDUR B, AYDIN A. Hormones and cytokines in childhood obesity. **Indian Pediatr.**; 47(10):829-39. Oct, 2010

BRADLEY RL, JEON JY, LIU FF, MARATOS-FLIER E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**2007

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A (2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett.**, 531: 2-6, 2002.

BANDEIRA, P. N.; MACHADO, M. I. L.; CAVALCANTI, F. S.; & LEMOS, T. L. G. Essential Oil Composition of Leaves, Fruits and Resin of *Protium heptaphyllum*(Aubl.) March. **Journal of Essential Oil Research**, Volume 13, pages 33-34, Issue 1, 2001.

BANDEIRA, P.N.; PESSOA, O.D.L.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L.G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, 25: 1078-1080, 2002.

BASBAUM, A.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL. **Principles of Neural Science**, 4ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 472-491, 2000.

BASBAUM, A.; BUSHNELL, M. C. Pain: basic mechanisms. In: GUAMBERARDINO, M. A. **Pain**: an updated review. International Association for the Study of Pain. Seattle: IASP Press, 2002.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BEIRITH A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J. B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 345, p. 233-245, 2002.

BOWSHER, D. The lifetime occurrence of herpes zoster and prevalence of postherpetic neuralgia: a retrospective survey in an elderly population. **European Journal Pain**, v.3, n.4, p.335-342, Dec. 1999.

BURKE GAFFNEY, A. & HELLEWELL, P. G. Eotaxin stimulates eosinophil adhesion to human lung microvascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 227: 35. 1996.

CALIXTO, J.B. et al Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 131-4. 2000.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 179-189. 2001.

CANETTI, M. D.; RIBEIRO JÚNIOR, C.; FALHAUBER, M. H. W.; SILVA JÚNIOR, Edson Gonçalves Arantes da. Rotinas de atendimento pré-hospitalar ao politraumatizado pelo GSE: grupamento de socorro de emergência do corpo de bombeiros. In: FREIRE, Evandro (Ed.). **Trauma: a doença dos séculos**. São Paulo: Atheneu, v. 2, cap. 44, p. 593-617. 2001.

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolo em psicofarmacologia comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais**, São Paulo: Fap-Unifesp, 2011.

CARTER, R.J.; MORTAN, J.; DUNNETT, S.B. Motor coordination and balance in rodents. **Curr Protoc Neuroscin**. 2012.

CARVALHO, L. E.; MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARQUES, M. O. M. & FACANALI, R. Essential Oils of *Protium* of the Adolpho Ducke Forest Reserve: *Protium crassipetalum*, *P. heptaphyllum* subs. *ulei*, *P. pilosissimum* and *P. Polybotryum*. pág. 551-554 **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Volume 16, Issue 4, 2013.

CASTRO, F.B.G., FERNANDES, J.B., SILVA, M.F.G.F., VIEIRA, P.C., Estudo fitoquímico de *Protium icicariba* (Burseraceae). In: XL Meeting of the Brazilian Society for the Progress of Science (**SBPC**). Anais do Congresso, pp. 575,1988.

CAPUANO, D. M. et al. Difilobotríase: relato de caso no município de Ribeirão Preto, SP, **Brasil. Revista Brasileira de Análises Clínicas, Ribeirão Preto**, v. 39, n. 3, p. 163-164, 2007.

CHE, C.; WANG, Z.J.; CHOW, M.S.; LAM, C.W. Herb-Herb Combination for Therapeutic Enhancement and Advancement: Theory, Practice and Future Perspectives. - **Molecules**. v.18, p.5125-5141, 2013 -

COSTA, A. F. Farmacognosia, v. 1. (4ª ed.) **Fundação Calouste Gulbenkian**. Lisboa, Portugal. p. 841-842.34, 1972 b.

COSTA, A. F. Farmacognosia. v.1. (4ª ed.) **Fundação Calouste Gulbenkian**. Lisboa, Portugal. p. 202-315, 1972 c.

COSTA A. F. Farmacognosia: Fármacos Resinosos, v. 1. (5ª ed.) **Fundação Calouste Gulbenkian**. Lisboa, Portugal. p. 773–4. 1994.

COSTA, T.O.G.; ALMEIDA, R.A.; KOOLEN, H.H.F.; SILVA, F.M.A.; PINTO, A.C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum*(Burseraceae). **Acta Amazônica**, v.42, p.557-560, 2012.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J-C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Na electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 401-407, 2004.

CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociceptive in mice. **Proc Natl Acad Sci**. v. 5, p. 1755-60, 2005.

DALY, D.C.; A taxonomic revision of *Protium* Burm. f. in Eastern Amazonia and the Guianas. **Ph.D. dissertation, City University of New York**, 1987.

DALY, D.C.B. A Taxonomic revision of the genus *Protium* (Burseraceae) in eastern Amazonia and the Guianas. v.1-2. University Microfilms International. **Tese de Doutorado**. New York, Faculty in Biology, 1989.

DALY, D.C.B. New taxa and combinations in *Protium* Burm. f. studies in neotropical Burseraceae VI. **Brittonia** 44(3): 280-299,1992.

DAL SECCO D, PARON JA, OLIVEIRA SHP DE, FERREIRA SH, SILVA JS, CUNHA FQ. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide*; 9: 153–64, 2004.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor. *Current Opinion in Pharmacology*, Oxford, v.10, n. 4, p. 497-504, 2010.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, n. 1, p. 74-79, 1941.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; E PINTO, A. C. Separação semipreparativa de a e b-amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 4, 704-706, 2011.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **CHEST J.** 118, 503–508. doi: 10.1378/chest.118.2.503, 2000.

DI STASI, L.C. Plantas Medicinais: arte e ciências – Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: **UNESP**, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2.ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 1959.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FACCIOLI L.H., SOUZA G.E.P., CUNHA F.Q., POOLE S., FERREIRA S.H. Recombinant interleukin-1 and tumour necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. **Agents Actions**; 30:344–349.1990.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor**. 1ª ed. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 2011.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**. v. 98, p. 729–733, 2003.

GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 316(2). 129-139. Mar, 2010.

GALLUZZI, K.E. Managing neuropathic pain. **JAOA**, v.107, n.10, s. 6, p. 39-48, Nov. 2007.

GOYAL, A.; BERES, B.L.; RANDHAWA, H.S.; NAVADI, A.; SALMON, D.F. AND EUDES. F. Yield stability analyses of broadly adaptive triticale germplasm in Southern and central Alberta, Canada, for industrial end-use suitability, *Can. J. Plant Sci.*, 91: 125-135. 2011.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.S.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** 107: 949-957, 2010.

GILROY, D. W. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature Medicine**, v. 5, n. 6, p. 698–701, 1 jun. 2004.

GRIFFIS, C. A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research for Nursing**, v. 7, p. 297 - 312, 2006.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N. E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 55, p. 74-82, 2011.

GUIEU, R. et al. Adenosine and neuropathic pain. **Pain.**, v. 68, p. 271-274, 1996.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R.; GOMATHI, P.; RAJAESHWAR, Y.; KAKOTI, B. B.; TAMIL SELVEN, V. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 267-273, 2005.

GUYTON, A. C. e HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 12. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier/Medicinas Nacionais**, 2011.

HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M.; GUEDES, M. A.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M.H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antinociceptive effect of triterpenoid alpha, beta-amiryn in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**, 15 (8), 630-634, 2008.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: Toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 365-376, 2007.

HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S, HOLE, K. The formalin test in mice - dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, 2001.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I.; Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KRAEMER, F. B. Adrenal and cholesterol utilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 265-266, p. 42-45, Feb. 2007

KONG, J.M.; GOH, M.K.; CHIA, L.S.; CHIA, T.F.; Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologic Sinica*, v. 24, n.1, p. 7-21, 2003.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; De BEER, E. J. Acetic Acid for Analgesic Screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-4, 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças. 7ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 49 – 79, 2005.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs. **Rev. Bras. Anestesiol.** v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LANGENHEIM, J. H. Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany, Timber Press Inc., **Portland**. pp. 1-586, 2003.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Ed. Lagoa, Florianópolis: 2003

LE BARS, D.; DICKENSON, A. H.; BESSON, J. M. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurons in the rat. **Pain**, v. 6, p. 283-304, 1979.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEGLER, D. F.; BRUCKNER, M.; ALLMEN, E. U. V.; KRAUSE, P. Prostaglandin E2 at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 2, p. 198-201, 2010.

LIMA, E. M.; NASCIMENTO, A. M.; LENZ, D.; SCHERER, R.; MEYRELLES, S. S.; BOËCHAT, G. A. P.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C. Triterpenes from the

Protium heptaphyllum resin – chemical composition and cytotoxicity. **Rev Bras Farmacogn** 24: 399-407,2014.

