

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA
RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. E DE
SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES, MISTURA DE
 α - E β -AMIRINA**

Francisco de Assis Oliveira

Fortaleza – CE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA
RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. E DE SEUS
PRINCIPAIS CONSTITUINTES, MISTURA DE
 α - E β -AMIRINA**

Francisco de Assis Oliveira

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Vietla Satyanarayana Rao

Fortaleza – CE

2005

Esta tese foi submetida como parte integrante dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na biblioteca da Faculdade de Medicina da referida universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética.

Francisco de Assis Oliveira

Tese aprovada em: 24/06/2005

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
(Orientador)

Prof. Dr. João Batista Calixto (UFSC)

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (UFPB)

Prof. Dra. Glauce Socorro Barros Viana (UFC)

Prof. Dr Carlos Maurício de Castro Costa (UFC)

O47e Oliveira, Francisco de Assis

Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. e de seus principais constituintes, mistura de α -e β -amirina. / Francisco de Assis Oliveira / Fortaleza, 2005.

237 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-graduação em Farmacologia

1. Burseraceae. 2. Plantas medicinais. 3. Farmacologia. 4. Triterpenos. 5. Receptor TRPV1.

CDD 615.32324

**A Deus fonte de força e esperança;
Aos meus pais, Alcides (*in memorian*) e Elisa;
Aos meus irmãos;
A Waleska, minha esposa e companheira.**

Dedico

“Outras formas de descobertas dos efeitos terapêuticos das plantas se encontram em inúmeras práticas, tais como: o uso de amuletos, a cura por meio de orações que, muitas vezes, utilizam plantas para o benzimento, em rituais africanos, indígenas e outros. Todas essas manifestações contribuíram, graças ao seu componente empírico, com a seleção e a incorporação de espécies vegetais como plantas medicinais eficazes. Estes exemplos mostram-se suficientes para caracterizar a importância e a relevância, não apenas dos magos, bruxos, feiticeiros e alquimistas, mas também do conhecimento disseminado por toda a população, os quais contribuem amplamente para o conhecimento da natureza e servem como subsídio básico, e de extremo valor, para a seleção de plantas medicinais para estudos detalhados voltados para a obtenção de novos medicamentos.” (Di Stasi)

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Vietla Satyanarayana Rao**, pela orientação, estímulo e dedicação durante a realização deste trabalho. Meu muito obrigado.

À **Universidade Federal do Piauí** pelo afastamento concedido durante o período da qualificação.

À **Profa. Fernanda Regina** (UFPI) e à **Silvéria Lira** pelo incentivo no início desta jornada.

À **Profa. Mariana Helena Chaves** (UFPI) pelo fornecimento dos produtos de *Protium heptaphyllum* e apoio durante todo o trabalho.

À **Profa Gerly Anne de Castro Brito** pela colaboração nos trabalhos de análise histológica.

À **Profa Glauce Socorro Barros Viana** pela utilização do laboratório.

Ao **Prof. Pedro Jorge Caldas Magalhães** pelo fornecimento do vermelho de rutênio.

Aos meus amigos da Pós-graduação **Regilane, Roberto, Jeferson, Adriana Rolim, Luilma, Karina e Juliana**.

Gostaria de agradecer, de forma especial, aos amigos **Regilane Matos** (NC) e **Roberto César** (Bob) pela imprescindível e imensurável ajuda na realização deste trabalho. A vocês dois, meu reconhecimento e o meu muito obrigado.

Meu agradecimento aos bolsistas e ex-bolsistas do Laboratório de Produtos Naturais **Mariana, Kelcyana, Alana, Livia, Ítalo, Bruno, Cinthia, Fabrício, Deive, Jonny, Hermes, Wilcare, Rafaela** pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de alegria.

À **Karina Marques e Aline Bastos** pela colaboração técnica, apesar do pouco tempo de convivência no LPN.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, em especial a **Rose, Íris, Chiquinho, Fernando e Edmilson**.

À **Sílvia Maria e Áura Farias**, pela disponibilidade, amizade no decorrer do curso de Pós-Graduação.

À **Profa Flávia Almeida Santos** pela ajuda no início dos trabalhos.

À todos os **Professores** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À **CAPES/PROCAD** pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xiv
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xix
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Os produtos naturais e sua importância como fonte de novos medicamentos.	01
1.2. Biodiversidade	09
1.3. Resinas naturais	11
1.4. Terpenos	13
1.4.1. Monoterpenos	14
1.4.2. Sesquiterpenos	15
1.4.3. Diterpenos	15
1.4.4. Triterpenos	16
1.4.5. Tetraterpenos e carotenóides	17
1.5. Triterpenos e atividade biológica	17
1.5.1. Atividade antiinflamatória e antinociceptiva	18
1.5.2. Atividade gastroprotetora	25
1.5.3. Atividade hepatoprotetora	31
1.5.4. Neurônios sensoriais aferentes, receptores vanilóides e seus papéis na gastroproteção e nocicepção visceral	35
1.5.5. Outras atividades	42
1.6. <i>Protium heptaphyllum</i>	44
1.6.1. Considerações botânicas	44

1.6.2. Usos populares	45
1.6.3. Química e farmacologia de <i>Protium</i> spp	47
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAL	55
3.1. Material botânico	55
3.2. Animais experimentais	58
3.3. Drogas e reagentes	58
3.4. Aparelhos	60
4. MÉTODOS	61
4.1. QUÍMICOS	61
4.2. TOXICIDADE AGUDA	61
4.2.1. Toxicidade aguda para camundongos	61
4.2.2. Toxicidade aguda para camarão de salmoura (<i>Artemia</i> sp)	62
4.3. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA	63
4.3.1. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no edema de pata induzido por carragenina	65
4.3.2. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no granuloma induzido por “pellet” de algodão	64
4.3.3. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no aumento de permeabilidade vascular induzido por ácido acético	63
4.4. ATIVIDADE GASTROPROTERORA	71
4.4.1. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> na úlcera gástrica induzida por etanol	71

4.4.2. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> na úlcera gástrica induzida por etanol acidificado	72
4.4.3. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> sobre a secreção gástrica em modelo de ligação do piloro	73
4.4.4. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> na úlcera gástrica induzida por indometacina	
4.4.5. Efeito da mistura de α - e β -amirina na úlcera gástrica induzida por etanol: papel dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina	73
4.5. ATIVIDADE ANTIPRURIGINOSA	68
4.5.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40	68
4.5.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido pelo composto 48/80	69
4.5.3. Efeito do antagonista da naloxona sobre a atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina ou morfina no prurido induzido pelo composto 48/80	69
4.5.4. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a degranulação de mastócitos <i>ex vivo</i>	70
4.5.5. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por dextrana	67
4.5.6. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido pelo composto 48/80	66
4.5.7. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por histamina	65
4.5.8. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por serotonina	66

4.6. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	74
4.6.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela capsaicina	75
4.6.2. Efeito da mistura de α - e β -amirinas na nocicepção induzida pela administração intracolônica de capsaicina (nocicepção visceral)	76
4.6.3. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a resposta térmica induzida por capsaicina	77
4.7. ATIVIDADE HEPATOPROTETORA	77
4.7.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em camundongos	78
4.7.2. Efeito da mistura de α - e β -amirinas na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos.	79
4.7.3. Avaliação histopatológica	80
4.8. AVALIAÇÃO DA MISTURA DE α- E β-AMIRINA NOS TESTES DE ROTA-ROD, CAMPO ABERTO E TEMPO DE SONO	81
4.8.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a coordenação motora de camundongos	81
4.8.2. Efeito da mistura de α - e β -amirinas sobre a atividade exploratória	82
4.8.3. Efeito da mistura de α - e β -amirinas sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital sódico	82

4.9. Efeito da mistura de α- e β-amirina sobre os grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH)	83
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
5. RESULTADOS	85
5.1. TOXICIDADE AGUDA	85
5.1.1. Toxicidade aguda para camundongos	85
5.1.2. Toxicidade aguda para <i>Artemia</i> sp	85
5.2. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA	86
5.2.1. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no edema de pata induzido por carragenina	92
5.2.2. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no granuloma induzido por “pellet” de algodão	89
5.2.3. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no aumento de permeabilidade vascular induzido por ácido acético	86
5.3. ATIVIDADE GASTROPROTERORA	120
5.3.1. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> na úlcera gástrica induzida por etanol	120
5.3.2. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> na úlcera gástrica induzida por etanol acidificado	125
5.3.3. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> sobre a secreção gástrica em modelo de ligação do piloro	128
5.3.4. Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> na úlcera gástrica induzida por indometacina	

5.3.5. Efeito da mistura de α - e β -amirina na úlcera gástrica induzida por etanol: papel dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina	132
5.4. ATIVIDADE ANTIPRURIGINOSA	107
5.4.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40	107
5.4.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido pelo composto 48/80	110
5.4.3. Efeito da naloxona (antagonista de receptor opióide) sobre a atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina ou morfina no prurido induzido pelo composto 48/80	113
5.4.4. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a degranulação de mastócitos <i>ex vivo</i>	116
5.4.5. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por dextrana	104
5.4.6. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido pelo composto 48/80	101
5.4.7. Efeito da mistura de α - e β -amirinas no edema de pata induzido por histamina	95
5.4.8. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por serotonina	98
5.5. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	139
5.5.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela capsaicina	139
5.5.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela administração intracolônica de capsaicina (nocicepção visceral)	144

5.5.3. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a resposta térmica induzida por capsaicina	147
5.6. ATIVIDADE HEPATOPROTETORA	150
5.6.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno	150
5.6.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos	158
5.7. ATIVIDADE DA MISTURA DE α- E β-AMIRINA NOS TESTES DE ROTA-ROD, CAMPO ABERTO E TEMPO DE SONO	166
6. DISCUSSÃO	170
7. CONCLUSÕES	202
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	205
9. ANEXO –RELAÇÃO DOS ARTIGOS PUBLICADOS A PARTIR DOS ESTUDOS REALIZADOS COM A RESINA E A MISTURA DE TRITERPENOS α- E β-AMIRINA ISOLADAS DE <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March. (Bursearaceae).	

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
AAS	Ácido acetil salicílico
Abs	Absorbância
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Aminotransferase
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
cm	Centímetro
DL ₅₀	Dose letal 50%
DTNB	5,5'- dithil-bis (2-nitrobenzoic acid)
E. P. M.	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético sal dissódico
FM	Fórmula molecular
g	Gramas (s)
GalN	Galactosamina
GSH	Glutathiona reduzida
h	Hora (s)
HE	Hematoxilina-eosina
NaOH	Hidróxido de sódio
i. p.	Intraperitoneal
kg	Kilograma (s)
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
min	Minuto (s)

mL	Mililitro
NAC	N-acetilcisteína
NF-kappa B	Fator nuclear kappa B
nm	Nanômetro
NP-SH	Grupos sulfidrilas não protéicos
PF	Ponto de fusão
PG`s	Prostaglandinas
PM	Peso molecular
rpm	Rotações por minuto
s.c.	Subcutânea
°C	Grau (s) Centígrado (s)
TCA	Ácido tricloroacético
TNB	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
v.o.	Via Oral
μ g	Microgramas
μ L	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
FIGURA 1 -	<i>Protium heptaphyllum</i>	46
FIGURA 2 -	Estruturas químicas de α -amirina (a) e β -amirina (b).	52
FIGURA 3 -	Representação esquemática da obtenção da resina purificada e da mistura de triterpenos α - e β -amirina a partir da resina bruta de <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March.	57
FIGURA 4	Efeito da administração oral da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no edema de pata induzido por carragenina em ratos.	
FIGURA 5 -	Efeito da administração oral da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no granuloma induzido por “pellet” de algodão em ratos.	91
FIGURA 6 -	Efeito da administração oral da resina de <i>P. heptaphyllum</i> sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos.	94
FIGURA 7 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e N-acetilcisteína (NAC) nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	122
FIGURA 8 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	124
FIGURA 9 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e N-acetilcisteína (NAC) nas lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.	127
FIGURA 10	Efeito da administração intraduodenal da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e cimetidina no volume secretório gástrico em ratos.	130
FIGURA 11 -	Efeito da administração intraduodenal da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e cimetidina na acidez total gástrica em ratos.	131

FIGURA 12 - Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e cimetidina nas lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.	122
FIGURA 13 - Efeito da mistura de α - e β - amirina nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	134
FIGURA 14 - Efeito da capsaicina nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	136
FIGURA 15 - Efeito da mistura de α - e β -amirina nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos normais e dessensibilizados pela capsaicina.	138
FIGURA 16 - Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40 em camundongos.	109
FIGURA 17 - Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por composto 48/80 em camundongos.	112
FIGURA 18 - Efeito do antagonismo de receptor opióide (naloxona) sobre a atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina ou morfina no prurido induzido por Composto 48/80 em camundongos.	115
FIGURA 19 - Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a degranulação de mastócitos mesenteriais induzido pelo composto 48/80 <i>ex vivo</i> .	118
FIGURA 20 - Microfotografias de mastócitos mesenteriais.	119
FIGURA 21 - Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por histamina em camundongos.	97
FIGURA 22 - Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por serotonina em camundongos.	100
FIGURA 23 - Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos.	103
FIGURA 24 - Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por dextrana em camundongos.	106

FIGURA 25 - Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina.	141
FIGURA 26 - Efeito da mistura de α - e β -amirina e vermelho de rutênio sobre o tempo de lambadura induzido pela injeção subplantar de capsaicina em camundongos.	143
FIGURA 27 - Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a nocicepção induzida pela administração intracolônica de capsaicina (dor visceral).	146
FIGURA 28 - Efeito da mistura de α - e β -amirina e vermelho de rutênio sobre a resposta térmica induzida por capsaicina em camundongos.	149
FIGURA 29 - Efeito da Mistura de α - e β -Amirina e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.	153
FIGURA 30 - Efeito da mistura de α - e β -amirina e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos.	155
FIGURA 31 - Microfotografias de fígados de camundongos.	157
FIGURA 32 - Efeito da mistura de α - e β -amirina, N-acetilcisteína (NAC) e dexametasona (DEX) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.	161
FIGURA 33 - Efeito da mistura de α - e β -amirina, N-acetilcisteína (NAC) e dexametasona (DEX) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.	163
FIGURA 34 - Microfotografias de fígados de camundongos.	165

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
TABELA 1 -	Constituintes fixos isolados da espécie do gênero <i>Protium</i> <i>heptaphyllum</i> com registrados na literatura.	49
TABELA 2 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no edema de pata induzido por carragenina em ratos.	93
TABELA 3 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no granuloma induzido por “pellet” de algodão em ratos.	90
TABELA 4 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no aumento de permeabilidade vascular induzido por ácido acético em camundongos.	87
TABELA 5 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.	121
TABELA 6 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.	123
TABELA 7 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol acidificado (0,3M HCl/60% etanol) em camundongos.	126
TABELA 8 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> e cimetidina sobre o volume secretório gástrico e acidez gástrica total em ratos com piloro ligado.	129
TABELA 9 -	Efeito da resina de <i>P. heptaphyllum</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina em camundongos.	121
TABELA 10 -	Efeito da mistura de α - e β -amirina no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.	133

TABELA 11 - Efeito da capsaicina no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.	135
TABELA 12 - Efeito da mistura de α - e β -amirina na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos normais e dessensibilizados pela capsaicina	137
TABELA 13 - Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40 em camundongos	108
TABELA 14 - Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido pelo composto 48/80 em camundongos	111
TABELA 15 - Efeito da naloxona (antagonista de receptor opióide) sobre a atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina ou morfina no prurido induzido pelo composto 48/80	114
TABELA 16 - Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a degranulação de mastócitos mesentéricos induzido pelo composto 48/80 <i>ex vivo</i>	117
TABELA 17 - Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por dextrana em camundongos.	105
TABELA 18 - Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos.	102
TABELA 19 - Efeito da resina da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por histamina em camundongos.	96
TABELA 20 - Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por serotonina em camundongos.	99
TABELA 21 - Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina	140
TABELA 22 - Efeito da mistura de α - e β -amirina e vermelho de rutênio sobre o tempo de lambadura induzido pela injeção subplantar de capsaicina em camundongos	142
TABELA 23 - Efeito da mistura de α - e β -amirinas no nocicepção induzida pela administração intracolônica de capsaicina (dor visceral)	

	145
TABELA 24 - Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a hipotermia induzida pela capsaicina em camundongos	148
TABELA 25 - Efeito da Mistura de α - e β -amirina sobre os níveis de glutathiona na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos	152
TABELA 26 - Efeito da mistura de α - e β -amirina nos níveis de AST e ALT na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos	154
TABELA 27 - Efeito da mistura de α - e β -amirina nos escores de lesão hepática na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos	156
TABELA 28 - Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre os níveis de glutathiona na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.	160
TABELA 29 - Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre os níveis séricos de AST e ALT na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.	162
TABELA 30 - Efeito da mistura de α - e β -amirina nos escores de lesão hepática na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.	164
TABELA 31 - Efeito da mistura de α - e β -amirinas sobre a coordenação motora em camundongos.	167
TABELA 32 - Efeito da mistura de α - e β -Amirina sobre a atividade exploratória em camundongos.	168
TABELA 33 - Efeito da mistura de α - e β -amirinas sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital sódico em camundongos.	169

RESUMO

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. E DE SEUS PRINCIPAIS CONSTITUENTES, MISTURA DE α - E β -AMIRINA. Francisco de Assis Oliveira. Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (Burseraceae) popularmente conhecida como almécega, é encontrada na região Amazônica, em vários Estados do Brasil e países da América do Sul. Esta espécie exsuda uma resina oleosa e amorfa, usada na medicina popular como analgésico, antiinflamatória, cicatrizante e expectorante. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de monoterpenos e triterpenos pentacíclicos, tais como α - amirina e β -amirina, maniladilol e breina. O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos tóxicos e farmacológicos da resina e de seus constituintes majoritários, a mistura de triterpenos α - e β -amirina. Na avaliação dos efeitos tóxicos observamos a toxicidade aguda destes produtos em camundongos e *Artemia* sp. Analisando os efeitos sistêmicos, avaliamos a atividade antiinflamatória da resina (edema de pata induzido por carragenina, granuloma induzido por “pellets” de algodão e permeabilidade vascular induzida por ácido acético) e da mistura de α - e β -amirina (edema induzido por histamina, serotonina, dextrana T40 e composto 48/80). Examinamos ainda as atividades gastroprotetora e antisecretória da resina (lesões gástricas induzidas pelo etanol absoluto e etanol acidificado e secreção ácida induzida pela ligação pilórica) e as atividades gastroprotetora (lesões gástricas induzidas pelo etanol absoluto, com animais dessensibilizados por capsaicina), antipruriginosa (prurido induzido pelo dextrana T40 e composto 448/80 e desgranulação de mastócitos *ex vivo*), antinociceptiva (nocicepção induzida pela administração subplantar e intracolônica de capsaicina, resposta hipotérmica induzida por capsaicina) e hepatoprotetora (lesões hepáticas induzidas por acetaminofeno e GalN/LPS) da mistura de α - e β -amirinas. Não foi possível estabelecer as DL_{50} da resina (até 5 g/kg, v.o. e 1 g/kg, i.p.) e da mistura de α - e β -amirina (até 3 g/kg, v.o. e até 2 g/kg, i.p.) em camundongos. A mistura de α - e β -amirina, mas não a resina, mostrou toxicidade para *Artemia* sp, sendo as CL_{50} de $42,54 \pm 19,96$ e $400 \pm 27,85$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Nos modelos de permeabilidade vascular induzido por ácido acético (camundongos) e granuloma induzido por “pellet” de algodão (ratos), a resina demonstrou efeito antiinflamatório significativo na dose de 400 mg/kg, reduzindo a permeabilidade vascular e o peso seco do granuloma. Contudo, a resina não apresentou atividade sobre edema induzido por carragenina (ratos). Adicionalmente, a resina preveniu as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado, além de impedir a depleção dos grupos sulfidrilas produzida pela etanol absoluto nas doses de 200 e 400 mg/kg. Um efeito antisecretório da resina (200 e 400 mg/kg) foi observado no modelo de secreção ácida induzida pela ligação pilórica em ratos. A mistura de α - e β -amirina também exibiu atividade gastroprotetora inibindo as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, cujo mecanismo parece envolver os neurônios sensoriais primários sensíveis à capsaicina. A administração oral dos triterpenos α - e β -amirina (100 mg/kg), apresentou atividade antiedematogênica, nos modelos de edema de pata induzidos por histamina, composto 48/80 e dextrana T40, mas não sobre o edema induzido por serotonina. A atividade antipruriginosa também foi observada com as α - e β -amirina nas doses variando de 50 a 200 mg/kg, em modelos de prurido induzido por dextrana T40 e pelo

composto 48/80 e na redução (100 mg/kg) da degranulação de mastócitos peritoneais *ex vivo* pelo composto 48/80. O efeito antinociceptivo da mistura, nas doses de 3 a 100 mg/kg, foi verificado através da inibição dos comportamentos de nocicepção induzidos pela administração subplantar ou intracolônica de capsaicina em camundongos. A antinocicepção produzida por estes triterpenos (10 mg/kg) sobre o tempo de lambadura induzido pela capsaicina (1,6 µg/20 µL) não foi potencializada nem revertida pelo vermelho de rutênio (1,5 mg/kg), mas foi significativamente inibida pela naloxona (2 mg/kg), sugerindo mecanismo opióide. A participação dos receptores α_2 -adrenérgicos neste efeito também foi eliminada, tendo em vista que a ioimbina não reverteu o efeito antinociceptivo das amirinas no modelo de nocicepção visceral induzida pela capsaicina. Estes triterpenos bloquearam ainda a hipertermia induzida pela capsaicina (10 mg/kg), mas não reverteram a resposta hipotérmica induzida por este agente, sugerindo a participação do receptor vanilóide (TRPV1) no efeito antinociceptivo das amirinas. Nos modelos de hepatotoxicidade, a mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg) reduziu o aumento nos níveis séricos de ALT e AST e restabeleceu os níveis de GSH hepáticos, diminuindo as alterações histopatológicas induzidas pelo acetaminofeno (500 mg/kg), além de potencializar o tempo de sono induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg), indicando que este efeito hepatoprotetor envolve a inibição do citocromo P-450. A mistura ofereceu ainda completa proteção contra a mortalidade induzida por GalN/LPS, reduzindo as lesões hepáticas em camundongos e reduzindo os níveis séricos de ALT, mas não de AST ou GSH hepáticos, sugerindo um possível efeito neuroimunomodulatório neste modelo. Os triterpenos α - e β -amirina nas doses variando de 3 a 30 mg/kg, não manifestaram efeitos sedativos ou incoordenação motora em camundongos. A resina e mistura de α - e β -amirina possuem baixa toxicidade e atividades antiinflamatória e gastroprotetora. Os triterpenos α - e β -amirina exibiram atividade antipruriginosa, antinociceptiva e hepatoprotetora, cujos efeitos envolvem, pelo menos em parte, a participação dos neurônios aferentes sensoriais primários.

Palavras Chaves: 1. Burseraceae. 2. Plantas medicinais. 3. Farmacologia. 4. Triterpenos. 5. Capsaicina

ABSTRACT

STUDIES ON THE PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF RESIN FROM *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. AND ITS MAJOR CONSTITUENT, ALPHA- AND BETA-AMYRIN MIXTURE. Francisco Assis de Oliveira. Thesis submitted in partial fulfillment to obtain Doctor's Degree in Biological Sciences (Pharmacology) to the Post-Graduate Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará.

Protium heptaphyllum March (Burseraceae) popularly known as "almécega" is a popular medicinal plant largely encountered in the Amazon region, various States of Brazil and in several other South American Countries. The oily amorphous exudate obtained from this plant is widely used in skin diseases, healing of ulcers, and as an analgesic and anti-inflammatory agent. Phytochemical studies revealed the presence of several monoterpenes and pentacyclic triterpenes such as a mixture of α - and β -amyrin, maniladilol and breine. The present study aimed to investigate the general toxicity and to establish the pharmacological activity of resin and its major triterpenoid mixture, the α - and β -amyrin. In toxicity tests, both the resin and triterpene mixture exhibited low toxicity to mice. Resin at doses up to 5 g/kg, (p.o.) or 2 g/kg, (i.p.) and triterpene mixture up to 3 g/kg, (p.o.) or 2 g/kg (i.p.) failed to induce any mortality in mice. In *Artemia*-lethality test, the calculated (probit analysis) LC₅₀ values for resin and triterpenes were in the order of 42,54 ± 19,96 and 400 ± 27,85 µg/mL, respectively. In pharmacological tests, the resin was analysed for anti-inflammatory (carrageenan-induced edema, cotton pellet-induced granuloma, and vascular permeability increase induced by i.p. acetic acid) and gastroprotective (absolute ethanol and acidified ethanol) effects, whereas the triterpene mixture was examined in assays that demonstrate gastroprotective (against lesions induced by absolute ethanol), antipruritus (against pruritus induced by Dextran T40 and compound 48/80), acute and visceral antinociceptive (tests of subplantar and intracolonic capsaicin) and hepatoprotective (against acetaminophen- and GalN/LPS-induced models of hepatitis) effects. In anti-inflammatory tests, the resin (200 and 400 mg/kg, p.o.) although failed to modify the carrageenan-induced acute rat paw-edema response, it caused significant inhibitions at a dose of 400 mg/kg on the formation of cotton pellet-induced granulomas and on the vascular permeability increase induced by i.p. acetic acid in mice. In addition, the resin (200 e 400 mg/kg) showed gastroprotective potential against absolute- and acidified ethanol- induced gastric lesions as evidenced from significant diminution in lesion scores, restoration of the ethanol-induced depletion of non-protein sulfhydryl content. More over, the resin demonstrated an antisecretory effect on gastric acid secretion induced in 4-h pylorus ligated rats. The triterpene mixture also produced similar gastroprotection against ethanol-induced lesions in a manner similar to capsaicin, a pungent principle from hot peppers. This protection possibly involves capsaicin-sensitive primary afferents since it was abolished in mice pretreated with a neurotoxic dose of capsaicin. The α - and β -amyrin mixture (100 mg/kg) manifested antipruritus effect as evidenced from suppression of scratching behavior in the mouse model of pruritis induced by s.c. injections of dextran T40 and compound 48/80. Besides, it also produced an antiedematogenic effect in models of hind paw edema induced by histamine, compound 48/80 and dextran T40 and markedly depressed the compound 48/80-elicited rat mast cell degranulation (ex vivo). An antinociceptive effect of triterpenoid mixture (3-100 mg/kg) was observed in capsaicin-evoked somatic (1.6 µg/site, subplantar) and visceral (149 µg, intracolonic) models of nociception in mice. Greater suppression of nociceptive behaviors were evidenced at a dose of 10 mg/kg α - and β -amyrin mixture, which mimicked the effect produced by ruthenium red, a non-competitive capsaicin antagonist. The antinociceptive effect of triterpenoid mixture was found to

be naloxone (2 mg/kg)-sensitive, suggesting an opioid mechanism. A blockade by triterpene mixture was also evidenced on the hyperthermic but not the hypothermic response of subcutaneously administered capsaicin (10 mg/kg) suggesting possible involvement of TRPV1 receptor. In open-field and rota-rod tests, the triterpene mixture did not manifest signs of either sedation or motor abnormality in mice that could account for the observed antinociception. In the model of acetaminophen (500 mg/kg)-induced hepatotoxicity, the triterpenoid mixture (50 and 100 mg/kg) effectively reduced the elevated serum AST and ALT levels, restored the depleted GSH and markedly diminished the histopathological alterations. Potentiation of pentobarbital-sleeping time was, however, observed at these doses of triterpenoid, indicating a probable suppression of cytochrome P450 and thus a diminished metabolite formation that may account for reduced acetaminophen toxicity. The α - and β -amyrin mixture offered complete protection against the mortality associated with GalN/LPS, but caused only a moderate diminution of serum enzymes and histopathological alterations. Taken together, these findings show that the resin and α - and β -amyrin mixture possess low toxicity and have a wide therapeutic potential with anti-inflammatory, antinociceptive, antipruritus, and gastro- and hepato-protective actions. Most of the effects of triterpenoid mixture appear to involve in part the participation of primary sensory afferents in their actions.

Keywords: 1. Burseraceae. 2. Medicinal plants. 3. Pharmacology. 4. Triterpenes. 5. Capsaicin

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os Produtos Naturais e sua importância como fonte de novos medicamentos.

Os produtos naturais, compreendendo todos os produtos derivados de origem natural, plantas, animais, micróbios, minerais e mais recentemente organismos marinhos, têm sido a mais bem sucedida fonte de novas drogas. Historicamente, a mais importante fonte natural tem sido as plantas. A pesquisa utilizando plantas medicinais tem avançado em duas linhas principais: etnofarmacologia e toxicologia. Estas estratégias têm produzido muitas substâncias valiosas e provavelmente produzirão outras (TULP & BOHLIN, 2004).

Antes da segunda guerra mundial, um grande número de produtos naturais isolados de plantas superiores tornou-se importantes agentes clínicos e muitos ainda são utilizados nos dias de hoje. Quinina isolada da casca da *Cinchona*, morfina e codeína isoladas do látex do opium, digoxina obtida das folhas da *Digitalis*, atropina e hioscina isoladas de espécies da *Solanaceae* continuam em uso na clínica. Da mesma forma, alguns antibióticos desenvolvidos a partir dos efeitos antibacterianos de produtos naturais isolados dos gêneros *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces* produzidos durante a segunda guerra também continuam em uso.

Nos anos pós-guerra, houve poucas descobertas de novas drogas a partir de plantas superiores, com exceção para a reserpina isolada de espécies da *Rauwolfia*, introduzindo a era dos tranqüilizantes e a vinblastina obtida da *Catharanthus roseus*, droga efetiva no tratamento do câncer, com venda global da ordem de US\$ 100 milhões ao ano (KONG et al., 2003).

O principal objetivo no uso de plantas como fonte de agentes terapêuticos baseia-se em: i) isolar compostos bioativos para uso direto como droga, por exemplo, digoxina, digitoxina, morfina, reserpina, taxol, vinblastina, vincristina; ii) produzir compostos bioativos de estrutura nova ou conhecida como protótipo para semi-síntese na produção de entidades patenteáveis com alta atividade e/ou baixa toxicidade. Como exemplo, pode-se citar as drogas: metformina, nabilona, oxycodon, taxotere, teniposídeo, verapamil, amiodarona, cujas estruturas foram baseadas em galegina, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, morfina, taxol, pofilotoxina, khellina; respectivamente; iii) utilizados como ferramentas farmacológicas, por exemplo, dietilamina do ácido lisérgico, mescalina, ioimbina e, iv) utilizar toda a planta ou parte desta como fitoterápico, por exemplo, equinácea, alho, ginkgo biloba, erva de São João (FABRICANT & Farnsworth, 2001).

Os produtos naturais não apenas servem de protótipo ou modelo para medicamentos sintéticos, eles também exibem características relevantes insuperáveis por qualquer composto sintético. Uma das características dos produtos de origem natural é sua grande diversidade estrutural e química. Aproximadamente 40% das substâncias químicas

isoladas de produtos naturais estão ausente na química medicinal atual, complementando as moléculas produzidas sinteticamente (MULLER-KUHRT et al., 2003).

Existem mais de 120 moléculas derivadas de plantas usadas na medicina Ocidental, com muitas delas descobertas como resultado do seu uso em vários sistemas da medicina tradicional por todo o mundo. Muitas dessas drogas derivadas de plantas são bem estudadas, tais como atropina, codeína, colchicina, pilocarpina e quinina, mais recentemente, estes exemplos incluem galanthamina (um inibidor da colinesterase usado em alguns países da Europa e nos Estados Unidos no tratamento da doença de Alzheimer) e paclitaxel (um agente anticâncer o qual tem vendagem da ordem de 1 bilhão de dólares) (KINGHORN, 2002).

Das drogas aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration), nos Estados Unidos no período de dez anos (1983-1992), 157 das 520 drogas (30%) aprovadas eram produtos naturais ou seus derivados (SEIDL, 2002). De fato, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais. Além disso, 10 dentre os 20 medicamentos mais vendidos no ano de 1998 foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, e muitas outras moléculas estão, hoje, na fase de estudo clínico (SIANI, 2003).

Nos Estados Unidos, em 1991 para cada 10.000 compostos puros (muitos originados de síntese) que possuíam atividade biológica (*in vitro*), 20 foram testados em modelos animais e 10 destes foram clinicamente avaliados, e apenas um foi aprovado para

comercialização pela FDA. O tempo gasto neste processo foi estimado em 10 anos a um custo de U\$ 231 milhões (Fabricant & farnsworth, 2001), valor maior que o produto interno bruto de alguns países, conseqüentemente o desenvolvimento de um novo medicamento está, infelizmente, restrito às grandes indústrias farmacêuticas localizadas em países desenvolvidos, sobretudo nos Estados Unidos e Europa (SIANI, 2003).

No Brasil, a indústria de medicamentos concentra significativa parcela de recursos na produção de Fitoterápicos. Os problemas mais freqüentes encontrados nestes produtos são: identificação botânica equivocada, composição química sem uniformidade, presença de contaminantes, bula irregular, prazo de validade determinado empiricamente. Todas estas questões demonstram a deficiência e precariedade, desde a matéria prima até o produto acabado. A nova legislação submete a indústria ao desenvolvimento de tecnologias que assegurem e confirmem a eficiência formulação. É neste contexto, que as monografias oficiais, tornam-se um instrumento que vem atender as necessidades da indústria de fitoterápicos, fornecendo dados importantes na produção destes medicamentos (MIGUEL & MIGUEL, 2000).

Já as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários e comerciantes. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, dessa forma, o controle e comercialização pelo órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais. Estudos multidisciplinares envolvendo etnobotânicos, químicos, farmacólogos e agrônomos são necessários para que sejam ampliados os conhecimentos das plantas

medicinais, como agem, quais são os seus efeitos tóxicos e colaterais, como seriam suas interações com novos medicamentos alopáticos e quais seriam as estratégias mais adequadas para o controle de qualidade e produção de fitoterápicos (VIEIGA JUNIOR, 2005).

Mesmo com a potencialidade da terapia genética, seria fácil imaginar que essa forma de cura poderá ser a única forma de tratamento médico das doenças no futuro. Visto que as plantas forneceram muitas drogas no passado e permanecem como uma rica fonte de novos compostos baseados na química combinatória natural de milhões de anos de evolução, estes devem continuar a ser investigado como uma fonte de novos agentes terapêuticos. A maioria das plantas não foi investigada quimicamente ou biologicamente e o fracionamento monitorado por ensaios biológicos e os modernos métodos de determinação estrutural continuarão a auxiliar na pesquisa sobre novas drogas no futuro (PHILLIPSON, 2003).

1.2. Biodiversidade

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos. O número de espécies vegetais superiores (angiospermas e gimnospermas) no planeta é estimado em 250.000, podendo variar entre 215.000 a 500.000. Destas, apenas 6% tem sido estudadas sobre atividade biológica e aproximadamente 15% avaliadas fitoquimicamente (FABRICANT & FARNSWORTH, 2001).

O maior número de espécies encontra-se nas regiões equatoriais da América do Sul, da África e da Ásia, com o máximo de diversidade global situado na flora da Colômbia, Equador e Peru (NODARI & GUERRA, 1999). Estas regiões, compostas por florestas, são uma fonte vital de medicamentos. Atualmente, menos de 1% de todas as plantas encontradas nas florestas tropicais foram estudadas por suas propriedades farmacêuticas e, pelo menos, 25% de todas as drogas atuais foram oriundas destas regiões (KONG et al, 2003).

O Brasil abriga 55 mil espécies de plantas, aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas. Destas, 10 mil podem ser medicinais, aromáticas e úteis. Como consequência, pode-se esperar potenciais descobertas de novos produtos naturais biologicamente ativos nas florestas tropicais. Com este número de espécies, não é surpresa o descobrimento de plantas ricas em produtos bioativos, que podem ter aplicação direta em medicina ou para servirem de modelos para síntese de novos medicamentos (IBD, 2005).

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 65 a 80% (estimada em 6 bilhões de pessoas) da população nos países em desenvolvimento dependem primariamente das plantas medicinais na atenção primária à saúde. Dessa forma, as plantas medicinais por constituírem matéria prima de fácil acesso, de baixo custo e de fácil manipulação, têm contribuído muito para a saúde da população. São bilhões de pessoas utilizando essa alternativa, mas somente uma pequena percentagem sob indicação médica. São muitos os fatores que colaboram no uso de plantas medicinais, sobretudo econômicos e sociais. Sendo assim, o trabalho de pesquisa com plantas medicinais tende a produzir

medicamentos com custos inferior e mais acessíveis a população, a qual muitas vezes não conseguem arcar com os custos elevados da aquisição de medicamentos em atendimento às necessidades básicas de saúde.

A utilização de plantas medicinais, prática difundida pela maioria dos povos em todo o mundo, vem recebendo incentivo da OMS, a qual recomenda o emprego de plantas medicinais nos programas de atenção primária à saúde. Um bom exemplo desse emprego são as Farmácia Vivas, projeto criado pela Universidade Federal do Ceará, utilizando plantas medicinais validadas e executado com colaboração de médicos, farmacêuticos e agrônomos (MATOS, 1998).

1.3. Resinas Naturais

Diversas famílias botânicas (Pinaceae, Hamamelidaceae, Leguminosae, Zingiberaceae, Burseraceae, Anacardiaceae, Umbelíferae, etc.) são produtoras de resinas que em geral encontram-se dissolvidas em óleos essenciais líquidos e voláteis. Esse líquido obtido por incisão no próprio vegetal, não tem composição simples (COSTA, 1994).

Os óleos resinas quando expostas ao ar e à luz endurecem por evaporação e oxidação das essências, resultando em substância de natureza consistente com características próprias.

As resinas são produtos amorfos de natureza química complexa. Fisicamente são duras, transparentes ou translúcidas, insolúveis em água, mas podem ser dissolvidas em álcool ou em outros solventes orgânicos. As resinas queimam com uma chama fumarenta característica e são provavelmente produtos da oxidação dos terpenos (ROBBERS et al., 1997).

As resinas podem ocorrer em misturas homogêneas com óleos voláteis. Essas misturas são conhecidas como óleos-resinas. Dependendo da quantidade relativa do óleo volátil na mistura, as óleos-resinas poder ser líquidas, semi-sólidas ou sólidas. Em geral, observa-se uma pequena quantidade de exsudato natural nas árvores que contêm óleo-resinas, devido à agressão por insetos, à quebra de ramos ou outras lesões, podendo obter essa substância pela incisão artificial do córtex ou mesmo da madeira (ROBBERS et al., 1997).

A própolis também é produto resinoso da colméia coletado pelas abelhas a partir de várias fontes vegetais. As atividades biológicas atribuídas à própolis são as mais diversas: antibiótica, antifúngica, antiviral, antitumoral, entre outras (BURDOCK, 1998). A composição da própolis depende da época, vegetação e área de coleta (BANSKOTA et al., 2000).

Muitas propriedades são atribuídas às resinas, dentre estas podemos destacar: atividade antiinflamatória e antitumoral da resina do gênero *Boswellia* (BÜCHELE et al., 2003). *Pistacia lentiscus* var. Chia produz uma resina com atividade antioxidante *in vitro* (ANDRIKOPOULOS et al, 2003). A resina extraída das espécies *Commiphora* (*C. kua* e

C. confusa) (Burseraceae), é usada popularmente no tratamento de picada de cobra, gonorréia, desordens estomacais e nas infecções microbianas (MANGURO et al., 2003a, MANGURO et al., 2003b). Das partes aéreas de *Baccharis grisebachii* (Asteraceae), exsuda uma resina, a qual é usada no tratamento de úlceras, queimaduras e inflamação da pele (FERESIN et al., 2003). Outras atividades conferidas às resinas incluem: anti-séptica, expectorante, carminativa, antiespasmódica, emagotadora e anti-helmíntica. Externamente, os óleos-resinas são utilizados devido as sua propriedade desinfetante, cicatrizante, rubefaciente, vesicante e como parasiticida no tratamento da sarna (COSTA, 1994).

A óleo-goma-resina de *Commiphora molmol* (Burseraceae), conhecida como “mirra” é utilizada na medicina árabe no tratamento de algumas condições inflamatórias, como antipirética, anti-séptica, estimulante e na cicatrização de diferentes problemas estomacais, incluindo câncer. A análise química detectou a presença de óleos voláteis, goma e resina, a qual é formada por esteróides e triterpenos, como por exemplo, 3-epi- α -amirina (AL-HARBI et al., 1997).

A atividade antioxidante também é observada nas resinas naturais. Mais recentemente, Assimopoulou et al. (2004) demonstraram que a resina de *Pistacia lentiscus* var. Chia, e o óleo essencial obtido de *Commiphora myrrh* e *Boswellia serrata*, apresentam significativa atividade. Os principais componentes das resinas são álcoois e ácidos tetracíclicos e pentacíclicos, sendo este último o grupo mais importante, incluindo várias substâncias resinosas (COSTA, 1994).

1.4. Terpenos

Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores. Representam a segunda maior classe de metabólitos secundários com maior número de constituintes ativos (DI STASI, 1996). Encontram-se subdivididos em classes e são caracterizados por composição molecular do tipo $C_{10}H_{15}$, denominada unidade de isopreno, por isso, esses compostos também são chamados de isoprenóides.

Durante a formação dos terpenóides, as unidades de isopreno se ligam, e o número de unidades incorporadas em determinado terpenóide serve de base para a classificação desses compostos. Desta forma, temos os *monoterpenos* formados por duas unidades de isopreno, os *sesquiterpenos*, contêm três unidades de isopreno. Os *diterpenos*, com quatro unidades de isopreno. Os *triterpenos* são compostos por seis unidades de isopreno. Os *tetraterpenos* ou *carotenóides* têm oito unidades (ROBBERS et al., 1997).

1.4.1. Monoterpenos

São conhecidos mais de mil monoterpenóides naturais, a grande maioria isolada de plantas superiores. As características marcantes destes compostos são a volatilidade e o odor pungente, sendo estes compostos os componentes mais comuns de plantas responsáveis por fragrâncias e aromas. Possuem grande diversidade estrutural sendo formados por hidrocarbonetos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos ou policíclicos e em

geral acompanhados de derivados oxigenados como os álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres.

Dentre as drogas vegetais clássicas, ricas em monoterpenos podemos destacar: *Eucalyptus globulus* Labill, que fornece o eucaliptol, monoterpeno que possui diversas atividades biológicas (DUARTE et al., 2005; SANTOS et al., 2004), *Mentha x piperita* L., da qual isola-se o mentol (HALL et al., 2004) e *Thymus vulgaris* L., da qual se obtém o timol (AYDIN et al., 2005).

1.4.2. Sesquiterpenos

Apresentam grande distribuição na natureza e constituem a maior classe de terpenóides. Destacam-se nesta subclasse as lactonas sesquiterpênicas, as quais são possuidoras de um amplo espectro de atividades biológicas. Como exemplo, temos a artemisinina, isolada das folhas de *Artemisia annua* L. e utilizada no tratamento da malária (VAN DER MEERSCH et al., 2005), partenolido, isolado de *Tanacetum parthenium* L. (TIUMAN et al., 2005) com atividade leishmanicida e o ácido valerênico, principal constituinte do extrato de *Valeriana officinalis* L. e responsável pelos efeitos ansiolítico e sedativos desta planta (YUAN et al., 2004).

1.4.3. Diterpenos

Compreendem grupo de compostos do tipo C₂₀, na sua maioria são formados por compostos carbocíclico que contêm até cinco anéis, em diferentes estados de oxidação.

São notoriamente conhecidos por sua vasta atividade biológica. Exemplos clássicos de drogas ricas em diterpenos: *Ginkgo biloba*, cujo extrato hidroacetônico é rico em lactonas diterpênicas, denominadas de ginkgolídeos (A, B e C). Kuribara et al. (2003), demonstraram que o ginkgolídeo A, é o provável responsável pelos efeitos ansiolítico e colaterais, presentes no extrato desta planta. Do córtex de *Taxus brevifolia* Nutt, isola-se o taxol (paclitaxel), um diterpenóide complexo usado no tratamento do câncer de seios e no sarcoma de Kaposi (OBERLIES & KROLL, 2004).

1.4.4. Triterpenos

Os triterpenos pertencem à classe dos terpenos e são formados por seis unidades de isopreno. Apresentam estrutura do tipo C₃₀, policíclica, normalmente tetra ou pentacíclica, quase sempre hidroxilados na posição C-3. Já foram isolados mais de quatro mil triterpenóides naturais e identificados mais de quarenta tipos de esqueletos (ROBBERS et al., 1997).

Os triterpenóides podem ser dividido em três grupos principais: β -amirina (oleanano), α -amirina (ursano) e lupeol. As agliconas do tipo β -amirina possuem duas metilas em C-20. Aquelas do tipo α -amirina apresentam uma metila no C-20 e outra em C-19 com a estereoquímica entre os anéis D/E na forma *cis*. Já os triterpenos do tipo lupeol difere na estereoquímica entre os anéis D/E, que é *trans* e no número de carbonos do quinto anel (E), o qual é formado por cinco átomos de carbono (SHENKEL et al., 1999).

A maioria dos triterpenóides é formada por álcoois que podem combinar-se com açúcares para formar glicosídeos, denominados heterosídeos saponínicos ou saponinas triterpênicas. Os triterpenos livres são muitas vezes componentes das resinas, do látex ou da cutícula das plantas.

Entre as drogas vegetais conhecidas, ricas em triterpenos pentacíclicos, podemos destacar, o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) (Baltina, 2003), quilaia (*Quillaja saponaria* Molina) (BOYAKA et al., 2001), castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L) (LEACH, 2004), *Centella asiatica* L. (GNANAPRAGASAM et al., 2004) e *Polygala senega* L. (ESTRADA et al., 2000).

1.4.5. Tetraterpenos e Carotenóides

Formam uma classe importante e bastante difundida de tetraterpenóides do tipo C-40. Conferem as cores amarelas, alaranjadas, vermelhas e púrpuras observadas em organismos vivos. Foram descritos na literatura em torno de seiscentos carotenóides naturais.

Nas plantas funcionam como agentes fotoprotetores, pigmentos e na estabilização das membranas. Nos animais, funcionam como agentes fotoprotetores, antioxidantes e na prevenção do câncer. Exemplos, são o ácido *trans*-retinóico (tretinoína) (LEYDEN et al., 2005), beta-caroteno (WALDMANN et al., 2005) e a vitamina A (CLARKE et al., 2004), respectivamente.

1.5. Triterpenos e atividade biológica

Há um crescente interesse nos triterpenóides devido ao seu variado espectro de atividades farmacológicas (PATOCKA, 2003).

1.5.1. Atividades antiinflamatória e antinociceptiva

Testes para detecção das atividades analgésicas e antiinflamatórias são importantes para o desenvolvimento de drogas a partir de plantas medicinais, uma vez que dor e inflamação são comumente observadas, ao mesmo tempo, nas doenças inflamatórias. As drogas antiinflamatórias atualmente disponíveis para o tratamento das várias desordens inflamatórias, têm um ou mais efeito adverso e indesejáveis efeitos colaterais (GEETHA et al., 2001).

Nos últimos anos, princípios ativos de estruturas químicas variadas foram isolados de plantas reputadas por suas atividades antiinflamatórias. A presença de atividade antiinflamatória nos triterpenos parece ser interessante, uma vez que estes compostos possuem sistema de anéis mais ou menos similares aos encontrados nos esteróides, mas destituídos de efeitos colaterais (GEETHA et al., 2001).

Existem muitos trabalhos sobre as ações biológicas dos triterpenos, os quais podem ser relevantes pelos seus efeitos farmacológicos, incluindo suas propriedades antiinflamatórias (SAFAYHI & SAILER, 1997), característica comum a compostos desta

classe, principalmente aqueles triterpenos pertencentes às classes oleanano, ursano ou lupano (MÁÑEZ et al., 1997).

Considerando a similaridade dos triterpenóides com os compostos esteróideais, freqüentemente lhes são atribuídos, mecanismos destes agentes antiinflamatórios. Como por exemplo no efeito antiedematogênico do ácido ursólico nos modelos de inflamação dérmica induzida pelo ácido araquidônico ou do 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e na inativação do cortisol pelo 11- β -hydroesteróide desidrogenase em camungondos pelo ácido glicirretínico (MÁÑEZ et al., 1997).

Trabalhos recentes mostram triterpenos, na forma de aglicona ou heterosídeo, inibindo a enzima COX-2 (ciclooxigenase) e a produção de NO (óxido nítrico) (SHIN et al., 2005); modulando a expressão de moléculas de adesão, via inibição de NF-kappaB (ZHANG et al., 2003), ou ainda inibindo a isoenzima fosfodiesterase (PDE4), um novo alvo intracelular para novas drogas antiinflamatórias (WENIGER et al., 2005).