LIMA-JUNIOR, R. C. P., OLIVEIRA, F. A., GURGEL, L. A., et al. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta- amyryrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice, **Planta. Med** 72, 34–9, 2006.

LEVINE, J. D.; REICHLING, D. B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. Em: Wall, P. D.; MELZAK, R. (eds.) Textbook of pain. Fourth edition, London: Churchill Livingstone. 59-84 p. 2000.

LOESER, J. D. & TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, 137, 473-7,2008.

LUCCARINI, P.; CHILDERIC, A.; GAYDIER, A.M.; VOLSIN, D.; DALLEL, R. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. **J. Pain** 7, 908-914. 2006.

MACHADO, L.B.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 338-341, 2003.

MAIA, R.M.; BARBOSA, P.R.; CRUZ, F.G.; ROQUE, N.F.; FASCIO, M.; Triterpenos da Resina de *Protium heptaphyllum* March (BURSERACEAE): Caracterização em Misturas Binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623-626, 2000

MALECH. H. L. E GALLIN, J. Neutrophils in human diseases. **N Engl J Med** 317:687–94, 1987.

MARCHAND, S. The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 285–309, 2008.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. Plantas Mediciniais. Viçosa: Ed. **Imprensa Universitária**, 1994. p. 220

MARQUES D.D.; SARTORI R.A.; LEMOS, T.L.G.; MACHADO, L.L.; SOUZA, J.S.N.; MONTE, F.J.Q. Chemical composition of the essential oil from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 227-230, 2010

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: **Edições UFC**, 141 p. 1997.

MELO, M.F.F.; MACEDO, S.T.; DALY, D.C.; Morfologia de frutos, sementes e plântulas de nove espécies de *Protium* Burm. f. (Burseraceae) da Amazônia Central, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 503-520, 2007.

MENSE, S. Anatomy of nociceptors. In: BASBAUM, A.I.; BUSHNELL, M.C. **Science of pain**. 1 ed. Elsevier. p. 11-38. ISSN: 978-012-374625-2. 2009.

MING, G.L.; SONG, H.J.; BERNINGER, B.; HOLT, C.E.; TESSIER-LAVIGNE, M.; POO, M.M. CAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. **Neuron** 19:1225–1235. 1997.

MOHRLAND, J.S., GEBHART, G.F. Effect of selective destruction of serotonergic neurons in nucleus raphe magnus on morphine-induced antinociception. **Life Science**. v. 27, p. 2627- 2632. 1980.

MORELAND, R. L., ARGOTE, L., & KRISHNAN, R. Training people to work in groups. In R. S. Tindale, L. Heath, J. Edwards, E. J. Posavac, F. B. Bryant, Y. Suarez-Balcazar, E. HendersonKing, & J. Myers (Eds.), *Theory and research on small groups* (pp. 37–60). New York: Plenum.1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Brasília: **Ministério da Saúde**, 60p. 2006.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Program in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse in: Winyard, pg and Willoughby, da. *Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols*. Humana Press Inc., **Totowa**, NJ, vol. 225, p.115-121, 2003.

MUZITANO, M.F.; FALCÃO, C.A.B; CRUZ, E.A.; BERGONZI, M.C.; BILIA, A.R.; VINCIERI, F.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Oral Metabolism and Efficacy of *Kalanchoe pinnata* Flavonoids in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. **Planta Médica**, 75:307–311. 2009.

MUKINDA, J. T.; SYCE, J. A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 138–144, 2007.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. *Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*. Guideline: 423. Disponível <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf>. Acesso em janeiro de 2016.

OKOYE, N. N.; AJAGHAKU, D. L.; OKEKE, H. N.; IODIGWE, E. E.; NWORU, C. S. & OKOYE, F. B. C. Beta-amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem Bark of *Astonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. **Pharmaceutical Biology**, volume 52, Issue 11, pages 1478-1486, 2014.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 490-496, 2007.

OLIVEIRA, F. A, CHAVES, M. H, ALMEIDA, F. R., et al. Protective effect of alpha-and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Trunk

wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice, **J. Ethnopharmacol** **98**,103–8, 2005.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S. SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective effect of the mixture of a and b-amyrin from *Protium heptaphyllum*: Role of Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. **Plant Med.**, **70**: 780-782, 2004a.

OLIVEIRA, F.A., LIMA-JÚNIOR, C.P.; CORDEIRO, W.M.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Pentacyclic triterpenoids, a,b-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **78**: 719-725, 2004b.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; MARTINS, R.M.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastoprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological. Res.**, **49**: 105-111, 2004c

OLIVEIRA FS, SOUSA DP, ALMEIDA RN. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biol Pharm Bull** **31**(4): 588 – 591, 2008

PEREIRA, E. M. Avaliação do papel de receptores NMDA para glutamato na nocicepção orofacial aguda e crônica em ratos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia pelo Programa de Pós-Graduação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná), Curitiba, 2006.

PERIANAYAGAM, J.B.; SHARMA, S.K.; PILLAI, K.K. Ethnopharmacological communication Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p. 410.414, 2006.

PONTES, W.J.T.; OLIVEIRA, J.C.G. DE; CÂMARA, C.A.G. DA; LOPES, A.C.H.R.; GONDIM-JÚNIOR, M.G.C.; OLIVEIRA, J.V. DE; BARROS, R.; SCHWARTZ, M.O.E. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). **Acta Amazonica**, **37**: 103-110, 2007.

PONTE, E. L. Da. **Efeito anti - inflamatório do óleo essencial de *Croton zehntneri* pax et hofmm e do anetol**. Fortaleza, 2009. 91f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219–226, abr. 2004.

RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Peripheral mechanisms of somatic pain. **Anesthesiology**, v. 68, n. 4, p. 571–590, abr. 1988.

RAMOS, M.F.S., SIANI, A.C., TAPPIN, M.R.R., GUIMARAˆES, A.C., RIBEIRO, J.E.L.S. Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. of the Amazon region. **Flavour Fragr. J.** **150**, 383–387, 2000.

RIBEIRO-DA-SILVA, A. e DE KONINCK, Y. Morphological and neurochemical organization of the spinal dorsal horn. In: BUSHNELL, M.C.; BASBAUM, A.I. **Pain**. Academic Press, San Diego. 2008.

RICHARDSON, J. D. e VASKO, M. R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, V. 302, No. 3. 839-845, 2002.

RITTNER, H.L.; BRACK, A. & STEIN, C. Pain and the immune system. **British Journal of Anaesthesia**, vol 101, n 1, pag. 40-44, 2008.

ROBAK, E. et al. Proinflammatory interferon-gamma-inducing monokines (interleukin-12, interleukin-18, interleukin-15) -serum profile in patients with systemic lupus erythematosus. **European Cytokine Network**, v. 13, n. 3, p. 364–368, set. 2002.

ROCHA, F.A.G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L. COSTA e SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, ano 31, vol 1. 2015

ROCHA, A. P. C.; Kraychete, D. C.; Lemonica, L.; Carvalho, L. R.; Barros, G. A. M.; Garcia, J. B. S.; Sakata, R. K. Dor: Aspectos Atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

RODRIGUES, I. V. Estudo biomonitorado para avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica das folhas de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler (Burseraceae). **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Ouro Preto - MG, Brasil, 2010.

RODRIGUES, I. V.; SOUZA, J. N. P.; SILVA, A. C. G.; CHIBLI, L. A.; CABRAL, V. A. R.; VIERA FILHO, S. A.; PERAZZO, F. F.; GUIMARÃES, A. G.; SOUZA, G. H. B. Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth. (Engler). **Pharmacognosy journal**, v. 5, n. 1, p. 6-12, 2013.

ROSLAND, J. H.; TJØSLESEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

RUDIGER, A.L.; SIANI, A.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm, f. (Burseraceae). **Pharmacognosy Reviews**, 1: 93-104, 2007.

SAKATA, R. K. ISSY, A. M. **Fármacos para tratamento da dor**. 1. ed. Barueri: Manole, 2008.

SANTOS, F. A.; FROTA, J. T.; ARRUDA, B. R.; MELO, T. S.; SILVA, A. A. C. A.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M.H.; RAO, V. S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, p. 98-105, 2012.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. O. S.; et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed.

Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC. Bibliografia: p. 404-420, 2007.

SCHMIDTKO, A.; TEGEDER, I.; GEISLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. **Trends Neurosci.** 32:339–346. 2009.

SCOTT, D. T.; LAM, F. Y.; FERRELL, W. R. Acute joint inflammation Mechanisms and mediators. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 25, n. 7, p. 1285–1296, nov. 1994.