Muitas espécies vegetais são ricas numa gama variada de substâncias triterpenoídicas presentes em seus órgãos. Muitas destas plantas são utilizadas tradicionalmente como agentes antiinflamatórios.

As raízes de *Rosa rugosa* (Rosaceae), são tradicionalmente utilizadas na Coréia no tratamento da diabetes mellitus e da inflamação crônica. Jung et al. (2005) demonstraram que quatro triterpenos do tipo 19 α -hidroxiursano, isolados a partir do

fracionamento do extrato metanólico desta espécie, podem ser os responsáveis pelas atividades antiinflamatórias e antinociceptiva em modelos clássicos de dor e nocicepção observados em camundongos e ratos.

Carmona retusa é utilizada nas Filipinas na forma de chá preparado a partir das folhas secas e disponível em tabletes de 250 mg, sendo indicada no alívio dos sintomas da diarreia. Villasenõr et al. (2004), demonstraram que o principal constituinte desta planta é formado por uma mistura de triterpenos, composta de α -amirina, β -amirina e baurenol, a qual exibiu um potente efeito analgésico e antidiarréico.

Preparações feitas a partir da goma-resina de *Boswellia serrata* são utilizadas tradicionalmente na Índia para o tratamento de doenças antiinflamatórias. A goma é rica em triterpenos pentacíclicos, sendo o ácido boswellico o principal constituinte. Experimentos realizados com este triterpeno demonstra que este inibe a biosíntese de leucotrienos nos granulócitos neutrófilos através de uma inibição não-competitiva da enzima 5-lipoxigenase (AMMON et al., 2002). Experimentos clínicos mostraram resultados promissores em pacientes com artrite reumatóide, colite crônica e ulcerativa na doença de Crohn's e dentre outra patologias (KIELA et al., 2004). Além desses efeitos, estudos mostram que o ácido boswellico possui atividade anticancerígena, antitumoral, e anti-hiperlipidêmica (HUANG et al., 2000).

Baricevic et al. (2001), demonstraram que as propriedades antiinflamatórias de *Salvia officinalis*, deve-se ao seu principal componente, o ácido ursólico, o qual inibiu

consideravelmente o edema de orelha em camundongos induzido pelo óleo de Cróton. Neste mesmo trabalho, verificou-se que este triterpeno foi duas vezes mais potente que a indometacina, droga antiinflamatória não esteroidal utilizada como droga de referência.

Outros triterpenos com atividade antiinflamatória incluem, os ácidos corosólico, pomólico, tormentico, hyptadiênico, augustico e 3-epimaslínico, isolados das folhas de *Perilla frutescens*. Todos estes triterpenos mostraram efeito antiinflamatório, com inibição significativa no modelo de inflamação aguda intraepidermal induzido do TPA (acetado de 12-*O*-tetradecanoilforbol-13) em camundongos (BANNO et al., 2004).

O ácido 23-hidroxiursólico, um triterpeno isolado de *Cussonia bancoensis* mostrou potente atividade analgésica e antiinflamatória nos modelos de contorções induzidas por ácido acético e no teste da placa quente, respectivamente, além de exibir significativa ação antiinflamatória no modelo de edema induzido por carragenina em ratos. Estes resultados sugerem que os efeitos antiinflamatório de *C. bancoensis* pode dever-se ao 23-hidroxiursólico (TAPONDJOU et al., 2003). O efeito antiinflamatório do ácido 23-hidroxiursólico também foi verificado *in vitro*. Este triterpeno inibiu a expressão das enzimas iNOS (óxido nítrico sintase indutível) e da COX-2 (ciclooxigenase), através do bloqueio da ativação de NF- κ B, o que pode, em parte, explicar o efeito antiinflamatório observado nas cascas de *C. bancoensis* (SHIN et al., 2004).

A *Leptadenia hastata*, é planta medicinal utilizado popularmente como antiinflamatório de uso tópico. Trabalho desenvolvido por Nikiema et al. (2001)

demonstrou que o triterpeno lupeol, isolado desta planta, exibiu significativa atividade antiinflamatória em modelo clássico de inflamação, além de aumentar a proliferação de queratinócitos, em modelo *in vitro* de reparo da epiderme.

Os analgésicos atuais, tais como opióides e as drogas antiinflamatórias não esteroidais, não são adequadas a todos os pacientes e em todos os casos. Particularmente é na dor crônica, onde se observa suas limitações, como por exemplo, nos numerosos efeitos colaterais, incluindo propensão à tolerância. Dessa forma, a pesquisa visando a descoberta de outras terapias alternativas é necessária. E as plantas medicinais, conhecidas por serem importante fonte de novas substâncias químicas com potenciais efeitos terapêuticos, são fundamentais para este fim. Portanto, a pesquisa com plantas utilizadas tradicionalmente pela população no alívio de dores, desempenham papel estratégico na busca de novas drogas analgésicas (VONGTAU et al., 2004).

Diversos modelos animais são empregados no estudo de novas drogas analgésicas derivadas de produtos naturais. Nestes modelos experimentais a nocicepção pode ser induzida por agentes químicos, mecânicos, térmicos e inflamatórios.

Capsaicina, o ingrediente pungente da pimenta vermelha (*Capsicum* spp), é extensamente utilizada como ferramenta farmacológica no estudo dos mecanismos da dor tanto em humanos quanto em animais. Como visto anteriormente, a capsaicina possui ação seletiva sobre as fibras sensoriais que transmitem a sensação de dor. Este efeito resulta da

ativação dos receptores vanilóides pela capsaicina, depletando neuropeptídeos tais como substância P e CGRP a partir destes neurônios (PELISSIER et al., 2002).

Durante as décadas passadas, pesquisadores têm direcionado seus estudos sobre o papel da capsaicina na dor e inflamação. Um considerável número de estudos já foram realizados sobre os efeitos sensoriais da capsaicina quando aplicada sobre a pele ou na pleura, ou quando injetada intradermicamente em humanos ou em animais experimentais (SAADÉ et al., 2002).

A injeção de capsaicina da superfície plantar da pata traseira produz padrão de comportamento de dor característico, tais como lambar e morder a pata afetada (NAH et al., 2000), produzindo alterações significativas nos limiares de nocicepção térmica e mecânica (SAADÉ et al., 2002). Uma vez ativado pela capsaicina, os neurônios aferentes secretam neuropeptídeos (substância P e CGRP) induzindo a inflamação neurogênica.

Cada um desses peptídeos é conhecido por interferir em um ou mais mecanismos envolvidos na reação inflamatória. Por exemplo, a substância P, pode contribuir para vasodilatação, liberação de histamina de mastócitos e modular as funções das células do sistema imune, que expressam receptores para substância P em sua membrana citoplasmática. CGRP é conhecido por sua vasoativa e por seus efeitos sobre as células imunológicas (SAADÉ et al., 2002).

A dor visceral é uma das mais comuns forma de dor produzida por doença e uma das mais freqüentes razões que fazem os pacientes buscar auxílio médico. É um problema de considerável relevância clínica, e seu mecanismo neurobiológico difere dos mecanismos envolvidos nas dores nociceptiva ou neuropática. Muito progresso tem sido feito visando o entendimento das propriedades funcionais dos nociceptores viscerais que iniciam o estado de dor, seus mecanismos moleculares de ativação e sensibilização e sobre suas ações ao nível do sistema nervoso central. Alguns alvos moleculares que desempenham papel fundamental na ativação e sensibilização dos receptores viscerais já foram identificados, dentre eles está o receptor TRPV1 (CERVERO & LAIRD, 2004).

Muitos modelos de dor crônica são baseados sobre as lesões inflamatórias na pele, músculo ou articulações ou sobre danos aos nervos periféricos (CERVERO, 2002). Em modelos animais, substância algogênicas são aplicadas em muitas estruturas viscerais. Capsaicina, uma substância algogênica, seletiva aos neurônios aferentes (TRPV1), têm sido extensivamente utilizada em modelos experimentais de dor para induzir hiperalgesia cutânea. Laird et al. (2001) introduziram um modelo animal especificamente objetivando o estudo da dor visceral.

Neste modelo, a capsaicina administrada no colón de camundongos induz, de forma dose dependente, comportamentos de dor visceral e hiperalgesia referida, tais como lambar o abdômen, contorção abdominal, arrastar o abdômen contra o solo, etc (LAIRD et al., 2001; KAWAO et al., 2004), sendo estes efeitos revertidos pela morfina. Este modelo de dor visceral é útil no estudo farmacológico de drogas antinociceptivas, uma vez que

informações sobre dor visceral, hiperalgesia referida e inflamação do cólon podem ser obtidos de um mesmo animal em um único modelo.

Tendo em vista a vasta gama de atividades estudadas envolvendo os triterpenos, a atividade analgésica também faz parte dos efeitos relacionados a estes terpenóides. Por exemplo, o ácido 23-hidroxitormêntico isolado dos frutos de *Rubus coreanus*, mostrou efeito analgésico em testes de nocicepção (contorções abdominais, placa-quente e “tail flick”) utilizando camundongos e ratos. Este efeito foi mais potente que o seu respectivo heterosídeo, niga-ichigosídeo (ácido 1,2,3-hidroxitormêntico 28-*O*-glc) (CHOI et al., 2003).

Breina, um triterpeno isolada da resina de *Protium kleinii* e presente no extrato etéreo desta planta mostrou um pronunciado efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção inflamatória induzidos por ácido acético e formalina em camundongos (OTUKI et al., 2001).

Ferreira et al. (2000), demonstraram que o extrato metanólico de *Epidendrum Mosenii*, exibiu uma acentuada atividade antinociceptiva, frente a modelos de nocicepção química e térmica e que este efeito deve-se, em parte, a participação do sistema opióide. Os princípios ativos implicados nesta atividade são triterpenos. Mais recentemente, Otuki et al., 2005a, demonstraram que a mistura de triterpenos α - e β -amirinas, isolada da mesma espécie (*P. kleinii*), exibiu significativa antinocicepção em ratos. Efeito este que parece envolver a inibição de fibras sensíveis às proteínas quinases A e C. Otuki et al.,

(2005b) também descreveram o efeito antiinflamatório tópico do triterpeno α -amirina no modelo de edema de orelha induzido por TPA em camundongos.

1.5.2. Atividade gastroprotetora

Tradicionalmente, as plantas medicinais têm sido utilizadas na medicina popular por todo o mundo para o tratamento de várias doenças, em especial a úlcera gástrica (TOMA et al., 2002).

O extrato obtido a partir das folhas e frutos de *Sapindus saponaria* L., rico em triterpenos pentacíclicos, dentre os quais destacam-se ácido oleanólico, α -amirina e β -amirina, apresentou significativa atividade antiulcerogênica nos modelo do piloro ligado em ratos, diminuindo o volume da secreção gástrica, a concentração de ácido clorídrico e o pH (MEYER et al., 2002). Três espécies nativas da floresta atlântica, *Maytenus aquifolium*, *Soroceae bomplandii* e *Zolernia ilicifolia*, conhecidas como “espinheiras santa”, são tradicionalmente utilizadas como analgésicas e antiulcerogênica. Dentre os principais constituintes foram encontrados triterpenos, os quais podem estar relacionados com a gastroproteção observada nestas plantas, seja por aumento dos fatores de proteção ou pela atividade antioxidante (GONZALEZ et al., 2001).

A mucosa gástrica é continuamente exposta a agentes potencialmente danosos, tais como, ácido clorídrico, pepsina, ácidos biliares, condimentos alimentares, produtos bacterianos e medicamentos. Estes agentes são implicados na patogênese das lesões gástricas, por promover aumento na secreção do ácido gástrico e pepsina, diminuição no

fluxo sanguíneo gástrico, por suprimir a produção endógena de prostaglandinas, inibir a proliferação celular e o crescimento da mucosa, além de alterar a mobilidade gástrica (TOMA et al., 2002).

Dessa forma, um desequilíbrio entre os fatores prejudiciais dentro do lúmen e os mecanismos de proteção dentro da mucosa gastroduodenal, pode desencadear o surgimento das úlceras. A ansiedade prolongada, estresse emocional, choque cirúrgico hemorrágico, queimaduras e trauma também estão envolvidos nas lesões gástricas, cujo mecanismo ainda é pouco entendido (RAO et al., 2004).

A terapia utilizada para o tratamento das úlceras gástricas inclui o controle da bactéria *Helicobacter pylori* bem como o controle da bomba H^+/K^+ -ATPase, da secreção ácida e reversão dos danos à mucosa e da inflamação. Muitos medicamentos utilizados no tratamento desta doença não são completamente efetivos e muitos efeitos adversos acompanham estas drogas, além do alto custo desses medicamentos para o paciente (TOMA et al., 2002).

Dessa forma, muitos produtos derivados de plantas apresentam-se como uma fonte atraente de novas drogas e muitos têm mostrado resultados promissores no tratamento da úlcera gástrica (ZAYACHKIVSKA et al., 2004), seja como fonte no desenvolvimento de novas entidades farmacológicas ou como um produto adjuvante no tratamento desta doença (ARRIETA et al., 2003).

Como visto anteriormente, as ulcerações ocorrem quando há um desequilíbrio causado tanto por aumento dos fatores agressores ou por diminuição da resistência gástrica (SAIRAM et al., 2002). Os mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal contra agentes agressores, tais como ácido clorídrico, bile e drogas antiinflamatórias não esteroidais, consistem em três fatores principais: i) fatores funcionais, incluindo a secreção de muco alcalino, microcirculação da mucosa e motilidade; ii) fatores humorais, compreendendo as prostaglandinas e óxido nítrico e os iii) fatores neurais, formados pelos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina (CPSN) (ARRIETA et al., 2003).

Os modelos animais desempenham papel importante na busca de novas drogas com propriedades gastroprotetoras. As lesões na mucosa gástrica pode ser induzido por diferentes modelos experimentais, e cada um com seu próprio mecanismo (SAMONINA et al., 2004). Considerando que a etiologia da úlcera é multifatorial, incluindo interação entre atividade gástrica pepsina, motilidade intestinal e alterações na circulação da mucosa gástrica (CLEMENTI et al., 2002), comentaremos a seguir os principais modelos experimentais utilizados para induzir lesões gástricas.

As lesões gástricas por etanol, um modelo extensamente utilizado para avaliação experimental de drogas antiulcerogênicas (PANDIAN et al., 2002), ocorre predominantemente na parte glandular do estômago com formação de leucotrienos C4 (LTC4), produtos secretados dos mastócitos e espécies reativas do oxigênio, diminuição do muco e depleção de grupamento sulfidrílicos, resultando em danos à mucosa gástrica (RAO et al., 2004). Da mesma maneira que etanol, outros agentes necrotizantes tais como

HCl 0,6 N e NaOH, administrados intragastricamente, produzem graves erosões hemorrágicas na mucosa do estômago (MATSUDA et al., 1999).

A mucosa gástrica normalmente contém altas concentrações de glutathione reduzida (GSH) que atuando como antioxidante e desempenhando papel importante na manutenção da integridade da mucosa no estômago. As lesões induzidas por etanol estão também associadas com diminuição significativa dos níveis de GSH na mucosa gástrica (PONGIPIRIYADACHA et al., 2003).

Administração intraperitoneal de indometacina significativamente reduz a secreção de prostaglandinas (PG's) e bicarbonato e o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica em animais experimentais. A inibição das PG's predis põe o estômago e o duodeno à danos na mucosa, enquanto o estímulo das PG's pode exercer um papel de proteção. Assim, o efeito antiulcerogênico citoprotetor de uma droga pode ser mediado pelas PG's endógenas (SZABO & SZELENYI, 1987; TAN et al., 2002).

Assim como as lesões induzidas por etanol, o modelo de lesões gástricas induzido por estresse também é bastante utilizado para avaliação de drogas gastroprotetoras. Este modelo divide similaridades com o modelo do etanol, mas difere na etiologia das lesões. As lesões induzidas por estresse de retenção e frio são pequenas e com sangramento no lúmen, já no modelo de etanol observa-se estrias lineares relacionadas à necrose da mucosa, hemorragia da submucosa e edema (CHO & OGLE, 1992).

Alterações na secreção e na microcirculação da mucosa gástrica, além da motilidade anormal desta, são considerados os mecanismos patogênicos responsáveis pelas lesões gástricas induzidas estresse, que desenvolve-se como um resultado da estimulação do nervo vago, o qual aumenta a secreção gástrica e depleção do muco gástrico (AL-HOWIRINY et al., 2005), levando a uma grave hemorragia, juntamente com um aumento na atividade da mieloperoxidase, sugerindo que neste modelo as lesões envolve a participação de neutrófilos, uma vez que a mieloperoxidase é um marcador da infiltração desta célula durante a inflamação no estômago (CHO et al., 2003).

O mecanismo envolvido na formação das lesões gástricas tem sido estudada por vários pesquisadores utilizando deferentes modelos animais de úlcera induzida. Exposição de agentes irritantes aumentam a produção de PG's pela mucosa gástrica com consequência de uma redução do pH do lúmen gástrico, provavelmente através da estimulação da secreção ácida. A ação protetora das PG's é mediada pelo aumento na produção de muco e secreção de bicarbonato, modulação da secreção do ácido gástrico, inibição da liberação de mediadores inflamatórias por mastócitos e na manutenção do fluxo sanguíneo durante a exposição a estes agentes (BATISTA et al., 2004).

Desse forma, outro modelo utilizado na avaliação antiulcerogênica de produtos naturais é o modelo do método do piloro ligado em ratos. A partir da ligação do piloro, observa-se alteração na circulação da mucosa gástrica e secreção dos produtos dos mastócitos, além do aumento da secreção ácida (SAMONINA et al., 2004). Os parâmetros bioquímicos do suco gástrico, bem como produção de muco e síntese de prostaglandinas

podem ser avaliados (BATISTA et al., 2004). Infiltração de leucócitos polimorfonucleares, os radicais livres derivados do oxigênio e a peroxidação lipídica também estão envolvidos na patogênese das lesões da mucosa estomacal induzida neste modelo (TANAKA et al., 2001).

Os danos teciduais produzidos por agentes nocivos, etanol por exemplo, pode resultar na acumulação de radicais livres tóxicos nas células da mucosa gástricas, depletando os níveis de glutathione reduzida (GSH) no estômago. Os tióis endógenos tais com GSH são capazes de ligar-se a radicais livres e prevenir a formação das lesões produzidos por vários agentes ulcerogênicos. Assim GSH é tem importante participação na manutenção na integridade da mucosa gástrica (MAITY et al., 2001), funcionando como agente gastroprotetor, idem as PG's. Várias enzimas anti-oxidantes, tais como glutathione peroxidase envolvidas na eliminação de peróxido de hidrogênio e na peroxidação lipídica, são importantes na proteção celular (LA CASA et al., 2000).

Como visto acima, os antioxidantes naturais podem proteger o corpo humano dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas, além de desempenhar papel importante na patogênese de várias doenças degenerativas (MONTILLA et al., 2003). Neste sentido, muitos triterpenóides têm se mostrado promissores como agentes antioxidantes, o que pode ser comprovado pelos diversos estudos envolvendo esta classe de metabólito secundário (CHEN et al., 2002; YAMASHITA et al., 2002; WANG et al., 2003; SEKIYA et al., 2003; SHIRWAIKAR et al., 2004; SHIH et al., 2004; SULTANOVA et al., 2004).

1.5.3. Atividade hepatoprotetora

Como dito anteriormente diversas atividades biológicas para aos triterpenos foram relacionadas nos últimos anos. Os triterpenos possuem uma ampla variedade de efeitos biológicos, tais como antiinflamatório, anti-hiperlipidêmico, antiulcerogênico e imunomodulatório. E dentre os efeitos biológicos destes compostos, a hepatoproteção é dos um mais notáveis (LIU et al., 1994).

O fígado é um dos órgãos mais freqüentemente prejudicados do corpo, tendo em vista que é exposto a grande variedade de agentes que são potencialmente hepatotóxicos. Dessa forma, o desenvolvimento de drogas hepatoprotetoras que possam proteger, satisfatoriamente, o fígado de tais danos são bem vindas (GUPTA et al., 2002).

As opções de tratamentos nas doenças hepáticas tais como, cirrose e hepatite crônica são problemáticas. Tratamentos efetivos, como interferon, colchicina, penicilamina e corticosteróides geram profundos efeitos colaterais, piorando, freqüentemente, o quadro clínico do paciente. Neste sentido, médicos e pacientes necessitam de agentes terapêuticos efetivos com baixa incidência de efeitos colaterais, e neste contexto, as plantas medicinais constituem uma alternativa potencial (LUPER, 1999).

O ácido oleanólico é um triterpeno utilizado clinicamente no tratamento da hepatite na China. Estudo realizado com preparações obtidas a partir deste triterpeno mostrou diminuição na atividade da alanina aminotransferase (ALT) e no conteúdo do

malonaldeído hepático (malonaldeído-MDA), em modelo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) (CHEN et al., 2005).

Outro triterpeno, o ácido ursólico presente nas folhas de *Eucalyptus hybrid* e *E. tereticornis* mostrou um significativo efeito protetor, *in vitro*, no modelo de toxicidade induzida por etanol em hepatócitos isolados de ratos. Este triterpeno foi capaz de preservar a viabilidade dos hepatócitos, revertendo as alterações enzimáticas séricas da ALT e AST (aspartato aminotransferase), induzidas pelo etanol, de forma concentração dependente (SARASWA et al., 2000).

Os mecanismos de hepatoproteção exercidos por alguns triterpenos, parecem ser múltiplos. Sabe-se que muitos agentes hepatotóxicos necessitam da ativação de um metabólito, via sistema citocromo P450 no fígado. Os ácidos olenólico e ursólico, exercem suas atividades hepatoprotetora por inibir as enzimas CYP1A e CYP2A. O efeito protetor do primeiro, nos modelos de hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno, bromobenzeno, tioacetamida, CCl₄ e furosamida, em camundongos, pode ser atribuído, em parte, a inibição do citocromo P450 no fígado (LIU, 1995).

Outra via de proteção envolve a modulação de sistemas enzimáticos de defesa no fígado. O ácido ursólico exerce sua atividade protetora por modular os níveis de catalase, glutathiona redutase e glutathiona peroxidase contribuindo com seus efeitos hepatoprotetores, além de melhorar a peroxidação lipídica por diminuir os níveis de

malonaldeído no modelo de hepatotoxicidade induzida por agentes hepatotóxicos, como o CCl_4 , por exemplo. (MARTIN-ARAGON et al., 2001).

O lupeol, triterpeno isolado de *Leptadenia hastata*, planta medicinal utilizado popularmente como antiinflamatório Nikiema et al., (2001), mostrou atividade hepatoprotetora no modelo de hepatotoxicidade induzida por cádmio em ratos. Neste modelo, Sunitha et al.. (2001), demonstraram que o lupeol, através de sua propriedade antioxidante, melhorando o sistema “redox” tecidual por intermédio da destruição de radicais livres, o que foi observado pelas alterações nos níveis de MDA e das enzimas hepáticas.

Várias espécies de *kalanchoe* são utilizadas na oriente como tônico, adstringente analgésico, carminativo, e no tratamento da diarreia e vômito. Várias atividades já foram comprovadas em laboratório, como antiulcergênica, antiinflamatória e antimicrobiana. Yadav & Dixit (2003), demonstraram que o suco e o extrato etanólico obtidos da folha desta planta exibiram significativa atividade hepatoprotetora, *in vivo* e em *in vitro* no experimento de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4).

Neste modelo a hepatotoxicidade induzida pelo CCl_4 é devido ao metabólito CCl_3^\bullet um radical livre que liga-se às lipoproteínas promovendo a peroxidação de lipídeos do retículo endoplasmático. A análise fitoquímica desta planta mostra há presença de triterpenos pentacíclicos dentre outros compostos. Jeong (1999), mostrou que o efeito

hepatoprotetor do ácido oleanólico, no modelo de dano hepático induzido por CCl₄, em camundongos, envolve o citocromo P450, mais especificamente o P4502E1.

O tratamento dos animais, por três dias, com este triterpeno resultou em uma inibição, significativa, do sistema enzimático P4502E1, de maneira dose dependente, além de prevenir o aumento da ALT, da atividade da lactato desidrogenase e a peroxidação lídica no fígado. Assim, o efeito hepatoprotetor deste triterpeno, deve-se, em parte, à sua capacidade de bloquear a bioativação do CCl₄, sobretudo pela inibição da expressão e atividade do citocromo P4502E1.

Acetaminofeno é uma das drogas mais utilizadas no mundo devido as suas propriedades analgésica e antipirética. Contudo, esta droga é conhecida por causar necrose hepática centrolobular em humanos e em animais experimentais quando altas doses desta substância são administradas (HAZAI et al., 2002). Assim, como CCl₄, a toxicidade exercida pelo acetaminofeno é mediada por um mecanismo que envolve a produção de radical livre, via citocromo P450, denominado N-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI) (ROSEN et al., 1983). Liu et al. (1995), demonstraram que o ácido oleanólico exerce efeito hepatoprotetor frente à hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em camundongos, via diminuição da atividade de várias enzimas do sistema P450, além de aumentar os níveis de GSH no fígado e diminuir a atividade da enzima catalase em 20%.

1.5.4. Neurônios sensoriais aferentes, receptores vanilóides e seus papéis na gastroproteção e nocicepção visceral

Os nervos sensoriais aferentes, algumas vezes descritos como nervos aferentes primários, desempenham papel de proteção, alertando o Sistema Nervoso Central sobre

eventos nocivos nos tecidos periféricos. Estes nervos são encontrados na pele, intestinos e pulmões e quando estimulados por agentes inflamatórios, secretam os neuropeptídeos CGRP (calcitonin gene-related peptide) e Substância P (SP), os quais atuam em conjunto no processo inflamatório. CGRP atua em seu receptor (CGRP₁) causando vasodilatação arteriolar e aumento do fluxo sanguíneo nos tecidos inflamados, levando ao edema.

A SP age sobre o receptor de neurocinina (NK₁), nas vênulas pós-capilares, com conseqüente extravasamento plasmático, além de estimular a adesão e infiltração de neutrófilos. A SP induz ainda a secreção de triptase, a partir de grânulos encontrados nos mastócitos, efeito que estimula a liberação de CGRP e SP, a partir das terminações periféricas dos neurônios aferentes, o que contribui para manutenção da inflamação neurogênica (STEINHOFF et al., 2000 AMADESI et al., 2004).

O envolvimento das fibras sensoriais sensíveis à capsaicina na integridade da mucosa gástrica é discutida há décadas (ZOLCSANYI & BARTHO, 2001). Os nervos sensoriais sensíveis à capsaicina também desempenham papel importante nos mecanismos de defesa gástrica frente a agentes ulcerogênicos. Recentemente, Horie et al., (2004), demonstraram a participação dos receptores vanilóides (VR1) no mecanismo de defesa da mucosa gástrica de ratos, no modelo de úlcera induzida por HCl. Receptores vanilóides presentes na mucosa gastrintestinal estão envolvidos na regulação da motilidade gastroentérica, secreção ácida, aumento no fluxo sanguíneo gástrico através da ação da CGRP, estimulação da secreção de bicarbonato e muco gástrico ou na manutenção da

integridade da mucosa na presença de substâncias nocivas (PONGPIRIYADACHA et al., 2003).

A estimulação dos nervos sensoriais sensíveis à capsaicina estimulam a liberação de neuropeptídeos tais como CGRP e/ou substância P a partir das terminações destes neurônios e estes medeiam a resposta aferente. CGRP é um potente inibidor da secreção ácida gástrica em modelos animais e no homem, um efeito que parece ser mediado através da liberação de somatostatina e evidências apontam que CGRP é um forte candidato aos efeitos antiulcerogênicos mediado pela capsaicina (ABDEL-SALAM et al., 1999).

O receptor funcional TRPV1 (TRP-vanilloid receptor 1) assemelha-se aos membros da família de proteínas TRP (transient receptor potential) em termos de organização topológica. As proteínas TRP são formadas por canais de cálcio transmembrana, identificado primeiramente em *drosophila* com TRP mutante e deficiente para fotorecepção (WOOD, 2005).

A existência de outros tipos de receptores TRPV1 e um grande número de membros pertencentes à família do receptores TRP sugere que estes receptores podem estar envolvidos em grande variedade de diferentes estímulos. De fato, estes receptores estão implicados na transdução de um variedade de sinais extracelulares, incluindo luz, calor, frio e distensão mecânica; mediadores intracelulares, tais como diacilglicerol e metabólitos do ácido araquidônico e alguns atuando através de quinases podem também ativar os receptores TRP (WOOD, 2002).

A recente clonagem e caracterização dos receptores TRPV1 a partir dos tecidos animais (CATERINA et al., 1997) e humanos (HAYES et al., 2000), foi decisivo na identificação do alvo molecular dos ligantes para esta classe de receptores de membrana. Estes ligantes podem ser distribuídos em vários grupos, como os capsaicinóides (capsaicina, resiniferatoxina, piperina, eugenol, capsazepina e vermelho de rutênio), os gingeróis, os terpenos dialdeídos insaturados, os triprenilfenóis e os gíngenosídeos (CALIXTO et al., 2005).

Um importante papel têm sido atribuído aos receptores TRPV1 na pesquisa da dor. Evidências sugerem que a regulação e ativação destes receptores são determinados por diversos mecanismos, tendo em vista que o canal iônico é regulado por mediadores lipídicos, pH ácido (prótons), temperatura (acima de cerca de 42°C), fosfolipídeos e fosforilação, além de produtos de natureza química ou sintética. (CATERINA & JULIUS, 2001; CALIXTO et al., 2005). Assim, estes receptores representam um alvo promissor para novos compostos analgésicos.

A capsaicina é um composto extensamente utilizado em animais e humanos no estudo dos mecanismos envolvidos na dor para avaliação da eficácia de várias drogas analgésicas. A ativação pela capsaicina dos nociceptores, tais como fibras-C, promove a liberação de glutamato e peptídeos neuromodulatórios a partir dos seus neurônios sensitivos aferentes, bem como peptídeos pró-inflamatórios, tais como substância P e CGRP de seus terminais periféricos. Estes eventos neuroquímicos são responsáveis pela

hiperalgesia, vasodilatação, inflamação comumente observadas após administração de capsaicina em humanos e animais de laboratórios (BARRET et al., 2003).

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é principal ingrediente da pimenta vermelha, planta do gênero *Capsicum*. Capsaicina é estimulante seletivo dos neurônios aferentes sensoriais da raiz do gânglio dorsal nos mamíferos, formados por fibras não mielinizadas C e mielinizadas A δ , as quais respondem a estimulação nociva (térmica, mecânica e química) (CATERINA & JULIUS, 2001). Esta propriedade seletiva da capsaicina tem estimulado a investigação do papel destas fibras aferentes em um considerável número de processos fisiológicos.

Peskar et al. (1991), verificaram que a estimulação desses receptores pela administração intragástrica de capsaicina foi efetiva em proteger contra lesões da mucosa gástrica induzidas por etanol em ratos, efeito que parece não envolve a participação das PG's, mas possivelmente a participação do óxido nítrico (NO), o qual pode ser secretado das terminações nervosas da mucosa gástrica pela própria capsaicina.

As observações de Peskar *et al* foram confirmadas por ABDEL-SALAM et al. (1999). Eles observaram que a estimulação do nervo sensorial com capsaicina não modificou a ação citoprotetora da mucosa pela prostaciclina, tão pouco potenciou a citoproteção mediada por esta nos modelos de lesão gástrica induzido por administração tópica de aspirina e HCl, etanol 96% ou HCl 0,6 N. Apesar da controvérsia da capsaicina sobre a secreção gástrica, este é dos mecanismo pelo qual este agente exerce sua atividade

protetora. Uma vez estimulado, os neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina aumenta a defesa da mucosa gástrica através do aumento da microcirculação além de reduzir os efeitos agressivos através do efeito inibitório sobre a secreção gástrica (ABDEL-SALAM et al. (1999).

Porém, altas concentrações desensibilizantes de capsaicina administradas localmente ou doses neurotóxicas sistêmicas deste agente aumenta, significativamente, a suscetibilidade da mucosa gástrica de ratos às lesões induzidas por substâncias ulcerogênicas, como aspirina, etanol 96% ou indometacina (ABDEL-SALAM et al., 1999), além de retardar o processo de cicatrização das úlceras gástricas (MA et al., 2000).

Estes resultados sugerem que os neurônios aferentes sensíveis à capsaicina participam nos mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Assim, a ativação das terminações destes neurônios aferentes protegeria a mucosa gástrica da formação das lesões (HOLZER & LIPPE, 1998). De fato, estudo conduzido por Park et al. (2000), demonstrou que a capsaicina significativamente inibiu as lesões hemorrágicas induzidas pelo etanol em ratos. Além de inibir a peroxidação lipídica e a atividade da mieloperoxidase no mesmo modelo, de forma dose dependente.

Como vimos, os receptores para capsaicina e os neurônios sensíveis à capsaicina modulam funções fisiológicas tais como manutenção da integridade tecidual. Dessa forma, a inibição dos receptores TRPV1 ou a desensibilização das fibras sensíveis à capsaicina,

tanto podem ser benéficas como podem produzir perda de algumas funções fisiológicas (NAGY et al., 2004).

Alguns triterpenos exercem sua atividade envolvendo os neurônios aferentes sensíveis à capsaicina. Matsuda et al., (1999a; 1999b) demonstraram que o efeito gastroprotetor e de inibição do esvaziamento gástrico, ambos efeitos exercidos por Mormodina Ic, um oligoglicosídeo do ácido oleanólico, isolado das frutas de *Kochia scopara* (L), devem-se a participação dos neurônios sensíveis à capsaicina participam no efeito. Os triterpenos são os princípios responsáveis pelo efeito antinociceptivo em modelos de dor induzido por capsaicina, dentre outros, do extrato metanólico do caule de *Epidendrum Mosenii*. Este efeito parece dever-se em parte a interação com o sistema opióide (FERREIRA et al., 2000).

Estudos mostram que alguns triterpenos pentacíclicos ou seus derivados são possuidores de ação gastroprotetora ou antiulcerogênica em diferentes modelos de lesões gástricas em animais (MATSUDA et al., 1998; FARINA et al., 1998; ARRIETA et al., 2003). Navarrete et al. (2002) propuseram que a presença de um grupamento hidroxila (OH), livre ou na forma de derivado, na posição C-3 dos triterpenos é necessário para que estes compostos exerçam sua atividade antiulcerogênica. Dentre os compostos com propriedades gastroprotetoras, e possuidoras de OH (livre ou derivada) destacam-se α -amirina, β -amirina, ácido 3-epi-oleanólico, ácido 18 β -glicirrético, ácido oleanólico, ácido ursólico, carbenoxolona, lupeol, sericosídeo e diversas saponinas triterpênicas (NAVARRETE et al., 2002; FARIANA et al., 1998).

1.5.5. Outras atividades

Uma outra atividade biológica relacionada aos triterpenos é o efeito antitumoral, o qual é bem descrito para esta classe de compostos. Por exemplo, o ácido ursólico e o ácido oleanólico, parece exercer suas atividades antitumorais, possivelmente por i) inibir a inflamação produzida pelo tumor; ii) pela supressão na expressão de certos oncogênes, tais como *c-jun* e *c-fos* e, iii) pela modulação dos sistemas de defesa, tais como potencial antioxidante e funções immune (LIU, 1995). O ácido ursólico foi capaz de inibir a angiogênese, *in vitro*, incluindo a proliferação de células endoteliais, migração e diferenciação (CARDENAS et al., 2004).

Mais recentemente, Saleem et al. (2004), utilizando modelo de câncer de pele, verificaram que animais pré-tratados com lupeol mostraram significativa redução na incidência do tumor e retardo no período de latência para o surgimento do tumor. Este efeito está ligado à inibição da ativação de PI3K induzido por TPA; pela ativação de NF-kappaB e IKKalfa e degradação e fosforilação de IkappaBalfa.

No período entre 1989 e 1994, cerca de 200 medicamentos aprovados pela FDA (Food and Drugs Administration) foram obtidos de fontes naturais. Dentre as drogas anticancerígenas e antimicrobianas, aproximadamente 70% foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (SIANI, 2003). Dessa forma, triagens sistemáticas a partir de produtos vegetais, representa uma alternativa na descoberta de novos compostos com potencial

atividade antimicrobiana frente às bactérias multiresistentes. Neste contexto, os triterpenos representam uma fonte potencial de novos fármacos.

Os principais metabólitos de *Diopsiros melanoxylon*, os triterpenos, amirinas e ácido ursólico, exibiram potente atividade contra bactérias Gram negativa (*Pseudomonas syringae*), com razoável atividade contra bactérias Gram positivas (*Bacillus sphaericus*) e *Bacillus subtilis* (MALLAVADHANI et al., 2004). Encontra-se na literatura trabalhos relatando atividade antifúngica aos triterpenos. O ácido betulínico, wogonina e oroxindina, isolados das partes aéreas de *Bacopa monnieri* e *Holmskioldia sanguinea*, inibiram completamente (100% de inibição) o crescimento dos fungos *Alternaria alternata* e *Fusarium fusiformis* (CHAUDHURI et al., 2004).

Frações obtidas do extrato metanólico de *Buchholzia coriacea* exibiram uma significativa atividade antifúngica, de forma concentração-dependente, quando comparado ao tioconazol (droga de referência). Os dois princípios ativos presentes no extrato foram isolados e identificados como lupeol e beta-sitosterol (AJAIYEGBA et al., 2003).

Outras atividades relacionadas aos triterpenos incluem ainda, atividade hipoglicêmica (XIE et al., 2004; PEREZ & VARGAS, 2002), antiviral (GONG et al., 2004; MADUREIRA et al., 2003) e anticariogênica (LIU, 1995).

1.6. *Protium heptaphyllum*

1.6.1. Considerações Botânicas

A família Burseraceae, pertencente à ordem Rutales, é distribuída em 16 gêneros encontrados nas regiões tropicais e subtropicais, sendo dividida em três tribos: *Protieae*, *Boswellieae* e *Canarieae*, sendo a *Protieae* distribuída em três gêneros: *Garuga*, *Tetragastris* e *Protium*. Este último gênero é o mais representativo com cerca de 136 espécies (GUIMARÃES, 1997; SUSUNAGA, 1995).

O *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., da família Burseraceae, popularmente conhecido como almecegueira, breu-branco verdadeiro (Amazônia), almecegueira-cheirosa, almecegueira-de-cheiro, almecegueira-vermelha, almecegueiro-bravo, é uma planta de ocorrência em todo o Brasil em terrenos arenosos, tanto úmidos quanto secos. Possui altura de 10-20 m, com tronco de 40-60 cm de diâmetro, folhas compostas pinadas de 2-4 jugas, com folíolos de 7-10 cm de comprimento por 4-5 cm de largura (LORENZI, 1992) (**Figura 1**).

A planta é perenifólia, heliófita, característica da floresta latifoliada semidecídua. É particularmente freqüente em áreas ciliares úmidas. Ocorre tanto em matas primárias como em formações secundárias. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, amplamente disseminadas por pássaros. Floresce durante os meses de agosto-setembro. Os frutos amadurecem em novembro-dezembro. A madeira é moderadamente pesada (densidade 0,77 g/cm³), compacta, dura, revessa porém dócil ao

cepilho, bastante elástica, de grande durabilidade quando em lugares secos sendo de excelente qualidade para a construção civil (LORENZI, 1992) (**Figura 1**).

As mudas da planta podem ser produzidas a partir da colocação de sementes para germinação, logo que colhidas, em canteiros ou diretamente em recipientes individuais contendo substrato peneirado de 0,5 cm de espessura e irrigar diariamente. A emergência ocorre em 15-25 dias e, a taxa de germinação geralmente é baixa. O desenvolvimento das plantas no campo é apenas moderado (LORENZI, 1992).

1.6.2. Usos populares

A madeira do *P. hepthapyllum* é apropriada para construção civil, obras internas, assoalhos, serviço de torno, carpintaria e marcenaria. A árvore proporciona boa sombra e apresenta qualidades ornamentais, podendo, por conseguinte, ser utilizada na arborização urbana e rural. Seus frutos são avidamente procurados por várias espécies de pássaros que comem o arilo adocicado que envolve as sementes. Por essa razão não pode faltar na composição de florestas mistas destinadas ao re-povoamento vegetal de áreas degradadas de preservação permanente, principalmente as localizadas ao longo de rios e córregos.

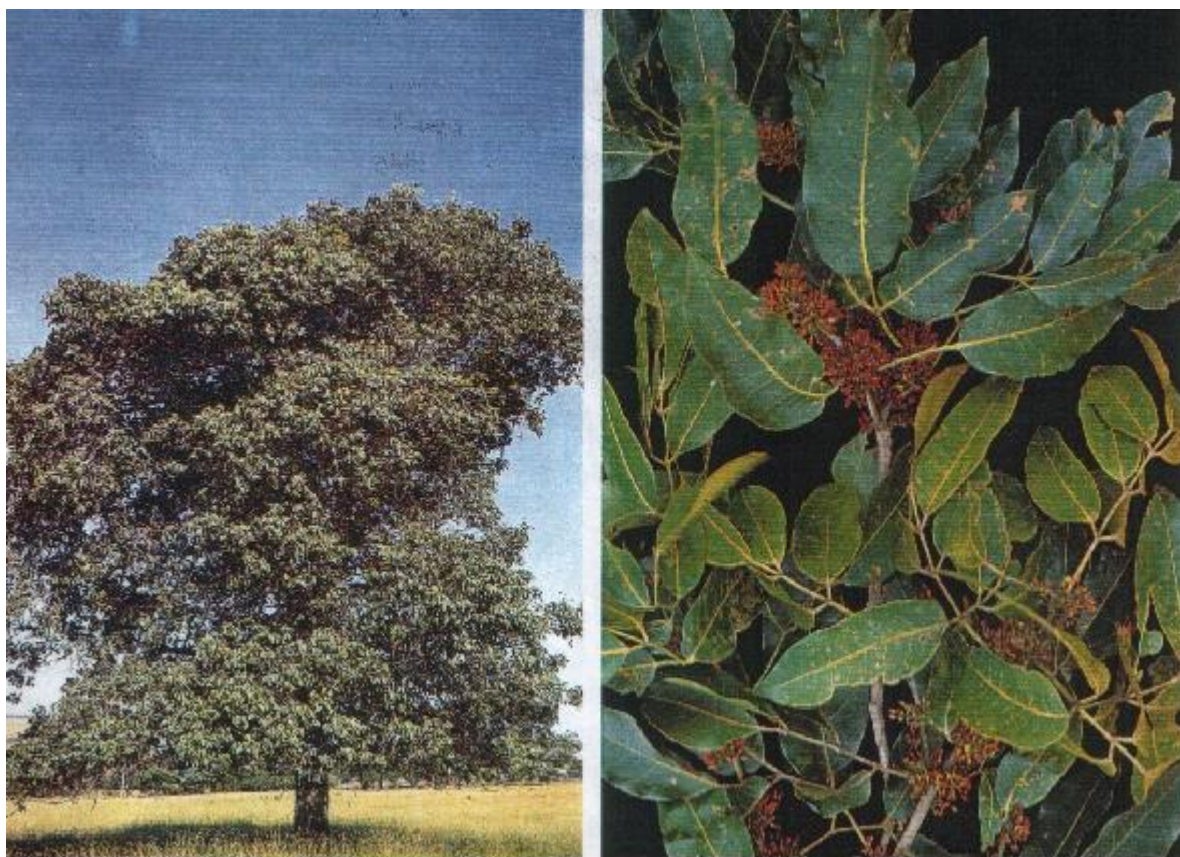


FIGURA 1– *Protium heptaphyllum* (à direita, detalhes das partes aéreas)
(LORENZI, 1992).

A família Burseraceae é uma conhecida fonte de exsudatos e resinas ricas em substâncias aromáticas que são utilizadas para fins medicinais e industriais (SIANI et al., 1999). O *Protium* é o principal gênero desta família e um dos mais distribuídos na América do Sul (SIANI et al., 1999). Na medicina popular, gomas e óleos-resina de espécies de *Protium* são usados para vários fins, como por exemplo, tônico, estimulante, antiulcerosos e antiinflamatórios (SIANI et al., 1999). A atividade imunestimulante e antiinflamatória foi descrito para o extrato aquoso de resinas de espécies de Burseraceae (DUWIEJUA et al., 1993).

A partir de incisões feitas no tronco de *P. heptaphyllum* obtém-se um óleo-resina aromática, amarelo claro, que se solidifica com o ar e se inflama facilmente (BRAGA, 1976). A resina é utilizada na indústria de verniz, calafetagem de embarcações em rituais religiosos na forma de incenso (CORRÊA, 1973; MAIA et al., 2000). Na medicina popular, a resina é utilizada como cicatrizante, antiinflamatória, hemostática, balsâmica, analgésica e expectorante, no tratamento de doenças da pele e como antiulcerogênica (CORRÊA, 1973; SUSUNAGA et al., 2001; OTUKI et al., 2001a).

1.6.3. Química e farmacologia de *Protium* spp

Há poucos relatos na literatura acerca de estudos químico e farmacológico com espécies do gênero *Protium*. O levantamento bibliográfico realizado no “Chemical Abstracts” revelou a presença dos constituintes químicos, os quais encontram-se listados

na **Tabela 1**. A maioria dos compostos isolados já foram reportados na literatura, sendo os triterpenos os constituintes predominantes nesta espécie.

A literatura registra ainda dois trabalhos relatando a composição química dos óleos essenciais da resina e um trabalho sobre óleos essenciais das folhas e caule (ZOGHBI et al., 1995; SIANI et al., 1999). Trabalho desenvolvido por Bandeira et al., (2001), a partir do óleo essencial das folhas, frutos e resina, de um exemplar coletado no Ceará, elevou à identificação, nas folhas, de mono e sesquiterpenos, tais como, mircereno, β -cariofileno, enquanto os óleos da resina e frutos continham, sobretudo monoterpenos, como α -pineno, limoneno, α -felandreno e terpinoleno.

Os mesmo autores deram continuidade aos estudos fitoquímicos sobre a composição química da resina, estendendo-se a outras partes da planta, tais como caule, folhas e frutos. Da resina, além do óleo essencial, cujo teor é de 11%, foram isolados o monoterpeno triidroxilado, triterpenos (α -amirina, β -amirina e breina); dos frutos verdes, (-) catequina; dos frutos maduros e folhas, flavonóides quercetina e quercetina-3-O-ramnosil, respectivamente; e do caule, escopoletina (BANDEIRA et al., 2002).

Dentre as plantas do gênero *Protium*, algumas vêm sendo estudadas e têm demonstrado propriedades farmacológicas variadas. Estudo realizado por Otuki et al. (2001) demonstra que a atividade antinociceptiva de uma fração etérea obtida de *P. kleinii*, está relacionada, em parte, com há presença de triterpenos no extrato desta planta.

Tabela 1. Constituintes fixos isolados da espécie do gênero *Protium heptaphyllum* com registrados na literatura.

Substâncias	Referências
3 β -hidroxiursano-12-eno (α -amirina)	MAIA et al., 2000; VIEIRA-JUNIOR, et al, 2005
3 β -hidroxioleano-12-eno (β -amirina)	ZOGHBI et al., 1993; MAIA et al., 2000; VIEIRA-JUNIOR, et al, 2005
ursano-12-eno-3 β ,16 β -diol (breína)	MAIA et al., 2000; OTUKI et al., 2001; VIEIRA-JUNIOR, et al, 2005
oleano-12-eno-3 β ,16 β -diol (maniladiol)	MAIA et al., 2000; VIEIRA-JUNIOR, et al., 2005
ursano-9(11):12-dieno-3 β -ol	MAIA et al., 2000
oleano-9(11):12-dieno-3 β -ol	MAIA et al., 2000
Ácido 3 α -hidroxi-tirucalla-7,24-dieno-21-óico	MAIA et al., 2000; MORA et al., 2001
Ácido 3 α -hidroxi-tirucalla-8,24-dieno-21-óico	MAIA et al., 2000
3 β ,24-diidroxiursano-12-eno	SUSUNAGA et al., 2001
3-oxo-20S-hidroxitaxastano	SUSUNAGA et al., 2001
3 β ,20S-diidroxitaxastano	SUSUNAGA et al., 2001
Éter etílico do ácido p-cumárico	ALMEIDA et al., 2001
6-metoxi-7-hidroxycumarina	ALMEIDA et al., 2001
7,8-dihidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiran-2-ona	ALMEIDA et al., 2001
cleomiscosina A	ALMEIDA et al., 2001
β -sitosterol	ALMEIDA et al., 2001; Zoghbi et al., 1993
3-O- β -D-glicopiranosil- β -sitosterol	ALMEIDA et al., 2001
Lupeol	ALMEIDA et al., 2001
Lupenona	VIEIRA-JUNIOR, et al, 2005
α -amirinona	VIEIRA-JUNIOR, et al, 2005
β -amirinona	VIEIRA-JUNIOR, et al, 2005
Estigmasterol	ALMEIDA et al., 2001; Zoghbi et al., 1993

Os mesmos autores (OTUKI et al., 2005b), evidenciaram ainda que o extrato etéreo ou seu principal constituinte ativo, um triterpeno pentacíclico denominado α -amirina isolado do mesmo vegetal, apresentaram pronunciado efeito antiinflamatório em modelo de inflamação tópica. Dando continuidade ao estudo com *P. kleinii*, Otuki et al. (2005a), mostraram ainda que a mistura de dois triterpenos pentacíclicos, α -amirina e β -amirina, isolados da resina desta planta produziu, de forma dose dependente, expressiva antinocicepção em modelos de nocicepção inflamatória induzidos por ácido acético, formalina e capsaicina em camundongos.