SMITH, B.P. Tratado de medicina interna de grandes animais. 2 ed. São Paulo: **Manole**, 1993.

SAMUELSSON, S.; BYRNE, B.; WADSWORTH, S.; CORLEY, R.; DEFRIES, J.C.; WILLCUTT, E.; HULSLANDER, J.; OLSON, R. K. Genetic and environmental influences on prereading skills and early reading and spelling development: A comparison between United States, Australia, and Scandinavia. **Reading and Writing: An Interdisciplinary Journal.**20:51–75. 2007.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIBATA, M.; OHBUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R.; Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5ª ed. Revista ampliada. Porto Alegre/Florianópolis. Editora UFRGS, editora da UFSC, 2003.

SIANI, A.C.; ZOGHBI, M.G.; WOLTER, E.L.; VENCATO, I. 5-methoxyjusticidin A, a new aryl-naphthalene lignan from *Protium unifoliolatum*. **J. Nat. Prod.**, 61: 796-797, 1998.

SIANI A.C.; GARRIDO, I.S.; MONTEIRO, S.S.; CARVALHO, E.S.; RAMOS, M.F.S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematic and Ecology**, 32: 477-489, 2004.

SIANI, A.C., RAMOS, M.S.F., GUIMARÃES, A.C., SUSUNAGA, G.S., ZOGHBI, M.G.B., Volatile constituents from the oleoresin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **J. Essent. Oil Res.** 11, 72–74, 1999a.

SIANI, A.C., RAMOS, M.F.S., MENEZES-DE-LIMA, JR. O., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., FERNANDEZ-FERREIRA, E., SOARES, R.O.A., ROSAS, E.C., SUSUNAGA, G.S., GUIMARÃES, A.C., ZOGHBI, M.G.B., HENRIQUES, M.G.M.O., Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **J. Ethnopharmacol.** 66, 57–69, 1999

SIQUEIRA, J.B.G., Estudo fitoquímico do gênero *Protium*: *P. unifoliolatum* (Engl.) Engl. e *P. laxiflorum* Engl. **Dissertação** (Mestrado em Química de Produtos Naturais) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil. 488 A.C., 1991.

SIQUEIRA, J.B.G., ZOGHBI, G.B., CABRAL, J.A., WILSON, W.F. Lignans from *Protium tenuifolium*. **J. Nat. Prod.**, 58: 730-732, 1995.

SIMÕES, C.M.O e SPITZER, V.; Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Revista ampliada. Porto Alegre/Florianópolis. Editora UFRGS, editora da UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5. ed., **Editora da UFSC** 2003. 1.102 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª edição. **Editora da UFSC**, p.467, 2010

SPECTOR, S. L.; SURETTE, M. E., et al. Diet and asthma: has the role of dietary lipids been overlooked in the management of asthma? **Ann Allergy Asthma Immunol** 2003; 90:371-377.

SILVA, J.R.A.; ZOGHBI, M.G.B.; PINTO, A.C.; GODOY, R.L.O.; AMARAL, A.C.F. Analysis of the hexane extracts from seven oleoresins of *Protium* species. **Journal of Essential Oil Research**, 21:305-308, 2009.

SILVA, S.S.; Estudo do xilema secundário de espécies da família Burseraceae produtoras de óleos. **Tese** de doutorado – Universidade Federal de Lavras, 2012.

SILVA, E. R.; OLIVEIRA, D. R. ; LEITÃO, S. G. ; ASSIS, IGOR M. ; VEIGA- JUNIOR, V. F. ; LOURENÇO, M. C. ; ALVIANO, D. S. ; ALVIANO, C. S. & BIZZO, H. R. Essential oils of *Protium spp.* samples from Amazonian popular markets: chemical composition, physicochemical parameters and antimicrobial activity. **Journal of Essential Oil Research**.Volume 25, pages 171-178 Issue 3, 2013.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654. 2008. 78

SUSUNAGA, G.S., Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae). **Dissertação** (Mestrado em Química de Produtos Naturais), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, 1996.

SUSUNAGA, G.S., SIANI, A.C., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A., DELLEMONACHE, F., Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia**. 72, 709-711, 2001.

TAIZ, L. AND ZEIGER, E. Plant Physiology, Fifth Edition. **Sinauer Associates**. Sunderland, MA. (In press). 2010.