A atividade antinociceptiva também foi observada por Aragão (2004). Neste estudo, a mistura de triterpenos α -amirina e β -amirina, isolada de *P. heptaphyllum* mostrou efeito antinociceptivo em modelos agudos de nocicepção induzidos por ácido acético, formalina e placa quente, além das atividades antiinflamatórias (antiedematogênica), ansiolítica e antiagregante plaquetária.

Muitas espécies de *Protium* produzem uma resina aromática que exsuda das cascas e folhas, a qual, dependendo da espécie, é utilizada na confecção de incensos. Da mesma forma, para algumas espécies, a resina é usada na medicina tradicional por suas propriedades antiinflamatórias (DEHARO et al., 2001).

Siani et al. (1999), avaliaram a atividade antiinflamatória *in vivo* e *in vitro* de óleos essenciais obtidos da resina e folhas de várias espécies do gênero *Protium*. Neste trabalho, os óleos essenciais obtidos da resina *P. heptaphyllum* (PHP) e das folhas de *P.*

strumosum (PS) *P. grandifolium* (PG), *P. lewellyni* (PL) e *P. hebetatum* (PHT) foram avaliados em modelos de inflamação e nocicepção em camundongos.

Os óleos de PHP, PS e PL, inibiram significativamente o extravasamento de proteínas no modelo de pleurisia induzida por zymosan. Já os óleos de PG, PL e PHT, inibiram o acúmulo de neutrófilos, enquanto os óleos de PHP e PL inibiram o acúmulo de eosinófilo na cavidade pleural induzido por LPS. Já *in vitro* os óleos de PHP e PS, inibiram a produção de óxido nítrico induzido por LPS. O efeito antinociceptivo não foi observado com nenhum dos óleos quando os mesmos foram administrados por via oral.

Na busca de novas drogas com potencial atividade contra a malária, a resina *Protium glabrescens*, tradicionalmente utilizada devido as suas propriedades antiinflamatória e analgésica, mostrou significativa atividade antimalárica *in vivo* contra o parasita *Plasmodium falciparum* (DEHARO et al., 2001).

Há um crescente interesse na elucidação das atividades biológicas dos triterpenóides. Estudos envolvendo alguns destes compostos, como o ácido ursólico, ácido oleanólico e lupeol, já são bem estabelecidos na literatura. Diferentemente destes últimos, são escassos os trabalhos abrangendo as atividades relacionadas aos triterpenos α -amirina e β -amirina (**Figura 2**) e a resina de *Protium heptaphyllum*.

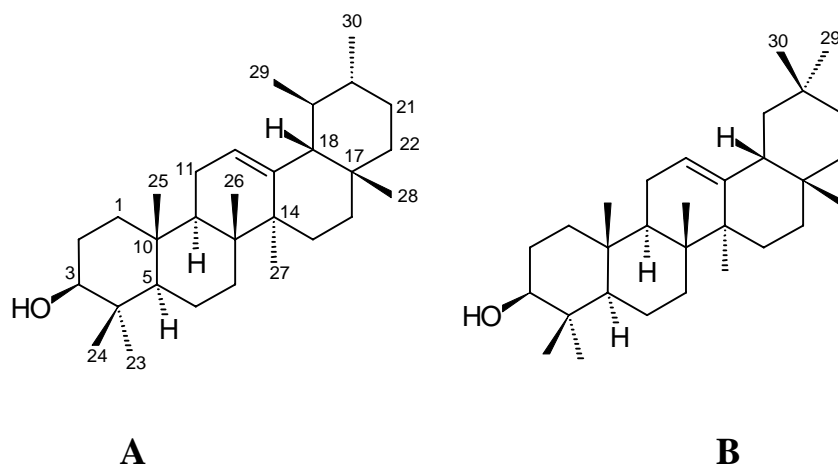


FIGURA 2. Estruturas químicas de α -amirina (A) e β -amirina (B).

Com base nestes dados, decidimos investigar os efeitos farmacológicos de *P. heptaphyllum*, uma vez que esta planta é rica em terpenos, particularmente triterpenos pentacíclicos, incluindo α -amirina e β -amirina.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os poucos estudos farmacológicos envolvendo a espécie *Protium heptaphyllum* e sabendo que a resina desta espécie é rica em substâncias de natureza terpênica, particularmente os triterpenos pentacíclicos α -amirina e β -amirina, e sendo os triterpenos, de uma forma geral, possuidores de variadas atividades farmacológicas, o presente trabalho tem como objetivo geral estudar os efeitos farmacológicos da resina e da mistura de triterpenos α -amirina e β -amirina, um dos seus principais componentes.

Como objetivos específicos, buscamos:

- ❖ Obter e purificar a resina a partir do exsudato da casca do caule de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March e isolar a mistura de triterpenos pentacíclicos α - e β -amirinas, a partir da resina;
- ❖ Avaliar a toxicidade, em camundongos e *Artemia* sp, e a CL_{50} da resina purificada e da mistura de triterpenos α - e β -amirinas;
- ❖ Examinar farmacologicamente os efeitos da resina nos modelos de inflamação: edema de pata, granuloma em ratos e permeabilidade vascular em camundongos;

- ❖ Analisar a atividade gastroprotetora da resina em modelos agudos de úlcera por etanol absoluto, HCl/etanol sobre a produção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) em camundongos, além de estudar o efeito da resina sobre a secreção gástrica, utilizando ligadura do piloro em ratos; Estudar a atividade gastroprotetora da mistura de triterpenos α - e β -amirinas, nos modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos;
- ❖ Investigar os efeitos da mistura da mistura de triterpenos α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40 e Composto 48/80 em camundongos e na degranulação de mastócitos mesenteriais de ratos pelo composto 48/80, avaliar ainda a mistura de triterpenos α - e β -amirinas em modelos de edema de pata utilizando camundongos, delineando, quando possível, os mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos farmacológicos;
- ❖ Verificar a atividade antinociceptiva da mistura de triterpenos α - e β -amirina, em modelos de nocicepção utilizando a capsaicina como agente algogênico em camundongos, projetando os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos farmacológicos;
- ❖ Estudar a ação hepatoprotetora da mistura de triterpenos α - e β -amirinas nos modelos de lesões hepáticas induzidas por acetaminofeno e galactosamina/lipopolissacarídeo em camundongos, avaliando a função hepática através determinando a produção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) e

a atividade das enzimas séricas ALT e AST, além da avaliação microscópica do fígado;

- ❖ Averiguar os efeitos da mistura de triterpenos α - e β -amirinas, nos testes de rotarod, campo aberto e no tempo de sono induzido por pentobarbital sódico em camundongos.

MATERIAL

3. MATERIAL

3.1. Material botânico

O exsudato resinoso (resina bruta) de *P. hepthaphyllum* foi coletado durante o mês de Agosto de 2001, no município de Timon, estado do Maranhão, após a identificação pela botânica Dra. Roseli Farias de Melo Barros. A exsicata da planta foi depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob o número 18247.

3.2. Animais experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss Webster, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 25-30 g e ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 180-200 g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura ambiente de 22-24 °C, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará.

3.3. Drogas e reagentes

Acetaminofeno	Sigma, USA
Ácido acético glacial P.A.	Synth, Brasil
Ácido Etilenodiaminotetraacético sal dissódico (EDTA)	Proanalysis, Brasil
Ácido fosfórico	Sigma, USA
Ácido tiobarbitúrico	Sigma, USA
Ácido tricloroacético P.A.	Sigma, USA
Ácido trinitrobenzeno sulfônico - TNB	Sigma, USA
Álcool etílico absoluto P.A.	Quimex, Brasil
Azul de Evans	Reagen, Brasil
Azul de Toluidina	Vetec, Brasil
Bicarbonato de sódio	Vetec, Brasil
Capsaicina	Calbiochem, USA
Carragenina	Sigma, Brasil.
Cetotifeno	Farmalab, Brasil.
Cimetidina	Smithkline Beecham, Brasil.
Ciproeptadina	Prodome, Brasil
Clonidina	Sigma, USA
Cloreto de cálcio	Vetec, Brasil
Cloreto de magnésio	Vetec, Brasil
Cloreto de potássio	Vetec, Brasil
Cloreto de sódio	Vetec, Brasil
Composto 48/80	Sigma, USA
Dexametasona	Prodome, Brasil
Dextrana T40	Sigma, USA
Dextrana	Sigma, USA
Dimetilfulfóxido (DMSO)	Reagen, Brasil
Éter etílico	Labsynth, Brasil
Galactosamina	Sigma, ,USA

Glicose	Vetec, Brasil
Glutation reduzido	Sigma, USA
Histamina	Sigma, USA
Ibuprofeno	Schering- Plough, Brasil.
Indometacina	Predome, Brasil.
Ioimbina	Sigma, USA
Lipopolissacarídeo	Sigma, USA
Malonaldeído	Sigma, USA
N-Acetilcisteína	Fluimucil [®] , Eurofarma, Brasil
Naloxona	Dupont, USA
n-butanol	Lafan, Brasil
Pentobarbital sódico	Abbots Lab, Brasil
Serotonina	Sigma, USA
Sulfato de magnésio	Vetec, Brasil
Sulfato de sódio	Vetec, Brasil
Sulfato de Morfina	Cristália, Brasil
Vermelho de rutênio	Sigma, USA
Trisma	Sigma, USA
Tween 80	Riedel, Alemanha

3.4. Aparelhos

Agitador – aquecedor, modelo 258	Fanen [®] , Brasil
Agitador de tubos – VORTEX, AP 56	PHOENIX
Analizador bioquímico semi-automático: modelo RA-50	Bayer [®] , Brasil
Balança analítica	Marte [®] , Brasil
Balança para animais	Filizola [®] , Brasil
Banho-maria: Modelo Q-249	QUIMIS [®] , Brasil
Centrifuga refrigerada, modelo CT 5500 DR	CIENTEC [®] , Brasil

Freezer -75°C	Legaci System®
Lavadora ultrasônica, modelo USC 700	UNIQUE®
Material cirúrgico	---
Microscópio óptico binocular	Nikon
pHmetro, modelo PM 608	Alalion®
Plestismógrafo	Ugo, Basile
Pipetas automáticas	Jencons®
Rota-rod, RT-2002	Insight, Brasil
Seringas plásticas	B-D-Plastipak

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. QUÍMICOS

O estudo fitoquímico, incluindo a obtenção da resina purificada e isolamento da mistura binária dos triterpenos α -amirina e β -amirina, foi realizado pela Profa. Dra. Mariana Helena Chaves do Departamento de Química da UFPI. O material vegetal (resina bruta) (410 g) foi dissolvida em metanol/diclorometano (4:1). Após filtração, os solventes foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se 408 g de resina purificada, resultando num rendimento de 99,5%. A resina (12,0 g) foi cromatografada em coluna (5,5 x 38 cm) de gel de sílica (280 g), empacotada com hexano, utilizando como eluente os solventes hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade.

Foram coletas 104 frações, de aproximadamente 125 mL, as quais depois de concentradas e analisadas por CCF de sílica, foram reunidas. As frações de M-19 (5,43 g) foram reunidas e submetidas à caracterização, utilizando as técnicas cromatográficas e espectroscópicas. A fração M-19 (5,43 g; 45,3%) apresentou-se como um sólido amorfo branco (FM=C₃₀H₅₀O; PF=179-181°C; PM=426) cuja identificação foi realizada através da análise dos seus espectros de RMN ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura,

permitindo-nos constatar que os dois triterpenóides tratam-se da α -amirina e β -amirina (**Figura 2**) na razão de 63:37. Considerando que foram obtidos 5,4 g da mistura de α - e β -amirina, assim como a proporção entres estes triterpenos, constatou-se que 28,3% α -amirina (3,4 g) e 16,6% (2,0 g) β -amirina.

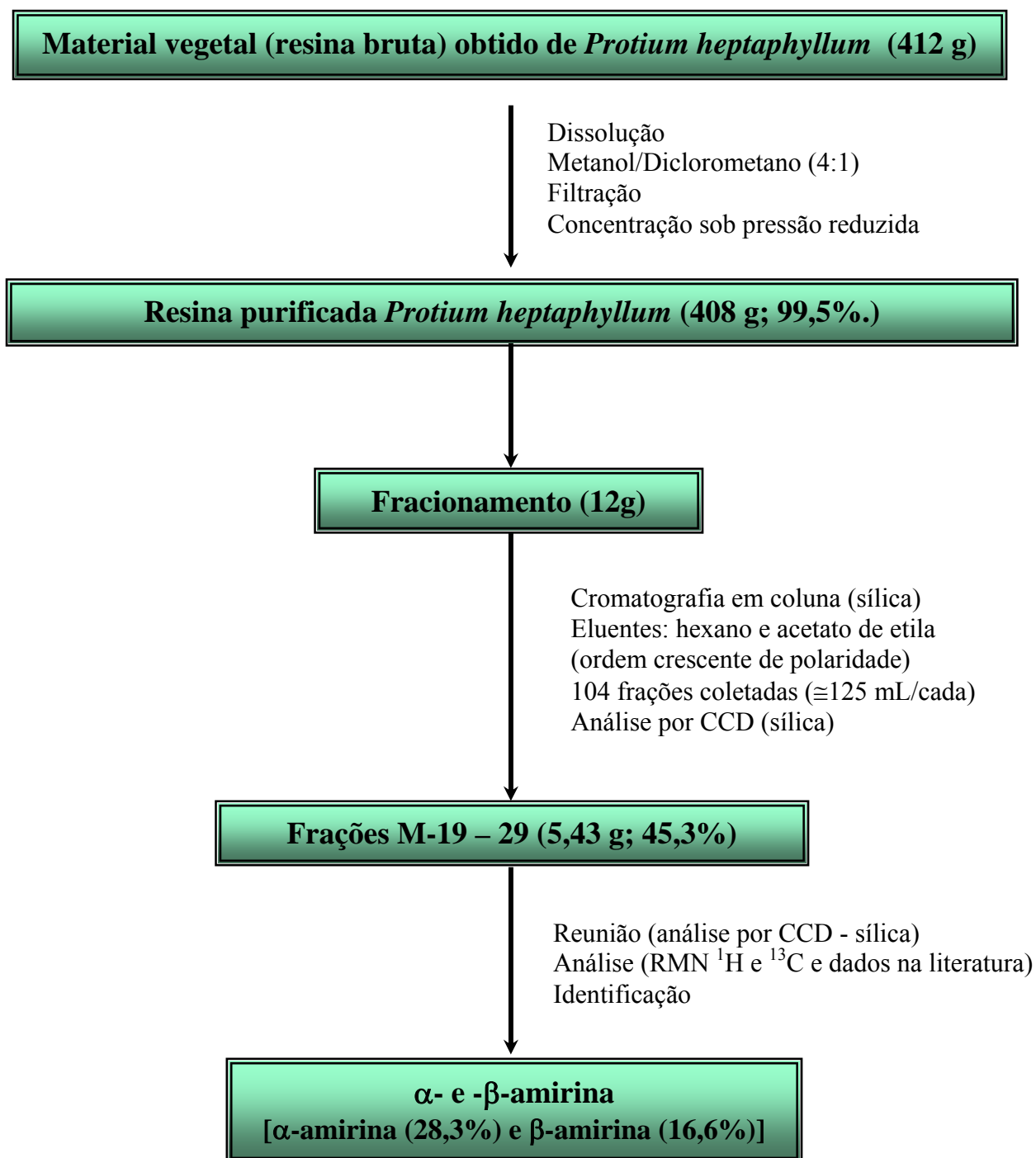


FIGURA 3 – Representação esquemática da obtenção da resina purificada e da mistura de triterpenos α- e β-amirina a partir do material vegetal (resina bruta) de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.

4.2. TOXICIDADE AGUDA

4.2.1. Toxicidade aguda para camundongos

Para a determinação da toxicidade aguda da resina e da mistura de α e β -amirina, camundongos Swiss, 25-30 g, foram divididos em grupos de 5 machos e 5 fêmeas, em jejum de sólidos de 18h e tratados, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina (1, 2, 3, 4 e 5 g/kg, via oral; 1 g/kg, via intraperitoneal) ou mistura de α e β -amirina (1,2 e 3 g/kg, via oral; 1 e 2 g/kg, via intraperitoneal).

Durante o período de 72 h após a administração das drogas os animais foram observados quanto aos parâmetros: estado de alerta, sedação, ptose, dispnéia, micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, nocicepção e morte (MILLER & TAINTER, 1944; LITCHFIELD & WILCOXON, 1949).

4.2.2. Toxicidade aguda para camarão de salmoura (*Artemia* sp)

A avaliação da toxicidade frente a *Artemia* sp segue o método descrito por Meyer et al. (1982). Os ovos de artemia (50 mg) foram colocados para eclodir em um recipiente contendo água marinha (1000 mL) e aerado durante 48 h (colocado um foco de luz após as primeiras 24 h). Após este período, as larvas foram coletadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Várias concentrações da resina de *P. heptaphyllum* (1-3000 µg/ml) e da mistura de α- e β-amirina (1-1000 µg/ml) foram preparadas e colocadas em frascos aos quais adicionou-se água marinha, sendo 5 mL o volume final em cada frasco. Dez larvas foram adicionadas a cada frasco e utilizados três frascos para cada dose da resina, sendo o número de mortes dentre as trinta larvas verificado após 24 h.

A CL₅₀ (concentração letal para 50% das larvas) com intervalo de confiança de 95% foi determinada para a resina de acordo com o método descrito por Miller & Tainter (1944). Controle não tratado, veículo (3% de Tween 80) ou dicromato de potássio (10-100 µg/ml) foram adicionados ao estudo com finalidade de comparação.

4.3. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

Muitos exsudatos resinosos possuem valores medicinais como desifetantes e parasiticidas. A resina de *P. heptaphyllum*, rica em terpenos, é utilizada na medicina popular como analgésica e antiinflamatória. (CORRÊA, 1973; FINNEY & TARKNOY, 1960). Siani et al. (1999), demonstraram a atividade antiinflamatória e antitumoral do óleo essencial obtido das folhas e resina de *P. heptaphyllum*. Assim, como base no exposto, investigou-se a atividade antiinflamatória da resina e de seus principais constituintes, a mistura de triterpenos α- e β- amirina isolados de *P. heptaphyllum* em modelos experimentais de inflamação aguda (edema de pata por carragenina 1%, permeabilidade vascular induzida por ácido acético) e crônica (granuloma por “pellet” de algodão). Estes modelos envolvem fases distintas da inflamação com participação de variados mediadores

inflamatórios e são amplamente utilizados no estudo de drogas com potencial atividade antiinflamatória. Tendo em vista a baixa toxicidade da resina e baseados em estudos preliminares, utilizamos as doses de 200 e 400 mg/kg da resina nos experimentos subsequentes.

4.3.1. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata foi induzido em ratos Wistar, machos, 150-180g, divididos em grupos de 6 animais cada, pela injeção subplantar de 0,1 mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. A pata contralateral recebeu o mesmo volume de salina 0,9%.

Os animais foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) e após 1h receberam a carragenina. Após 3h da administração da carragenina o volume das patas foi registrado em pletismógrafo (Ugo Basile[®]) e o edema expresso com a diferença, em mililitros, entre a pata que recebeu carragenina e a pata contralateral que recebeu salina (WINTER et al., 1962).

4.3.2. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no granuloma induzido por “pellet” de algodão

Ratos Wistar, machos, 150-180 g, foram divididos em grupos de 8 animais cada. O dorso dos animais foi depilado um dia antes do experimento. Os animais foram

anestesiados e feita uma incisão no centro do dorso onde foram implantados subcutâneamente dois “pellets” de algodão esterilizados (50 mg/cada), um de cada lado do dorso (SWINGLE & SHIDEMAN, 1972).

Os animais foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) ou ibuprofeno (300 mg/kg), uma vez ao dia, durante sete dias consecutivos. Ao final do oitavo dia, os animais foram sacrificados, os “pellets” de algodão retirados e determinado o peso úmido e o peso seco após secagem em estufa a 60 °C por 24 horas.

4.3.3. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) ou ácido acetilsalicílico (AAS - 250 mg/kg). Uma hora após os tratamentos os animais receberam uma injeção endovenosa de Azul de Evans (25 mg/kg) e 5 min após, uma injeção intraperitoneal de ácido acético 1% (10 mL/kg).

Após 30 minutos os animais foram sacrificados, as cavidades peritoneais foram abertas e lavadas com água destilada, o fluido peritoneal coletado e colocado em frascos com capacidade para 10 mL previamente preparados com 0,1 mL de solução de NaOH

0,1 N. O volume foi completado para 10 mL e a concentração de Azul de Evans determinada por espectrofotometria em 610 nm (WHITTLE, 1964). A quantidade de corante extravasada para a cavidade peritoneal foi determinada de acordo com uma curva padrão de Azul de Evans.

4.4. ATIVIDADE GASTROPROTERORA

Em geral, triterpenos pentacíclicos possuem atividade antiinflamatória, gastroprotetora, antinociceptiva e antitumoral (FINNEY & TARKNOY, 1960; INOUE et al., 1990; NAVARRETE et al., 2002; FERNANDES et al., 2003). Os modelos utilizados neste estudo (lesões gástricas induzidas por etanol, etanol acidificado, secreção ácida gástrica por piloro ligado e lesões gástricas induzidas por indometacina) são modelos clássicos de avaliação de drogas com atividade citoprotetoras/antiulcerogênicas. Assim, investigou-se a atividade gastroprotetora da resina de *P. heptaphyllum* e de seus principais constituintes, a mistura binária de triterpenos α - e β -amirina.

4.4.1. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* na úlcera gástrica induzida por etanol

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 24 h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina (200 e 400 mg/kg) ou N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg, i.p.).

Uma hora após os tratamentos os animais receberam 0,2 mL de etanol 96% e após 30 minutos foram sacrificados, os estômagos retirados e a área de lesão gástrica

glandular determinada por planimetria e os dados expressos em termos de percentagem (ROBERT et al., 1979). Para a determinação dos grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH) a porção glandular foi processada de acordo com Sedlak & Lindsay (1968).

4.4.2. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* na úlcera gástrica induzida por etanol acidificado

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina (200 e 400 mg/kg) ou N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg, i.p.).

Uma hora após os tratamentos os animais receberam 0,2 mL de uma solução de 0,3M de HCl em etanol 60% e após 1h foram sacrificados, os estômagos retirados e a área de lesão gástrica glandular determinada por planimetria e os dados expressos em termos de percentagem (MIZUI et al., 1987).

4.4.3. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* sobre a secreção gástrica em modelo de ligação do piloro

Ratos, Wistar, machos, 150-180 g, divididos em grupos de 6 animais cada, em jejum de sólidos de 24 h, foram anestesiados e realizada a ligação do piloro (SHAY et al., 1945). Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina (200 e 400 mg/kg) ou

cimetidina (100 mg/kg) foram administradas por via intraduodenal imediatamente após a ligação do piloro em um volume de 2,5 mL/kg.

Após 4h da ligação do piloro, os animais foram sacrificados, a cárdia foi amarrada para evitar uma possível perda do material secretado, e o estômago retirado, lavados externamente com água destilada e secado em papel de filtro. O conteúdo gástrico foi coletado em tubos de ensaio e centrifugados a 1500 rpm por 30 minutos. O volume do sobrenadante foi mensurado em proveta e a acidez total gástrica foi determinada através de titulação com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (REITMAN et al., 1970).

4.4.4. Efeito da da resina de *P. heptaphyllum* sobre as úlcera gástrica induzida por indometacina

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais, em jejum de sólidos de 18 h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina (100 e 200 mg/kg) ou cimetidina (100 mg/kg, v.o.). Após uma hora, os animais foram tratados por via subcutânea com indometacina (20 mg/kg), preparada com 0,5 % de carboximetilcelulose e 8 horas depois, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. De acordo com BHARGAVA (1973), os estômagos foram retirados, instilados com formalina a 5 % por 15 minutos, abertos ao longo da grande curvatura, lavados em salina e inspecionados para atribuições de escores de acordo com SZABO et al. (1985) abaixo descrito, onde n corresponde ao número de úlceras encontradas.

1. Perda de pregas da mucosa.....	1 ponto
2. Descoloração da mucosa.....	1 ponto
3. Edema.....	1 ponto
4. Hemorragias.....	1 ponto
5. Número de petéquias	
- até 10.....	2 pontos
- mais de 10.....	3 pontos
6. Intensidade da ulceração	
- úlceras ou erosão de até 1mm.....	n x 2 pontos
- úlceras ou erosão maiores que 1mm.....	n x 3 pontos
- úlceras perfuradas.....	n x 4 pontos

4.4.5. Efeito da mistura de α - e β -amirina na úlcera gástrica induzida por etanol: papel dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina

Sabendo-se que os neurônios aferentes sensíveis à capsaicina participam no mecanismo de defesa da mucosa gástrica (HOLZER & LIPPE, 1988), verificamos um possível papel destas fibras sensoriais na gastroproteção exercida pelos triterpenos α - e β -amirina.

Para tanto, camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18 h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100, 300 e 600 mg/kg) ou capsaicina (2,5, 5, 15 e 20 mg/kg). Uma hora após os tratamentos os animais receberam 0,2 mL de etanol 96% e após 30 min foram sacrificados, os estômagos retirados

e a área de lesão gástrica glandular determinada por planimetria e os dados expressos como percentagem (ROBERT et al., 1979).

A participação dos neurônios aferentes sensíveis à capsacina no efeito gastroprotetor das amirina (100 mg/kg, via oral) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol foi investigado em camundongos dessensibilizados com capsaicina. Para isso, Camundongos machos, 25-30 g, foram anestesiados com pentobarbital sódico e tratados com capsacina, duas injeções de 25 mg/kg por via intraperitoneal, por três dias consecutivos (MATSUDA & YOSHIKAWA, 1999).

Para prevenir alguma dificuldade respiratória associada ao tratamento com capsaicina, os animais foram pré-tratados com aminofilina (10 mg/kg, i.m.) antes da administração de capsacina. Após oito dias, a depleção pela capsacina foi avaliada pela instilação ocular de uma solução de capsacina 10 µg/mL, a ausência de reflexo ocular foi considerada como dessensibilização dos neurônios sensoriais aferentes.

Animais dessensibilizados e animais normais, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) ou mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg). Uma hora após os tratamentos os animais receberam 0,2 mL de etanol 96% e após 30 min foram sacrificados, os estômagos retirados e a área de lesão gástrica glandular determinada por planimetria.

4.5. ATIVIDADE ANTIPRURIGINOSA

A literatura mostra que os receptores vanilóides (TRPV1), expressos nas fibras sensoriais aferentes cutâneas, modulam a nocicepção e inflamação neurogênica (STANDER et al., 2004). Dessa forma, investigou-se a atividade da mistura de α - e β -amirina em modelos de prurido experimentais induzidos por dextrana T40 e pelo Composto 48/80, avaliando ainda a participação do sistema opióide, assim como, a ação dos triterpenos sobre a degranulação de mastócitos *ex vivo* induzido pelo composto 48/80.

4.5.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) ou ciproptadina (10 mg/kg).

Duas horas após os tratamentos os animais foram colocados para ambientação no local de observação por 30 min, após este período receberam uma injeção subcutânea (50 μ l), na região dorsal da cabeça, de Dextrana T40 (75 mg/kg). Os animais controle receberam o mesmo volume de salina 0,9%. O prurido foi observado durante 20 min, sendo registrado o prurido em todas as parte do corpo (KURAISHI et al., 1995).

4.5.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por composto 48/80

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18 h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) ou ciproheptadina (10 mg/kg).

Duas horas após os tratamentos os animais foram colocados para ambientação no local de observação por 30 min, após este período receberam uma injeção subcutânea (50 μ l), na região dorsal da cabeça, de composto 48/80 (3 mg/kg). Os animais controle receberam o mesmo volume de salina 0,9%. O prurido foi observado durante 20 min, sendo registrado o prurido no nariz com as patas dianteiras e traseiras e o prurido no local de injeção com as patas traseiras (KURAIISHI et al., 1995).

4.5.3. Efeito da naloxona (antagonista de receptores opióides) sobre a atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina ou morfina no prurido induzido por composto 48/80

Para avaliar a participação do sistema opióide na atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina, camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, v.o.) e mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg, v.o.) 2 horas antes e,

naloxona (2 mg/kg, i.p.) ou morfina (7,5 mg/kg, s.c.) 30 minutos antes da administração subcutânea (50 µl), na região dorsal da cabeça, de composto 48/80 (3 mg/kg).

Os animais controle receberam o mesmo volume de salina 0,9%. O prurido foi observado durante 20 min, sendo registrado o prurido no nariz com as patas dianteiras e traseiras e o prurido no local de injeção com as patas traseiras (KURAIISHI et al., 1995).

4.5.4. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a degranulação de mastócitos *ex vivo*

Ratos Wistar, machos, 150-180 g, em jejum de sólidos de 18 h, divididos em grupos de 4 animais cada, foram tratados com salina 0,9% (0,1 mL/10 g, v.o.), veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, v.o.), mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg, v.o.) ou cetotifeno (1 mg/kg, v.o.).

Após 2 h, os animais foram sacrificados, os mesentérios retirados e colocados em tubos de ensaio contendo solução de Ringer (10 mL). A degranulação dos mastócitos foi induzida pela incubação dos mesentérios, dos respectivos grupos, com Composto 48/80 (concentração final de 0,4 µg/mL). O mesmo volume de água destilada foi adicionado aos tubos de ensaio contendo o mesentério de animais que receberam somente salina.

Após 30 minutos de incubação, os mesentérios foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina 0,1% para a observação dos mastócitos degranulados em microscopia ótica. A contagem dos mastócitos íntegros e degranulados

foi realizada em cinco campos de cada lâmina e o resultado expresso como a percentagem de mastócitos degranulados (NORTON, 1954).

Com o intuito de corroborar com os resultados obtidos na investigação antipruriginosa das amirinas, avaliou-se os efeitos da mistura dos triterpenos em modelos de edema de pata induzido por conhecidos agentes degranuladores de mastócitos: dextrana T40 e Composto 48/80, além de histamina e serotonina

4.5.5. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por dextrana T40

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) ou ciproheptadina (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos os animais receberam uma injeção subplantar (50 μ l) de dextrana 150 mg/kg e o mesmo volume de salina na pata contralateral.

Após 2h os animais foram sacrificados, as patas cortadas e pesadas e o edema expresso, em miligramas, pela diferença de peso entre a pata que recebeu dextrana e a pata contralateral que recebeu salina (WINTER et al., 1962).

4.5.6. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por composto 48/80

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18 h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) ou ciproeptadina (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos os animais receberam uma injeção subplantar (50 μ l) de composto 48/80 (10 mg/kg) e o mesmo volume de salina na pata contralateral.

Após 2h os animais foram sacrificados, as patas cortadas e pesadas e o edema expresso em miligramas, pela diferença de peso entre a pata que recebeu Composto 48/80 e a pata contralateral que recebeu salina (WINTER et al., 1962).

4.5.7. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por histamina

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) ou ciproeptadina (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos os animais receberam uma injeção subplantar (50 μ l) de histamina 10 mg/kg e o mesmo volume de salina na pata contralateral.

Após 2 h os animais foram sacrificados, as patas cortadas e pesadas, sendo o edema expresso em miligramas, pela diferença de peso entre a pata que recebeu histamina e a pata contralateral que recebeu salina (WINTER et al., 1962).

4.5.8. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por serotonina

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) ou ciproheptadina (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos os animais receberam uma injeção subplantar (50 μ l) de serotonina 10 mg/kg e o mesmo volume de salina na pata contralateral.

Após 2h os animais foram sacrificados, as patas cortadas e pesadas, sendo o edema expresso em miligramas, pela diferença de peso entre a pata que recebeu serotonina e a pata contralateral que recebeu salina (WINTER et al., 1962).

4.6. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Sabe-se que a capsaicina quando aplicada topicamente ou injetada na pele humana ou de animais experimentais, estimula o receptor TRPV1 localizado nas Fibras C iniciando uma cascata de eventos incluindo excitação neuronal e liberação de mediadores pró-inflamatórios. A ativação destes neurônios sensoriais pela capsaicina produz dor em queimação, seguido por estado refretário, analgésico, quando de um subsequente estímulo nociceptivo (SAADÉ et al., 2002; SZALLASI & BLUMBERG, 1999). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar uma possível modulação das amirinas na dor aguda e na nocicepção visceral induzida por capsaicina.

4.6.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela capsaicina

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram colocados para ambientação no local de observação por 30 min. Após este período, os animais foram tratados com veículo da capsaicina (80% de PBS + 10% de Tween 80 + 10% de Etanol absoluto, v.o.), veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, v.o.), mistura de α - e β -amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) 60 min antes da administração subplantar (20 μ l) de capsaicina (1,6 μ g). O prurido (tempo de lambadura) na pata injetada com capsaicina foi observado durante 5 min (SANTOS & CALIXTO, 1997).

Para avaliar a participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da mistura de α - e β -amirina, naloxona (2 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes do tratamento com morfina (5 mg/kg) ou α - e β -amirina (10 mg/kg).

Em um outro grupo de experimento, camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados durante três dias consecutivos com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, v.o.), mistura de α - e β -amirina (10 mg/kg, v.o.), vermelho de rutênio (1,5 mg/kg, s.c.) ou a combinação de vermelho de rutênio (1,5 mg/kg, s.c.) e a mistura de α - e β -amirina (10 mg/kg, v.o.). Após 1h do último tratamento, foi administrado por subplantar 20 μ l de capsaicina (1,6 μ g) e o prurido na pata foi observado durante 5 min.

4.6.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela administração intracolônica de capsaicina (nocicepção visceral)

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram colocados para ambientação no local de observação por 30 min. Após este período, os animais foram tratados com veículo da capsaicina (80% de PBS + 10% de Tween 80 + 10% de Etanol absoluto, v.o.), veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, v.o.), mistura de α - e β -amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), clonidina (0,1 mg/kg, v.o.) ou ioimbina (2 mg/kg, s.c.).

Após 60 min, foi administrado por via intracolônica, 50 μ L de capsacina (149 μ g) em cada animal, utilizando-se uma cânula (1,6 mm), a uma distância de 4 cm do ânus, após aplicação de vaselina na região perianal para evitar evitar a estimulação de áreas somáticas pelo contato com a capsaicina. Um grupo de animais recebeu somente veículo intracolônico foi incluído no estudo.

Imediatamente após a administração da capsacina foi registrado, por um período de 30 minutos, o número de comportamento relacionado a nocicepção por capsacina que são: lambertura abdominal, contorção abdominal, arrastar o abdômen contra o solo e retração abdominal (KAWAO et al., 2004).

4.6.3. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a resposta térmica induzida por capsaicina

A capsaicina quando administrada em animais experimentais por via subcutânea, nas doses variando de 1-10 mg/kg, induz, de forma dose dependente, queda da temperatura corporal que persiste por um período de 2 a 5 horas (SZIKSZAY et al., 1982). Dessa forma, analisamos se a mistura dos triterpenos e o vermelho de rutênio, um antagonista não competitivo dos receptores TRPV1, poderiam antagonizar a resposta hipotérmica induzida pela injeção subcutânea da capsaicina em camundongos.

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, v.o.), mistura de α - e β -amirina (10 e 100 mg/kg, v.o.) ou vermelho de rutênio (1,5 mg/kg, s.c.) duas vezes ao dia durante três dias, 60 min antes da administração subcutânea de capsacina (10 mg/kg).

A temperatura retal (°C) dos animais foi medida antes e 30, 60, 90, 120, 150 min, como também 24 e 48h após a injeção de capsaicina, utilizando-se um termômetro digital clínico (Becton Dickinson®) inserido a 2 cm do reto (SZIKSZAY et al., 1982).

4.7. ATIVIDADE HEPATOPROTETORA

O paracetamol (acetaminofeno) é um fármaco mundialmente utilizado como analgésico e antipirético. O seu uso em sobredoses (suicídio ou acidental) ou por indivíduos com doenças hepáticas (ex. usuários crônicos de álcool) pode levar à hepatite

fulminante (PRESCOTT, 2000; GYAMLANI & PARIKH, 2002). A hepatotoxicidade é resultado da formação de um metabólito tóxico, n-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI), pelo sistema do citocromo P4502E1 hepático, que promove depleção da glutathione e alteração na homeostase do cálcio (LEE et al., 1996; CHEN et al., 1999; HOLOWNIA & BRASZKO, 2004).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), é uma citocina secretada por macrófagos que apresenta um amplo espectro de efeitos fisiopatológicos. Esta citocina participa não apenas na imunidade celular e humoral, mas também em muitas patologias tais como choque séptico, nas doenças inflamatórias intestinais e nas hepatites causadas por vírus, álcool, agentes químicos, doenças autoimunes, e nas lesões hepáticas experimentais induzidas por GalN/LPS, modelo que frequentemente tem sido utilizado na avaliação de drogas com atividade hepatoprotetora (KIMIO et al., 2002; SONG et al, 2005.).

Ensaio *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos demonstram a ação hepatoprotetora de vários triterpenos como ácido oleanólico, ácido ursólico, hederina (LIU et al., 1994). Nossos estudos demonstraram a atividade gastroprotetora e antipruriginosa da mistura de α - and β -amirina (OLIVEIRA et al., 2004a; OLIVEIRA et al., 2004b). Estes achados levaram-nos a investigar o possível efeito da mistura de α - e β -amirina na prevenção da hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno e no modelo de hepatotoxicidade inflamatória, induzido por Galactosamina/Lipopolissacarídeo (GalN/LPS).

4.7.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em camundongos

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em 5 grupos de vinte animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados via intraperitoneal, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg) ou N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg) 48, 24 e 2h antes, com exceção da N-acetilcisteína que foi administrada apenas 2 horas antes, da administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). Animais que receberam apenas salina 0,9% foram incluídos no estudo como controle normal (JANBAZ & GILANI, 2000).

Após o período de 24 horas depois da administração do acetaminofeno, amostras de sangue, de todos os animais, foram obtidas através do plexo orbital, sob leve anestesia com éter, em tubos de coleta de soro com gel separador (Vacuette[®]) para determinação dos níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest[®]) e um analisador bioquímico semi-automático (Bayer[®], modelo RA-XT). Os animais foram então sacrificados e o tecido hepático coletado, pesado e processado para a dosagem de grupos sulfidrilas não protéicos hepáticos - NP-SH (Sedlack & Lindsay, 1968).

4.7.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos.

Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de sólidos de 18h, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água

destilada – 0,1 mL/10g, v.o.), mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg) ou Dexametasona (DEX – 2 mg/kg, i.p.) 48, 24 e 2 horas antes, com exceção da dexametasona que foi administrada apenas 2 horas antes, da administração intraperitoneal de uma solução de D-galactosamina (GalaN - 800 mg/kg) e Lipopolissacarídeo (LPS - 7,5 μ g/kg), que foram dissolvidos em solução salina normal e administrados conjuntamente (GalN/LPS). Os animais que receberam apenas veículo foram incluídos no estudo como controle normal (MORIKAWA et al., 2002).

Após duas horas da administração de GalN/LPS, amostras de sangue, de todos os animais, foram obtidas através do plexo orbital, sob leve anestesia com éter, em tubos de coleta de soro com gel separador (Vacuette[®]), para determinação dos níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest[®]) e um analisador bioquímico semi-automático (Bayer[®], modelo RA-XT).

Seis horas após a administração de GalN/LPS, os animais foram sacrificados, o tecido hepático coletado, pesado e processado para a dosagem grupos sulfidrila não protéicos hepáticos - NP-SH (SEDLACK & LINDSAY, 1968).

4.7.3. Avaliação histopatológica

Para avaliação das alterações teciduais microscópicas dos fígados, foram realizados cortes histológicos de todos os grupos. O órgão foi fixado em formalina neutra

10%, incluído em parafina, realizadas secções em micrótomo e corado com hematoxilina-eosina. As alterações histopatológicas foram examinadas em microscópio óptico e atribuídos escores numa escala de 0 a 5 para presença e intensidade das lesões de acordo com Silva *et al.*, 2001, onde:

0 = nenhuma lesão;

1 = mínimo de lesões envolvendo poucas células necróticas;

2 = lesões suaves com 10-25% de células necróticas ou suaves mudanças degenerativas;

3 = lesões moderadas com 25-40% de células necróticas ou degenerativas;

4 = lesões marcadas com 40-50% de células necróticas ou degenerativas;

5 = lesões severas com mais de 50% de células necróticas ou degenerativas.

4.8. AVALIAÇÃO DA MISTURA DE α - E β -AMIRINA NOS TESTES DE ROTA-ROD, CAMPO ABERTO E TEMPO DE SONO

Drogas que diminuem atividade motora ou induz sedação podem fornecer resultados falso-positivo ou falso/negativo em testes de nocicepção. Dessa forma, avaliamos os efeitos da mistura de α - e β -amirina, no testes do “rota-rod”, campo aberto e tempo de sono induzido por pentobarbital sódico. Este último modelo, também foi utilizado com o objetivo de se verificar uma possível influência das α - e β -amirinas, sobre o sistema enzimático do citocromo-P450.

4.8.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a coordenação motora de camundongos

Camundongos Swiss, machos, 25-30g, em jejum de sólidos de 18h, foram pré-selecionados pela colocação em um aparelho de “rota-rod” de 5 cm de diâmetro, realizando 4 rotações por minuto (rpm). Os animais que permaneceram no aparelho dentro de 120 segundos foram selecionados, divididos em grupos de 8 animais cada, e tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) ou mistura de α - e β -amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg).

Após 1h da administração das drogas, os animais foram recolocados no “rota rod” e registrado o tempo, em segundos, que o animal permaneceu no aparelho sendo 2 min o tempo máximo de permanência (ROSLAND et al, 1990).

4.8.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a atividade exploratória

A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto, quadrangular, com 30 cm de diâmetro, sendo sua base (local onde ocorre à movimentação dos animais) dividida em 9 quadrados de diâmetros iguais. Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, em jejum de sólidos de 18h, divididos em grupos de 8 animais cada, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, v.o.) ou mistura de α - e β -amirina (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.).

Após 45 min da administração das drogas, os animais foram levados individualmente ao campo aberto e observados durante um período de 4 minutos, com 1 min de adaptação, quanto a frequência de locomoção, baseado no modelo descrito por Archer (1973); Capaz et al. (1981).

4.8.3. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital sódico

A atividade hipno-sedativa dos animais foi verificada no modelo de sono induzido por pentobarbital (DANDIYA & COLLUMBINE, 1959). Camundongos Swiss, machos, 25-30 g, em jejum de sólidos de 18h, divididos em grupos de 10 animais cada, foram tratados via oral com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%) ou mistura de α - e β -amirina nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, 1 h antes, e nas doses de 50 e 100 mg/kg, no período de 48, 24 e 2 h antes da administração intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg).

Iniciado o período de sono, em seus respectivos grupos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em local de adequada observação. Os animais foram observados quanto ao tempo total de sono. O período total de observação foi de no máximo 120 min.

4.9. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre os grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH)

A quantificação dos grupos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) foi realizada segundo o método de Sedlack & Lindsay (1968). A porção glandular do estômago ou fígado foram removidos, pesados e homogeneizados com EDTA 0,02 M gelado, para preparar um homogenato a 10%. Uma alíquota de 4 mL de cada amostra foi retirada e adicionado 3,2 mL de água destilada e 0,8 mL de ácido tricloroacético - TCA 50% em solução aquosa.

Os tubos de ensaio contendo a mistura foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Um volume de 2 mL foi retirado do sobrenadante e adicionado 4 mL de Tris 0,4M, pH 8,9 e 0,1 mL de DTNB 0,01M. A absorbância foi medida dentro de 5 minutos a 412 nm. A concentração de NP-SH foi calculada através de uma curva de calibração de glutathiona reduzida (GSH) e os resultados expressos em μg de NP-SH/g de tecido.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores experimentais obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação entre as médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos estabelecida pelos testes de Student Newman Keul, para dados paramétricos, e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnett, para dados não paramétricos (scores das lesões hepáticas induzidas por acetaminofeno e GalN/LPS e lesões gástricas induzidas por indometacina). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. TOXICIDADE AGUDA

5.1.1. Toxicidade aguda para camundongos

A resina na dose de até 5 g/kg, via oral e de 1 g/kg, via intraperitoneal, e a mistura de α - e β -amirina na dose de até 3 g/kg, via oral e de até 2 g/kg, via intraperitoneal, não demonstraram nenhum sinal de toxicidade evidente e não provocaram morte dos animais.

5.1.2. Toxicidade aguda para *Artemia* sp

Através da utilização do método dos probitos determinou-se a CL_{50} (concentração letal para 50% das larvas) da resina de *P. heptaphyllum* que foi de $400 \pm 27,85 \mu\text{g/mL}$, vinte vezes menos tóxico do que o dicromato de potássio, conhecida substância tóxica para a *Artemia* sp que possui CL_{50} entre 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto que a mistura de α - e β -amirina exibiu a CL_{50} de $42,54 \pm 19,96 \mu\text{g/mL}$, sendo este resultado similar ao dicromato de potássio.

5.2. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

5.2.1. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no edema de pata induzido por carragenina

Os animais tratados com a resina de *P. heptaphyllum* nas doses de 200 e 400 mg/kg não foram capazes de reduzir o volume do edema da pata ($0,663 \pm 0,062$ e $0,510 \pm 0,052$ mL, respectivamente) induzido pela carragenina 1% quando comparado ao controle veículo ($0,625 \pm 0,030$). Indometacina (10 mg/kg), conhecida droga antiinflamatória, reduziu significativamente ($p < 0,01$) o peso da pata induzido pela administração de carragenina ($0,392 \pm 0,053$ ml) (**Tabela 2 e Figura 4**).

Tabela 2. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no edema de pata induzido por carragenina em ratos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Edema de Pata (mL)
Controle (veículo)	---	0,625 ± 0,030
Resina	200	0,663 ± 0,062
	400	0,510 ± 0,052
Indometacina	10	0,392 ± 0,053 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) do peso das patas (mg) para 6 animais após 3 horas da administração de carragenina. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da injeção subplantar de carragenina 1% (0,1 mL/pata). Após 3 horas o volume do edema (mL) da pata foi registrado em pletismógrafo. ^ap<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

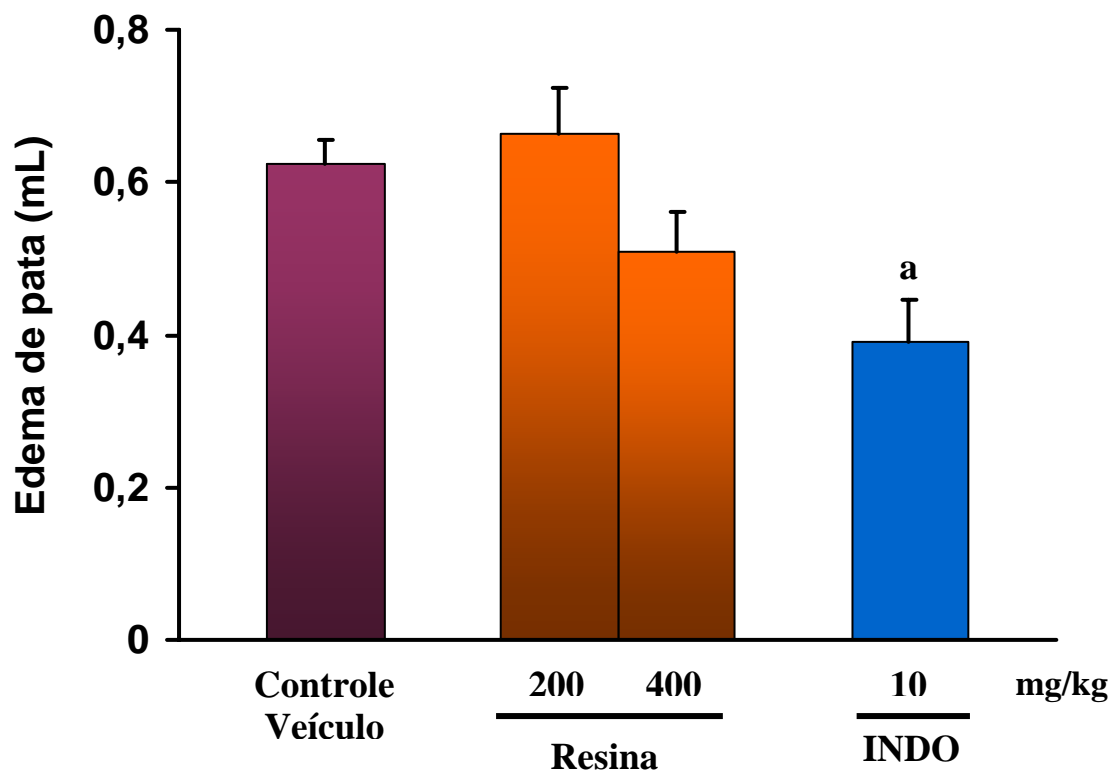


FIGURA 4. Efeito da administração oral da resina de *P. heptaphillum* no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphillum* (200 e 400 mg/kg, v.o.) e indometacina (INDO - 10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1 hora antes da injeção subplantar de carragenina 1% (0,1 mL/pata). Após 3 horas o volume do edema (mL) da pata foi registrado em pletismógrafo. ^ap<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.2.2. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no granuloma induzido por “pellet” de algodão

Após sete dias da implantação dos “pellets” a média de peso dos granulomas formados foi de $0,714 \pm 0,04$ mg (peso úmido) e $0,171 \pm 0,007$ mg (peso seco) para o grupo controle veículo. A resina nas doses de 200 e 400 mg/kg e ibuprofeno (300 mg/kg) inibiram de modo significativo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) o desenvolvimento do granuloma induzido por “pellet” de algodão. Em ambas as doses (200 e 400 mg/kg) a resina reduziu somente o peso seco ($0,148 \pm 0,006$ e $0,147 \pm 0,004$ mg, respectivamente) enquanto o ibuprofeno, fármaco antiinflamatório, reduziu o peso úmido ($0,585 \pm 0,04$ mg) e o peso seco ($0,106 \pm 0,008$ mg) dos granulomas (**Tabela 3 e Figura 5**).

Tabela 3. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no granuloma induzido por “pellet” de algodão em ratos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Peso dos Granulomas (mg)	
		Peso Úmido	Peso Seco
Controle (veículo)	---	0,714 ± 0,04	0,171 ± 0,007
Resina	200	0,704 ± 0,03	0,148 ± 0,006 ^a
	400	0,635 ± 0,02	0,147 ± 0,004 ^a
Ibuprofeno	300	0,585 ± 0,04 ^a	0,106 ± 0,008 ^b

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) do peso (mg) dos “pellets” de algodão para 8 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) e ibuprofeno (300 mg/kg) foram administrados por via oral durante todo o período do experimento (7 dias). O peso dos granulomas foi verificado imediatamente após a remoção e o peso seco após 24 horas de secagem em estufa a 60 °C. ^ap<0,05; ^bp<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

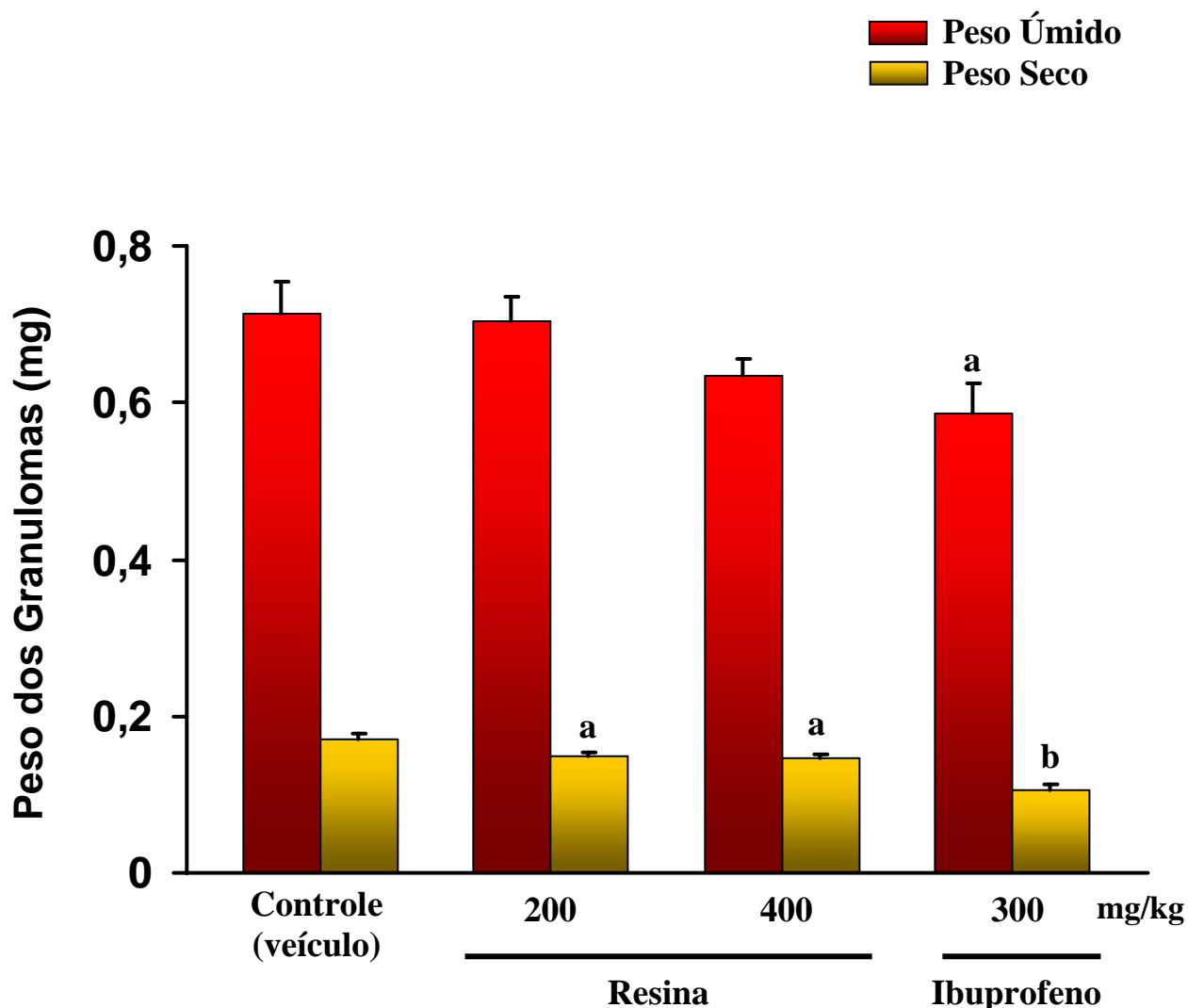


FIGURA 5. Efeito da administração oral da resina de *P. heptaphyllum* no granuloma induzido por “pellet” de algodão em ratos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg, v.o.) e Ibuprofeno (300 mg/kg, v.o.) foram administrados diariamente, uma vez ao dia, durante 7 dias após a implatação de “pellets” de algodão no dorso dos animais. O peso úmido dos granulomas foi verificado imediatamente após a remoção e o peso seco após 24 horas de secagem em estufa a 60 °C. ^ap<0,05; ^bp<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.2.3. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no aumento de permeabilidade vascular induzido por ácido acético

Os animais tratados com a resina na dose de 400 mg/kg e o ácido acetilsalicílico (250 mg/kg), fármaco antiinflamatório padrão, apresentaram extravasamento do corante da ordem de $2,57 \pm 0,30$ e $1,06 \pm 0,52$ μg de Azul de Evans, respectivamente, quando comparados ao grupo que recebeu apenas ácido acético ($5,34 \pm 0,17$ μg de Azul de Evans). A resina (400 mg/kg) apresentou atividade semelhante ao ácido acetil salicílico tendo em vista que ofereceu inibição de 52 e 80% respectivamente, sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético (**Tabela 4 e Figura 6**).

Tabela 4. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no aumento de permeabilidade vascular induzido por ácido acético em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Concentração de Azul de Evans (µg)
Controle normal	---	0,81 ± 0,07
Controle ácido acético	---	5,34 ± 0,17 ^a
Resina	200	5,39 ± 0,52 ^a
	400	2,57 ± 0,30 ^{ab}
AAS	250	1,06 ± 0,52 ^{ab}

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da concentração de Azul de Evans (µg) no lavado peritoneal 20 min após a administração intraperitoneal de ácido acético 0,6% (10 mL/kg) para 8 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* e Ácido Acetilsalicílico (AAS - 250 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da injeção de ácido acético 0,6%. ^ap<0,01 vs controle veículo; ^bp<0,01 vs controle ácido acético (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

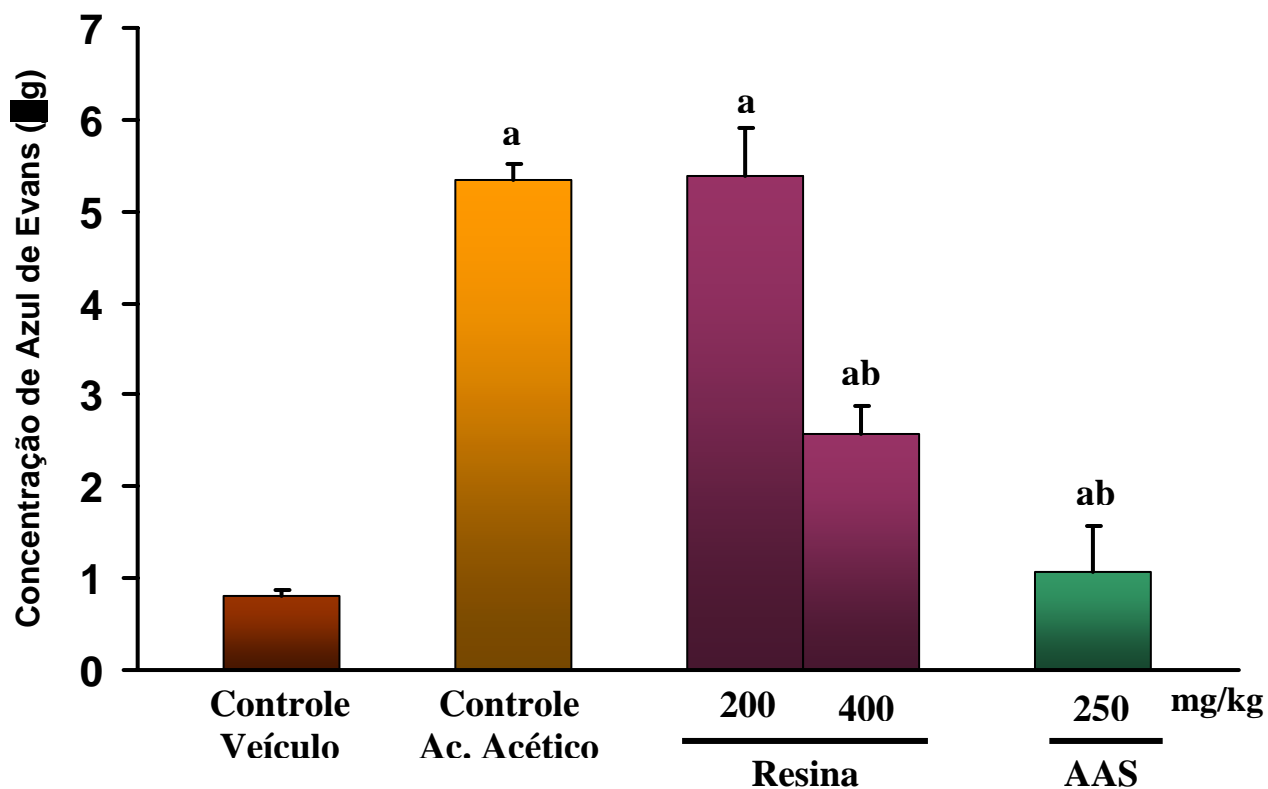


FIGURA 6. Efeito da administração oral da resina de *P. heptaphyllum* sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg, v.o.) e Ácido Acetilsalicílico (AAS - 250 mg/kg, v.o.) foram administrados, 1 hora antes da injeção de ácido acético 0,6%. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da concentração de Azul de Evans (μg) no lavado peritoneal para 8 animais. ^a $p < 0,01$ vs controle veículo; ^b $p < 0,01$ vs controle ácido acético (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.3. ATIVIDADE GASTROPROTERORA

5.3.1. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* na úlcera gástrica induzida por etanol

Os efeitos da resina e N-acetilcisteína sobre as lesões gástricas induzidas por etanol estão demonstrados na **Tabela 5** e **Figura 7**.

Os animais que receberam apenas veículo mostraram extensa área de lesão da mucosa gástrica (mm^2) na forma de erosões hemorrágicas. A resina, nas doses de 200 e 400 mg/kg, reduziu significativamente ($p < 0,001$) a lesão gástrica de maneira dose dependente ($7,38 \pm 0,61$ e $2,50 \pm 0,26 \text{ mm}^2$, respectivamente) quando comparada ao controle ($23,15 \pm 1,82 \text{ mm}^2$) correspondendo a uma inibição de 68 e 89%. A N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg), fármaco de referência, diminuiu de forma significativa ($p < 0,001$) as lesões gástricas ($11,78 \pm 1,59 \text{ mm}^2$), quando comparada ao controle em 49%.

Os animais que receberam etanol mostraram significativa redução ($p < 0,05$) nos níveis de NP-SH ($152,0 \pm 14,1 \text{ } \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao controle normal. A resina, nas doses de 200 e 400 mg/kg, não foi capaz de impedir a depleção dos grupos sulfidrilas produzida pelo etanol ($176,5 \pm 6,6$ e $148,9 \pm 11,3 \text{ } \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente). A N-acetilcisteína (750 mg/kg) inibiu significativamente ($p < 0,05$) a depleção dos grupos sulfidrilas ($306,2 \pm 16,6 \text{ } \mu\text{g/g}$ de tecido) produzida pelo etanol (**Tabela 6** e **Figura 8**).

Tabela 5. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Área de lesão gástrica (mm²)
Controle (veículo)	---	23,15 ± 1,82
Resina	200	7,38 ± 0,61 ^a
	400	2,50 ± 0,26 ^a
NAC	750	11,78 ± 1,59 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) e resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) foram administrados por via oral e N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg) por via intraperitoneal, 1 hora antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. ^ap<0,001 vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

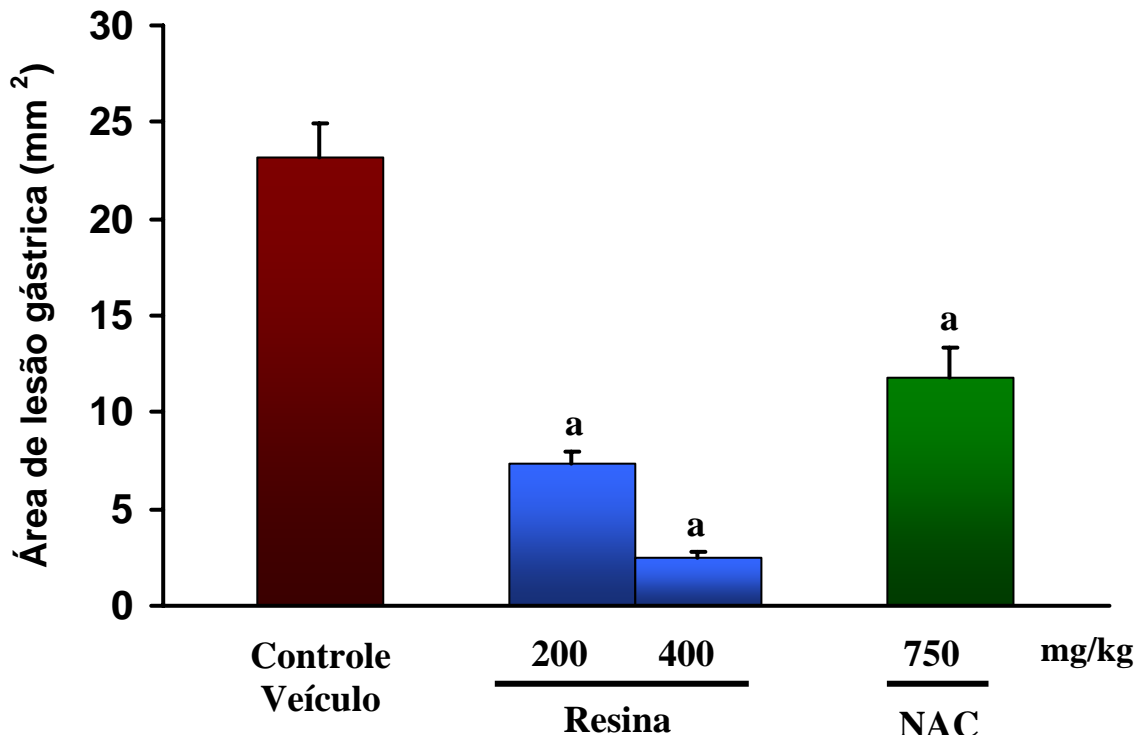


FIGURA 7. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* e N-acetilcisteína (NAC) nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80, v.o.), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg, v.o.) e NAC (750 mg/kg, i.p.) 1 hora antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL). ^a $p < 0,001$ vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 6. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* sobre os níveis de grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH ($\mu\text{g/g}$ tecido)
Controle (veículo)	---	332,8 \pm 25,0
Controle (etanol)	---	152,0 \pm 14,1 ^a
Resina	200	176,5 \pm 6,6 ^a
	400	148,9 \pm 11,3 ^a
NAC	750	306,2 \pm 16,6 ^b

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis gástricos de glutathiona (NP-SH) de 8 animais. Os níveis foram analisados 30 minutos após a administração oral de etanol. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) e resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) foram administrados por via oral e N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg) por via intraperitoneal, 1 hora antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL). ^ap<0,05 vs controle veículo; ^bp<0,05 vs controle etanol (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

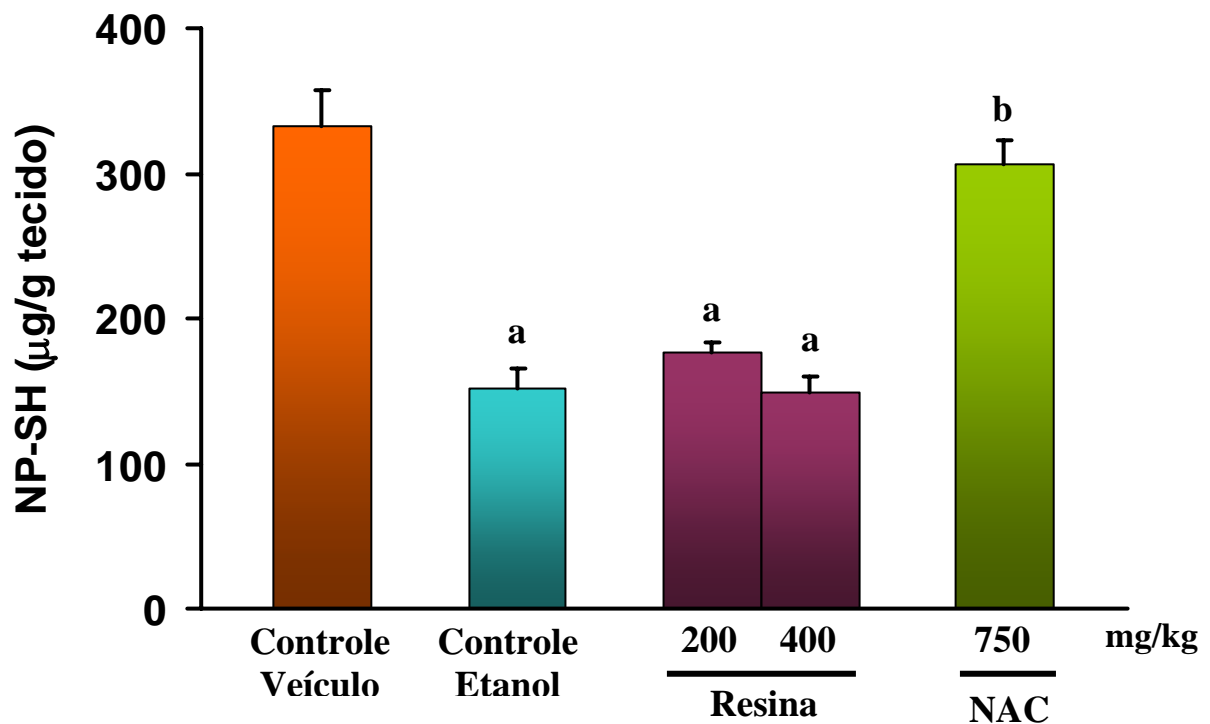


FIGURA 8. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrilas não protéicos nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Os níveis de glutathiona foram analisados 30 minutos após a administração oral de etanol. Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80, v.o.), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg, v.o.) e NAC (750 mg/kg, i.p.) 1 hora antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL). ^a $p < 0,05$ vs controle veículo; ^b $p < 0,05$ vs controle etanol (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.3.2. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* na úlcera gástrica induzida por etanol acidificado

Os efeitos da resina e N-acetilcisteína sobre as lesões gástricas induzidas por etanol/HCl (0,3 M HCl/60% etanol) estão demonstrados na **Tabela 7** e **Figura 9**.

Os animais que receberam apenas veículo mostraram extensa área de lesão da mucosa gástrica (mm^2) na forma de erosões hemorrágicas. A resina, nas doses de 200 e 400 mg/kg, reduziu significativamente ($p < 0,01$) a injúria gástrica de maneira dose dependente ($8,91 \pm 0,96$ e $6,53 \pm 1,15 \text{ mm}^2$, respectivamente) correspondendo a uma inibição de 45 e 66%. A N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg), diminuiu de forma significativa ($p < 0,001$) as lesões gástricas ($4,89 \pm 0,05 \text{ mm}^2$) quando comparada ao controle em 69%

Tabela 7. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol acidificado (0,3M HCl/60% etanol) em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Área de lesão gástrica (mm²)
Controle normal	---	16,14 ± 1,95
Resina	200	8,91 ± 0,96 ^a
	400	6,53 ± 1,15 ^a
NAC	750	4,89 ± 0,05 ^b

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) e resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) foram administrados por via oral e N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg) por via intraperitoneal, 1 hora antes da administração de uma solução de 0,3M de HCl em etanol 60% (0,2 mL). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. ^ap<0,01; ^bp<0,001 vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

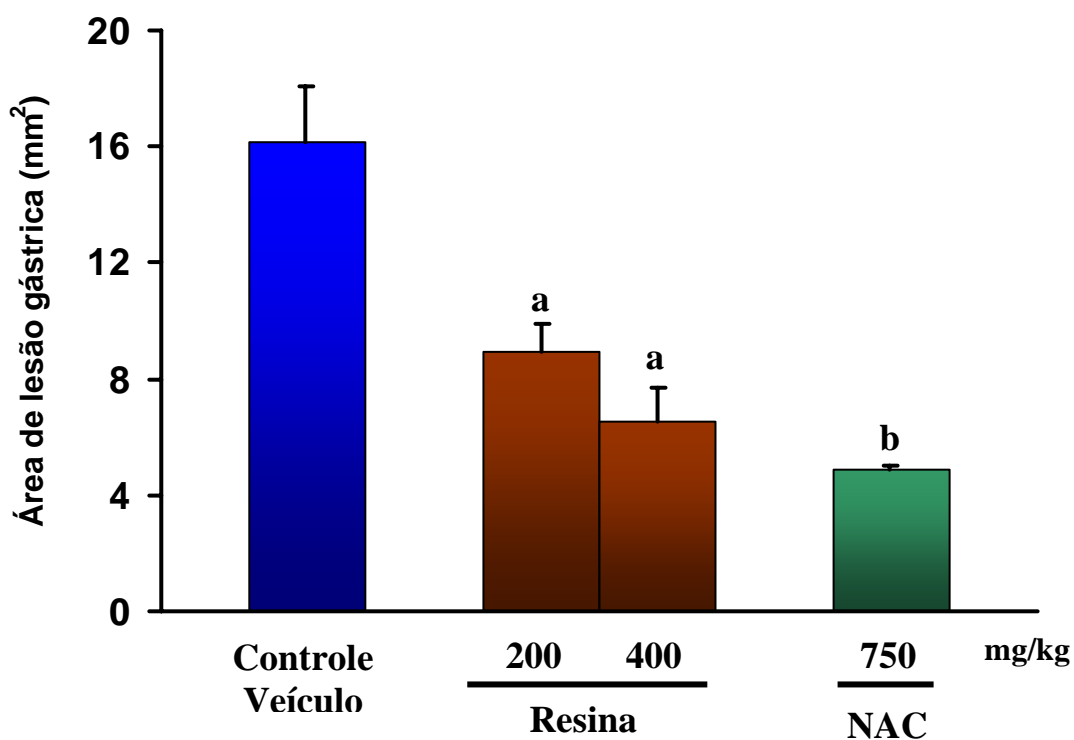


FIGURA 9. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* e N-acetilcisteína (NAC) nas lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.

Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80, v.o.), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg, v.o.) e NAC (750 mg/kg, i.p.) 1 hora antes da administração de uma solução de 0,3M de HCl em etanol 60% (0,2 mL). ^ap<0,01; ^bp<0,001 vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.3.3. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* sobre a secreção gástrica em modelo de ligação do piloro

Em ratos com piloro ligado, por 4 h, a administração intraduodenal da resina, nas doses de 200 e 400 mg/kg ou cimetidina (100 mg/kg), não promoveu alteração significativa no volume secretório gástrico ($2,63 \pm 0,23$; $2,48 \pm 0,38$ e $2,82 \pm 0,34$ mL, respectivamente), quando comparadas ao controle ($3,26 \pm 0,32$ mL). Contudo, a resina foi capaz de inibir, significativamente ($p < 0,001$), a acidez total gástrica ($2,41 \pm 0,50$ e $2,07 \pm 0,45$ $\mu\text{Eq/h}$, respectivamente) de maneira similar a cimetidina ($0,95 \pm 0,22$ $\mu\text{Eq/h}$), um conhecido antagonista H_2 , quando comparada ao controle ($8,35 \pm 1,97$ $\mu\text{Eq/h}$) (**Tabela 8 e Figuras 10 e 11**).

As inibições na acidez total gástrica com resina nas doses de 200 e 400 mg/kg e cimetidina (100 mg/kg) foram na ordem de 70, 75 e 88% respectivamente.

Tabela 8. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* e cimetidina sobre o volume secretório gástrico e acidez gástrica total em ratos com piloro ligado.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Volume Secretório Gástrico (mL)	Acidez Total Gástrica (μEq/h)
Controle	---	3,26 \pm 0,32	8,35 \pm 1,97
Resina	200	2,63 \pm 0,23	2,45 \pm 0,50 ^a
	400	2,48 \pm 0,38	2,07 \pm 0,45 ^a
Cimetidina	100	2,82 \pm 0,34	0,95 \pm 0,22 ^a

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais do volume secretório gástrico (mL) e da acidez gástrica total (μ Eq/h). Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) foram administrados por via intraduodenal, imediatamente após a ligação do piloro. Os animais foram sacrificados 4 horas após a ligação do piloro. ^ap<0,001 vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

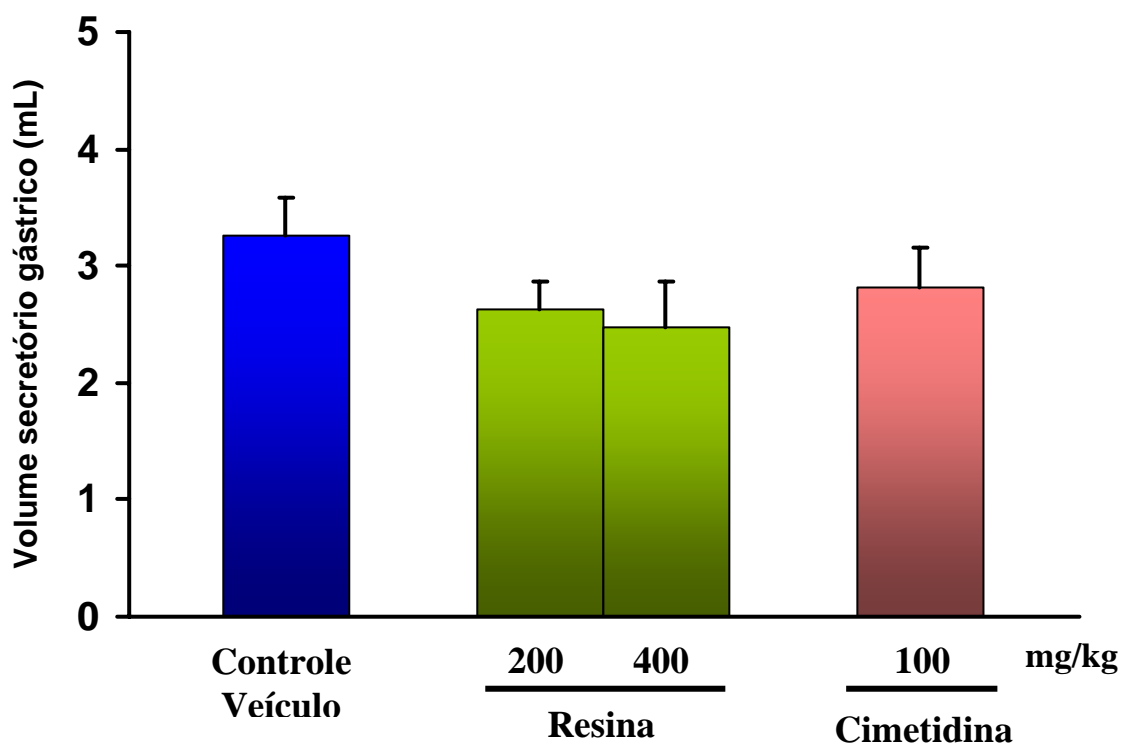


FIGURA 10. Efeito da administração intraduodenal da resina de *P. heptaphyllum* e cimetidina no volume secretório gástrico em ratos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) foram administrados por via intraduodenal, imediatamente após a ligação do piloro. Os animais foram sacrificados 4 horas após a ligação do piloro.

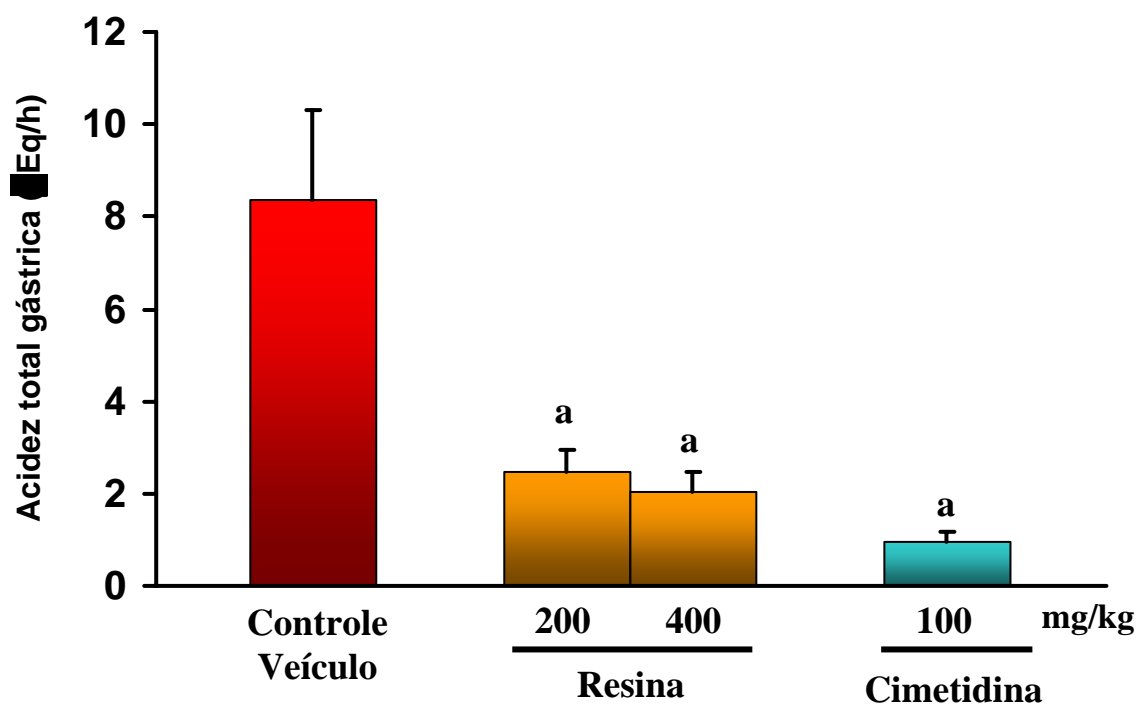


FIGURA 11. Efeito da administração intraduodenal da resina de *P. heptaphyllum* e cimetidina na acidez total gástrica em ratos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) foram administrados por via intraduodenal, imediatamente após a ligação do piloro. Os animais foram sacrificados 4 horas após a ligação do piloro. ^a $p < 0,001$ vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.3.4. Efeito da da resina de *P. heptaphyllum* sobre as úlcera gástrica induzida por indometacina

A **Tabela 9** mostram os efeitos da resina de *P. heptaphyllum* e da cimetidina em comparação com o grupo controle, pré-tratado com veículo, nas lesões gástrica induzidas por indometacina.

A administração subcutânea de indometacina (20 mg/kg) produziu lesões gástricas com uma média de escores de $17,57 \pm 1,71$. Enquanto que nos animais pré-tratados com cimetidina (100 mg/kg, v.o.), um antagonista dos receptores H₂, este efeito foi reduzido significativamente ($p < 0,01$). O pré-tratamento dos animais com a resina nas doses testadas não foi capaz de inibir as lesões induzidas pela indometacina.

Tabela 9. Efeito da resina de *P. heptaphyllum* no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Lesão gástrica (escores)
Controle (veículo)	---	17,57 ± 1,71
Resina	200	18,87 ± 2,29
	400	17,83 ± 2,37
Cimetidina	100	5,50 ± 1,60 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) e resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de indometacina (20 mg/kg). Os animais foram sacrificados 8 horas após a administração da indometacina. ^ap<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Kruskal Wallis - Dunnett).

5.3.5. Efeito da mistura de α - e β -amirina na úlcera gástrica induzida por etanol: papel dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina

Os animais que receberam apenas veículo mostraram extensa área de lesão da mucosa gástrica (mm^2) na forma de erosões hemorrágicas. A mistura de α,β -amirina, nas doses de 50 e 100 mg/kg e capsaicina nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, reduziram significativamente ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) a injúria gástrica de maneira dose dependente, sendo esta inibição da ordem de 52 e 67% para amirina e 79 e 83% para capsaicina, respectivamente. Altas doses de amirina (300 e 600 mg/kg) e capsaicina (15 e 20 mg/kg) produziram menor ou não produziram efeito de gastroproteção indicando um modo semelhante de ação (**Tabelas 10 e 11 e Figuras 12 e 13**).

A participação dos neurônios aferentes sensíveis à capsaicina no efeito gastroprotetor das amirina (100 mg/kg, via oral) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol foi investigado em camundongos dessensibilizados com capsaicina. Nos animais dessensibilizados pela capsaicina o dano gástrico produzido pelo etanol ($56,70 \pm 4,18 \text{ mm}^2$) foi mais intenso que aquele observado nos animais normais que receberam apenas veículo ($24,59 \pm 1,54 \text{ mm}^2$). A dessensibilização dos neurônios sensoriais aferentes pela capsaicina aboliu completamente o efeito gastroprotetor da mistura de α - e β -amirina na dose de 100 mg/kg ($58,46 \pm 4,44 \text{ mm}^2$), quando comparado ao grupo tratado apenas as α - e β -amirina em animais normais ($8,12 \pm 1,43 \text{ mm}^2$) (**Tabela 12 e Figura 14**).

Tabela 10. Efeito da mistura de α - e β -amirina no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Área de lesão gástrica (mm²)
Controle	---	22,63 \pm 2,25
α , β -amirina	50	10,78 \pm 2,12 ^a
	100	7,58 \pm 2,12 ^a
	300	11,39 \pm 1,55 ^a
	600	19,47 \pm 3,55

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) e mistura de α - e β -amirina (50, 100, 300 e 600 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol (0,2 mL). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. ^ap<0,01 vs controle (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

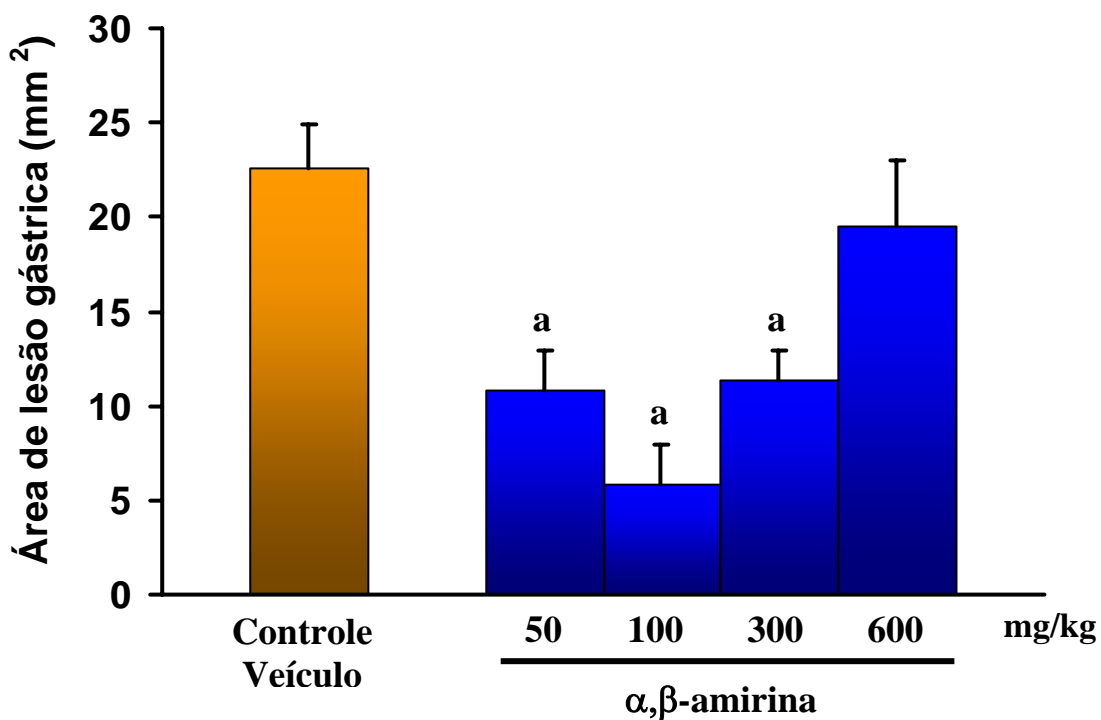


FIGURA 12. Efeito da mistura de α - e β - amirina nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80, v.o.) e mistura de α - e β -amirina (50, 100, 300 e 600 mg/kg) 1 hora antes da administração de etanol (0,2 mL). ^ap<0,01 vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 11. Efeito da capsaicina no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Área de lesão gástrica (mm²)
Controle	---	19,82 ± 2,21
Capsaicina	2,5	4,25 ± 1,03 ^a
	5	3,43 ± 0,54 ^a
	15	8,29 ± 1,50 ^a
	20	27,26 ± 3,30

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) e capsaicina (2,5, 5, 15 e 20 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol (0,2 mL). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. ^ap<0,001 vs controle (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

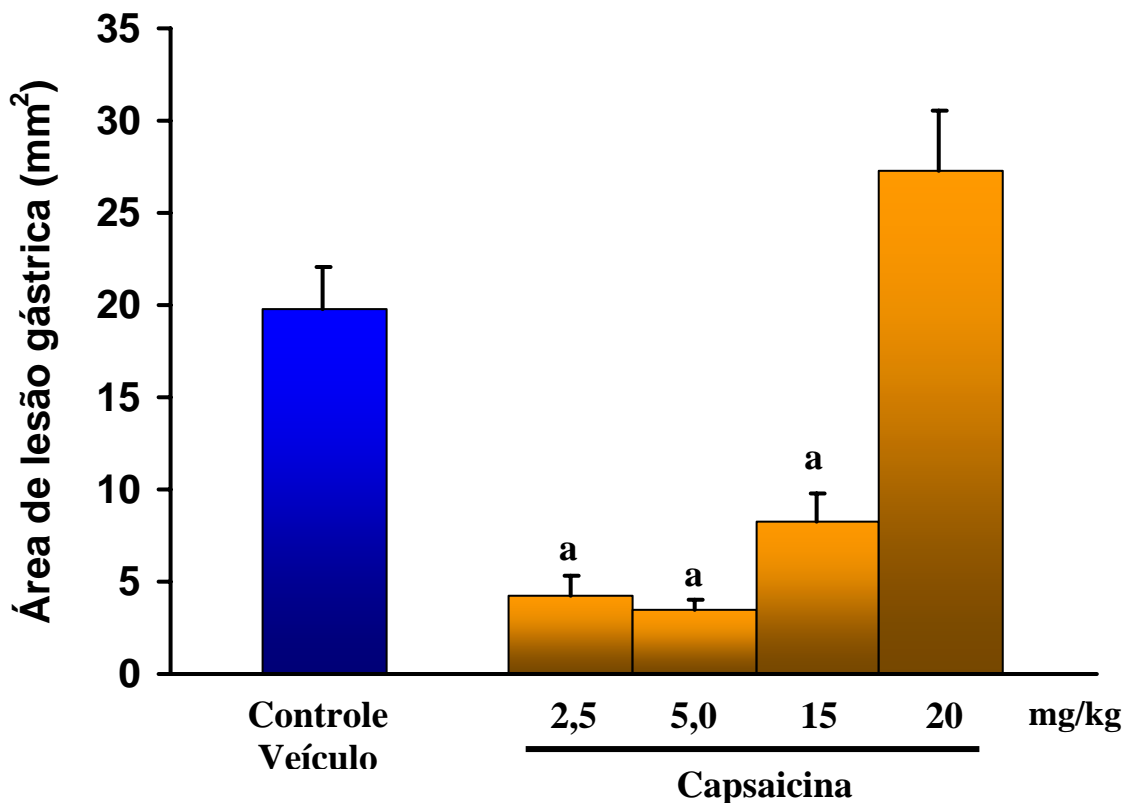


FIGURA 13. Efeito da capsaicina nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80, v.o.) e capsaicina (2,5, 5, 15 e 20 mg/kg) 1 hora antes da administração de etanol (0,2 mL). ^a $p < 0,001$ vs controle normal (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 12. Efeito da mistura de α - e β -amirina na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos normais e dessensibilizados pela capsaicina

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Área de Lesão Gástrica (mm ²)	
		Animais Normais	Animais Dessensibilizados
Controle (veículo)	---	24,59 ± 1,54	56,70 ± 4,18 ^a
α,β -amirina	100	8,12 ± 1,43 ^a	58,46 ± 4,44 ^{ab}

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Os animais foram tratados com capsacina (25 mg/kg) por via intraperitoneal, por três dias consecutivos. Após oito dias, animais dessensibilizados e animais normais foram tratados via oral com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) ou mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg) 1 hora antes da administração de etanol (0,2 mL). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. ^ap<0,001 vs controle veículo animais normais; ^bp<0,01 vs mistura de α - e β -amirina em animais normais (ANOVA e Teste de Mann-Whitney).

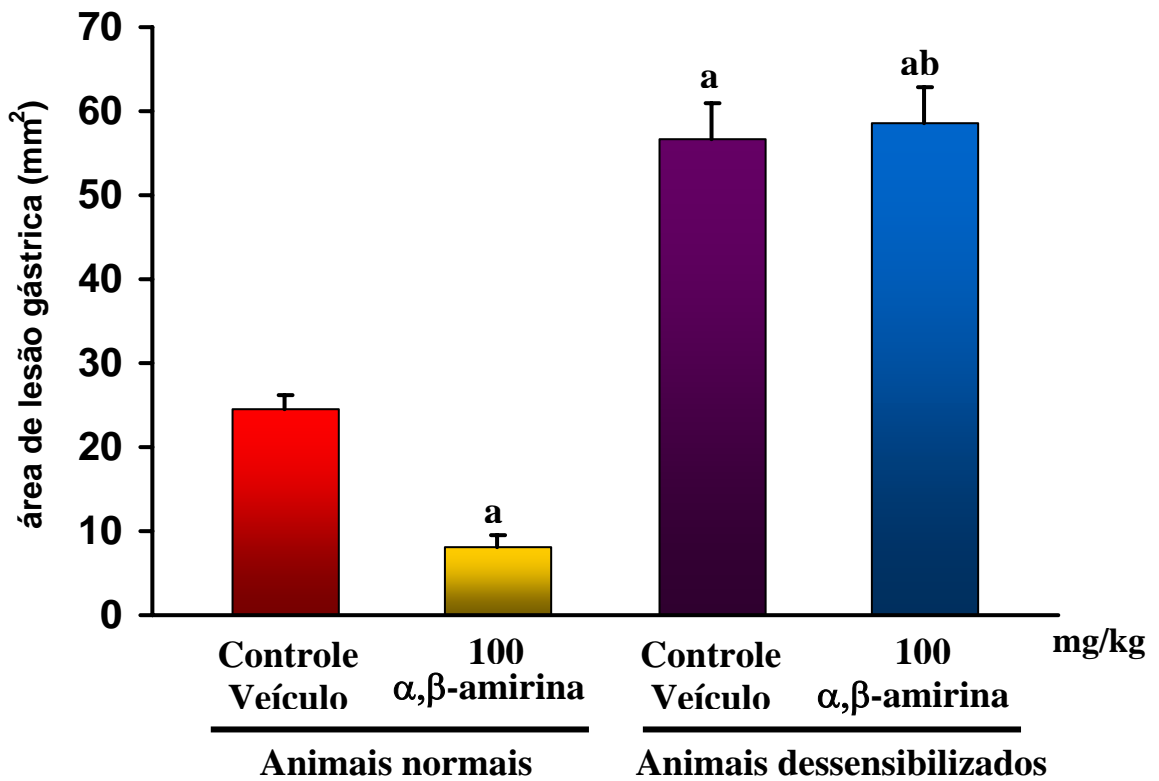


FIGURA 14. Efeito da mistura de α - e β -amirina nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos normais e dessensibilizados pela capsaicina. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais. Os animais foram tratados com capsacina (25 mg/kg) por via intraperitoneal, por três dias consecutivos. Após oito dias, animais dessensibilizados e animais normais foram tratados com veículo (3% de Tween 80, v.o.) ou mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg), 1 hora antes da administração de etanol (0,2 mL). ^a $p < 0,001$ vs controle veículo em animais normais; ^b $p < 0,01$ vs mistura de α - e β -amirina em animais normais (ANOVA e Teste de Teste de Mann-Whitney).

5.4. ATIVIDADE ANTIPRURIGINOSA

5.4.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40

A administração de salina nos animais controle não demonstrou prurido enquanto que, os animais que receberam Dextrana T40 manifestaram intenso prurido. Quando os animais foram pré-tratados com a mistura de α - e β -amirina nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, esta reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) o prurido induzido pela administração de Dextrana T40 ($70,66 \pm 22,42$; $45,00 \pm 6,21$ e $54,33 \pm 14,85$ s/20 min, respectivamente) quando comparado ao grupo controle veículo ($140,71 \pm 20,21$ s/20 min.). Ciproptadina (10 mg/kg), uma conhecida droga antihistamínica, reduziu o prurido de forma significativa ($16,71 \pm 9,34$ s/20 min) (**Tabela 13 e Figura 15**).