TAVARES-MURTA, B.M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br J Pharmacol** 124: 1369-1374. 1998.

TAVES, M. D.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; SOMA, K. K. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*, Bethesda, v. 301, n. 1, p. 11-24, 2011.

TAIWO, Y. O, LEVINE, J. D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience** 44:131–135. 1991.

TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A.; RODERICK, R.E.; TATE, J.; GREEN, P.G.; LEVINE, J.O.; BASBAUM, A.I. Opioid inhibition of formalin-induced changes in plasma extravasation and local blood flow in rats. **Pain**, v. 84, p. 263-70, 2000.

TEIXEIRA, M.J., CORREA, C.F.; PIMENTA, C.A.M. **Dor: Conceitos Gerais**. São Paulo: Limay; 72p, 1994.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **JBA**, v. 1, n. 4, p. 329-334, out./dez. 2001

TJØLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TREEDE, R. D.; MEYE, R. A.; RAJA, S.N.; CAMPBELL, J. N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 38, n. 4, p. 397-421, 1992.

TODD, A. J. et al. Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 4103–4113, 15 maio. 2002.

TODD, A. J. e KOUBER, M.F. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. **Experimental Physiology**, v. 87, n. 2, p. 245–249, mar. 2005.

VERRI JUNIOR, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception by triggering a sequential release of IFN-gamma, endothelin, and prostaglandin. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 103, n. 25, p. 9721–9725, 20 jun. 2006.

VANEGAS, H. E SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Prog. Neurobiol.**, 64(4): 327-363, 2001.

VIEIRA-JUNIOR, J.B.; SOUZA, C. M. L. AND CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas, **Química. Nova** 28, 183–187, 2004.

VIERA-JUNIOR JB, SOUZA, C. M. L, CHAVES, M. H. Estudo das propriedades Físico -químicas da resina de almecega (*Protium heptaphyllum*). **55ª Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, Recife-PE, 2003.

WALLACE. J.L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology** 15 691-703.2008.

WEEKS, A.; DALY, D.C.; SIMPSON, B.B.; The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, p. 85-101, 2005.

WEI, X.H.; ZANG, Y.; WU, C.Y.; XU, J.T.; XIN, W.J.; Liu, X.G. Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. 205(2):471-84Exp Neurol. 2007.

WINKLER, G.; KISS, S.; KESZTHELYI. L.; SAPI, Z.; ORY, I.; SALAMON, F. et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor- 2 concentrations and C-peptide level. **Eur J Endocrinol.** 149(2):129-35. 2003.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WILLIS, W. D.; COGGESHALL, R. E. **Sensory Mechanisms of the Spinal Cord**. New York: Plenum Press. 595 p.,1991.

WILLIS, W. D. Jr.; COGGESHALL, R. E. Ascending sensory tracts and their descending control. In: WILLIS W. D.; COGGESHALL R. E., ed. **Sensory mechanisms of the spinal cord**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 857-881. 2004.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidinehydrochlorie. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307,1944.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**. v.288, n.5472, p.1765-1769. 2000.

WHO- World Health Organization - The world medicines situation. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. **Geneva**. 12p. 2011.

VALADARES, M. C. **Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”**. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev**, Caracas, v. 46, n. 3, p. 295-309. 2004.

ZHANG, B.; LI, J-B.; ZHANG, D-M.; DING, Y.; DU, G-H. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of a Fraction Rich in Gaultherin Isolated from *Gaultheria yunnanensis* (FRANCH.) REHDER. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n.3, p. 465-469, 2001.

ZEILHOFER, H.U. & BRUNE, K. Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. **Trends Pharmacol Sci**. 27(9):467-74, Sep2006.

YU, CHENG-HAO.; TANG, WEI-ZHONG.; PENG, CHENG.; SUN, TAO.; LIU, BIN.; LI, MIN.; XIE, XIAO-FANG.; ZHANG, HONG. Diuretic, anti-inflammatory, and analgesic activities of the ethanol extract from *Cynoglossum lanceolatum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 149-154, 2012.

ZOGHBI, M.G.B., CUNHA, E.V.L., WOLTER-FILHO, W., Essential oil of *Protium unifoliolatum* Burseraceae. **Acta Amazonica** 23, 15–16,1993.

ZOGHBI, M.G.B.; ROQUE, N.F.; GOTTLIEB, O.R. Propacin, a coumarinolignoid from *Protium opacum*. **Phytochemistry**, 20:180,1981.