Tabela 13. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40 em camundongos

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Prurido (s/20min)
Controle (salina)	---	4,39 \pm 1,46
Controle (veículo)	---	140,71 \pm 20,21 ^a
α , β -amirina	50	70,66 \pm 22,42 ^{ab}
	100	45,00 \pm 6,21 ^{ab}
	200	54,33 \pm 14,85 ^{ab}
Ciproeptadina	10	16,71 \pm 9,34 ^{ab}

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do tempo de prurido registrado em segundos (s) durante 20 minutos para 8 animais, imediatamente após a injeção subcutânea de Dextrana T40. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) e ciproeptadina (10 mg/kg) foram administrados por via oral, 2 horas antes da injeção subcutânea de Dextrana T40 (50 μ L/75 mg/kg). ^ap<0,01 vs controle salina; ^bp<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

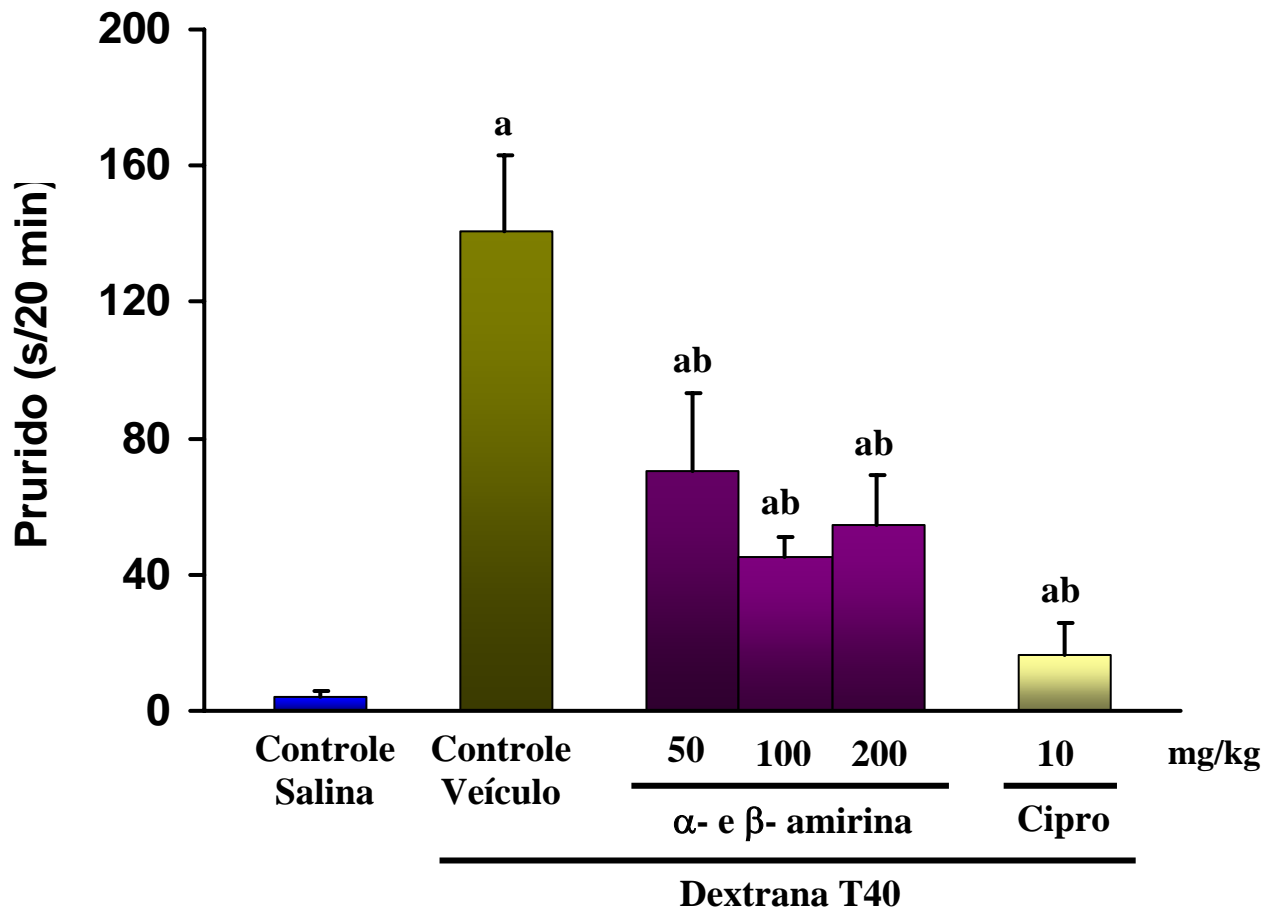


FIGURA 15. Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por dextrana T40 em camundongos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) e ciproheptadina (Cipro - 10 mg/kg, v.o.) foram administrados 2 horas antes da injeção subcutânea de dextrana T40 (75 mg/kg) e o tempo de prurido registrado (s) durante 20 minutos. ^ap<0,01 vs controle salina; ^bp<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.4.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido pelo composto 48/80

A administração de salina nos animais controle não demonstrou prurido enquanto que, os animais que receberam Composto 48/80 manifestaram intenso prurido. O pré-tratamento com a mistura dos triterpenos α - e β -amirina nas doses de 100 e 200 mg/kg, reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) o prurido induzido pela administração do Composto 48/80 ($45,87 \pm 8,07$ e $45,37 \pm 7,29$ s/20 min, respectivamente) quando comparado ao grupo controle veículo ($127,90 \pm 11,07$ s/20 min.). A administração de ciproceptadina (10 mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) o prurido causado pelo composto 48/80 ($41,28 \pm 7,07$ s/20 min) (**Tabela 14 e Figura 16**).

Tabela 14. Efeito da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido por composto 48/80 em camundongos

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Prurido (s/20min)
Controle (salina)	---	3,57 \pm 1,07
Controle (veículo)	---	127,90 \pm 11,07 ^a
α , β -amirina	50	122,19 \pm 23,98 ^a
	100	45,87 \pm 8,07 ^{ab}
	200	45,37 \pm 7,29 ^{ab}
Ciproptadina	10	41,28 \pm 7,07 ^{ab}

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do tempo de prurido registrado em segundos (s) durante 20 minutos para 8 animais, imediatamente após a injeção subcutânea de Composto 48/80. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) e ciproptadina (10 mg/kg) foram administrados por via oral, 2 horas antes da injeção subcutânea do Composto 48/80 (50 μ L/3 mg/kg). ^ap<0,01 vs controle salina; ^bp<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

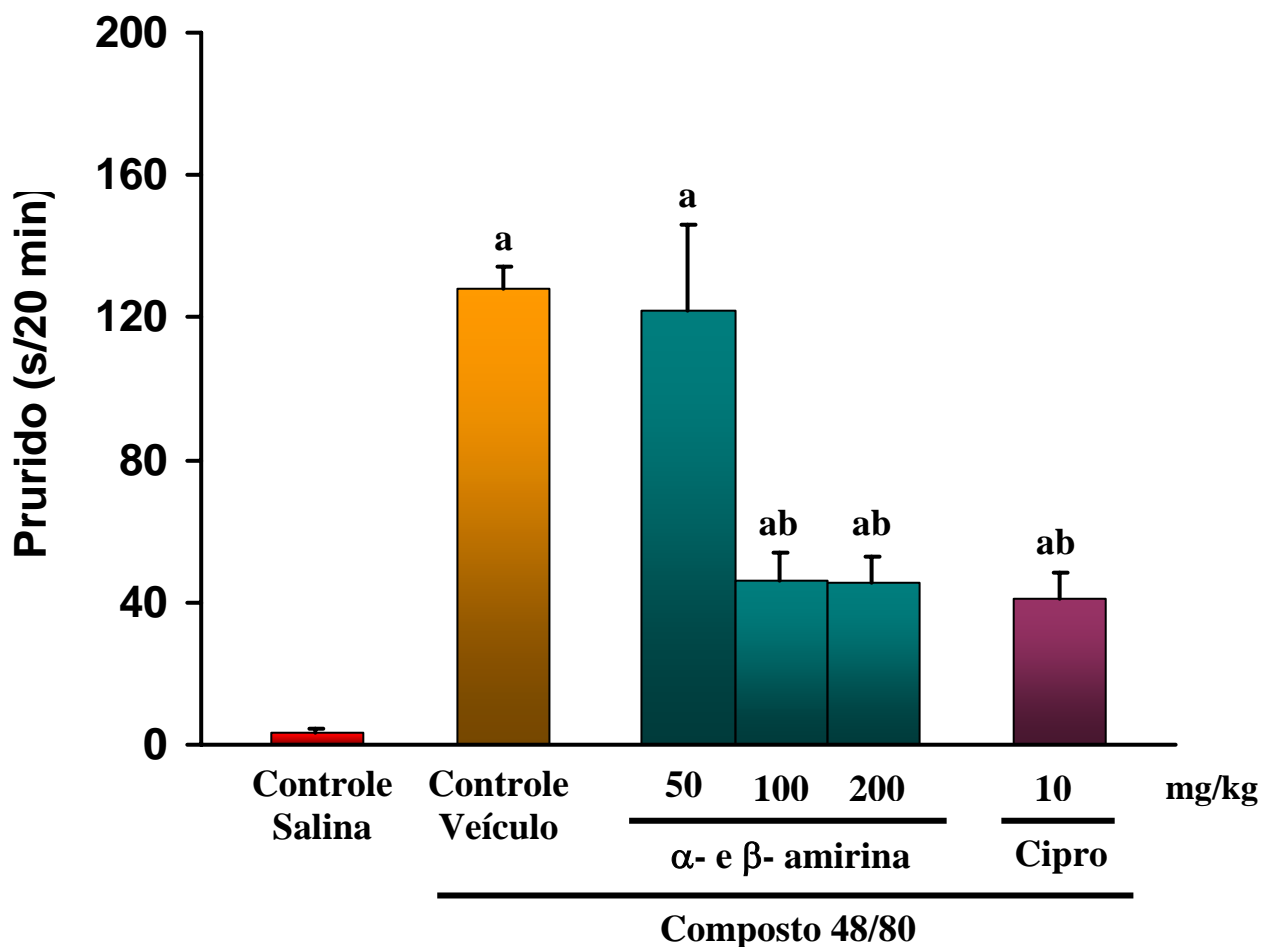


FIGURA 16. Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no prurido induzido pelo composto 48/80 em camundongos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) e ciproetidina (Cipro - 10 mg/kg, v.o.) foram administrados 2 horas antes da injeção subcutânea do composto 48/80 (3 mg/kg) e o tempo de prurido registrado (s) durante 20 minutos. ^ap<0,01 vs controle salina; ^bp<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.4.3. Efeito da naloxona (antagonista de receptor opióide) sobre a atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina ou morfina no prurido induzido por composto 48/80

O tratamento dos animais com a mistura de α e β -amirina (100 mg/kg) ou morfina (7,5 mg/kg) produziu redução significativa ($p < 0,01$) do prurido causado pelo Composto 48/80 ($20,09 \pm 2,84$ e $0,42 \pm 0,42$ s/20 min, respectivamente) quando comparado ao grupo controle veículo ($64,38 \pm 4,73$ s/20 min). Naloxona (2 mg/kg) quando administrada sozinha, não alterou o tempo de prurido ($67,76 \pm 5,75$ s/20 min) porém, quando associada à morfina, inibiu totalmente a ação antipruriginosa desta ($61,71 \pm 5,45$ s/20 min). Naloxona apenas inibiu parcialmente a atividade antipruriginosa da mistura de α e β -amirina ($41,50 \pm 4,14$ s/20) (**Tabela 15 e Figura 17**).

Tabela 15. Efeito da naloxona (antagonista de receptor opióide) sobre a atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina ou morfina no prurido induzido por composto 48/80

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Prurido (s/20min)
Controle (veículo)	---	64,38 \pm 4,73
α , β -amirina	100	20,09 \pm 2,84 ^a
Morfina	7,5	0,42 \pm 0,42 ^a
Naloxona	2,0	67,76 \pm 5,75
Naloxona + α , β -amirina	2,0 / 100	41,50 \pm 4,14 ^{a,b}
Naloxona + Morfina	2,0 / 7,5	61,71 \pm 5,45 ^c

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do tempo de prurido registrado em segundos (s) durante 20 minutos para 8 animais, imediatamente após a injeção subcutânea do Composto 48/80. Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg, v.o.) ou mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg, v.o.) 2 horas antes e, morfina (7,5 mg/kg, s.c.) ou naloxona (2 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção subcutânea do Composto 48/80 (50 μ L/3 mg/kg). ^ap<0,01 vs controle veículo; ^bp<0,01 vs α , β -amirina; ^cp<0,01 vs morfina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

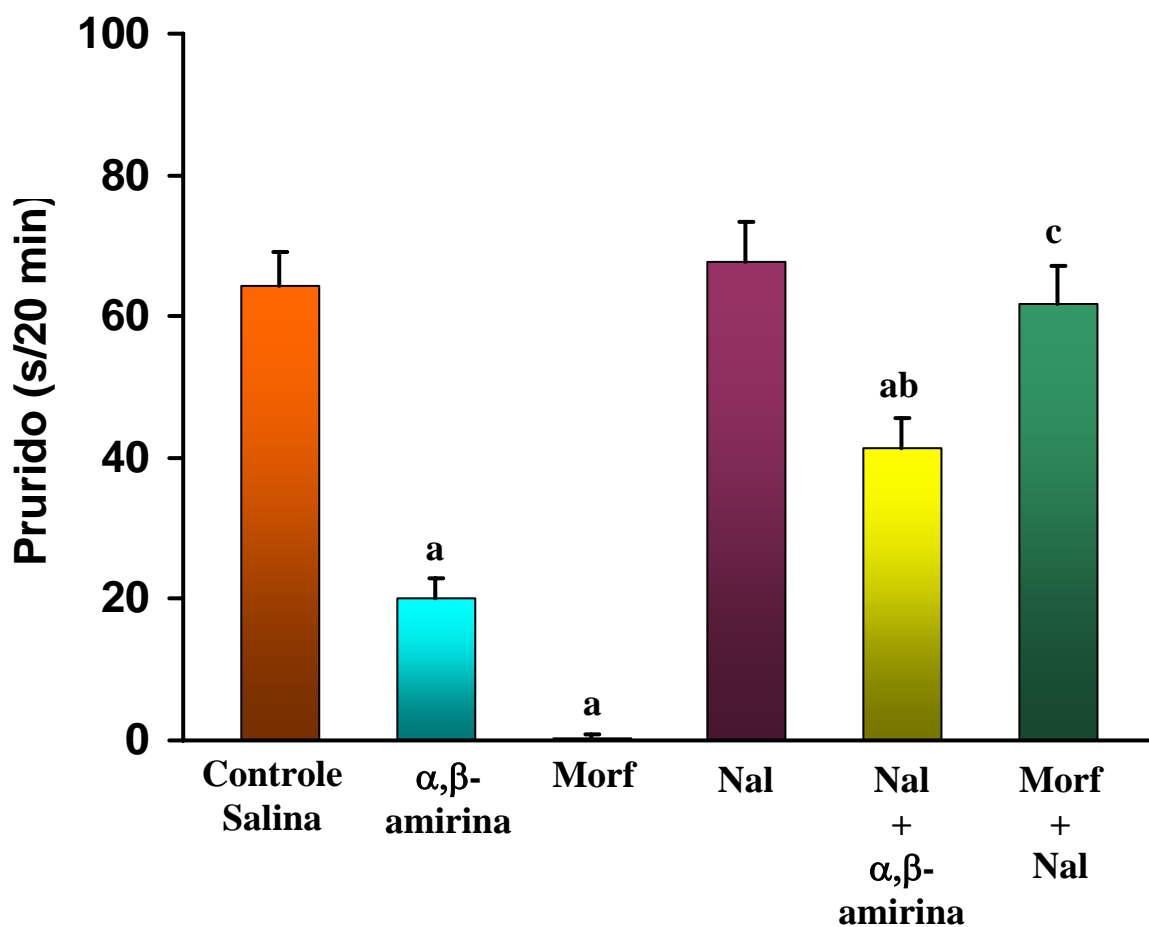


FIGURA 17. Efeito do antagonismo de receptor opióide (naloxona) sobre a atividade antipruriginosa da mistura de α - e β -amirina ou morfina no prurido induzido pelo composto 48/80 em camundongos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg) ou mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg, v.o.) foram administrados 2 horas e, morfina (Morf - 7,5 mg/kg, s.c.) ou naloxona (Nal - 2 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção subcutânea do composto 48/80 (3 mg/kg) e o tempo de prurido registrado (s) durante 20 minutos. ^ap<0,01 vs controle veículo; ^bp<0,01 vs α,β -amirina; ^cp<0,01 vs morfina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.4.4. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a degranulação de mastócitos *ex vivo*

O percentual de células degranuladas no controle veículo foi de $90,60 \pm 2,84$ %, enquanto que o grupo tratado apenas com salina exibiu um percentual de $5,50 \pm 1,47$ %. O pré-tratamento dos animais com a mistura de α - e β -amirina na dose de 100 mg/kg reduziu forma significativa ($p < 0,01$) a degranulação de mastócitos ($12,60 \pm 3,18$ %) quando comparado ao grupo controle veículo. Da mesma forma, cetotifeno (1 mg/kg) reduziu significativamente o percentual de degranulação induzida pelo Composto 48/80 ($13,60 \pm 2,76$ %). As inibições exibidas pelas α - e β -amirina e cetotifeno foram de 86% e 85%, respectivamente (**Tabela 16 e Figuras 18 e 19**).

Tabela 16. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a degranulação de mastócitos mesentéricos induzido pelo composto 48/80 *ex vivo*

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Mastócitos Degranulados (%)
Controle (salina)	---	2,50 \pm 1,47
Controle (veículo)	---	90,60 \pm 2,85 ^a
α - e β -amirina	100	12,60 \pm 3,18 ^b
Cetotifeno	1,0	13,60 \pm 2,76 ^b

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do percentual de mastócitos degranulados para 4 animais. Os animais foram tratados via oral com salina 0,9% (0,1 mL/10 g), veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg) ou cetotifeno (1 mg/kg) e 2 horas após os animais foram sacrificados e os mesentérios retirados e incubados com Composto 48/80 por 30 minutos. Os mastócitos íntegros e degranulados foram contados em cinco campos de cada grupo. ^ap<0,01 vs controle salina; ^bp<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Bonferroni).

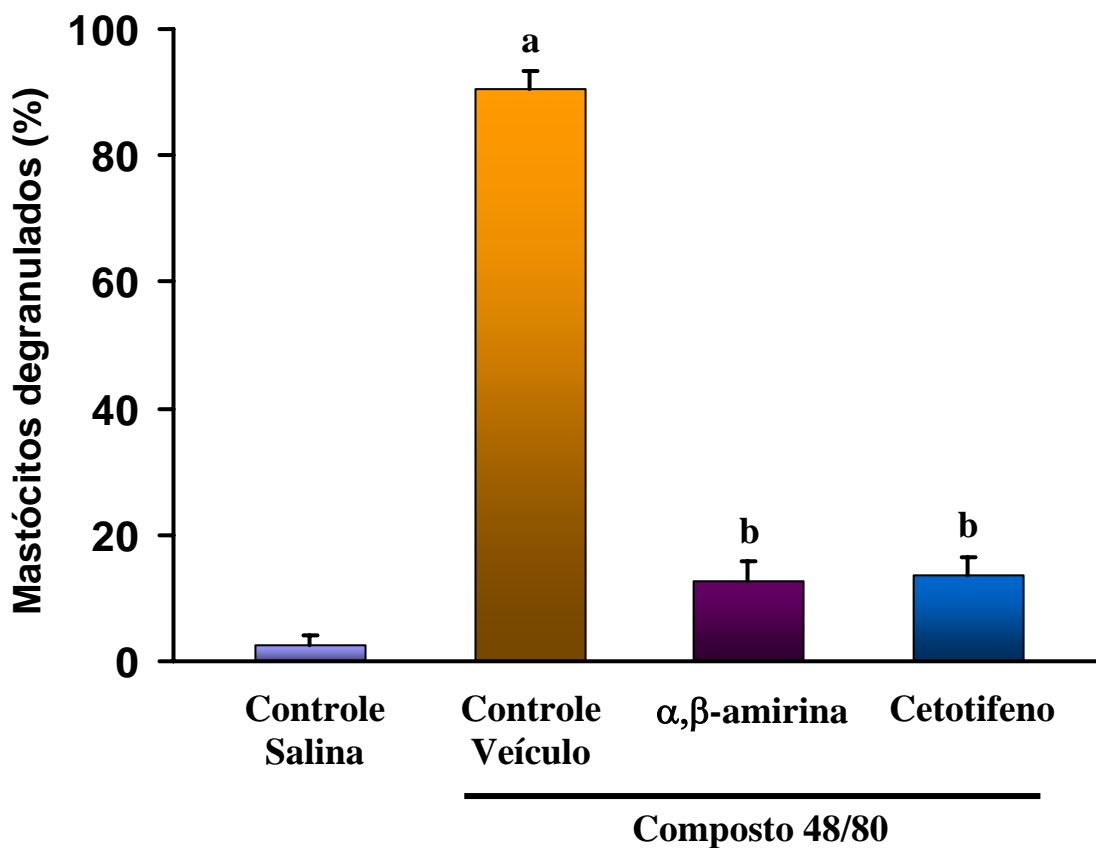
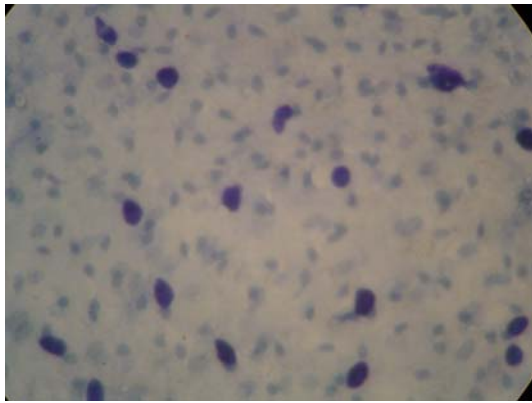
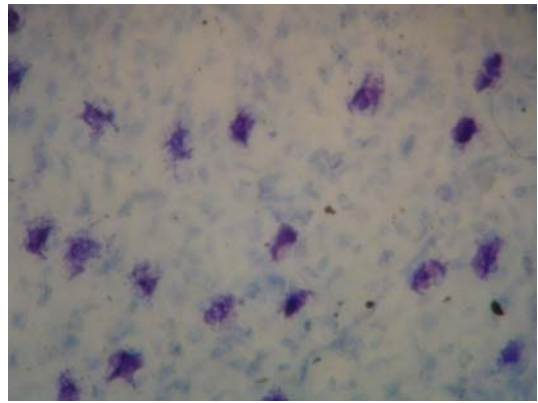


FIGURA 18. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a degranulação de mastócitos mesenteriais induzido pelo composto 48/80 *ex vivo*. Salina 0,9% (0,1 mL/10 g), veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (100 mg/kg) ou cetotifeno (1 mg/kg) e 2 horas após os animais foram sacrificados e os mesentérios retirados e incubados com Composto 48/80 por 30 minutos. Os mastócitos íntegros e degranulados foram contados em cinco campos de cada grupo. ^a $p < 0,01$ vs controle salina; ^b $p < 0,01$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de Bonferroni).



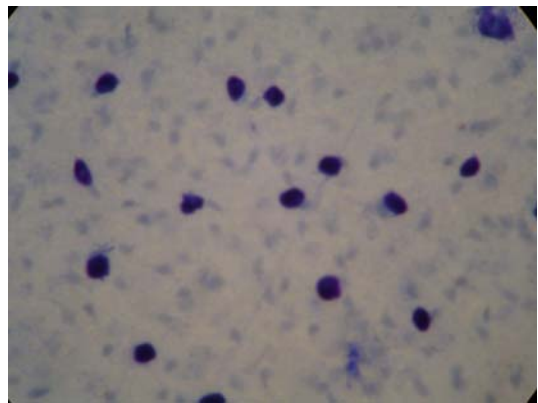
A – Controle salina



B – Controle Veículo



C – Mistura α,β - amirina



D – Cetotifeno

FIGURA 19. Microfotografias de mastócitos mesenteriais. (A) Animais tratados com salina; (B) Animais tratados com veículo (Tween 80 a 3%) e incubados com Composto 48/80 (0,4 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando extensa degranulação de mastócitos; (C) Animais tratados com α - e β -amirina (100 mg/kg) e incubados com Composto 48/80 (0,4 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando inibição da degranulação de mastócitos; (D) Animais tratados com cetotifeno (1 mg/kg) e incubados com Composto 48/80 (0,4 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando inibição da degranulação de mastócitos.

5.4.5. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por dextrana

Os pesos das patas (mg) dos animais tratados com a mistura de α - e β -amirina, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, foram reduzidos significativamente ($23,22 \pm 4,14$; $23,22 \pm 4,14$ e $21,02 \pm 2,00$ mg, respectivamente), quando comparado ao grupo controle veículo ($55,45 \pm 3,79$ mg), sendo as inibições de 38, 58 e 62% respectivamente. A ciproeptadina reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) o peso da pata ($20,75 \pm 3,55$ mg) sendo esta inibição de 63% (**Tabela 20 e Figura 23**).

Tabela 20. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por dextrana em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Edema de Pata (mg)
Controle (veículo)	---	55,45 \pm 3,79
α - e β -amirina	50	34,31 \pm 8,99 ^a
	100	23,22 \pm 4,14 ^c
	200	21,02 \pm 2,00 ^c
Ciproheptadina	10	20,75 \pm 3,55 ^b

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do peso das patas (mg) para 8 animais após 2 horas da administração do Composto 48/80. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) e ciproheptadina (10 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da injeção subplantar de Dextrana (150 mg/kg). Após 2 horas os animais foram sacrificados e as patas cortadas e pesadas (mg). ^ap<0,05; ^bp<0,01; ^cp<0,001 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

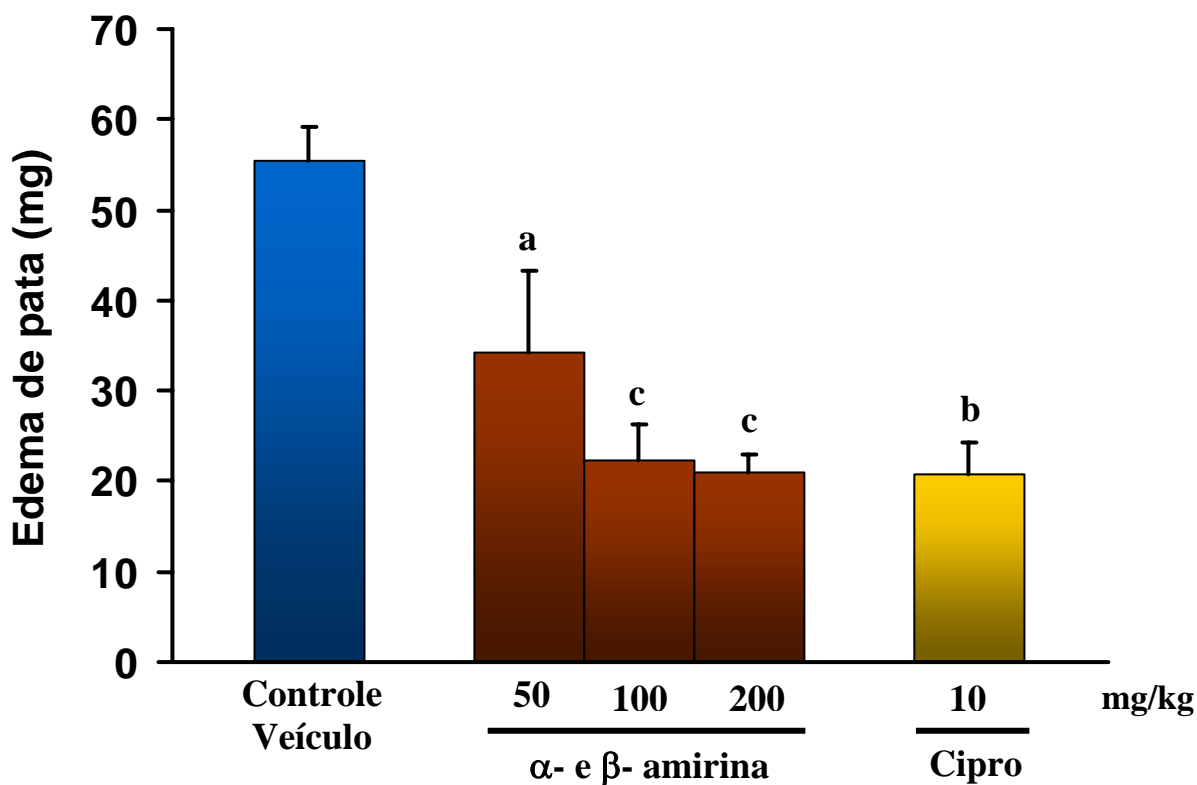


FIGURA 23. Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por dextrana em camundongos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) e ciproetadina (cipro - 10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1 horas antes da injeção subplantar de serotonina (10 mg/kg). Após 2 horas os animais foram sacrificados e as patas cortadas e pesadas (mg). ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,001$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.4.6. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por composto 48/80

A mistura de α - e β -amirina na dose de 100 mg/kg, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o peso da pata ($60,95 \pm 4,14$ mg) induzido pelo Composto 48/80, com inibição da ordem de 30%. Ciprooptadina (10 mg/kg), conhecido antihistamínico, reduziu significativamente ($p < 0,001$) o peso da pata induzido pela administração do Composto 48/80 ($52,88 \pm 5,14$ mg), sendo o percentual de inibição de 39% (**Tabela 19 e Figura 22**).

Tabela 19. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por composto 48/80 em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Edema de Pata (mg)
Controle (veículo)	---	86,28 \pm 4,08
α - e β -amirina	50	90,81 \pm 6,29
	100	60,95 \pm 4,14 ^a
	200	85,42 \pm 7,05
Ciproeptadina	10	52,88 \pm 5,14 ^b

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do peso das patas (mg) para 8 animais após 2 horas da administração do Composto 48/80. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) e ciproeptadina (10 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da injeção subplantar do Composto 48/80 (10 mg/kg). Após 2 horas os animais foram sacrificados e as patas cortadas e pesadas (mg). ^ap<0,05; ^bp<0,001 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

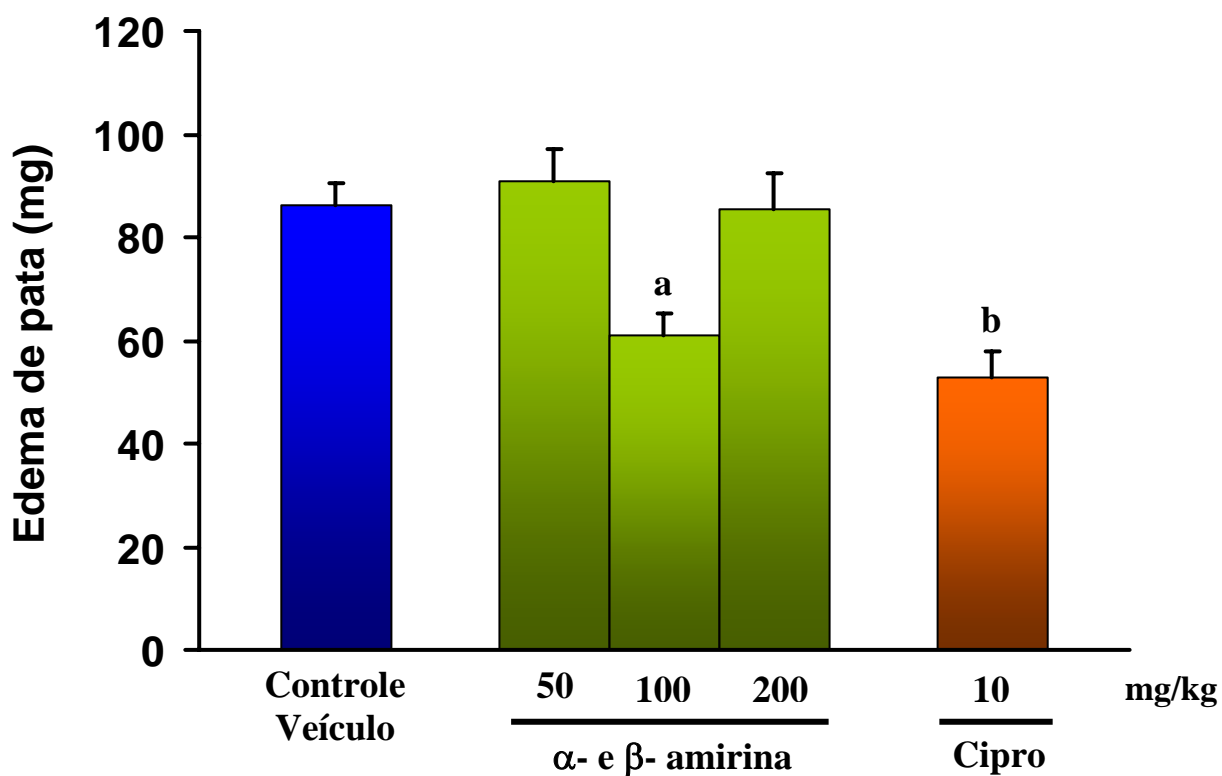


FIGURA 22. Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) e ciproeptadina (cipro - 10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1 horas antes da injeção subplantar de serotonina (10 mg/kg). Após 2 horas os animais foram sacrificados e as patas cortadas e pesadas (mg). ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,001$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.4.7. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por histamina

Os animais tratados com a mistura de α - e β -amirina nas doses de 50 e 100 mg/kg reduziram de forma significativa ($p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente) o peso da pata ($14,38 \pm 1,89$ e $18,91 \pm 2,69$ mg, respectivamente) induzido por histamina, sendo as inibições de 53 e 38% respectivamente. Ciproptadina (10 mg/kg), conhecido antihistamínico, reduziu significativamente ($p < 0,01$) o peso da pata induzido pela administração de histamina ($14,95 \pm 1,36$ mg), sendo o percentual de inibição da ordem de 51% (**Tabela 17 e Figura 20**).

Tabela 17. Efeito da resina da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por histamina em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Edema de Pata (mg)
Controle (veículo)	-	30,33 \pm 1,95
α , β -amirina	50	14,38 \pm 1,89 ^a
	100	18,91 \pm 2,69 ^b
	200	32,01 \pm 2,40
Ciproheptadina	10	14,95 \pm 1,36 ^a

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do peso das patas (mg) para 8 animais após 2 horas da administração de histamina. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) e ciproheptadina (10 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da injeção subplantar de histamina (10 mg/kg). Após 2 horas os animais foram sacrificados e as patas cortadas e pesadas (mg). ^ap<0,01; ^bp<0,001 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

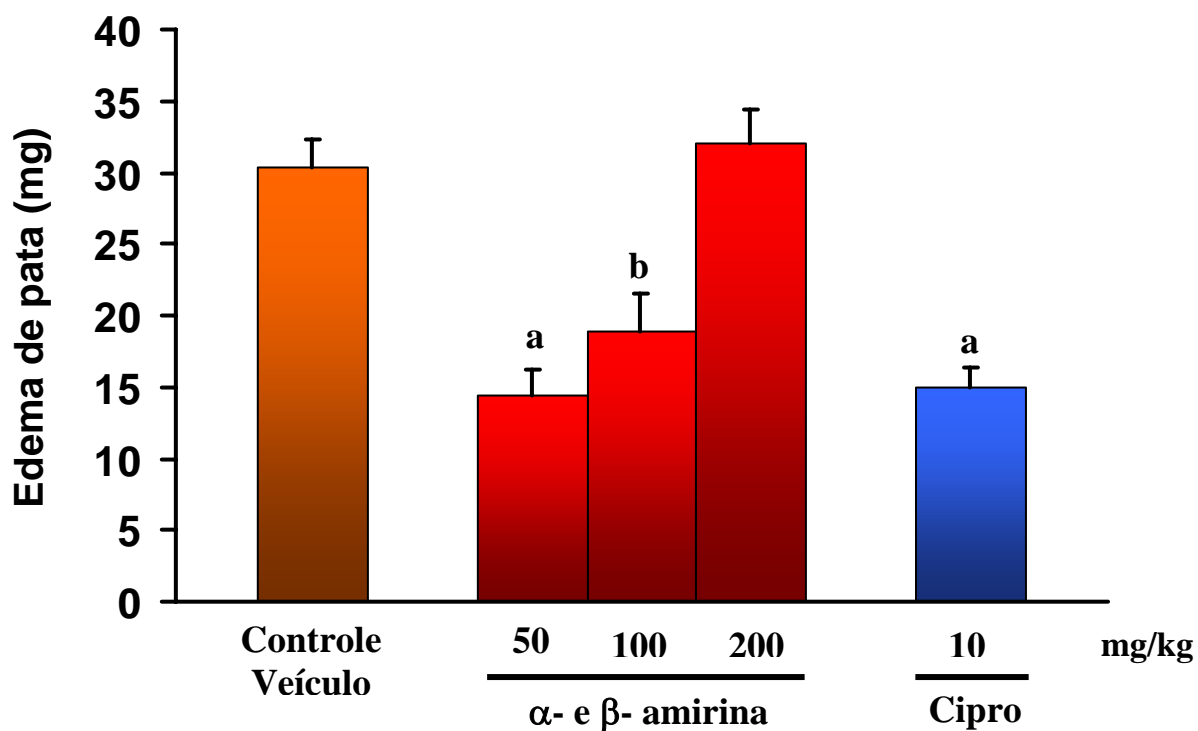


FIGURA 20. Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por histamina em camundongos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) e ciproetadina (cipro - 10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1 horas antes da injeção subplantar de histamina (10 mg/kg). Após 2 horas os animais foram sacrificados e as patas cortadas e pesadas (mg). ^ap<0,01; ^bp<0,001 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.4.8. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por serotonina

A mistura de α - e β -amirina nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg não alterou o peso de pata ($28,64 \pm 5,92$; $27,60 \pm 3,41$ e $22,97 \pm 2,78$ mg, respectivamente) induzido por serotonina (10 mg/kg), porém a ciproheptadina reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o peso da pata ($6,64 \pm 0,86$ mg) com inibição da ordem de 75% (**Tabela 18 e Figura 21**).

Tabela 18. Efeito da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por serotonina em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Edema de Pata (mg)
Controle (veículo)	---	26,94 \pm 1,58
α - e β -amirina	50	28,64 \pm 5,92
	100	27,60 \pm 3,41
	200	22,97 \pm 2,78
Ciprooptadina	10	6,64 \pm 0,86 ^a

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do peso das patas (mg) para 8 animais após 2 horas da administração de serotonina. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg) e ciprooptadina (10 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da injeção subplantar de serotonina (10 mg/kg). Após 2 horas os animais foram sacrificados e as patas cortadas e pesadas (mg). ^ap<0,001 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

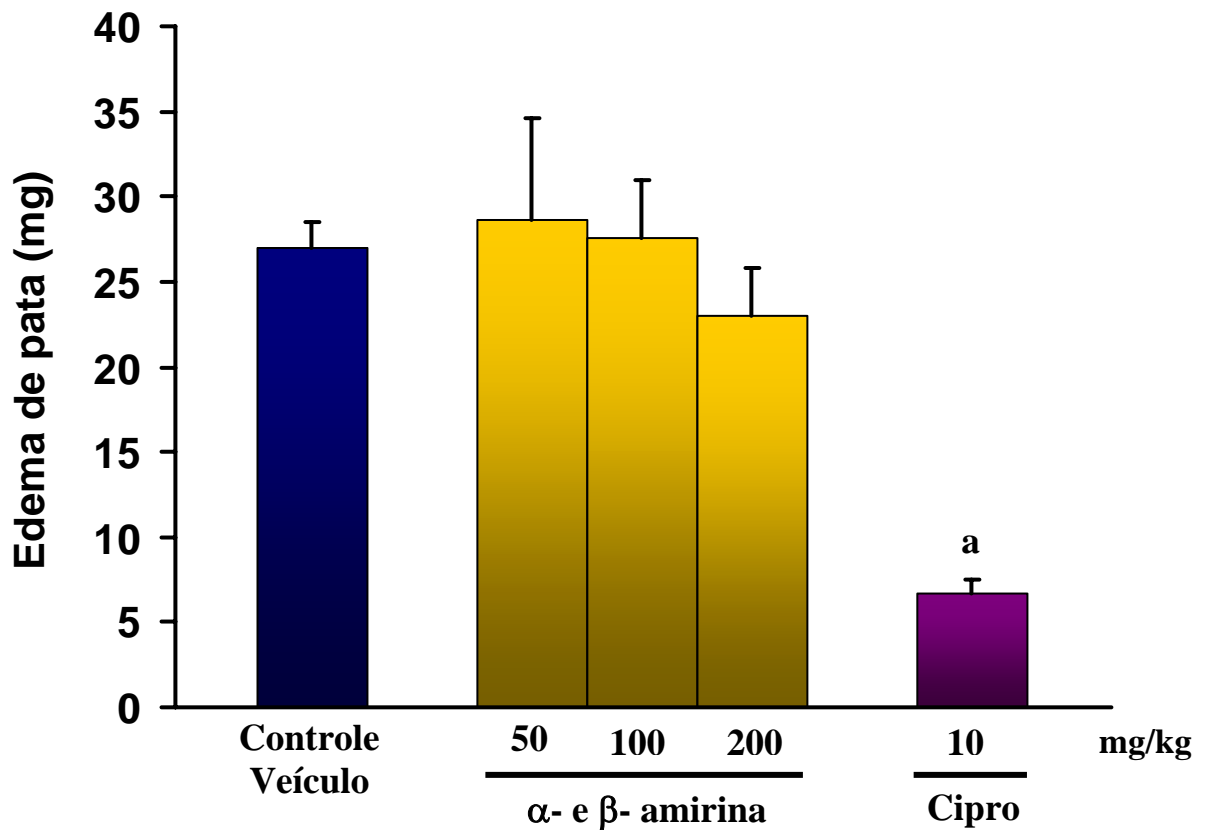


FIGURA 21. Efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina no edema de pata induzido por serotonina em camundongos. Veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) e ciproeptadina (cipro - 10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1 horas antes da injeção subplantar de serotonina (10 mg/kg). Após 2 horas os animais foram sacrificados e as patas cortadas e pesadas (mg). ^ap<0,001 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.5. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

5.5.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela capsaicina

A **Figura 24** ilustra o efeito da administração oral da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela injeção subplantar de capsaicina (1,6 μ g/20 μ L). Os triterpenos α - e β -amirina, nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg, causaram inibições significativas da ordem de 43, 54, 49 e 27%, respectivamente ($p < 0,05$) do tempo de reação, tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata ($41,42 \pm 6,0$; $33,43 \pm 4,87$; $37,0 \pm 5,54$ e $52,84 \pm 8,18$ s/5 min), quando comparado ao grupo capsaicina ($72,44 \pm 9,01$ s/5 min).

Morfina (5 mg/kg) exibiu uma potente inibição de 97%, enquanto que naloxona (2 mg/kg) inibiu completamente a ação antinociceptiva da morfina ($77,37 \pm 8,17$ s/5 min) e da mistura de α - e β -amirina na dose de 10 mg/kg ($80,63 \pm 7,65$ s/5 min) (**Tabela 21**).

Os resultados obtidos com o objetivo de verificar uma possível interação entre vermelho de rutênio (1,5 mg/kg) e α - e β -amirina (10 mg/kg) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina encontram-se na **Tabela 22**. Assim como as α - e β -amirina, o vermelho de rutênio produziu uma significativa inibição da nocicepção ($37,77 \pm 4,87$ e $36,87 \pm 5,53$ s/5 min) quando comparada ao grupo veículo ($60,50 \pm 5,97$ s/5 min). A associação destas duas substâncias (vermelho de rutênio + α - e β -amirina) não mostrou efeitos aditivos ou antagônicos ($35,0 \pm 3,12$ s/5 min) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina (**Figura 25**).

Tabela 21. Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela administração subplantar de capsaicina

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Tempo de Lamedura da Pata (s/5 min)
Controle (veículo da capsaicina)	---	1,21 \pm 0,84
Controle (veículo)	---	72,44 \pm 9,01 ^a
Morfina	5,0	2,12 \pm 1,42 ^b
α - e β -amirina	3,0	41,42 \pm 6,0 ^{a,b}
	10	33,43 \pm 4,87 ^{a,b}
	30	37,00 \pm 5,54 ^{a,b}
	100	52,84 \pm 8,18 ^{a,b}
Naloxona + Morfina	2,0 / 5,0	77,37 \pm 8,17 ^{a,c}
Naloxona + α - e β -amirina	2,0 / 10	80,63 \pm 7,65 ^{a,d}

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do tempo de lamedura da pata injetada com capsaicina para 8 animais. Os animais foram tratados via oral com veículo da capsaicina (80% de PBS + 10% de Tween 80 + 10% de Etanol absoluto, v.o.), veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), mistura de α - e β -amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg) 1 hora antes da injeção subplantar de Capsaicina (1,6 μ g/20 μ L) e observado durante 5 minutos. A naloxona (2 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes do tratamento com morfina (5 mg/kg, s.c.) e mistura de α - e β -amirina (10 mg/kg, v.o.). ^ap<0,05 vs controle veículo da capsaicina; ^bp<0,05 vs morfina; ^cp<0,05 vs morfina; ^dp<0,05 vs α - e β -amirina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

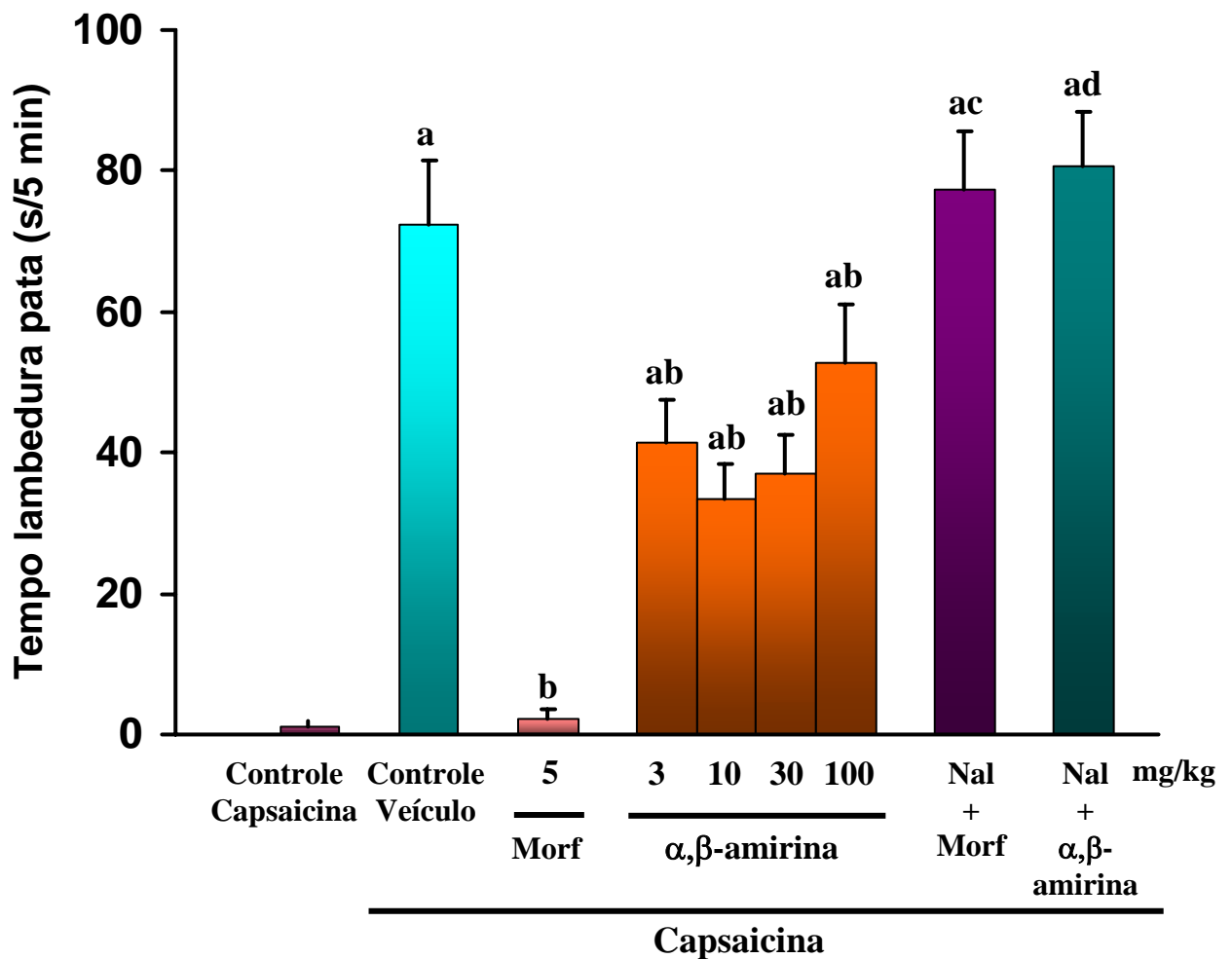


FIGURA 24. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a nocicepção induzida pela administração subplantar de capsaicina. Veículo da capsaicina (PBS, Tween 80, Etanol, v.o.), veículo (3% de Tween 80), mistura de α - e β -amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg) foram administrados 1h e morfina (Morf - 5 mg/kg, s.c.) 30 minutos antes da injeção subplantar de Capsaicina (1,6 μ g/20 μ L). Naloxona (Nal - 2 mg/kg, i.p) foi administrada 15 min antes do tratamento com morfina (Morf - 5 mg/kg, s.c.) e mistura de α - e β -amirina (10 mg/kg, v.o.). Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo gasto pelo animal lambendo a pata durante 5 min. ^a $p < 0,05$ vs controle veículo capsaicina; ^b $p < 0,05$ vs controle veículo; ^c $p < 0,05$ vs morfina; ^d $p < 0,05$ vs α, β -amirina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 22. Efeito da mistura de α - e β -amirina e vermelho de rutênio sobre o tempo de lambedura induzido pela injeção subplantar de capsaicina em camundongos

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Tempo de Lambedura da Pata (s/5 min)
Controle (veículo)	---	60,50 \pm 5,97
Vermelho de Rutênio	1,5	36,87 \pm 5,53 ^a
α - e β -amirina	10	37,77 \pm 4,87 ^a
Vermelho de Rutênio + α - e β -amirina	1,5 / 10	35,00 \pm 3,12 ^a

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do tempo de lambedura da pata injetada com capsaicina para 8 animais. Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg), Vermelho de Rutênio (1,5 mg/kg, s.c.), mistura de α - e β -amirina (10 mg/kg) ou a combinação de Vermelho de Rutênio (1,5 mg/kg, s.c.) e mistura de α - e β -amirina (10 mg/kg) durante três dias consecutivos. Após 1 hora do último tratamento, uma injeção subplantar de Capsaicina (1,6 μ g/20 μ L) foi administrada aos animais e observado durante 5 minutos o prurido na pata. ^ap<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

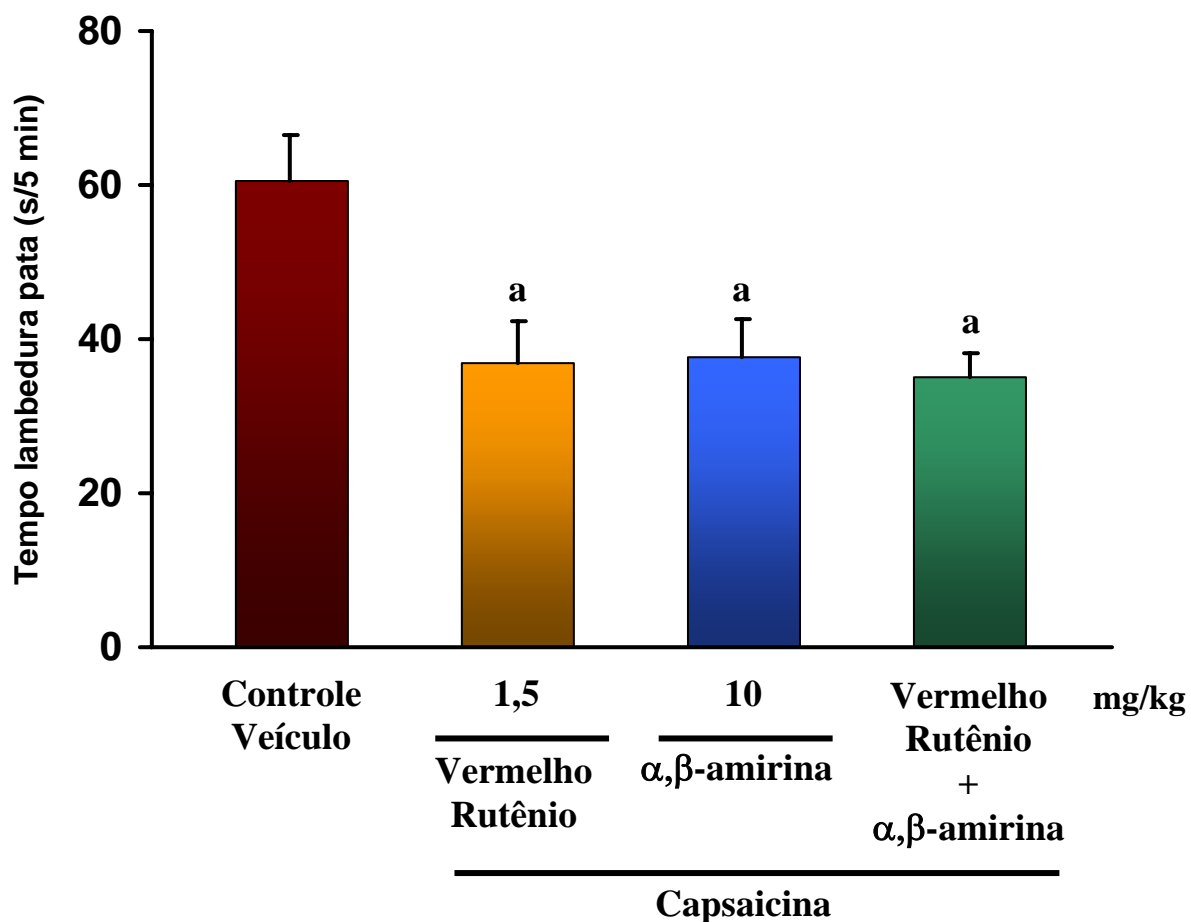


FIGURA 25. Efeito da mistura de α - e β -amirina e vermelho de rutênio sobre o tempo de lambertura induzido pela injeção subplantar de capsaicina em camundongos. Veículo (3% de Tween 80), Vermelho de Rutênio (1,5 mg/kg, s.c.), mistura de α - e β -amirina (10 mg/kg) ou a combinação de Vermelho de Rutênio (1,5 mg/kg, s.c.) e mistura de α - e β -amirina (10 mg/kg) durante três dias consecutivos. Após 1 hora do último tratamento, uma injeção subplantar de Capsaicina (1,6 μ g/20 μ L) foi administrada aos animais e observado durante 5 minutos o prurido na pata. ^ap<0,01 vs controle veículo (ANOVA e Teste de Student Newman Keul)

5.5.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina na nocicepção induzida pela administração intracolônica de capsaicina (nocicepção visceral)

A administração intracolônica de capsacina (149 μ g) nos animais tratados com veículo promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de comportamentos nociceptivos ($55,0 \pm 1,90$ /30 min) quando comparado aos animais que receberam apenas o veículo da capsaicina ($9,75 \pm 3,72$ /30 min).

A administração de α - e β -amirina, nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg e clonidina (0,1 mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o número de comportamentos nociceptivos ($32,12 \pm 3,99$; $26,85 \pm 3,79$; $28,0 \pm 6,08$; $34,14 \pm 3,88$ e $6,50 \pm 2,46$ /30 min, respectivamente), sendo a inibição de 42, 56, 49, 38 e 88%, respectivamente.

Ioimbina (2 mg/kg) inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a antinocicepção da clonidina ($44,20 \pm 6,88$ /30 min) porém não alterou a antinocicepção das α - e β -amirina na dose de 10 mg/kg ($9,87 \pm 1,44$ /30 min) (**Tabela 23 e Figura 26**).

Tabela 23. Efeito da mistura de α - e β -amirina no nocicepção induzida pela administração intracolônica de capsaicina (dor visceral)

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Número de Comportamentos Nociceptivos (30 min)
Controle (veículo da capsaicina)	---	9,75 \pm 3,72
Controle (veículo)	---	55,00 \pm 1,90 ^a
Clonidina	0,1	6,50 \pm 2,46 ^b
α - e β -amirina	3,0	32,12 \pm 3,99 ^{ab}
	10	26,85 \pm 3,79 ^{ab}
	30	28,00 \pm 6,08 ^{ab}
	100	34,14 \pm 3,88 ^{ab}
Ioimbina + Clonidina	2,0 / 0,1	44,20 \pm 6,88 ^{ac}
Ioimbina + α - e β -amirina	2,0 / 10	9,87 \pm 1,44 ^{ab}

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do número de comportamentos nociceptivos para 8 animais. Os animais foram tratados com veículo da capsaicina (80% de PBS + 10% de Tween 80 + 10% de Etanol absoluto, v.o.), veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%, 10 mL/kg, v.o.), mistura de α - e β -amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), clonidina (0,1 mg/kg, v.o.) ou ioimbina (2 mg/kg, s.c.) 1 hora antes da administração intracolônica de Capsaicina (149 μ g/50 μ L) e imediatamente registrado por 30 min o número de comportamentos relacionados a nocicepção. ^ap<0,05 vs controle veículo da capsaicina; ^bp<0,05 vs controle veículo; ^cp<0,05 vs clonidina; ^dp<0,05 vs α - e β -amirina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

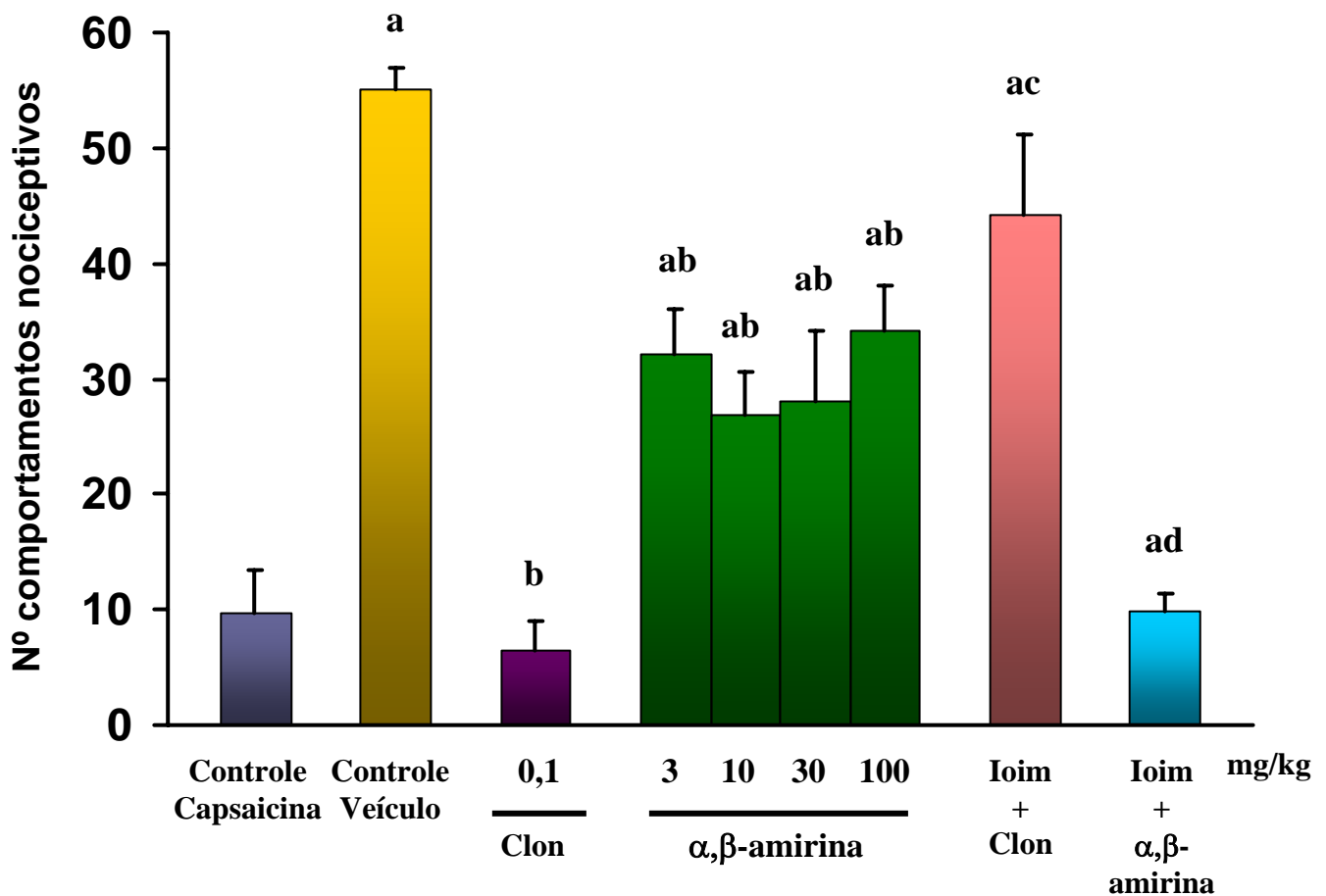


FIGURA 26. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a nociceção induzida pela administração intracolônica de capsaicina (Dor visceral).

Veículo da capsaicina (80% de PBS + 10% de Tween 80 + 10% de Etanol absoluto, v.o.), veículo (3% de Tween 80), mistura de α - e β -amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg), clonidina (Clon - 0,1 mg/kg, v.o.) ou ioimbina (Ioimb - 2 mg/kg, s.c.) 1 hora antes da administração intracolônica de Capsaicina (149 μ g/50 μ L). Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos relacionados a nociceção durante 30 min. ^ap<0,05 vs controle veículo capsaicina; ^bp<0,05 vs controle veículo; ^cp<0,05 vs clonidina; ^dp<0,05 vs α , β -amirina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.5.3. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a resposta térmica induzida por capsaicina

A **Tabela 24** mostra a mudança na temperatura retal em camundongos induzida pela capsaicina (10 mg/kg) e o efeito do pré-tratamento da mistura de α - e β -amirina e vermelho de rutênio.

A administração subcutânea de capsacina induziu uma hipotermia inicial nos animais que receberam apenas veículo durante o período de observação de 30 a 150 min, seguido por uma hipertermia observada no período de 24 e 48 h após a administração da capsaicina.

As α - e β -amirina, nas doses de 10 e 100 mg/kg e o vermelho de rutênio (1,5 mg/kg) não reverteram a resposta hipotérmica da capsacina. Contudo, a fase de hipertermia observada no período de 24 e 48 h, após a administração de capsacina foi revertida pelo vermelho de rutênio e α - e β -amirina apenas na dose de 10 mg/kg (**Figura 27**).

Tabela 24 Efeito da mistura de α - e β -amirinas sobre a hipotermia induzida pela capsaicina em camundongos.

GRUPOS	DOSES (mg/kg)	Temperatura Corpórea (°C)							
		T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 150	24 h	48 h
Normal	---	37,27±0,04	37,37±0,11	37,53±0,08	37,35±0,19	37,20±0,18	37,17±0,13	37,85±0,21	37,35±0,19
Capsaicina	10	36,85±0,12	35,56±0,39 ^a	36,16±0,32 ^a	35,10±0,44 ^a	34,83±0,40 ^a	35,12±0,43 ^a	39,37±0,09 ^a	38,67±0,15 ^a
α,β -amirinas	10	38,59±0,22	35,10±0,40 ^a	35,60±0,45 ^a	34,96±0,25 ^a	35,17±0,28 ^a	34,96±0,26 ^a	39,53±0,13 ^a	37,91±0,07 ^{a,b}
	100	36,52±0,22	34,65±0,36 ^a	35,14±0,41 ^a	34,94±0,27 ^a	34,83±0,27 ^a	34,60±0,30 ^a	38,87±0,20 ^a	38,96±0,13 ^a
Vermelho de Rutênio	1,5	37,00±0,07	33,28±0,18 ^a	33,49±0,13 ^a	33,36±0,10 ^a	33,22±0,73 ^a	34,65±0,28 ^a	36,80±0,15 ^a	37,27±0,15 ^{a,b}

Cada valor representa a média \pm E. P. M. para 8 animais. Vermelho de Rutênio foi administrado duas vezes ao dia (12/12 h), por um período de três dias, iniciando-se os experimentos. Todos os grupos (exceto normal) foram tratados com capsaicina (10 mg/kg, s.c.) e medida a temperatura retal nos tempos T0 a 24 h após a sua administração. A capsaicina foi administrada duas horas após o tratamento com a mistura de α,β -amirinas. ^ap<0,001 vs controle normal. ^bp<0,001 vs controle Capsaicina (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls).

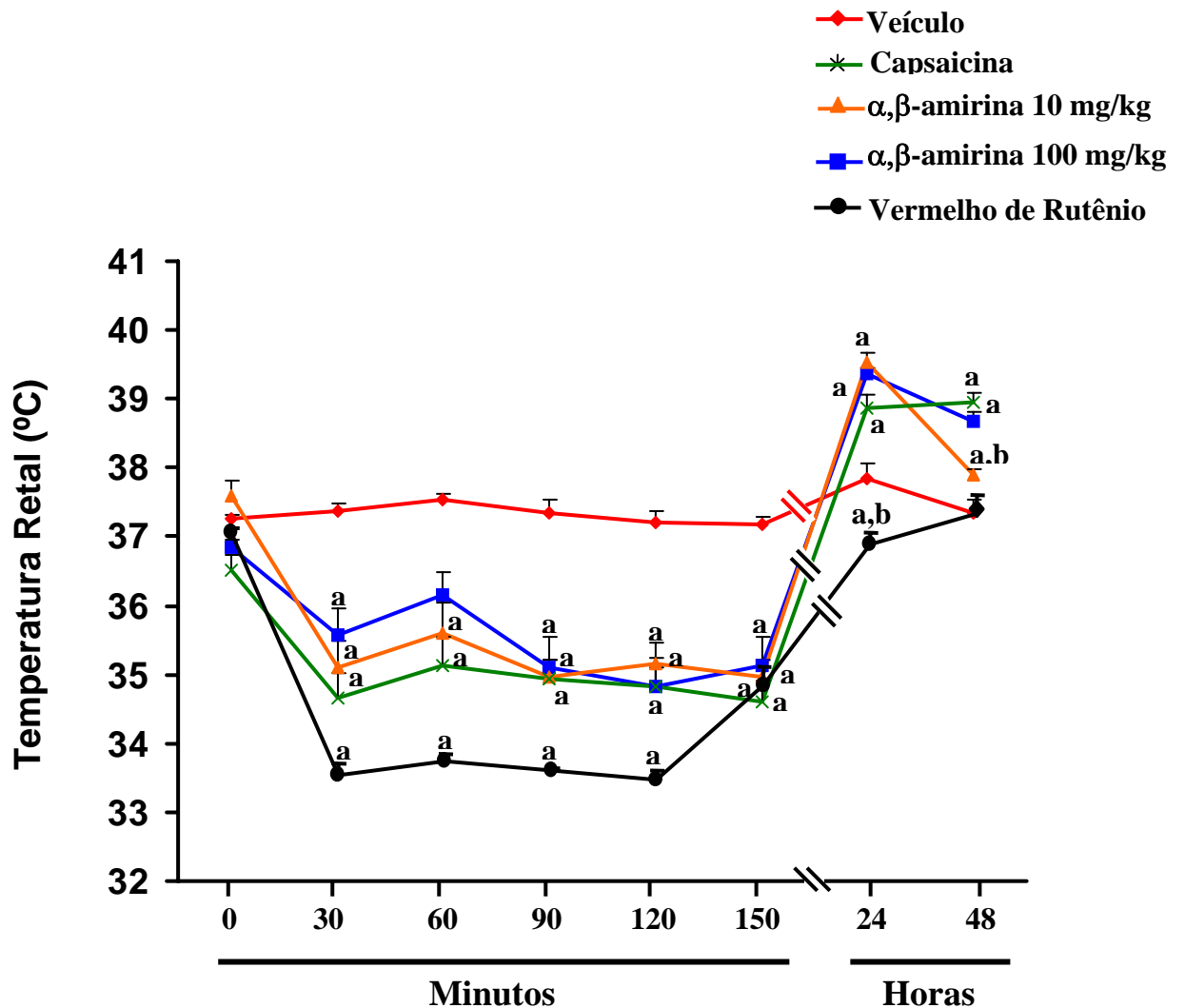


FIGURA 27. Efeito da mistura de α - e β -amirina e vermelho de rutênio sobre a resposta térmica induzida por capsaicina em camundongos. A Veículo (3% de Tween 80, v.o.), mistura de α - e β -amirina (10 e 100 mg/kg, v.o.) e vermelho de rutênio (1,5 mg/kg, s.c.), duas vezes ao dia durante três dias consecutivos. A temperatura retal foi medida antes e 30, 60, 90, 120 e 150 min. Os valores representam a média \pm E.P.M. da temperatura retal para 8 animais. ^a $p < 0,05$ vs controle veículo; ^b $p < 0,05$ vs capsaicina (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

5.6. ATIVIDADE HEPATOPROTETORA

5.6.1. Efeito da mistura de α - e β -amirina na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno

A administração via oral de acetaminofeno (500 mg/kg) mostrou uma significativa redução ($p < 0,05$) nos níveis de NP-SH ($432,17 \pm 32,37 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo controle normal ($655,17 \pm 24,10 \mu\text{g/g}$ de tecido).

O pré-tratamento via oral 48, 24 e 2 h antes do acetaminofeno com α - e β -amirina nas doses de 50 e 100 mg/kg, foi capaz de impedir a depleção dos grupos sulfidrila produzidos pelo acetaminofeno ($612,54 \pm 32,78$ e $642,01 \pm 28,59 \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparado ao grupo acetaminofeno ($432,17 \pm 32,37 \mu\text{g/g}$ de tecido).

A administração intraperitoneal de N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg), inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a depleção dos grupos sulfidrila ($611,83 \pm 32,29 \mu\text{g/g}$ de tecido) produzidas pelo acetaminofeno (**Tabela 25 e Figura 28**).

A administração de acetaminofeno (500 mg/kg, v.o.) aumentou de forma significativa ($p < 0,01$) os níveis AST e ALT séricos ($107,28 \pm 16,02$ e $134,35 \pm 19,76 \text{ U/L}$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($43,17 \pm 7,34$ e $61,98 \pm 11,27 \text{ U/L}$, respectivamente).

O tratamento com os triterpenos α - e β -amirina nas doses de 50 e 100 mg/kg via oral, promoveu uma redução significativa ($p < 0,01$) dos níveis séricos de AST ($32,53 \pm 6,98$ e $28,57 \pm 4,42 \text{ U/L}$, respectivamente) e ALT ($61,28 \pm 12,49$ e $44,15 \pm 6,65 \text{ U/L}$, respectivamente) quando comparado ao grupo acetaminofeno ($107,28 \pm 16,02$ e $134,35 \pm$

19,76 U/L, respectivamente). Da mesma forma, NAC (750 mg/kg, i.p.) promoveu redução significativa ($p < 0,01$) em ambos os níveis de enzimas séricas ($29,96 \pm 6,46$ e $41,46 \pm 5,34$ U/L, respectivamente) (**Tabela 26 e Figura 29**).

O pré-tratamento com α - e β -amirina nas doses de 50 e 100 mg/kg via oral, antes da administração de acetaminofeno, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) os escores de lesão hepática (2 [1-3] e 1,5 [1-2], respectivamente) quando comparado ao grupo acetaminofeno (5 [4-5]), o que também foi observado nos animais tratados com NAC (0,5 [0-1]) (**Tabela 27**).

A análise histológica dos fígados dos animais tratados com veículo (3% de Tween 80) demonstrou tecido com arquitetura preservada, apresentando hepatócitos com disposição normal. Já o grupo tratado com acetaminofeno, mostrou necrose centrolobular, congestão e intensa área de infiltrado de células inflamatórias. No grupo que recebeu NAC observou-se presença de hepatócitos com arquitetura parcialmente preservada e pequenas áreas de necrose e infiltrado de células inflamatórias. Os animais tratados com os triterpenos α - e β -amirina, apresentou hepatócitos com arquitetura bem preservada, com pequenas áreas de necrose e infiltrado de células inflamatórias (**Figura 30**).

Tabela 25. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre os níveis de glutathiona na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (μg/g tecido)
Controle normal	---	655,17 \pm 24,10
Acetaminofeno	500	432,17 \pm 32,37 ^a
α , β -amirina	50	612,54 \pm 32,78 ^b
	100	642,01 \pm 28,59 ^b
NAC	750	611,83 \pm 32,29 ^b

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutathiona (NP-SH) para 8 animais. As dosagens foram analisadas 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, i.p.) foi administrada 2 horas antes e veículo (Tween 80) e a mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de acetaminofeno. ^ap<0,05 vs controle normal; ^bp<0,05 vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

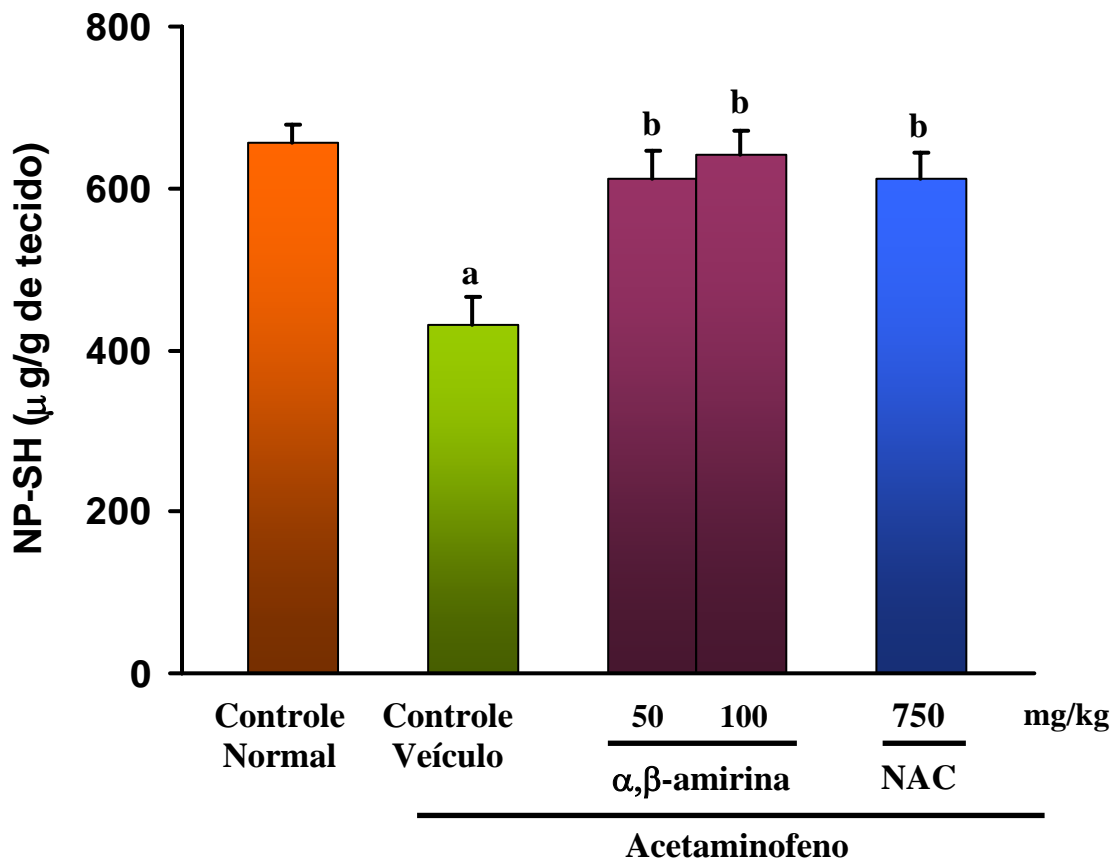


FIGURA 28. Efeito da mistura de α - e β -amirina e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de grupos sulfidrilas não protéicos (NP-SH) na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos. Os níveis de glutatona hepática (NP-SH) foram analisados 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes e NAC (750 mg/kg, i.p.) 2 horas antes do tratamento com acetaminofeno. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de oito animais. ^ap<0,05 vs controle normal; ^bp<0,05 vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 26. Efeito da mistura de α - e β -amirina nos níveis de AST e ALT na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)
Controle Normal	---	43,17 \pm 7,34	61,98 \pm 11,27
Acetaminofeno	500	107,28 \pm 16,02 ^a	134,35 \pm 19,76 ^a
α,β - amirina	50	32,53 \pm 6,98 ^b	61,28 \pm 12,49 ^b
	100	28,57 \pm 4,42 ^b	44,15 \pm 6,65 ^b
NAC	750	29,96 \pm 6,46 ^b	41,46 \pm 5,34 ^b

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) das concentrações séricas de ALT e AST (U/L) para 8 animais. As transaminases foram analisadas 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg, i.p.) foi administrada 2 horas antes e veículo (Tween 80) e a mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de acetaminofeno. ^ap<0,01 vs controle normal; ^bp<0,01 vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

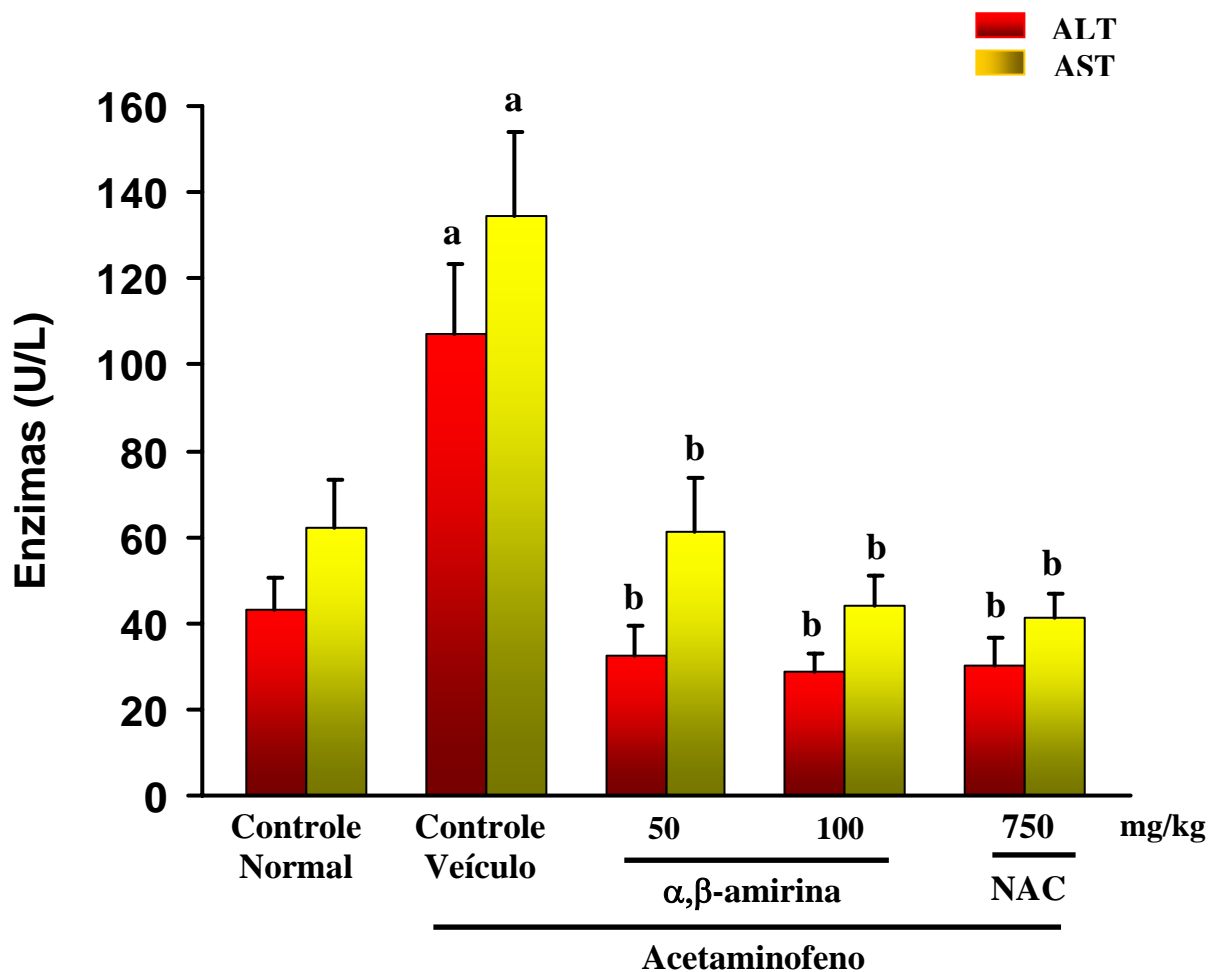
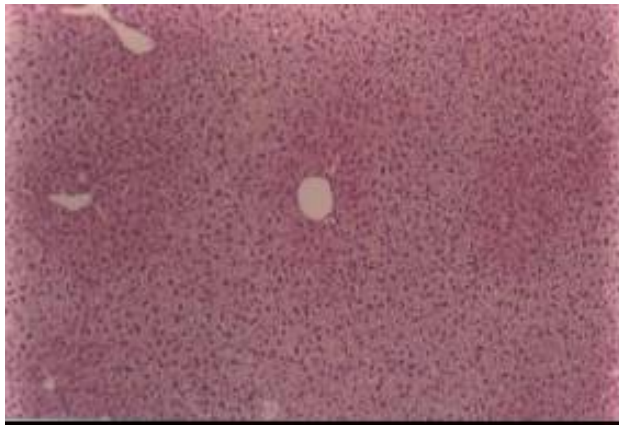


FIGURA 29. Efeito da mistura de α - e β -amirina e N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos. Os níveis séricos das transaminases ALT e AST foram analisados 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). A mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes e NAC (750 mg/kg, i.p.) 2 horas antes do tratamento com acetaminofeno. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para oito animais. ^a $p < 0,01$ vs controle normal; ^b $p < 0,01$ vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 27. Efeito da mistura de α - e β -amirina nos escores de lesão hepática na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em camundongos

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Escores de Lesão Hepática
Controle Normal	---	0 (0 – 0)
Acetaminofeno	-	5 (4 – 5) ^a
α,β amirina	50	2 (1 – 3) ^b
	100	1,5 (1 – 2) ^c
NAC	750	0,5 (0 – 1) ^c

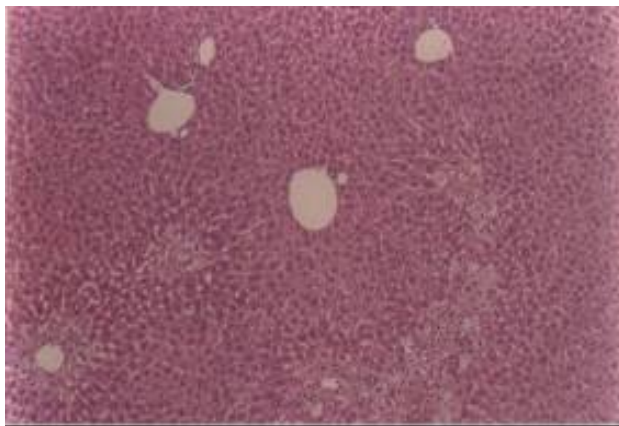
Os resultados são expressos em termo de mediana mínimos e máximos dos escores de lesão hepática para 8 animais. Os animais foram sacrificados 24 horas após a administração oral de acetaminofeno (500 mg/kg). Os fígados foram coletados e examinados histologicamente e atribuídos escores numa escala de 0 a 5 para presença e intensidade das lesões. A N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/Kg, i.p.) foi administrada 2 horas antes e veículo (Tween 80) e a mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de acetaminofeno (500 mg/kg). ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,05 vs controle acetaminofeno; ^cp<0,01 vs controle acetaminofeno (ANOVA e Teste de Kruskal Wallis - Dunnett).



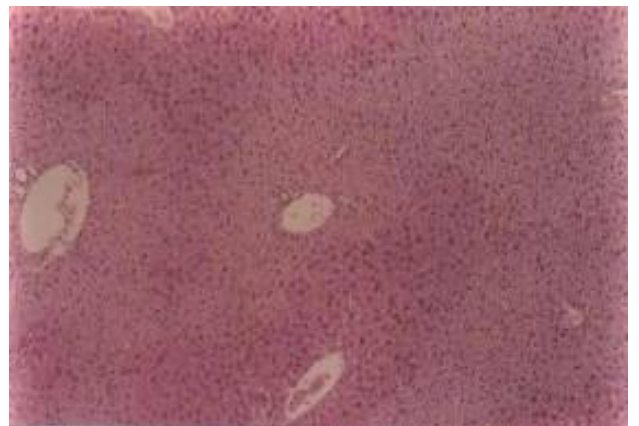
A – Controle normal



B – Controle Acetaminofeno



C – α,β -amirina 100 mg/kg



D – N-acetilcisteína

FIGURA 30. Microfotografias de fígados de camundongos. (A) Animais tratados com salina (v.o.); (B) Animais tratados com acetaminofeno (500 mg/kg, v.o.); (C) Animais tratados com α - e β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e acetaminofeno; (D) Animais tratados com NAC (750 mg/kg, i.p.) e acetaminofeno.

5.6.2. Efeito da mistura de α - e β -amirina na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos

Dexametasona (DEX, 2 mg/kg) inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a depleção dos grupos sulfidrila produzidos pela GalN/LPS sendo o mesmo efeito observado com a administração intraperitoneal de N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg) ($167,82 \pm 20,54$ e $125,45 \pm 16,15$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparado ao grupo GalN/LPS ($70,07 \pm 10,17$ $\mu\text{g/g}$ de tecido).

A administração de α - e β -amirina nas doses de 50 e 100 mg/kg não foi capaz de aumentar os níveis de glutatona hepática ($81,11 \pm 7,60$ e $96,36 \pm 5,01$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente) quando comparada ao grupo GalN/LPS (**Tabela 28 e Figura 31**).

Os níveis séricos das transaminases ALT e AST, aumentaram de forma significativa ($p < 0,01$) no grupo GalN/LPS ($120,64 \pm 51,32$ e $70,27 \pm 19,47$ U/L, respectivamente) quando comparado ao grupo controle normal ($16,40 \pm 2,58$ e $32,12 \pm 5,21$ U/L, respectivamente).

O tratamento oral com a mistura de α - e β -amirina nas doses de 50 e 100 mg/kg, reduziu significativamente ($p < 0,01$) os níveis séricos de ALT ($17,10 \pm 1,62$ e $22,17 \pm 2,11$ U/L, respectivamente) quando comparado ao grupo controle GalN/LPS ($120,64 \pm 51,32$ U/L). Entretanto, não houve diferença significativa nos níveis séricos de AST.

NAC (750 mg/kg, i.p.) e Dexametasona (2 mg/kg, s.c.) promoveram redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis de ALT ($22,52 \pm 6,61$ e $25,31 \pm 1,14$ U/L, respectivamente) e AST ($32,12 \pm 3,41$ e $44,34 \pm 4,51$ U/L, respectivamente) quando

comparado ao grupo controle GalN/LPS ($120,64 \pm 51,32$ e $70,27 \pm 19,47$ U/L, respectivamente) (**Tabela 29 e Figura 32**).

O pré-tratamento oral com α - e β -amirina nas doses de 50 e 100 mg/kg, antes da administração de GalN/LPS, reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) os escores de lesão hepática (1 [1-2] e 1 [1-2]) quando comparado ao grupo GalN/LPS (5 [5-5]), observado também no grupo tratado com Dexametasona (1 [0-1]) (**Tabela 30**).

A análise histológica dos fígados dos animais tratados com veículo (3% de Tween 80) demonstrou tecido com arquitetura preservada, apresentando hepatócitos com disposição normal. Já o grupo tratado com GalN/LPS, mostrou extensas áreas hemorrágicas com presença de células necróticas e de infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfosnucleares (PMN) e presença de células apoptóticas. O grupo que recebeu Dexametasona observou-se presença de pequenos focos de necrose com infiltrado inflamatório (mononucleares), presença de neutrófilos e pontos de infiltração inflamatória e células apoptóticas.

Nos animais tratados com os triterpenos α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) observou-se pequenos pontos de infiltrado inflamatório não observando áreas hemorrágicas e presença de células necróticas (**Figura 33**).

Tabela 28. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre os níveis de glutatona na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	NP-SH (μg/g tecido)
Controle normal	---	155,91 \pm 4,03
GalN/LPS	800/75 x 10 ⁻³	70,07 \pm 10,17 ^a
α , β -amirina	50	81,11 \pm 7,60
	100	96,36 \pm 5,01
NAC	750	125,45 \pm 16,15 ^b
DEX	2,0	167,82 \pm 20,54 ^c

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para os níveis hepáticos de glutatona (NP-SH) para 8 animais. As dosagens foram analisadas 24 horas após a administração de GalN/LPS (800/75x10⁻³ mg/kg). A N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg, i.p.) e Dexametasona (DEX, 2 mg/Kg, s.c.) foram administradas 2 horas antes e veículo (Tween 80) e a mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de GalN/LPS. ^ap<0,01 vs controle normal; ^bp<0,05 vs controle GalN/LPS; ^cp<0,01 vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

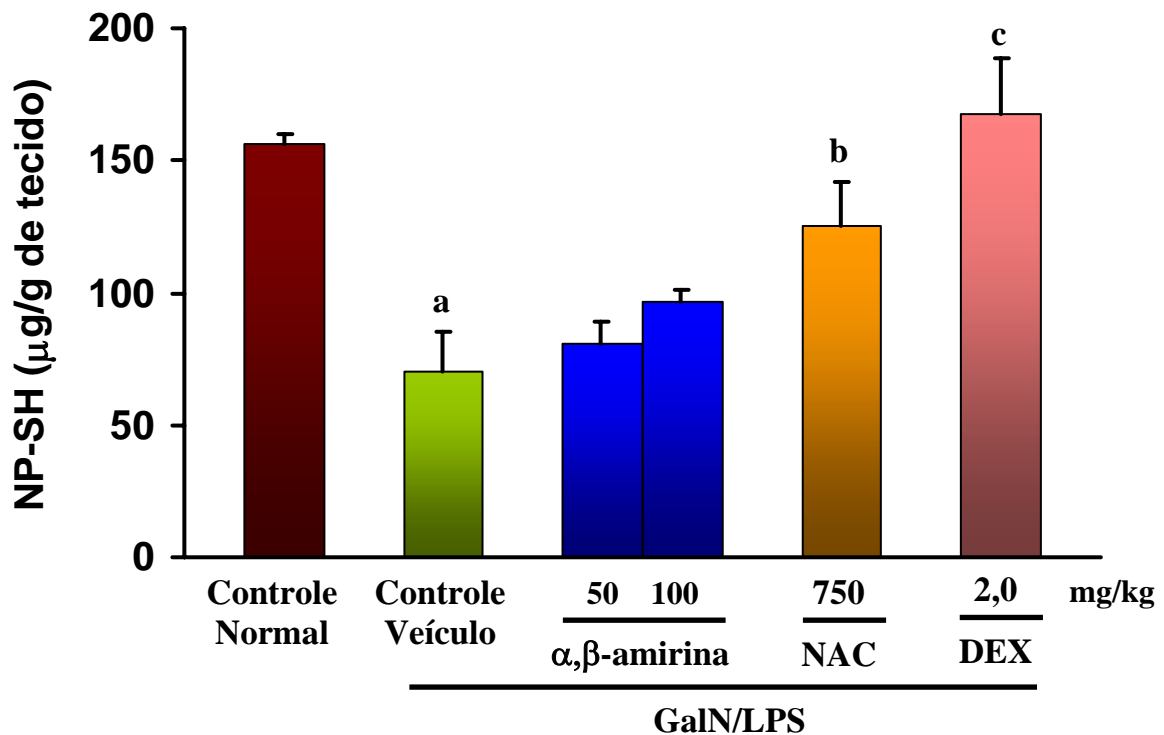


FIGURA 31. Efeito da mistura de α - e β -amirina, N-acetilcisteína (NAC) e dexametasona (DEX) sobre os níveis de grupos sulfidrila não protéicos (NP-SH) na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos. Os níveis de glutatona hepática (NP-SH) foram analisados 6 horas após a administração intraperitoneal de GalN/LPS ($800/75 \times 10^{-3}$ mg/kg). A mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes, NAC (750 mg/kg, i.p.) e DEX (2,0 mg/kg, s.c.) 2 horas antes, do tratamento GalN/LPS. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para oito animais. ^a $p < 0,01$ vs controle normal; ^b $p < 0,05$ vs controle GalN/LPS; ^c $p < 0,01$ vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

Tabela 29. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre os Níveis Séricos de AST e ALT na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
Controle normal	---	16,40 \pm 2,58	32,12 \pm 5,21
GalN /LPS	800/75x10 ⁻³	120,64 \pm 51,32 ^a	70,27 \pm 19,47 ^a
α , β -amirina	50	17,10 \pm 1,62 ^b	40,59 \pm 3,71
	100	22,17 \pm 2,11 ^b	43,82 \pm 4,37
NAC	750	22,52 \pm 6,61 ^c	32,12 \pm 3,41 ^c
DEX	2,0	25,31 \pm 1,14 ^c	44,34 \pm 4,51

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) das concentrações séricas de ALT e AST (U/L) para oito animais. As transaminases foram analisadas 2 horas após a administração intraperitoneal de GalN/LPS (800/75x10⁻³ mg/kg). A N-acetilcisteína (NAC - 750 mg/kg, i.p.) foi administrada 2 horas antes e, veículo (Tween 80) e a mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes da administração de GalN/LPS. ^ap<0,01 vs controle normal; ^bp<0,01 vs controle GalN/LPS; ^cp<0,001 vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

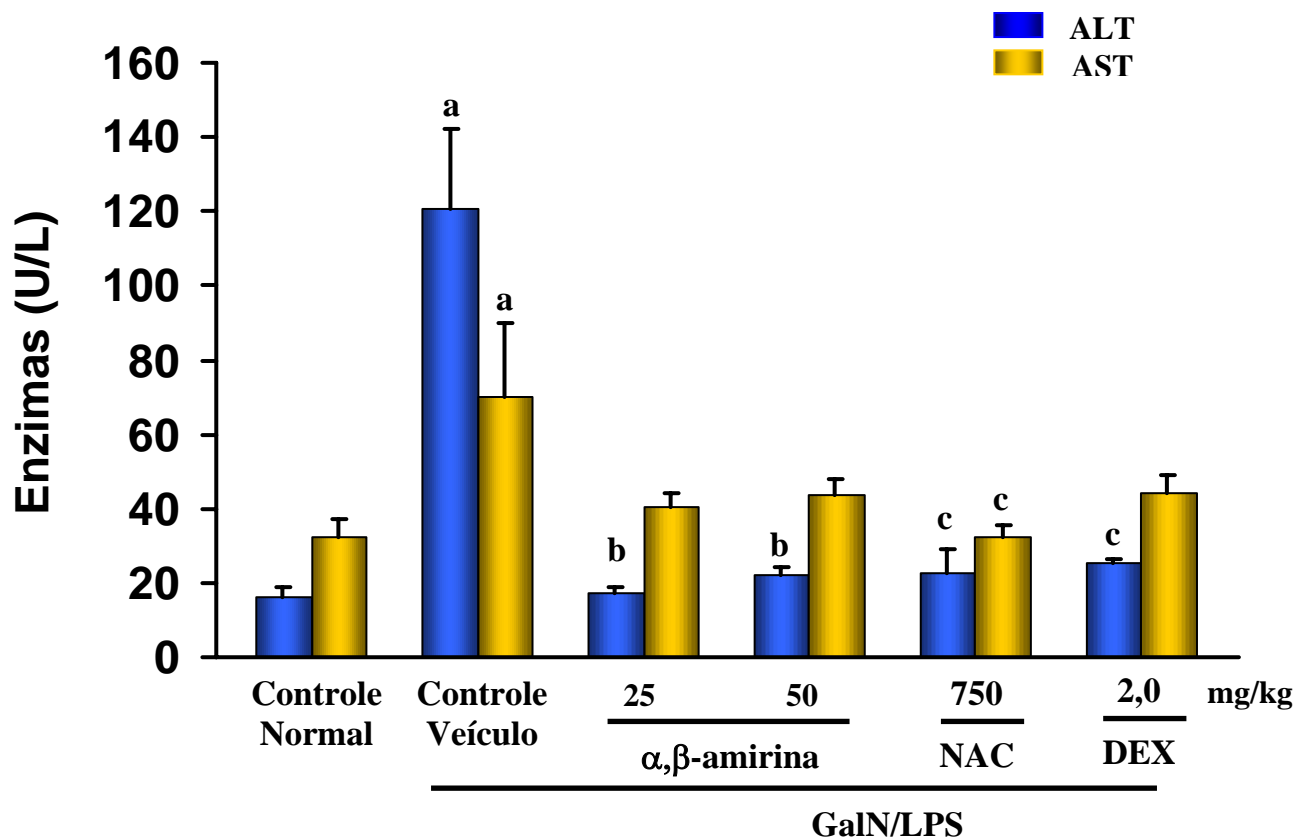
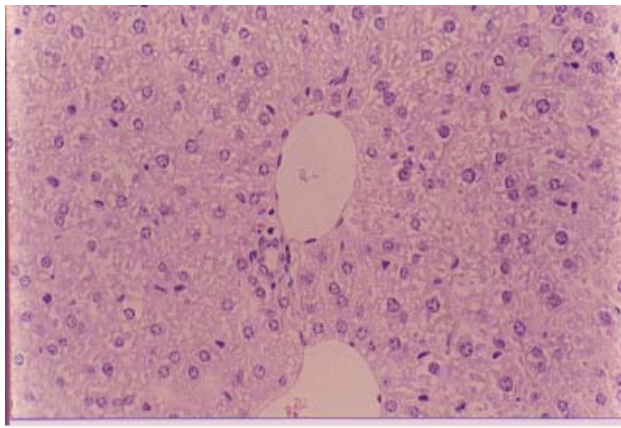


FIGURA 32. Efeito da mistura de α - e β -amirina, N-acetilcisteína (NAC) e dexametasona (DEX) sobre os níveis séricos de ALT e AST na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos. Os níveis séricos das transaminases ALT e AST foram analisados 2 horas após a administração intraperitoneal de GalN/LPS ($800/75 \times 10^{-3}$ mg/kg). A mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) e veículo (controle normal) foram administrados 48, 24 e 2 horas antes, NAC (750 mg/kg, i.p.) e DEX (2,0 mg/kg, s.c.) 2 horas antes, do tratamento GalN/LPS. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para oito animais. ^a $p < 0,01$ vs controle normal; ^b $p < 0,01$ vs controle GalN/LPS; ^c $p < 0,001$ vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

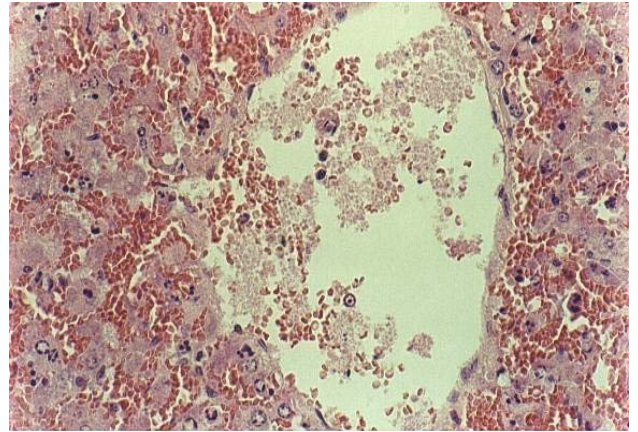
Tabela 30. Efeito da mistura de α - e β -amirina nos Escores de Lesão Hepática na hepatotoxicidade induzida por D-Galactosamina/LPS em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Escores de Lesão Hepática
Controle Normal	---	0 (0 – 0)
GalN/LPS	800/75x10 ⁻³	5 (5 – 5) ^a
α , β -amirina	50	1 (1 – 2) ^b
	100	1 (1 – 2) ^b
DEX	750	1 (0 – 1) ^c

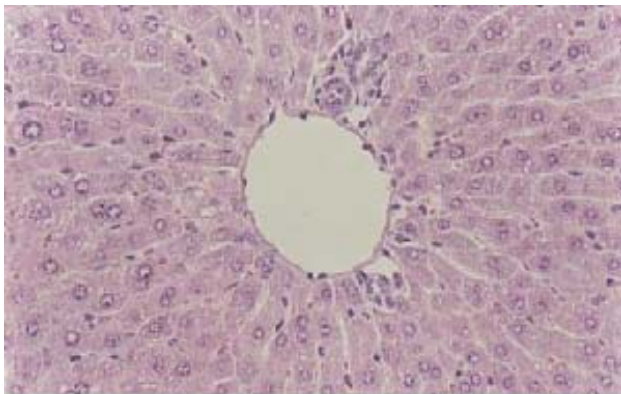
Os resultados são expressos em termo de mediana mínimos e máximos dos escores de lesão hepática para oito animais. Os animais foram sacrificados 6 horas após a administração intraperitoneal de GalN/LPS (800/75x10⁻³ mg/kg). Os fígados foram coletados e examinados histologicamente e atribuídos escores numa escala de 0 a 5 para presença e intensidade das lesões. A dexametasona (DEX, 2,0 mg/kg, s.c.) foi administrada 2 horas antes, veículo (Tween 80) e a mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg, v.o.) 48, 24 e 2 horas antes, da administração de GalN/LPS. ^ap<0,001 vs controle normal; ^bp<0,05 vs controle GalN/LPS; ^cp<0,001 vs controle GalN/LPS (ANOVA e Teste de Kruskal Wallis - Dunnett).



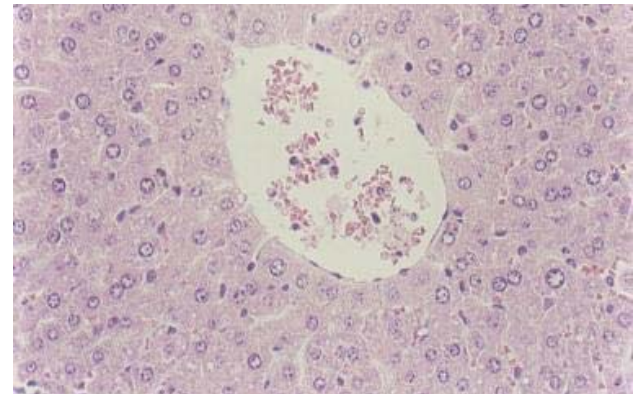
A - Controle Veículo



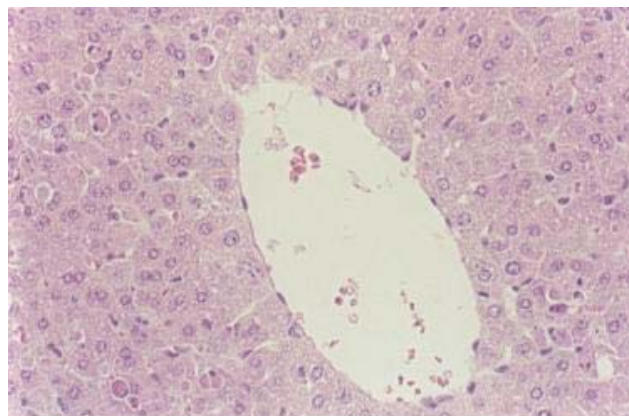
B - Controle GalN/LPS



C - α,β -amirina 50 mg/kg



D - α,β -amirina 100 mg/kg



E - Dexametasona

FIGURA 33. Microfotografias de fígados de camundongos. (A) animais tratados com veículo (3% de Tween 80 - controle normal); (B) animais tratados com GalN/LPS; (C) animais tratados com mistura de α - e β - amirina 50 mg/kg; (D) animais tratados com mistura de α - e β - amirina 100 mg/kg; (E) animais tratados com dexametasona (2,0 mg/kg) (HE, 400x).

5.7. ATIVIDADE DA MISTURA DE α - E β -AMIRINA NOS TESTES DE ROTA-ROD, CAMPO ABERTO E TEMPO DE SONO

A mistura de triterpenos α - e β -amirina, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, por via oral, não alterou o tempo de permanência dos animais no aparelho de “rota rod”, como também não influenciou na a atividade locomotora e tão pouco modificou o tempo de sono dos animais quando comparados aos grupos controles (**Tabelas 31 e 32**).

O pré-tratamento com a mistura de α - e β -amirina, nas doses de 50 e 100 mg/kg, potencializou o tempo de sono induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) em camundongos. Entretanto, a significância estatística foi observada apenas na dose de 100 mg/kg (**Tabela 33**).

Tabela 31. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a coordenação motora em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Tempo de Permanência (s/2min)
Controle (veículo)	---	117,37 \pm 2,62
α,β -amirina	3	120,00 \pm 0,00
	10	114,14 \pm 3,82
	30	119,28 \pm 0,71

Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80) ou mistura de α - e β -amirina (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) 1 hora antes do início de cada experimento. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do tempo de permanência no aparelho de “rota-rod”.

Tabela 32. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre a atividade exploratória em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Frequência de Locomoção (4min)
Controle (veículo)	---	41,11 \pm 2,43
α,β -amirina	3	45,30 \pm 3,26
	10	41,88 \pm 3,71
	30	36,62 \pm 2,58
	100	36,52 \pm 2,81
	200	37,38 \pm 3,45

Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80) ou mistura de α - e β -amirina (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) 1 hora antes do início de cada experimento. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da frequência de locomoção, que consiste do ato do animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões da arena do campo aberto, durante o período de 4 min.

Tabela 33. Efeito da mistura de α - e β -amirina sobre o tempo de Sono induzido por pentobarbital sódico em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg)	Tempo de Sono (min)
Controle (veículo)	---	60,55 \pm 4,71
α,β -amirina	3	43,42 \pm 3,34
	10	44,50 \pm 4,63
	30	61,75 \pm 4,21
	50	86,25 \pm 7,89
	100	105,25 \pm 5,29 ^a

Os animais foram tratados com veículo (3% de Tween 80) ou mistura de α - e β -amirina (3, 10, 30, 50 e 100 mg/kg, v.o.) 1 hora antes do início de cada experimento. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) do tempo gasto pelo animal dormindo, que foi registrado (min) desde o momento do início do sono até o retorno à situação de alerta. ^ap<0,001 vs controle (ANOVA e Teste de Student Newman Keul).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Do ponto de vista histórico, os produtos naturais sempre desempenharam um importante papel no processo de obtenção de novos fármacos. A maior parte das drogas comercializadas é de origem natural ou produtos sintéticos originados a partir de produtos naturais.

A partir dos produtos naturais, incluindo as toxinas extraídas de animais, de bactérias, de fungos ou de plantas, foi possível compreender of diversos fenômenos relacionados à biologia celular e molecular e à eletrofisiologia, permitindo que estruturas biológicas fossem identificadas, isoladas e clonadas. O que tornou possível à indústria farmacêutica modelar drogas providas de maior seletividade e também mais eficazes contra várias patologias de maior complexidade (CALIXTO, 2003).

Resinas são secreções sólidas ou semi-sólidas produzidas por plantas e árvores, utilizadas para os mais variados fins, na indústria de perfume, fabricação de vernizes e em rituais religiosos. A partir de incisões obtém-se um exsudato resinoso utilizado na medicina popular com antiinflamatório, analgésico e na cicatrização de feridas (CORRÊA, 1984; PERNET, 1972; SIANI et al., 1999).

Muitas espécies de *Protium* exsudam uma resina aromática empregada na preparação de incensos utilizados em rituais religiosos, e na medicina tradicional por suas propriedades biológicas (DEHARO et al., 2001).

Análise fitoquímica de *P. heptaphyllum* revelou a presença de monoterpenos e triterpenos pentacíclicos, incluindo α - e β -amirina (SUSUNAGA ET AL., 2001; VIEIRA-JUNIOR, 2005). Aos triterpenos são atribuídas diversas atividades farmacológicas, dentre estas podemos destacar: atividade antiinflamatória, antiulcerogênica e antinociceptiva (NIKIEMA et al., 2001; ARRIETA et al., 2003; SPESSOTO et al., 2003).

Apesar de sua utilização pela medicina popular, para os mais variados fins, são escassos os estudos que comprovem a utilização de resinas como um agente antiinflamatório ou antiulcerogênico. Dessa forma, sabendo-se a resina de *P. heptaphyllum* é rica em triterpenos pentacíclicos, avaliamos o seu potencial tóxico, antiinflamatório e gastroprotetor em modelos experimentais de lesões gástricas e inflamação. E, sendo os triterpenos α - e β -amirina os constituintes majoritários da resina de *P. heptaphyllum*, avaliamos sua toxicidade aguda e suas atividades farmacológicas em modelos animais de lesões gástricas, nocicepção, prurido e hepatotoxicidade.

TOXICIDADE

A administração oral da resina e da mistura de α - e β -amirina até as doses de 5 g/kg e 3 g/kg, respectivamente, não foram tóxicas aos camundongos com até 72 horas de

observação. Da mesma forma, os animais que receberam, por via intraperitoneal, a resina e a mistura de α - e β -amirina até as doses de até 1 g/kg e 2 g/kg, respectivamente, não mostraram sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi observada no período de até 72 horas.

Os estudos de toxicidade aguda demonstram que, tanto a resina quanto a mistura de triterpenos, α - e β -amirina, possuem baixa toxicidade, uma vez que não foi possível estabelecer a DL_{50} , para ambos os produtos testados.

Artemia sp (Artemidae), uma larva de camarão de salmoura, é um invertebrado usado como teste alternativo para se determinar a toxicidade de produtos naturais e químicos. Nesta metodologia, é possível correlacionar a letalidade das larvas e a citotoxicidade da substância em estudo (CARBALLO et al., 2002). A literatura relata que existe uma correlação entre a toxicidade geral frente a *Artemia salina* e a citotoxicidade diante de linhagens de células tumorais humanas (CAVALCANTE et al., 2000).

Este teste foi empregado no presente estudo como objetivo de se avaliar possíveis efeitos tóxicos da resina e da mistura de triterpenos α - e β -amirina sobre *Artemia* sp, determinando seus os valores de CL_{50} . Os resultados mostraram que a Concentração Letal Média (CL_{50}) da resina e da mistura de α - e β -amirina, foram de $400 \pm 27,85$ e $42,54 \pm 19,96$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Os resultados obtidos com resina utilizando *Artemia* sp corroboram com aqueles em mamíferos, cuja a administração por via oral ou intraperitoneal não causaram sinais de toxicidade significativos. Por outro lado, a mistura de triterpenos α - e β -amirina, apesar de exibir baixa toxicidade *in vivo*, mostrou toxicidade similar ao dicromato de potássio, no modelo citotoxicidade com larvas de camarão. Este efeito é esperado, tendo em vista que efeitos citotóxicos de triterpenos pentacíclicos são observados na literatura e muitos são considerados potentes agentes anticancerígenos, tais como os ácidos betulínico, pomólico e oleanólico (FERNANDEZ et al., 2003).

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

Aos triterpenos são atribuídas diversas atividades farmacológicas, dentre estas podemos destacar: atividade antiinflamatória, antiulcerogênica e antinociceptiva (NIKIEMA et al., 2001; ARRIETA et al., 2003; SPESSOTO et al., 2003).

Apesar de sua utilização pela medicina popular, para os mais variados fins, são escassos os estudos que comprovem a utilização de resinas como um agente antiinflamatório ou antiulcerogênico. Dessa forma, sabendo-se a resina de *P heptaphyllum* é rica em triterpenos pentacíclicos, sendo os triterpenos α - e β -amirina os constituintes majoritários, avaliamos o potencial efeito antiinflamatório da resina nos modelos experimentais de inflamação.

Avaliando-se uma possível atividade antiinflamatória da resina, utilizamos modelos de edema de pata induzido por carragenina, aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético e granuloma por “pellet” de algodão.

O edema de pata induzido por carragenina tem sido utilizado como um modelo de inflamação aguda com o fim de se investigar os efeitos de drogas antiinflamatórias, uma vez que não produz efeitos sistêmicos, possui elevado grau de reprodutibilidade e sua ação inflamatória pode ser inibida por agentes antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais (WINTER et al., 1962). Neste modelo estão envolvidas três fases distintas: a primeira com liberação de histamina, serotonina, a segunda é mediada pela liberação de cininas, como a bradicinina e a fase terminal está associada com a liberação de prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971). Os resultados mostraram que a resina (200 e 400 mg/kg) não foi efetiva em diminuir o edema provocado por carragenina. Indometacina, utilizada como droga padrão, reduziu significativamente o edema quando comparado ao controle veículo. Os resultados mostram que a resina parece não interferir com os mediadores inflamatórios presentes no edema por carragenina.

O granuloma por “pellets” de algodão é um modelo bastante utilizado no estudo dos componentes presentes na exsudação, transudação e proliferação observados na inflamação crônica. O fluido absorvido pelos “pellets” influenciam o peso úmido do granuloma e o peso seco está correlacionado com a quantidade de tecido granulomatoso formado (RAMPRASATH et al., 2004). A administração oral da resina (200 e 400 mg/kg) promoveu redução significativa o peso seco dos granulomas, mas não do peso úmido. Este

resultado indica que a resina inibe a proliferação de fibroblastos, atuando sobre o processo inflamatório crônico.

Na inflamação aguda induzida pelo ácido acético há aumento nos níveis peritoneais das prostaglandinas PGE₂ e PGF₂ α , serotonina e histamina, constituindo um modelo útil no estudo de drogas com ação antiinflamatória periférica (KOU et al., 2005). Os resultados demonstram que a resina (400 mg/kg) inibiu, de forma significativa, a permeabilidade vascular induzida por ácido acético, que corresponde à fase exsudativa inicial da inflamação, onde há a participação de histamina e serotonina, substâncias que exibem papel menos importantes no modelo do edema induzido por carragenina (WINTER et al., 1962; WHITTLE et al., 1964).

Assim, é possível que a resina exerça sua atividade antiinflamatória ao inibir a degranulação de mastócitos, afetando assim, o aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético. Em conclusão, os dados mostram que a resina possui atividade antiinflamatória na fase inicial (permeabilidade vascular) e tardia (granuloma por “pellets” de algodão) da inflamação.

ATIVIDADE GASTROPROTETORA

A combinação de atividade antiinflamatória e gastroprotetora em uma mesma substância é favorável tendo em vista limitações encontradas em agentes antiinflamatórios

que mostram tendência em produzir irritação gástrica, sangramento e danos à mucosa gástrica (LANZA, 1984; FIORUCCI et al., 2001).

A mucosa gástrica é exposta continuamente a agentes potencialmente prejudiciais tais como, ácido, pepsina, ácidos biliares, condimentos, produtos bacterianos e drogas. Estes agentes estão implicados nas patogêneses das úlceras gástricas e muitos produtos farmacêuticos empregados para o tratamento das úlceras não são completamente eficazes, além de produzir muitos efeitos adversos (TOMA et al., 2002).

Os produtos derivados de plantas são uma das mais promissoras fontes de novas drogas e têm mostrado resultados satisfatórios no tratamento das úlceras gástricas (ALKOFAHI et al., 1999; ZAYACHKIVSKA et al., 2004). Dentre estes compostos, encontram-se os triterpenos (AL-HOWIRINY et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2004).

Estudos fitoquímicos demonstram que grupamento hidroxila na posição 3 parece conferir propriedades antiulcerogênicas a triterpenos pentacíclicos (NAVARRETE et al., 2002). Tendo em vista que a resina de *P. heptaphyllum* é rica em triterpenos pentacíclicos, do tipo α - e β -amirina, resolvemos avaliar se a resina e a mistura destes triterpenos possuem atividade gastroprotetora em modelos experimentais de lesões gástricas.

Etanol e etanol acidificado são modelos clássicos de avaliação de drogas com atividade antiulcerogênicas/citoprotetoras (ROBERT et al., 1979; SCHMEDA et al., 2002). A administração oral da resina de *P. heptaphyllum* (200 e 400 mg/kg), preveniu as

lesões gástricas induzidas pela administração de etanol e etanol acidificado. Nestes modelos, os radicais livres parecem contribuir com as lesões gástricas glandulares (TRIER et al., 1987; MATSUMOTO et al., 1992) e drogas com propriedades antioxidantes tendem a proteger a mucosa dos danos induzidos por estes agentes (MIZUI, et al., 1987; VALE et al., 1981).

A incidência das úlceras por etanol localiza-se predominantemente na parte glandular do estômago, com participação de leucotrienos C_4 (LTC_4) e produtos da degranulação de mastócitos (PESKAR et al., 1986; RAO et al., 2004) e estabilizadores de membrana de mastócitos podem reduzir os danos à mucosa gástrica, contribuindo para diminuição das lesões (CHO & OGLE, 1992). Além disso, etanol parece depletar os níveis dos grupos sulfidrílicos não protéicos no estômago e a restauração desses grupamentos parece ser importante na gastroproteção exercida por algumas drogas (TRIER et al., 1987).

Os resultados mostram que a NAC (750 mg/kg), mas não a resina (200 e 400 mg/kg), foi efetiva em restabelecer os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no estômago, no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol, sugerindo a possibilidade de outro mecanismo no efeito gastroprotetor da resina. No estudo em animais com piloro ligado por 4 horas, a resina não foi capaz de modificar o volume secretório gástrico, porém reduziu a acidez total no estômago de forma significativa, apontando que este efeito poderia estar envolvido na gastroproteção deste agente.

Sabe-se que a inibição de ambas as isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) induz a formação de úlcera gástrica (SULENYMAN et al., 2004). Indometacina, é um inibidor não seletivo de COX, que age por múltiplos mecanismos, incluindo supressão de PG's e produção de leucotrienos, o que resulta no aumento da suscetibilidade à lesões da mucosa e ulcerações gastroduodenais (BATISTA et al., 2004). As PG's tem efeito gastroprotetor, cujo mecanismo envolve a aumento na secreção de muco e bicarbonato, além do aumento no fluxo sanguíneo da mucosa (KANATANI et al., 2004). Dessa forma, o modelo de úlcera induzida por indometacina é um teste bastante utilizado para estudo de drogas antiulcerogênicas.

O pré-tratamento com a resina nas doses de 200 e 400 mg/kg, v.o., não inibiu o processo de ulceração induzida por indometacina. Por outro lado, a cimetidina; um antagonista H₂ foi capaz de inibir significativamente a formação das lesões. Estes resultados sugerem que o efeito gastroprotetor da resina não deve envolver aumento na produção de PG's ou inibição de leucotrienos.

Estudos mostrando atividade antioxidante de resinas naturais ricas em triterpenos pentacíclicos, tais como ácidos oleanólico, ursólico, glicirretínico amirina, lupeol são encontrados na literatura (ANDRIKOPOULOS et al., 2003; ASSIMOPOULOU et al., 2005). Assim, assumimos que o efeito gastroprotetor da resina, no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol, deve-se, pelo menos, à sua atividade antioxidante.

Uma das mais interessantes substâncias obtidas da pimenta vermelha (*Pipper*) é a capsaicina. Esta substância age sobre os neurônios sensoriais estimulando os receptores

de membrana, predominantemente receptores vanilóides (TRPV1), liberando neuropeptídeos tais como substância P e CGRP. Em pequenas doses, capsaicina funciona como um potente agente gastroprotetor, estimulando a microcirculação gástrica, porém em altas doses, capsaicina destrói seletivamente as terminações neuronais das fibras C, que resulta na inativação dos nervos sensoriais e perda dos reflexos nos quais estes nervos estão envolvidos (ABDEL-SALAM et al., 1999; SZOLCSANYI & BARTHO, 2001).

Evidências mostram que, no estômago, os nervos sensoriais sensíveis à capsaicina estão envolvidos no mecanismo de defesa local contra a formação de úlceras gástricas (ABDEL-SALAM et al., 1999) e que a administração oral de capsaicina exerce proteção contra lesões gástricas induzidas por etanol (PARK et al., 2000).

Sabendo-se que a resina de *P. heptaphyllum* possui propriedades gastroprotetoras (OLIVEIRA et al., 2004a) e sendo α - e β -amirina os triterpenos majoritários da resina, decidimos por investigar se estes triterpenóides seriam os responsáveis na gastroproteção observada no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos, investigando um possível papel das fibras aferentes sensíveis à capsaicina neste efeito.

Similar a capsaicina (2,5 a 20 mg/kg), a mistura α - e β -amirina (50 a 600 mg/kg) demonstrou proteção contra as lesões induzidas por etanol com tendência em diminuir a eficácia com altas doses, efeito observado em ambas as substâncias. Acredita-se que o mecanismo pelo qual a capsaicina exerce sua gastroproteção deve-se às

prostaglandinas e ao aumento da microcirculação na mucosa gástrica, aumento na secreção de muco e bicarbonato, efeitos estes, mediados pela ativação dos neurônios sensoriais aferentes no estômago (KATO et al., 2003).

Como visto, tratamento com pequenas doses de capsaicina protege a mucosa gástrica de danos provocados por agentes irritantes, porém a destruição funcional dos nervos sensoriais pelo pré-tratamento com altas doses de capsaicina aumentam a formação de lesões gástricas (BRZOZOWSKI et al., 1996).

Em nossos estudos, verificamos que com a dessensibilização química dos neurônios aferentes, o efeito gastroprotetor exercido pela capsaicina é revertido, comprovando a importância dessa via na atividade gastroprotetora da capsaicina. Os resultados mostraram que a gastroproteção observada com a mistura α - e β -amirina, na dose 100 mg/kg, via oral (67%) foi menor que a resina purificada, nas doses de 200 e 400 mg/kg, via oral (72 e 89%, respectivamente), sugerindo que outros triterpenóides podem estar presentes na resina e ativando outros mecanismos de proteção, por exemplo, prostaglandinas, óxido nítrico ou compostos sulfidrílicos (ARRIETA et al., 2002; PONGPIRIYADACHA et al., 2003).

Estes resultados confirmam que a mistura de triterpenos α - e β -amirina possui atividade gastro ou citoprotetora e que este efeito, envolve em parte, a ativação dos neurônios aferentes sensíveis à capsaicina.

ATIVIDADE ANTIPRURIGINOSA

Tendo em vista a quase inexistência de estudos envolvendo os triterpenos pentacíclicos do tipo α - e β -amirina, relacionando a atividade anti-alérgica destes compostos e, dando continuidade ao estudo farmacológico da mistura de triterpenos α - e β -amirina isolada de *P. heptaphyllum*, avaliamos se a mistura destes triterpenos apresenta atividades antipruritogênica em modelos de prurido induzido por dextrana T40 e composto 48/80, analisando o papel dos opióides endógenos e seus efeitos sobre a degranulação, induzida pelo composto 48/80, de mastócitos peritoneais *ex vivo*.

Prurido é um importante componente da dermatite atópica, e a utilização de métodos que quantifiquem a duração do “scratching” ou “coçar” é importante para se entender os fatores que podem causar o prurido, além da descoberta de novas drogas antipruriginosas (ORITO et al., 2004; OKU et al., 2003).

É possível encontrar na literatura trabalhos que mostram a eficácia de diversas classes de compostos naturais, como flavonóis, naftoquinonas, saponinas, frente ao prurido dependente e independente de histamina (ISHIGURO & OKU, 1994; FU et al., 2003).

Histamina é um dos conhecidos e mediador vasoativo, implicado na fase aguda da resposta de hipersensibilidade imediata, e uma das substâncias secretadas na degranulação de mastócitos. O composto 48/80 é um conhecido degranulador de mastócitos. A estimulação das mastócitos por esta substância parece envolver uma trilha de

sinais de transdução, culminando com a secreção de histamina. O composto 48/80 parece ativar proteínas G, ativando fosfolipase D de mastócitos, via complexo Proteína G-GTP, essencial na ativação e secreção dos mediadores presentes nos mastócitos (TASAKA et al., 1986; CHADI et al., 2000).

O efeito prurítico do composto 48/80 deve-se, em parte, a liberação de histamina e serotonina a partir dos mastócitos (INAGAKI et al., 1999), podendo ainda induzir prurido, em camundongos, por uma via independente desses autacóides (SUGIMOTO et al., 1998; INAGAKI et al., 2002). Esta pode ser a razão pela qual a ciproheptadina, um conhecido antagonista dos receptores histaminérgico e serotoninérgicos, bem como a amirina, mostraram maior eficácia em inibir o prurido induzido por dextrana T40 que pelo composto 48/80 (SANTOS et al., 2002). De forma similar ao composto 48/80, dextrana T40 também libera mediadores de mastócitos na pele, produzindo prurido em camundongos (CHAKRAVARTY et al., 1978).

Os resultados demonstram que a mistura de triterpenos, α - e β -amirina (50, 100 e 200 mg/kg), foi capaz de suprimir o prurido experimental induzido por dextrana T40 e pelo composto 48/80 em camundongos de forma significativa. Este é o primeiro estudo que demonstra atividade antiprurítica de triterpenos pentacíclicos através da inibição do prurido induzido por mastócitos.

No modelo de degranulação de mastócitos peritoneais *ex vivo*, pelo composto 48/80, a amirina, na dose de 100 mg/kg, foram capazes de prevenir a degranulação, efeito

comparável ao cetotifeno, um conhecido estabilizador de mastócitos (KIM et al., 2003). Corroborando com este achado, a mistura de triterpenos α - e β -amirina inibiu, significativamente, o edema de pata induzido pelo composto 48/80 e dextrana T40 em camundongos. Assim, os resultados encontrados sugerem que α - e β -amirina exerce sua ação modulando a ativação dos mastócitos.

Trabalhos anteriores mostram que antagonistas de receptores μ -opioides, como por exemplo, naloxona e naltrexona, inibem o prurido induzido pelo composto 48/80 e substância P, sugerindo a participação do sistema opioide no prurido (INAGAKI et al., 1999). Assim, avaliamos o papel dos opioides endógenos no prurido induzido pelo composto 48/80 e sua inibição pelas α - e β -amirina. Naloxona, *per si* não produziu prurido nem interferiu no prurido induzido pelo composto 48/80 nos camundongos. Por outro lado, a naloxona foi mais efetiva em antagonizar o efeito inibitório da morfina, porém reverteu apenas parcialmente o efeito das amirina (100 mg/kg) sobre o prurido induzido pelo composto 48/80. Estes resultados sugerem que o sistema opioide sensível a naloxona está, em parte, envolvido no efeito supressor das amirina sobre o prurido induzido pelo composto 48/80 em camundongos.

Sabe-se que algumas drogas que possuem atividade sedativa podem apresentar atividade antipruriginosa (KRAUSE & SHUSTER, 1983; WATANABE et al., 1999). Em nossos estudos, a mistura de α - e β -amirina (100 e 200 mg/kg), não interferiu na atividade locomotora dos animais, sugerindo que o mecanismo pelo qual a mistura exerce seu efeito supressor do prurido não envolve atividade sedativa sobre o sistema nervoso central.

Os dados obtidos sugerem que as α - e β -amirina possivelmente agem suprimindo a função secretagoga dos mastócitos, conferindo-lhes efeitos antipruriginoso e antiinflamatório.

Os modelos experimentais de edema de pata por dextrana, composto 48/80, histamina e serotonina, são utilizados na avaliação de drogas com atividades antiedematogênica. Nestes modelos, os mastócitos e seus produtos, incluindo histamina e serotonina, desempenham papel importante na formação do edema. Os mastócitos podem secretar seus grânulos por diversos estímulos: por soluções hipotônicas, incubação com anticorpos anti-IgE e alguns substâncias químicas, como dextrana e o composto 48/80, o qual é bastante utilizado para degranular mastócitos em modelos *in vivo* e *in vitro* (YANG et al., 2002).

A dextrana induz a degranulação parcial de mastócitos no período de 30 minutos, levando a rápido acúmulo de fluidos, com pequena concentração de proteínas e neutrófilos (LO et al., 1982), com participação de histamina e serotonina (GUPTA et al., 2003). Histamina é um dos mais importantes mediadores inflamatórios e um potente agente vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular (GUPTA et al., 2003).

A presença de serotonina no meio inflamatório induz múltiplas conseqüências. Uma delas é extravasamento de proteínas a partir das vênulas pós-capilares, contribuindo para edema periférico, efeito que provavelmente envolve a ativação dos receptores 5-HT_{2a} (ZEITZ et al., 2002).

Os resultados mostram que α - e β -amirina (100 mg/kg) reduzem significativamente o edema por dextrana, pelo composto 48/80, conhecidos degranuladores de mastócitos e por histamina, mas não por serotonina. Sugerindo que o efeito antipruriginoso/antiedematogênico das amirinas, deve-se em parte, à estabilização dos mastócitos e, provavelmente, à inibição da síntese, liberação ou ação da histamina (SRINIVASAN et al., 2001).

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Em trabalhos anteriores, demonstramos que a resina e a mistura de triterpenos α - e β -amirina isolada de *P. heptaphyllum*, possuem atividade gastroprotetora e que este efeito envolve a participação dos neurônios aferentes sensíveis à capsaicina (OLIVEIRA et al., 2004b). Os nervos aferentes sensíveis à capsaicina são descritos como um mecanismo protetor contra lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina e a sua destruição promove exacerbação dos processos inflamatórios. Todavia, estes nervos exercem ação pró-inflamatória sobre as lesões gástricas induzidas por estresse em ratos. Desse modo, dependendo da natureza e duração da inflamação, estes neurônios podem atuar diferentemente no controle dos processos inflamatórios gástricos (LARAUCHE et al., 2004).

Muitas substâncias derivadas de plantas são promissores agentes analgésicos, e vários triterpenos têm produzidos resultados promissores em estudos experimentais e

clínicos (CALIXTO et al., 2000; ALMEIDA et al., 2001; SPESSOTO et al., 2003). Assim, avançando nos estudo farmacológico com a mistura de triterpenos α - e β -amirina, avaliamos a participação dessa mistura em modelos de nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.

A capsaicina, o princípio pungente encontrado na pimenta vermelha, quando aplicada topicamente em humanos ou em animais experimentais, é conhecida por estimular o receptor vanilóide (TRPV1) localizado nas fibras C. Os receptores TRPV1 localizam-se nas terminações nervosas dos neurônios sensoriais, tanto ao nível central quanto periférico, e estudos sugerem que estes receptores estão envolvidos em um amplo número de processos nociceptivos. Outro receptor envolvido nos efeitos da capsaicina são os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). Administrada intradermicamente, a capsaicina promove o aparecimento da hiperalgesia primária (no sítio de aplicação) e secundária (próximo ao local de aplicação), a qual parece envolver a ativação destes receptores, cujos antagonistas como a cetamina, são utilizados no alívio da dor e hipersensibilidade mecânica induzidas por capsaicina em humanos e em animais experimentais (KINNMAN et al, 1997).

A ativação dos receptores TRPV1 pela capsaicina promove uma complexa cascata de eventos, incluindo excitação neuronal e liberação de mediadores pró-inflamatórios, dessensibilização do receptor e toxicidade neuronal (SZOLCSANYI, 1977; CATERINA et al., 1997). Dessa forma, a capsaicina representa uma importante ferramenta

farmacológica na exploração do papel fisiológico dessas fibras, denominadas de fibras primárias aferentes sensíveis à capsaicina (SAADÉ et al., 2002).

O papel dos receptores TRPV1 na nocicepção tem sido estabelecido pela utilização de antagonistas e camundongos “knockout” para esta classe de receptor (CATERINA et al., 2000; WALKER et al., 2003). Estudos mostraram que os camundongos “knockout” para este receptor mostraram-se resistentes aos estímulos nociceptivos produzidos por ativadores dos receptores vanilóides *in vivo*. Uma outra característica destes animais foi a perda da hipersensibilidade ao estímulo térmico nocivo observado durante processo inflamatório (DAVIS et al., 2000). Estes achados mostram claramente o papel que desempenha os receptores TRPV1 durante as condições inflamatórias, tornando estes receptores um alvo potencial para a ação de vários mediadores (CALIXTO et al., 2005).

A dessensibilização induzida por agonistas é útil no controle da supressão da dor neuropática e no controle da dor. Estudo desenvolvido por Karai et al. (2004), demonstra que o uso de resiniferatoxina, um potente agonista dos receptores TRPV1, é capaz de destruir seletivamente os neurônios nociceptivos bloqueando a inflamação hiperalgésica experimental e a inflamação neurogênica. Enquanto antagonistas destes receptores são valiosos agentes no tratamento da hiperalgisia inflamatória (LOPEZ-RODRIGUEZ et al., 2003).

É bem estabelecido que a capsaicina provoca comportamentos de nocicepção em roedores, seja decorrente da injeção subplantar (tempo de lambadura) ou administração intracolônica (lambadura do abdômen, contorções, arrastar a parte inferior do abdômen contra o piso e retração abdominal) (LAIRD et al., 2001; SAKURADA et al., 2003) e vários trabalhos demonstram que substâncias naturais como terpenóides, cetônicas fenólicas e dialdeídos insaturados suprimem estes comportamentos (SZALLASI e BLUMBERG, 1999; OTUKI et al., 2001; DEDOV et al., 2002; ANDRE et al., 2004).

Os resultados obtidos com os triterpenos α - e β -amirina (3 a 100 mg/kg), mostram que a mistura inibiu significativamente o comportamento de dor induzido pela aplicação subplantar (1,6 μ g/20 mL) ou intracolônica (149 μ g/50 μ L) de capsaicina, de forma quase equivalente em ambos modelos estudados. Estes resultados são corroborados por Otuki et al. (2005), que recentemente verificaram efeito antinociceptivo produzido pela mistura α - e β -amirina em modelos de nocicepção induzidos por carragenina e capsaicina em camundongos. Os autores sugerem inibição das vias sensíveis à proteína quinase A e proteína quinase C como o provável mecanismo de ação destes triterpenos.

As amirinas mostraram maior eficácia em menores doses, com diminuição do efeito observado em doses mais altas (3 e 100mg/kg, respectivamente), evidenciando uma curva dose-resposta na forma de “U” e implicando que a mistura pode ter uma dupla ação sobre a resposta da capsaicina. Em estudo anterior (OLIVEIRA et al., 2004b), observamos uma tendência similar no seu efeito gastroprotetor contra lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos e sugerimos que o mecanismo pelo qual a mistura dos triterpenos

s α - e β -amirina exerce seu efeito gastroprotetor, no modelo de lesões gástricas por etanol, envolve a ativação dos neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina, os quais são reconhecidamente implicados na defesa da mucosa gástrica (WEST & MERCER, 2005).

Por outro lado, o mecanismo da ação antinociceptiva das amirina parece envolver ainda ativação do sistema opióide. Naloxona (2 mg/kg), conhecido antagonista dos receptores opióides reverteu parcialmente o efeito antinociceptivo das α - e β -amirina (10 mg/kg) no modelo de dor induzido por capsaicina subplantar.

Este resultado vai de encontro ao obtido por Otuki et al. (2005). Neste trabalho, os autores demonstraram que os efeitos antinociceptivos, periférico, espinal e supraespinal observados com a mistura de triterpenos α - e β -amirina parece não ser mediada via sistema opióide.

Contudo, efeito antinociceptivo de triterpenos envolvendo sistema opióide já foi descrito na literatura. Ferreira et al. (2000) demonstraram que o efeito antinociceptivo do extrato de *Epidendrum Mosenii* deve-se, em parte, a participação do sistema opióide e que os triterpenos são provavelmente os princípios ativos responsáveis por este efeito. Os triterpenos presentes no extrato obtido das folhas de *Bouchea fluminensis*, parece exercer seus efeitos antinociceptivos através dos receptores opióides, uma vez que a naloxona foi capaz de reverter esta atividade (COSTA et al., 2003).

O receptor TRPV1 desempenha importante papel na regulação funcional dos nervos sensoriais. Crescentes evidências apontam para o potencial terapêutico dos moduladores destes receptores, particularmente no controle da dor (DOHERTY et al., 2005).

TRPV1 é um canal de cátion não seletivo e ativado não apenas por capsaicina mas também por outras vias como, temperatura, prótons (baixo pH) e fosforilação direta da proteína quinase C (CORREL et al., 2004). A capsaicina estimula uma fração significativa de nociceptores, promovendo respostas comportamentais de nocicepção, como tempo de lambadura e hipotermia, as quais são inibidos por antagonistas da própria capsaicina, como capsazepina e vermelho de rutênio (PERKINS & CAMPBELL, 1992; SZALLAZI & BLUMBERG, 1999).

Camundongos “knockout” para o receptor TRVP1 mostram uma acentuada redução nas comportamentais de nocicepção (CATERINA et al., 2000). Assim, com o objetivo de ampliar as evidencias que envolvem o mecanismo antinociceptivo pelo qual as amirina exercem seus efeitos, experimentos foram realizados utilizando o vermelho de rutênio, uma antagonista não seletivo da capsaicina, no modelo de nocicepção induzido pela injeção subplantar de capsaicina.

Os resultados obtidos mostram uma inibição similar encontrados com as amirina (10 mg/kg) e vermelho de rutênio (1,5 mg/kg). Além disso, quando estas duas substâncias foram co-administradas aos animais, não foi observado efeito aditivo ou antagonismo

sobre a nocicepção induzida pela capsaicina, indicando que possivelmente não houve interação das amirina com o receptor TRPV1. Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo produzido pelo vermelho de rutênio ou amirina pode ser mediado pela inibição do canal de membrana catiônico ativado pela capsaicina.

O próximo experimento foi avaliar se a mistura de α - e β -amirina e o vermelho de rutênio poderiam antagonizar a resposta hipotérmica induzida pela administração subcutânea de capsaicina em camundongos. Consistente com as observações de Szikszay et al. (1982), capsaicina na dose de 10 mg/kg, foi capaz de produzir uma nítida hipotermia, seguida por uma hipertermia que manteve-se por um período de, pelo menos, 48 horas. Os resultados demonstram que nem o vermelho de rutênio (1,5 mg/kg), nem as amirina (100 mg/kg) conseguiram reverter a resposta hipotérmica da capsaicina.

Porém, o vermelho de rutênio inibiu completamente a resposta hipertérmica induzida pela capsaicina, enquanto que o efeito inibitório das α - e β -amirina, nesta segunda fase, só foi observada apenas com 48 horas. Uma vez que não houve reversão da fase hipotérmica, induzida pela capsaicina, pela α - e β -amirina e o vermelho de rutênio leva-nos a sugerir que estas substâncias não apresentam especificidade em antagonizar o receptor TRPV1 em camundongos. Apoiando esta observação, Correll et al. (2004), questionam a seletividade da capsazepina, como um antagonista dos receptores TRPV1, sugerindo que este agente pode se um antagonista ineficaz destes receptores em modelos de nocicepção inflamatória em camundongos.

Os mecanismos α_2 -adrenérgicos modulam as sensações coloretal e o uso de agonistas desse receptores parece melhorar as condições fisiológicas e neuropáticas (ONTTONEN & PERTOVAARA, 2000; SABETKASAIE et al., 2004).

Em nossos estudos, verificamos a possível participações do adrenoreceptores α_2 no efeito antinociceptivo de α - e β -amirina, empregando a clonidina como substância de referência (PERTOVAARA & Kalmari, 2003). O pré-tratamento com ioimbina (2,0 mg/kg), antagonista α_2 , significativamente bloqueou o efeito antinociceptivo da clonidina (0,1 mg/kg), mas não das amirina (10 mg/kg), sugerindo a não participação do sistema adrenérgico no efeito antinociceptivo da mistura de triterpenos.

A constante ativação e sensibilização das fibras aferentes primárias tipo C é um importante componente da dor inflamatória. Estas fibras secretam neuropeptídeos, tais como substância P e CGRP, os quais contribuem para a inflamação neurogênica na periferia, podendo causar aumento na excitabilidade medular e a sensibilização central responsável pela hiperalgesia e alodinia (WOOLF, 1992).

A dor visceral é um importante sintoma em muitas doenças, tais como doença inflamatória intestinal, onde os neurônios sensoriais aferentes localizados na parede muscular e mucosa são ativados por distensão durante o peristaltismo e sensibilizados por uma variedade de mediadores químicos produzidos dentro e fora da parede intestinal, transmitindo a informação do intestino até o sistema nervoso central (GRUNDY, 2004).

Nos modelos de nocicepção induzidos por capsaicina, a mistura de α - e β -amirina, exibiu um efeito supressor sobre os comportamentos nociceptivos. Estes achados dão base para o uso da mistura de triterpenos como um agente terapêutico potencial no tratamento da dor neuropática e inflamatória. Porém, estudos dos efeitos das α - e β -amirina em modelos de hiperalgesia térmica e nocicepção neuropática são necessários.

Drogas que melhoram a atividade motora ou induz sedação podem fornecer resultados falso-positivo/negativo em testes de nocicepção. Desta forma, procuramos determinar a mistura de triterpenos α - e β -amirina no modelo de tempo de sono induzido por pentobarbital sódico, que detecta sedação (AHMED et al., 1997); no teste do “rota-rod”, o qual fornece indícios de déficits neurológicos, incluindo sedação, relaxamento muscular e comprometimento da atividade motora, e finalmente, o teste de campo aberto, que detecta incoordenação motora (NOVAS et al., 1988; PU et al., 1995).

A mistura de triterpenos, em doses variando de 3 a 30 mg/kg, por via oral, não alteraram de forma significativa, o tempo de sono induzido por pentobarbital, a ambulação no teste do campo aberto, nem a performance dos animais no teste do “rota-rod”. Estes resultados indicam que a mistura de α - e β -amirina exerce seu efeito antinociceptivo sem causar déficits neurológicos ou muscular.

Os dados apresentados mostram que α - e β -amirina, exerce pronunciado efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção aguda e visceral induzidos pela capsaicina em camundongos. Embora o exato mecanismo envolvido na ação antinociceptiva destes

triterpenos não seja claro, sugerimos que a mistura de triterpenos desempenhe um papel de antagonista inespecífico, tal como o vermelho de rutênio, inibindo as fibras sensoriais aferentes (fibras C), além de interagir com o sistema opióide endógeno.

ATIVIDADE HEPATOPROTETORA

O fígado é um órgão de extrema importância na metabolização de substâncias estranhas ao organismo, como medicamentos e substâncias nocivas, as quais produzem uma grande variedade de manifestações tóxicas. A ação contínua do fígado em degradar estes compostos, entretanto, pode induzir lesões hepáticas causada pelos metabólitos formados, após a ingestão de altas quantidades de drogas por períodos prolongados.

As drogas convencionais utilizadas no tratamento das doenças hepáticas são freqüentemente inadequadas (LUPER, 1999; RAJESH & LATHA, 2004). Por isso, torna-se necessário a busca de novos compostos para o tratamento das destas patologias, visando substituir as drogas atuais de eficácia e segurança duvidosas. Assim, os produtos naturais desempenham importante papel como fonte de novos agentes hepatoprotetores.

No passado, a pesquisa experimental e clínica confirmou a eficácia de poucas plantas, como a *Silybum marianum*, *Picrorhiza kurroa*, *Curcuma longa*, *Camellia sinensis*, e *Glycyrrhiza glabra* (LUPER, 1999). Em muitos casos, a pesquisa nasceu da experiência tradicional e sabedoria popular e, a partir daí, os mecanismos e vias da ação e a eficácia terapêutica de certas plantas ou extratos derivados de plantas foram sendo descobertos e confirmados em estudo clínicos.

Em estudos anteriores, demonstramos que a mistura de triterpenos pentacíclicos, α - e β -amirina, possui atividade gastroprotetora e antipruriginosa (OLIVEIRA et al., 2004b; OLIVEIRA et al., 2004c). É possível encontrar na literatura atividade hepatoprotetora relacionada a vários triterpenos pentacíclicos (LIU, 1995; LIN et al., 1999; YIM et al., 2001; TANG et al., 2004). Assim, com base nestas informações, decidimos por investigar, um possível efeito hepatoprotetor das α - e β -amirina, nos modelos de hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno e galactosamina/LPS em camundongos.

O paracetamol (acetaminofeno) é um analgésico potente e disponível sem prescrição médica. A superdosagem de paracetamol é conhecida desde 1966, podendo levar a falência hepática e sendo a principal razão de transplantes de fígado nos Estados Unidos e Inglaterra (NARONGCHAI et al., 2004) e responsável por 50-60% de todos os casos relatados associado a tentativa de suicídio neste último país (BRASIL et al., 2001). O acetaminofeno é convertido a um intermediário tóxico o N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI), ao ser metabolizado pelas isoenzimas do Citocromo P-450 (CYP2A6 e CYP2E1) (ROSEN et al., 1983; HAZAI et al., 2002), e os inibidores destas enzimas são conhecidos por reduzir a toxicidade do acetaminofeno (JANBAZ et al., 2002). Atualmente, a N-acetil cisteína (NAC) é o tratamento de escolha nas superdosagens de paracetamol, uma vez que eleva os níveis de glutathiona hepática citosólica e mitocondrial destoxificando o citotóxico e reativo NAPQI (MITCHELL et al., 1973; KOZER et al., 2001).

De acordo com estudo já realizado por Janbaz et al. (2004), a administração de uma sobre-dose de acetaminofeno por via oral, é efetiva em produzir necrose hepática

centrolobular fulminante, constatada com altos índices de mortalidade nos animais tratados.

Os resultados mostram que o pré-tratamento com a mistura de α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg) inibiu completamente a mortalidade induzida por altas doses de acetaminofeno (500 mg/kg). Concentrações, significativamente, elevadas de ALT e AST são aceitas como um índice de hepatotoxicidade (AHMAD et al., 2002; SENTHILKUMAR & NALINI, 2004). α - e β -amirina reduz, de forma significativa e de maneira dose dependente, os níveis de ALT e AST associados com a toxicidade do acetaminofeno.

A NAC é conhecida por elevar a concentração intracelular de glutathione (GSH) e por eliminar espécies reativas de oxigênio *in vivo* e *in vitro* (ARUOMA et al., 1989; MANOV et al., 2002). A glutathione é um importante antioxidante endógeno encontrada em altas concentrações no fígado e conhecida por desempenhar importante papel de proteção sequestrando radicais livres e participando de diversos processos de detoxificação.

De acordo com os resultados, os triterpenos α - e β -amirina preveniram a depleção da GSH hepático induzido por acetaminofeno devido, provavelmente, a produção do metabólito tóxico (NAPQI) (Tran *et al.*, 2001). Os achados histológicos mostram que a congestão e a infiltração de células inflamatórias, induzidas pela administração de acetaminofeno, foram consideravelmente diminuídas no grupo tratado com as amirina, indicando uma possível atividade antiinflamatória destes triterpenos.

Apesar do entendimento sobre as isoformas do citocromo P-450 envolvidas na ativação do paracetamol e conseqüente produção do seu metabólito tóxico (NAPQI), a pesquisa na obtenção de inibidores que possam ser utilizados na prevenção e/ou tratamento da hepatotoxicidade do acetaminofeno ainda prossegue (WALUBO et al., 2004).

Em trabalho recente mostramos que a resina de *Protium heptphyllum*, rica em α - e β -amirina, exibiu atividade antiinflamatória (OLIVEIRA et al., 2004a). Curiosamente, as estruturas químicas de α - e β -amirina semelham-se às estruturas de conhecidos triterpenos pentacíclicos que exibem atividade antiinflamatória, como ácido ursólico, ácido glicirrético e o ácido oleanólico (BARICEVIC et al., 2001; MURAV'EV et al., 2001; BANNO et al., 2004).

Estudos têm descritos o efeito hepatoprotetor dos triterpenos pentacíclicos como os ácidos ursólico e oleanólico na inibição das isoformas CYP2E1, CYP1A e CYP2A do citocromo P-450 (LIU et al., 1995; KIM et al., 2004), sugerindo que a co-administração de acetaminofeno com inibidores do citocromo P-450, pode ser útil na prevenção da hepatotoxicidade associada com o uso de acetaminofeno.

Visto que a hepatotoxicidade causada pelo acetaminofeno envolve reações mediadas pelo citocromo P-450, verificamos o efeito da mistura de α - e β -amirina no teste de tempo de sono induzido por pentobarbital sódico (PBS). O tempo de sono induzido por barbiturato (pentobarbital sódico – PBS) é uma medida da indução das enzimas do citocromo P450 (SOUZA et al., 1998). Sabe-se que o metabolismo e a conjugação do PBS

ocorre principalmente ao nível do citocromo P-450, no fígado, mais especificamente, CYP2B (NEBERT e GONZALEZ, 1987; KUBOTA et al., 2004).

Na maior dose (100 mg/kg) as amirina potencializaram, de forma significativa, o tempo de sono induzido por PBS, sugerindo interferência com o sistema enzimático citocromo P-450, e conseqüentemente formação do metabólito tóxico (NAPQI), via CYPE1, localizado predominantemente no fígado (LEE et al., 1996). Outros estudos são necessários para se determinar se a mistura de triterpenos α - e β -amirina inibe especificamente alguma isoforma do citocromo P-450.

Os resultados indicam que a mistura α - e β -amirina possui atividade hepatoprotetora contra a hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno e que esta proteção parece ser, pelo menos em parte, devido à diminuição do estresse oxidativo e à inibição do citocromo P-450.

A marcante atividade hepatoprotetora da mistura de triterpenos α - e β -amirina observada no modelo de hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno (OLIVEIRA et al., 2005d), levou-nos a investigar os efeitos destes triterpenos em um modelo inflamatório, *in vivo*, de hepatite tóxica induzido por D-Galactosamina e Lipopolissacarídeo. Embora a hepatite represente um grupo heterogêneo de doenças com diferentes etiologias e de patogênese complexa, o sistema imune exibe papel central em muitos destes processos. O fígado abriga vários tipos de células imunes, sendo a principal célula de defesa

imunológica as células de Kupffer (macrófagos residentes) as quais, sob estímulo, produzem grande quantidades de citocinas inflamatórias (SCHUMANN et al., 2000).

A D-Galactosamina (GalN) é metabolizada por enzimas que participam na metabolização da galactose no fígado. Uma vez que essa metabolização consome o nucleotídeo uridina, a administração de GalN induz uma rápida depleção destes nucleotídeos, primariamente no fígado, com diminuição da síntese de RNA. Assim, injeção de grandes doses deste agente em animais experimentais, induz necrose hepática com efeitos semelhantes à hepatite viral em humanos (ENDO et al., 1999; ANIYA et al., 2005).

Lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, é conhecida por estimular a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 β (IL-1 β), além de mediadores secundários, como leucotrienos e prostaglandinas (Kao *et al.*, 2005). Estes mediadores induzem síndrome inflamatória aguda, evidenciado pelo choque séptico, o qual é caracterizado por febre, hipotensão, coagulação intravascular e falência múltiplas dos órgãos (KAO et al., 2005; WEIGAND et al., 2004).

Dentre as citocinas produzidas pelo estímulo com LPS, TNF é considerada a responsável pela letalidade no modelo experimental de hepatotoxicidade em combinação com GalN. TNF- α é sintetizado e secretado por macrófagos, incluindo células de Kupffer - macrófagos residentes no fígado - em resposta a estimulação por LPS. A apoptose dos

hepatócitos, induzida por TNF- α , é importante no modelo de hepatotoxicidade induzida por GalN/LPS (MORIKAWA et al., 2002).

Portanto, o TNF- α exerce um papel chave na hepatotoxicidade induzida por GalN/LPS, a qual é caracterizada por apoptose e lise da célula hepática (VAN DIEN et al., 2001; MORIKAWA et al., 1998). Neste modelo de hepatotoxicidade, o TNF- α , através dos seus receptores (TNFR1, TNFR2), ativa fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1, incluindo várias proteínas como FADD, RIP e TRFA2, modulando a indução de muitos genes que codificam mediadores apoptóticos e caspases, as quais parecem desempenhar papel importante na morte celular induzida por GalN/LPS (LIU et al., 2002; LIU, 2005).

Assim, a injeção de baixas doses de GalN sensibiliza os animais experimentais aos efeitos tóxicos de LPS, induzindo a uma hepatite fulminante com congestão hepática grave, com participação de um intenso estresse oxidativo, resultando em uma morte rápida dentro de poucas horas (ANIYA et al., 2005; ENDO et al., 1999). Os resultados demonstram que a mistura α - e β -amirina (50 e 100 mg/kg), inibiu moderadamente a necrose hepática, oferecendo proteção contra a mortalidade no modelo de hepatotoxicidade induzido por GalN/LPS ($800/7 \times 10^{-3}$ mg/kg).

A administração de GalN/LPS induziu intensa necrose hepática verificada com a mortalidade em todos os animais do grupo controle. Entretanto, nos animais tratados com as amirina (50 e 100 mg/kg), dexametasona (2 mg/kg) e NAC (750 mg/kg) foi observada completa proteção contra a morte. Além disso, tanto as amirina, quanto a dexametasona,

impediram o aumento do peso hepático bem como as alterações histopatológicas (necrose, hemorragia) induzidos por GalN/LPS. Níveis elevados das enzimas séricas são indicativos da perda da integridade funcional das membranas celulares no fígado (AHMAD et al., 2002). Avaliando-se as enzimas séricas ALT e AST, consideradas um parâmetro de dano hepático, a mistura de α - e β -amirina reduziu significativamente os níveis séricos de ALT, idem à dexametasona, contudo não houve diferença significativa nos níveis séricos de AST e da glutatona hepática, quando comparado grupo controle GalN/LPS.

Como dito anteriormente, a falência hepática observada no modelo de hepatotoxicidade induzido GalN/LPS é dependente da produção de TNF- α , o qual contribui para a apoptose e conseqüentemente para a necrose. Entretanto, a apoptose *per se* não é a causa direta da injúria hepática, o que é em grande parte devido a infiltração de neutrófilos (LIEST et al., 1996).

A literatura mostra que muitos triterpenos pentacíclicos, que possuem estrutura química semelhantes às α - e β -amirina, tais como ácido boswellico, ácido oleanólico e ácido ursólico, exercem sua atividade antiinflamatória e hepatoprotetora por inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais com TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12, através da inibição de fatores de transcrição, como o NF-kappa B (BANSKOTA et al., 2000; SYROVETS et al., 2005; WU et al., 2004; SHISHODIA et al., 2003).

O fator NF-kappa B representa um importante alvo para novas drogas no tratamento de muitas doenças inflamatórias, incluindo artrite, asma e doenças autoimunes,

e muita atenção tem sido dada na última década na identificação de compostos que interfiram seletivamente na trilha deste fator de transcrição e/ou na modulação das citocinas pró-inflamatórias (CALIXTO et al, 2003; CALIXTO et al, 2004)

Estudos apontam que os neurônios peptidérgicos aferentes primários sensíveis à capsaicina desempenham um papel na indução e manutenção de hepatite experimental (BANG et al., 2003). Estes neurônios aferentes primários têm seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal, de onde emitem suas fibras C não- mielinizadas as quais exercem efeitos inflamatórios via liberação de substância P e CGRP a partir das suas terminações induzindo, desta forma, inflamação neurogênica (HARRISON & GEPPETI, 2001). Portanto, tendo em vista que a mistura de triterpenos influenciam na função dos nervos sensoriais aferentes, a hepatoproteção exercida por estas substâncias pode ser devida a um efeito neuroimunomodulatório.

Em resumo, os dados obtidos no presente trabalho demonstram que a resina e a mistura de triterpenos α - e β -amirina possuem baixa toxicidade e atividades antiinflamatória e gastroprotetora. Os resultados mostram ainda que a mistura de α - e β -amirina exibiu atividade antipruriginosa, antinociceptiva e hepatoprotetora, cujos efeitos envolvem, pelo menos em parte, a participação dos neurônios aferentes sensoriais primários.

Os achados farmacológicos sobre a resina e a mistura de triterpenos α - e β -amirina são promissores. Contudo, maiores esclarecimentos se fazem necessários sobre os

mecanismos moleculares que envolvem os efeitos farmacológicos destes agentes, sobretudo no tocante ao funcionamento dos neurônios sensoriais aferentes, os quais são implicados em muitas condições inflamatórias. E, a partir destes dados, propor a utilização de espécies ricas nestes triterpenos como uma alternativa terapêutica, oferecendo a perspectiva de um adjuvante (Fitoterápico) com propriedades antiinflamatórias, contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento regional, propriedade intelectual local e para a conservação da biodiversidade brasileira (patrimônio genético).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A investigação realizada com a resina e a mistura de triterpenos α - e β -amirina, isolada de *Protium heptaphyllum* nos permite concluir que:

◆ A resina e a mistura de triterpenos α - e β -amirina não exibem potencial tóxico, tendo em vista que não foi possível estabelecer suas respectivas DL_{50} (i.p. ou oral) em camundongos. A mistura de triterpenos α - e β -amirina, mas não a resina, apresenta toxicidade para o *Artemia* sp.

◆ A resina mostrou atividade antiinflamatória, reduzindo significativamente o granuloma induzido por “pellets” de algodão e o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético na cavidade peritoneal.

◆ A resina demonstrou atividade gastroprotetora em modelos de lesões gástricas (etanol e etanol acidificado). A mistura das amirina também inibiu significativamente as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto envolvendo neurônios primários sensíveis à capsaicina.

◆ O efeito antipruriginoso da mistura de triterpenos α - e β -amirina foi evidenciado através da inibição significativa do prurido induzido pelo Composto 48/80 e dextrana T40 e por intermédio da estabilização das membranas dos mastócitos.

◆ A administração da mistura de α - e β -amirina mostrou atividade antiedematogênica ao inibir, de forma significativa, o edema de pata induzido por histamina, Composto 48/80 e dextrana T40 em modelos experimentais. Porém não foi efetiva em inibir o edema por serotonina.

◆ A mistura de α - e β -amirina foi efetiva em inibir a dor somática e/ou visceral nos modelos de nociceção em animais induzida pela aplicação subplantar ou intracolônica de capsaicina.

◆ Os triterpenos α - e β -amirina impediram, de forma significativa, a hipertermia induzida pela capsaicina, mas não bloquearam a resposta hipotérmica inicial destes agentes, sugerindo que as α - e β -amirina exercem seu efeito antinociceptivo possivelmente através do receptor vanilóide (TRPV1) com participação opióide neste mecanismo.

◆ Contudo, o mecanismo de ação antinociceptiva das α - e β -amirina provavelmente não envolve a participação dos receptores α_2 -adrenérgicos, tendo em vista que a ioimbina não reverteu o efeito antinociceptivo das amirina no modelo de nociceção visceral induzida pela capsaicina. A mistura de triterpenos α - e β -amirina (3 a 30 mg/kg)

não manifestou efeitos sedativos ou incoordenação motora, indicando que estes efeitos não contribuíram para sua atividade antinociceptiva.

◆ A mistura de triterpenos α - e β -amirina ofereceu proteção contra a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno, possivelmente pela inibição enzimática do citocromo P-450 hepático.

◆ As α - e β -amirina protegeram contra a hepatite tóxica induzida pela administração de D-Galactosamina/Lipopolissacarídeo em camundongos. Neste modelo, as amirina reduziram a mortalidade e preveniram moderadamente as alterações histopatológicas. É possível que este efeito hepatoprotetor deva-se à sua atividade antiinflamatória e/ou a neuroimunomodulação, envolvendo as fibras aferentes sensíveis à capsaicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A.; PILLAI, K. K.; NAJMI, A. K.; AHMAD, S. J.; PAL, S. N.; BALANI, D. K. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p. 35-41, 2002.

AHMED, M.; SADHU, S. K.; DATTA, B. K.; KUNU, J. K.; BACHAR, S. C. Preliminary studies on the antiinflammatory, analgesic and diuretic activity of stagninol, a sesquiterpene isolated from *Persicaria stagnina*. **Pharmazie**. v. 52, n. 6, p. 472-475. 1997.

AJAIYEOBA, E. O.; ONOCHA, P. A.; NWOZO, S. O.; SAMA, W. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of *Buchholzia coriacea* stem bark. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7-8, p. 706-709, 2003.

ALBIERO, A. L. M.; SERTIÉ, J. A.; BACCHI, E. M. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 41-44, 2002.

AL-HOWIRINY, T.; AL-SOHAIBANI, M.; AL-SAID, M.; AL-YAHYA, M.; EL-TAHIR, K.; RAFATULLAH, S. Effect of *Commiphora opobalsamum* (L.) Engl. (Balessan) on experimental gastric ulcers and secretion in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 3, p. 287-294, 2005.

ALMEIDA, E. X.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Coumarins, coumarinslignoids and terpenes from *Protium heptaphyllum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 685-687, 2002.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 4, p. 310-322, 2001.

AMADESI, S.; NIE, J.; VERGNOLLE, N.; COTTRELL, G. S.; GRADY, E. F.; TREVISANI, M.; MANNI, C.; GEPPETTI, P.; MCROBERTS, J. A.; ENNES, H.; DAVIS, J. B.; MAYER, E. A.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 18, p. 4300-4312, 2004.

AMMON H. P. Boswellic acids (components of frankincense) as the active principle in treatment of chronic inflammatory diseases. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v.152, n. 15-16, p. 373-8, 2002.

ANDRE, E.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evidence for the involvement of vanilloid receptor in the antinociception produced by the dialdehydes unsaturated sesquiterpenes polygodial and drimaniol in rats. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 4, p. 590-597, 2004.

ANDRIKOPOULOS, N. K.; KALIORA, A. C.; ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAPEORGIOU, V.P. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, 501-507, 2003.

ANIYA, Y.; KOYAMA, T.; MIYAGI, C.; MIYAHIRA, M.; INOMATA, C.; KINOSHITA, S.; ICHIBA, T. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of the medicinal herb, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

ARAGÃO, G. F. **Atividade farmacológica da mistura isomérica de alfa e beta amirina extraído de *Protium heptaphyllum* (Aubl) March.** 2004. 185 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

ARHCER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 2, p. 205-235, 1973.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v. 69, p. 905-909, 2003.

ASSIMOPOULOU, A. N.; ZLATANOS, S. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. **Food Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 721-727, 2005.

ATTA, A. H.; EL-SOUD, K. A. The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 235-238, 2004.

AYDIN, S.; BASARAN, A. A.; BASARAN, N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1299-1305, 2005.

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**, v. 13, p. 33-34, 2001.

BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Secondary metabolites of *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1078-1080, 2002.

BANG, R.; SASS, G.; KIEMER, A. K.; VOLLMAR, A. M.; NEUHUBER W. L.; TIEGS, G. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 31-39, 2003.

BANNO, N.; AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; HIGASHIHARA, H.; UKIYA, M.; WATANABE, K.; KIMURA, Y.; HASEGAWA, J.; NISHINO, H.

Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 85-90, 2004.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 239-246, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; XIONG, Q.; HASE, K.; TRAN, K. Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Hepatoprotective effect of *Combretum quadrangulare* and its constituents. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 4, p. 456-460, 2000.

BARICEVIC, D.; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SIMONOVSKA, B.; KRASNA, A.; ZUPANCIC, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 125-132, 2001.

BARRETT, A. C.; SMITH, E. S.; PICKER, M. J. Capsaicin-induced hyperalgesia and mu-opioid-induced antihyperalgesia in male and female Fischer 344 rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 1, p. 237-245, 2003.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B.; PIETRO, M. L.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; BRITO, B. A. R. S. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.

BRASIL, I. R. C.; SILVA, P. M.; TOLENTINO, E. C.; SANKARANKUTI, A. K.; OLIVEIRA, G. R.; SILVA JR., O. C. Modelos experimentais cirúrgicos de falência hepática (fulminante experimental models of acute liver failure). **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, sup. 1, 2001.

BRZOZOWSKI, T; KONTUREK, S. J; SLIWOWSKI, Z; PYTKO-POLONCZYK, J; SZLACHCIC, A; DROZDOWICZ, D. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection against acid-independent and acid-dependent ulcerogens. **Digestion**, v. 57, n. 6, p. 424-432, 1996.

BÜCHELE, B; ZUGMAIER, W; SIMMET, T. Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. **Journal of Chromatography B**, v. 791, p. 21-30, 2003.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

BHARGAVA, K. P; GUPTA, M. B; TANGRI, K. K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. **European Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 191-195, 1973

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J. B; BEIRITH, A; FERREIRA, J; SANTOS, A. R; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 401-418, 2000.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v. 70, n. 2, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A.; ANDRE, E.; FERREIRA J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology Therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Medica**, v. 69, n. 11, p. 973-983, 2003.

CANTER, P. H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 180-185, 2005.

CAPAZ, F. R., VANCONCELLOS, L. E.; de MORAES, S.; NETO, J. P. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 251, p. 228-236, 1981.

CARBALLO, J. L.; HERNANDEZ-INDA, Z. L.; PEREZ, P.; GARCIA-GRAVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

CARDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 320, n. 2, p. 402-408, 2004.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience**; v. 24, p. 487-517, 2001.

CATERINA, M. J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K. R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A. I.; JULIUS D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**. v. 288, n. 5464, p. 306-313, 2000.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389. n. 6653, p. 816-824, 1997.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Synthesis of substituted 1,3,5-triazines and toxicity evaluation against *Artemia Salina* leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CERVERO F.; LAIRD, J. M. Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events. **Journal of Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 45-54, 2004.

CERVERO, F. **Mechanism of visceral pain. Pain - an update review: refresher course.** Syllabus, p. 2403-2411, 2002.

CHADI, A.; FRAUNDORFER, P. F.; BEAVEN, M. A. Compound 48/80 activates mast cell phospholipase D via heterotrimeric GTP-binding proteins. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 292, p. 22-130, 2000.

CHAUDHURI, P. K.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Phytotoxic and antimicrobial constituents of *Bacopa monnieri* and *Holmskioldia sanguinea*. **Phytother Res.**, v. 8, n. 2, p. 114-7, 2004.

CHEN, W.; SHOCKCOR, J. P.; TONGE, R., et al. Protein and nonprotein cysteinyl thiol modification by N-acetyl-p-benzoquinone imine via a novel ipso adduct. **Biochemistry**, v. 38, p. 8159-8166, 1999.

CHEN, Y.; LIU, J.; YANG, X.; ZHAO, X.; XU, H. Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in-vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 259-264, 2005.

CHEN, Y. L.; LU, C. M.; CHEN, I. L.; TSAO, L. T.; WANG, J. P. Synthesis and antiinflammatory evaluation of 9-anilinoacridine and 9-phenoxyacridine derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 21, p. 4689-4694, 2002.

CHO, C. H.; OGLE, C. W. The pharmacological differences and similarities between stress- and ethanol-induced gastric mucosal damage. **Life Science**, v. 51, p. 1833-1842, 1992.

CHO, C. H.; WU, K. K.; WU, S.; WONG, T. M.; SO, W. H.; LIU, E. S.; CHU, K. M.; SHIN, V. Y.; YE, Y. N.; WONG, B. C. Morphine as a drug for stress ulcer prevention and healing in the stomach. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, n. 2-3, p. 177-182, 2003.

CHOI, J.; LEE, K. T.; HA, J.; YUN, S. Y.; KO, C. D.; JUNG, H. J.; PARK, H. J. Antinociceptive and antiinflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentic acid obtained from *Rubus coreanus*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 10, p. 1436-1441, 2003.

CLARKE, N.; GERMAIN, P.; ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 6, n. 25, 1-23, 2004.

CORRÊA, P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, 1973. v. 1, p. 82.

CORRELL, C. C.; PHELPS, P. T.; ANTHES, J. C.; UMLAND, S.; GREENFEDER, S. Cloning and pharmacological characterization of mouse TRPV1. **Neuroscience Letters**, v. 370, n. 1, p. 55-60, 2004.

COSTA, V. B.; COUBE, C. S.; MARINHO, B. G.; MATHEUS, M. E.; LEITAO, S. G.; FERNANDES, P. D. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 364-371, 2003.

DANDIYA, P. C., CULLUMBINE, H. Studies on *Acorus calamus* (III); some pharmacological actions of the volatile oil. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 125, p. 353-359, 1959.

DARIAS, V.; ABDALA, S.; MARTIN-HERRERA, D.; TELLO, M. L.; VEGA, S. CNS effects of a series of 1,2,4-triazolyl heterocarboxylic derivatives. **Pharmazie**, v. 53, p. 477-481, 1998.

DAVIS, J. B.; GRAY, J. ; GUNTHORPE, M. J; HATCHER, J. P; DAVEY, P. T; OVEREND, P.; HARRIES, M. H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; HUGHES, S. A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A. J.; PUGH, P. L.; ROGERS, D. C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S. A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 183-187, 2000.

DEDOV, N. V.; TRAN, H. V.; DUKE, C. C.; CONNOR, M.; CHRISTIE, J. M. D.; MANDADI, S.; ROUFOGALIS; D. B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 793-798, 2002.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUNOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2001.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DOHERTY, E. M.; FOTSCH, C.; BO, Y.; CHAKRABARTI, P. P.; CHEN, N.; GAVVA, N.; HAN, N.; KELLY, M. G.; KINCAID, J.; KLIONSKY, L.; LIU, Q.; OGNJANOV, V. I.; TAMIR, R.; WANG, X.; ZHU, J.; NORMAN, M. H.; TREANOR, J. J. Discovery of potent, orally available vanilloid receptor-1 antagonists. Structure-activity relationship of N-aryl cinnamides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 71-90, 2005.

DREWES, A. M.; SCHIPPER, K. P.; DIMCEVSKI, G.; PETERSEN, P.; GREGERSEN, H.; FUNCH-JENSEN, P.; ARENDT-NIELSEN, L. Gut pain and hyperalgesia induced by capsaicin: a human experimental model. **Pain**, v.104, n. 1-2, p. 333-341, 2003.

DUARTE, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELENA, C. J. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

ENDO, Y.; SHIBAZAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; KAI, K.; SUGAWARA, K., TAKADA, H.; KIKUCHI, H.; KUMAGAI, K. Enhancement by galactosamine of lipopolysaccharide(LPS)-induced tumour necrosis factor production and lethality: its suppression by LPS pretreatment. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 5-12, 1999.

ESTRADA, A.; KATSELIS, G. S.; LAARVELD, B.; BARL, B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 27-43. 2000.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n. 1, p. 69-74, 2001.

FARINA, C.; PINZA, M.; PIFFERI, G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. **Il Farmaco**, v. 53, p. 22-32, 1998.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A. G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. S. Constituents of the Argentina medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 89, p. 73-80, 2003.

FERNANDES, J.; CASTILHO, R. O.; COSTA, M. R.; SOUZA, K.W.; COELHO, K. M. A.; GATTASS, C. R. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v. 190, n. 2, p. 165-169, 2003.

FERREIRA, J.; FLORIANI, A. E.; FILHO, V. C; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum Mosenii* stems (Orchidaceae). **Life Science**, v. 66, n. 9, p. 791-802, 2000.

FINNEY, R. S. H.; TARKANOY, A. L. The pharmacological properties of glycyrrhetic acid hydrogen succinate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 12, p. 49-58, 1969.

FU, L.; ZHANG, S.; LI, N.; WANG, J.; ZHAO, M.; SAKAI, J.; HASEGAWA, T.; MITSUI, T.; KATAOKA, T.; OKA, S.; KIUCHI, M.; HIROSE, K.; ANDO, M.. Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 2, p. 198-206, 2005.

FU, L. J.; DAI, Y.; WANG, Z. T.; ZHANG, M. Inhibition of experimental allergic rhinitis by the n-butanol fraction from the anomalous fruits of *Gleditsia sinensis*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 974-977, 2003.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 77-80, 2001.

GNANAPRAGASAM, A.; EBENEZAR, K. K.; SATHISH, V.; GOVINDARAJU, P.; DEVAKI, T. Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. **Life Science**, v. 76, n. 5, p. 585-597, 2004.

GONG, Y.; RAJ, K. M.; LUSCOMBE, C. A.; GADAWSKI, I.; TAM, T.; CHU, J.; GIBSON, D.; CARLSON, R.; SACKS, S. L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 127-130, 2004.

GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Soroceae bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, 77, p. 41-47, 2001.

GRUNDY, D. What activates visceral afferents? **Gut**, v. 53, Supl 2, p. 5-8, 2004.

GUPTA, Y. K.; SHARMA, M.; CHAUDHARY, G. Pyrogalol-induced hepatotoxicity in rats: a model to evaluate antioxidant hepatoprotective agents. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 8, p. 497-500, 2002.

GYAMLANI, G. G., PARIKH, C. R. Acetaminophen toxicity: suicidal vs. accidental. **Critical Care**, v. 6, p. 155-159, 2002.

HALL, A. C.; TURCOTTE, C. M.; BETTS, B. A.; YEUNG, W. Y.; AGYEMAN, A. S.; BURK, L. A. Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, n. 1, p. 9-16. 2004.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance P. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v. 33, n.6, p. 555-576, 2001

HAZAI, E.; VERECZKEY, L.; MONOSTORY, K. Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, n. 4, p. 1089-1094, 2002.

HOLOWNIA, A.; BRASZKO, J. J. Acetaminophen alters microsomal ryanidine Ca^{2+} channel in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 513-521, 2004.

HOLZER, P.; LIPPE, I. T. Stimulation of afferent nerve endings by intragastric capsaicin protects against ethanol-induced damage of gastric mucosa. **Neuroscience**. v. 27, n. 3, p. 981-987, 1988.

HORIE, S.; YAMAMOTO, H.; MICHAEL, G. J.; UCHIDA, M.; BELAI, A.; WATANABE, K.; PRIESTLEY, J. V.; MURAYAMA, T. Protective role of vanilloid receptor type 1 in HCl-induced gastric mucosal lesions in rats. **Scandinavian Journal Gastroenterology**, v. 39, n. 4, p. 303-312, 2004.

HUANG, M. T.; BADMAEV, V.; DING, Y.; LIU, Y.; XIE, J. G.; HO, C. T. Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid, beta-boswellic acid. **Biofactors**, v.13, n. 1-4, p. 225-230, 2000.

IBD - BASES DE DADOS TROPICAIS. **Biodiversidade**: perspectivas e oportunidades tecnológicas. Fitoterápicos. Disponível em:< <http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloint.html>>. Acesso em: 31 maio 2005.

INOUE, H.; KUROSU, S.; TAKEUCHI, T.; MORI, T.; SHIBATA, S. Glycyrrhetic acid derivatives: antinociceptive activity of deoxglycyrrhetol dihemiphthalate and related compounds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42, p. 199-200, 1990.

ISHIGURO, K.; OKU, H. Antipruritic effect of flavonol and 1,4-naphthoquinone derivatives from *Impatiens balsamina* L. chemical mediators of itching. In: BERHARD, J. (Ed.). **Itch: mechanisms and management of pruritis**. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 23-25,

JANBAZ, K. H.; GILANI, A. H. Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 25-33, 2000.

JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. **Phytomedicine**, v. 11, n. 5, p. 424-430, 2004.

JUNG, H. J.; NAM, J. H.; CHOI, J.; LEE, K. T.; PARK, H. J. 19 α -hydroxyursane-type triterpenoids: antinociceptive, anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 101-104, 2005.

KANATANI, K.; EBATA, M.; MURAKAMI, M.; OKABE, S. Effects of indomethacin and rofecoxib on gastric mucosal damage in normal and *Helicobacter pylori*-infected mongolian gerbils. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, p. 207-222, 2004.

KAO, E. S.; WANG, C. J.; LIN, W. L.; YIN, Y. F.; WANG, C. P.; TSENG, T. H. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 430-436, 2005.

KANATANI, K.; EBATA, M.; MURAKAMI, M.; OKABE, S. Effects of indomethacin and rofecoxib on gastric mucosal damage in normal and *Helicobacter pylori*-infected mongolian gerbils. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, p. 207-222, 2004.

KARAI, L.; BROWN, D. C.; MANNES, A. J.; CONNELLY, S. T.; BROWN, J.; GANDAL, M.; WELLISCH, O. M.; NEUBERT, J. K.; OLAH, Z.; IADAROLA, M. J.

Deletion of vanilloid receptor 1 – expressing primary afferent neurons for pain control. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1344-1352., 2004.

KAWAO, N.; IKEDA, H.; KITANO, T.; KURODA, R.; SEKIGUCHI, F.; KATAOKA, K.; KAMANAKA, Y.; KAWABATA, A. Modulation of capsaicin-evoked visceral pain and referred hyperalgesia by protease-activated receptors 1 and 2. **Journal of Pharmacological Science**, v. 94, p. 277-285, 2004.

KIELA, P. R.; MIDURA, A. J.; KUSCUOGLU, N.; JOLAD, S. D.; SOLYOM, A. M.; BESSELSSEN, D. G.; TIMMERMANN, B. N.; GHISHAN, F. K. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 288, n. 4, G798-808, 2005.

KIM, M. S.; NA, H. J.; HAN, S. W.; JIN, J. S.; SONG, U. Y.; LEE, E. J.; SONG, B. K.; HONG, S. H.; KIM, H. M. *Forsythia fructus* inhibits the mast-cell-mediated allergic inflammatory reactions. **Inflammation**, v. 27, n. 3, p. 129-135, 2003.

KINGHORN, A. D. The role of pharmacognosy in modern medicine. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 3, n. 2, p. 77-79, 2002.

KINNMAN, E.; NYGARD, E. B.; HANSSON, P. Effects of dextromethorphan in clinical doses on capsaicin-induced ongoing pain and mechanical hypersensitivity. **Journal of Pain and Symptom Management**. 1997, v. 14, n. 4, p. 195-201, 1997.

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

KOU, J.; NI, Y.; LI, N.; WANG, J.; LIU, L.; JIANG, Z. H. Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 176-180, 2005.

KRAUSE, L.; SHUSTER, S. Mechanism of action of antipruritic drugs. **British Medical Journal**, v. 287, n. 6400, p. 1199-1200, 1983.

KURAIISHI, Y.; NAGASAWA, T.; HAYASHI, K.; SATOH, M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. **European Journal of Pharmacol**, v. 275, p. 229-233, 1995.

KURIBARA, H.; WEINTRAUB, S. T.; YOSHIHAMA, T.; MARUYAMA, Y. An anxiolytic-like effect of *Ginkgo biloba* extract and its constituent, ginkgolide-A, in mice. **Journal of Natural Products**, v. 66, n.10, p. 1333-1337, 2003.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 39-50, 2002.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCÓN, L. C.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 45-53, 2000.

LAIRD, J. M.; MARTINEZ-CARO, L.; GARCIA-NICAS, E.; CERVERO, F. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. **Pain**, v. 92, n. 3, 335-342, 2001.

LARAUCHE, M.; ANTON, P. M.; PEIRO, G.; EUTAMENE, H.; BUENO, L.; FIORAMONTI, J. Role of capsaicin-sensitive afferent nerves in different models of gastric inflammation in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 110, 2, p. 89-97, 2004.

LEACH, M. J. The clinical feasibility of natural medicine, venotonic therapy and horsechestnut seed extract in the treatment of venous leg ulceration: a descriptive survey. **Complementary Therapies in Nursing and Midwifery**, v. 10, n. 2, p. 97-109, 2004.

LEE, W. M. Acetaminophen and the U.S. acute liver failure group: lowering the risks of hepatic failure. **Hepatology**, v. 40, p. 6-9, 2004.

LEYDEN, J. J.; SHALITA, A.; THIBOUTOT, D.; WASHENIK, K.; WEBSTER, G. Topical retinoids in inflammatory acne: A retrospective, investigator-blinded, vehicle-controlled, photographic assessment. **Clinical Therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 216-224, 2005.

LITCHFIELD, L. T. J. R., WILCOXON, F. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 19: p. 388-397, 1949.

LIU, J.; LIU, Y.; MAO, Q.; KLASSEN, C. D. The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 22, p. 34-40, 1994.

LIU, J.; SAAVEDRA, J. E.; LU, T.; SONG, J. G.; CLARK, J.; WAALKES, M. P.; KEEFER, L. K. O(2)-Vinyl 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate protection against D-galactosamine/endotoxin-induced hepatotoxicity in mice: genomic analysis using microarrays. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 1, p. 18-25, 2002.

LIU, Z. G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. **Cell Research**, v.15, n. 1, p. 24-27, 2005.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 221, n. 1, p. 261-267, 1982.

LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L.; VISO, A.; ORTEGA-GUTIERREZ, S. VR1 receptor modulators as potential drugs for neuropathic pain. **Mini Review in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 729-748, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Piracicaba: Plantarum Ltda, p. 76, 1992.

LUPER, S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. **Alternative Medicine Review**, v. 4, n. 3, p. 178-188, 1999.

MADUREIRA, A. M.; ASCENSO, J. R.; VALDEIRA, L.; DUARTE, A.; FRADE, J. P.; FREITAS, G.; FERREIRA, M. J. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. **Natural Product Research**, v.17, n. 5, p. 375-380, 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.

MAITY, S.; VEDASIROMONI, J. R.; CHAUDHURI, L.; GANGULY, D. K. Role of reduced glutathione and nitric oxide in the black tea extract-mediated protection against ulcerogen-induced changes in motility and gastric emptying in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 4, p. 358-364, 2001.

MALLAVADHANI, U. V.; MAHAPATRA, A.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. **Biol Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1576-1579, 2004.

MÁÑEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; RÍOS, J. L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 334, p. 103-105, 1997.

MANGURO, L. O. A.; UGI, I.; LEMMEN, P. Dammarane triterpenes of *Commiphora confusa* resin. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 5, p. 483-486, 2003.

MANGURO, L. O. A.; UGI, I.; LEMMEN, P. Further bisabolenes and dammarane triterpenes of *Commiphora kua* resin. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 5, p. 479-482, 2003.

MANOV, I.; HIRSH, M.; IANCU, T. C. Acetaminophen hepatotoxicity and mechanisms of its protection by N-acetylcysteine: a study of Hep3B cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 53, n. 6, p. 489-500, 2002.

MARTIN-ARAGON, S.; DE LAS HERAS, B.; SANCHEZ-REUS, M. I.; BENEDI, J. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 53, n. 2/3, p. 199-206, 2001.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**. Fortaleza: EUFC, p. 15-18, 1998.

MATSUDA, H.; LI, Y.; MURAKAMI, T.; YAMARA, J.; YOSHIKAWA, M. Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Science**, v. 63, p. 245-250, 1998.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Inhibition of gastric emptying by triterpene saponin, momordin Ic, in mice: roles of blood glucose, capsaicin-sensitive sensory nerves, and central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 2, p. 729-734, 1999b.

MATSUDA, H.; MASAYUKI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotection of escins Ia, Ib, IIa and IIb on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 337, p. 63-70, 1999.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MILLER L. C.; TAINTER, M. L. Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 57, p. 261, 1944.

MIGUEL, M. D; Miguel, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 44, p. 43-50, 1987.

MORIKAWA, T; MATSUDA, H; NINOMIYA, K; YOSHIKAWA, M. Medicinal foodstuffs. XXIX. Potent protective effects of sesquiterpenes and curcumin from *Zedoariae Rhizoma* on liver injury induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide or tumor necrosis factor-alpha. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 627-631, 2002.

MORITA, T.; JINNO, K.; KAWAGISHI, H.; ARIMOTO, Y.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; SUGIYAMA, K. Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1560-1565, 2003.

MULLER-KUHRT, L. Putting nature back into drug discovery. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 602, 2003.

MURAV'EV, I. A.; KULESHOVA, S. A.; SIVERSKAIA, E. V. Experimental study of anti-inflammatory and wound healing properties of 1% ointments of 18-dehydroglycyrrhetic acid sodium salt. **Ekspierimentalnaia I Klinicheskaia Farmakologiia**, v. 64, n. 4, p. 50-52, 2001.

NAGY, I.; SANTHA, P.; JANCZO, G.; URBAN, L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, n. 1-3, p. 351-369, 2004.

NAH, J. J.; HAHN, J. H.; CHUNG, S.; CHOI, S.; KIM, Y. I.; NAH, S. Y. Effect of ginsenosides, active components of ginseng, on capsaicin-induced pain-related behavior. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 11, p. 2180-2184, 2000.

NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J. L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 383-388, 2002.

NIKIEMA, J. B.; VANHAELEN-FASTRE, R.; VANHAELEN, M.; FONTAINE, J.; DE GRAEF, C.; HEENEN, M. Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on keratinocyte proliferation. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 131-134, 2001.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. **Biodiversidade**: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. T.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999. p. 12.

NORTON, S. Quantitative determination of mast cell fragmentation by compound 48/80. **British Journal of Pharmacology**, v. 9, p. 494-497, 1954.

NOVAS, M. L.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J. H.; DE ROBERTIS, E. Proconvulsant and 'p. anxiogenic' effects of n-butyl beta carboline-3-carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 30, n. 2, p. 331-336, 1988.

NOWAK, M.; GAINES, G. C.; ROSENBERG, J.; MINTER, R.; BAHJAT, F. R.; RECTENWALD, J.; MACKAY, S. L.; EDWARDS, C. K.; MOLDAWER, L. L. LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor. **American Journal of Physiology**, v. 278, p. 1202-1209, 2000.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 129-135, 2004.

OGONOWSKI, A. A.; MAY, S. W.; MOORE, A. B.; BARRETT, L. T.; O'BRYANT, C. L.; POLLOCK, S. H. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 2, p. 846-853, 1997.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 103-108, 2005d.

OLIVEIRA, F. A.; LIMA-JUNIOR, R. C.; CORDEIRO, W. M.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 719-725, 2004c.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; FLORENCIO, M. G.; LIMA JR, R. C.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p. 105-111, 2004a.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; SANTOS, K. A.; MARTINS, F. S.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica.**, v. 70, n. 8, p. 780-782, 2004b.

ONTTONEN, T.; PERTOVAARA, A. The mechanical antihyperalgesic effect of intrathecally administered MPV-2426, a novel alpha2 -adrenoceptor agonist, in a rat model of postoperative pain. **Anesthesiology.**, v. 92, n. 6, p. 1740-1745, 2000.

OTUKI, M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L. A.; CANI, G. S.; SANTOS, A. R.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 310-318, 2005.

OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Science**, v. 69, n. 19, p. 2225-2236, 2001a.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, n. 1-3, p. 253-259, 2005b.

PANDIAN, R. S.; ANURADHA, C. V.; VISWANATHAN, P. Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) on experimental gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 393-397, 2002.

PARK, J. S.; CHOI, M. A.; KIM, B. S.; HAN, I. S.; KURATA, T.; YU, R. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. **Life Science**, v. 67, n. 25, p. 3087-3093, 2000.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v.1, p. 7-12, 2003.

PELISSIER, T.; PAJOT, J.; DALLEL, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**, v. 96, n. 1-2, p. 81-87, 2002.

PEREZ, G. R. M.; VARGAS, S. R. Triterpenes from *Agarista mexicana* as potential antidiabetic agents. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 1, p. 55-58, 2002.

PERKINS, M. N.; CAMPBELL, E. A. Capsazepine reversal of the antinociceptive action of capsaicin in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 2, p. 329-333, 1992.

PERTOVAARA, A.; KALMARI, J. Comparison of the visceral antinociceptive effects of spinally administered MPV-2426 (fadolmidine) and clonidine in the rat. **Anesthesiology**, v. 98, n. 1, p. 189-194, 2003.

PESKAR, B. M.; RESPONDEK, M.; MULLER, K. M.; PESKAR, B. A. A role for nitric oxide in capsaicin-induced gastroprotection. **European Journal of Pharmacology**, v. 198, n. 1, p. 113-114, 1991.

PHILLIPSON, J. D. 50 Years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medica**, v. 69, p. 491-495, 2003.

PONGPIRIYADACHA, Y.; MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ASAO, Y.; YOSHIKAWA, M. Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 5, p. 651-657, 2003.

PRESCOTT, L. F. Paracetamol: past, present, and future. **American Journal of Therapeutics**, v. 7, p. 143-147, 2000.

PU, X. C.; WONG, P. T.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1425-1431, 1995.

RAJESH, M. G.; LATHA, M. S. Protective activity of *Glycyrrhiza glabra* Linn. on carbon tetrachloride-induced peroxidative damage. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 5, p. 284-287, 2004.

RAMPRASATH, V. R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Anti-inflammatory effect of *Semecarpus anacardium* Linn. Nut extract in acute and chronic inflammatory conditions. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 12, p. 2028-2031, 2004

RAO, C. V.; OJHA, S. K.; RADHAKRISHNAN, K.; GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Antiulcer activity of *Urtica salicifolia* rhizome extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 243-49, 2004.

REITMAN, S. Gastric secretion. In: FRANKEL, S.; REITMAN, S.; SONNENWORTH, A. C. (Ed.). **Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis**. London: Mosby, 1970. p. 1949-1958.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROSEN, G. M.; SINGLETARY, W. V. J. R.; RAUCKMAN, E. J.; KILLENBERG, P. G. Acetaminophen hepatotoxicity. An alternative mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 13, p. 2053-2059, 1983.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacology and Toxicology**, v. 66, p. 382-386, 1990.

SAADE, N. E.; MASSAAD, C. A.; OCHOA-CHAAR, C. I.; JABBUR, S. J.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; ATWEH, S. F. Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by subplantar injection of capsaicin in rats. **Journal of Physiology**, v. 545, n. 1, p. 241-253, 2002.

SABETKASAIE, M.; VALA, S.; KHANSEFID, N.; HOSSEINI, A. R.; LADGEVARDI, M. A. Clonidine and guanfacine-induced antinociception in visceral pain: possible role of alpha 2/I2 binding sites. **European Journal of Pharmacology**, v. 501, n. 1-3, p. 95-101, 2004.

SAFAYHI, H.; SAILER, E- R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. Review. **Planta Medica**, 63, p. 487-493, 1997.

SAIRAM, K.; RAO, C.V.; BABU, M.D.; KUMAR, K.V.; AGRAWAL, V.K.; GOEL, R.G. Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Embllica officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 1-9, 2002.

SAKURADA, T.; MATSUMURA, T.; MORIYAMA, T.; SAKURADA, C.; UENO, S.; SAKURADA, S. Differential effects of subplantar capsazepine and ruthenium red on

capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 1, p. 115-121, 2003.

SALEEM, M.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene**. v. 23, n. 30, p. 5203-5214, 2004.

SAMONINA, G. E.; KOPYLOVA, G. N.; LUKJANZEVA, G. V.; ZHUYKOVA, S. E.; SMIRNOVA, E. A.; GERMAN, S. V.; GUSEVA, A. A. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology**, v. 11, p. 1-6, 2004.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuroscience Letters**, v. 235, n. 1-2, p. 73-76, 1997.

SANTOS, F. A.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; de ARAUJO R. P.; LIMA JUNIOR, R. C.; RAO, V. S. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. **Food and Chemical Toxicology**., v. 42, n. 4, p. 579-84, 2004.

SARASWAT, B.; VISEN, P. K.; AGARWAL, D. P. Ursolic acid isolated from *Eucalyptus tereticornis* protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p. 163-166, 2000.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. T.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999. p. 597-640.

SEIDL, P. R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n.1, p. 145-150, 2002.

SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. Estimation total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SENTHILKUMAR, R.; NALINI, N. Effect of glycine on tissue fatty acid composition in an experimental model of alcohol-induced hepatotoxicity. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 7, p. 456-461, 2004.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHIN, K. M.; KIM, R. K.; AZEFACK, T. L.; DAVID, L.; LUC, S. B.; CHOUDHARY, M. I.; PARK, H. J.; CHOI, J. W.; LEE, K. T. In vitro anti-inflammatory activity of 23-hydroxyursolic acid isolated from *Cussonia bancoensis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Planta Medica**, v. 70, n. 9, p. 803-807, 2004.

SHISHODIA, S.; MAJUMDAR, S.; BANERJEE, S.; AGGARWAL, B.B. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. **Cancer Research**, v. 63, n. 15, p. 4375-4383, 2003.

SIANI, A. C. (Coord.). **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: planta forma metodológica**. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; LIMA-JUNIOR, O. M.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, E. F.; 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*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 57-69, 1999.

SILVA, V. M., CHEN, C., HENNING, G. E.; WHITELEY, H. E.; MANAUTOU, J. E. Changes in susceptibility to acetaminophen-induced liver injury by organic anion indocyanine green. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. p. 271-278, 2001.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SONG, H. L.; LU, S.; LIU, P. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of enterocytes in mice with fulminant hepatic failure. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 24, 3701-3709, 2005.

SOUZA, M. F.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by ternatin, a bioflavonoid from *Egletes viscosae* Less. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 1-5, 1998.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E.; SILVA, M. L.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 606-609, 2003.

STANDER, S.; MOORMANN, C.; SCHUMACHER, M.; BUDDENKOTTE, J.; ARTUC, M.; SHPACOVITCH, V.; BRZOSKA, T.; LIPPERT, U.; HENZ, B. M.; LUGER, T. A.; METZE, D.; STEINHOFF, M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. **Experimental Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 129-139, 2004.

STEINHOFF, M.; VERGNOLLE, N.; YOUNG, S. H.; TOGNETTO, M.; AMADESI, S.; ENNES, H. S.; TREVISANI, M.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J. L.; CAUGHEY, G. H.; MITCHELL, S. E.; WILLIAMS, L. M.; GEPETTI, P.; MAYER, E. A.; BUNNETT, N. W. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. **Nature Medicine**, v. 6, n. 2, p. 151-158, 2000.

SUNITHA, S.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. **Fitoterapia.**, v. 72, n. 5, p. 516-523, 2001.

SUSUNAGA, G. S.; SIANI, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia.** v. 72, n. 6, p. 709-711, 2001.

SYROVETS, T.; BUCHELE, B.; KRAUSS, C.; LAUMONNIER, Y.; SIMMET, T. Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha induction in monocytes by direct interaction with IkappaB kinases. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 1, p. 498-506, 2005.

SWINGLE, K. F., SHIDEMAN, F. E. Phases of inflammatory responses to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 183, p. 226-234, 1972.

SUGIYAMA, K; SHIMADA, Y; KASUMI, I; MORITA, T. Differential effects of dietary casein and soybean protein isolate on lipopolysaccharide-induced hepatitis in d-galactosamine-sensitized rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.**, v. 66, n. 10, p. 2223-2235, 2002.

SULEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; GOCER, F.; HALICI, Z.; HACIMUFTUOGLU, A. Role of adrenal gland hormones in the mechanism of antiulcer action of nimesulide and ranitidine. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 799-804, 2004

SZABO, S.; TRIER, J. S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, p. 228-236, 1985.

SZABO, S.; SZELENYI, I. 'Cytoprotection' in gastrointestinal pharmacology. **TIPS**, v. 8, p. 149-154, 1987.

SZALLASI A., BLUMBERG P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 159-212, 1999.

SZIKSZAY, M.; OBAL, F. J. R.; OBAL, F. Dose-response relationships in the thermoregulatory effects of capsaicin. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**. v. 320, n. 2, p. 97-100, 1982.

SZOLCSANYI, J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. **The Journal of Physiology**, v. 73, n. 3, p. 251-259, 1977.

SZOLCSANYI, J; BARTHO, L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. **The Journal of Physiology**, v. 95, n. 1-6, p. 181-188, 2001.

TABATA, M.; TANAKA, S.; CHO, H. J.; UNO, C.; SHIMAKURA, J.; ITO, M.; KAMISAKO, W.; HONDA, C. Production of an anti-allergic triterpene bryonolic acid, by plant cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 2, p. 165-174, 1993.

TAN, P. V.; NYASSE, B.; DIMO, T.; MEZUI, C. Gastric cytoprotective anti-ulcer effects of the leaf methanol extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 69-74, 2002.

TANAKA, J.; YUDA, Y.; INOUE, S.; YAMAKAWA, T. The role of nitric oxide in the gastric acid secretion induced by ischemia-reperfusion in the pylorus-ligated rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 424, n. 1, p. 69-74, 2001.

TANAKA, S.; UNO, C.; AKIMOTO, M.; TABATA, M.; HONDA, C.; KAMISAKO, W. Anti-allergic effect of bryonolic acid from *Luffa cylindrica* cell suspension culture. **Planta Medica**, v. 57, p. 527-530, 1991.

TANG, X. H.; GAO, J.; DOU, H.; WANG, Y. P.; XU, L. Z.; ZHU, Z. R.; XU, Q. Protective effect of the extract of *Terminalia catappa* leaves on acute liver injury induced by D-GalN in mice. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.**, v. 29, n. 11, p. 1069-1073, 2004.

TAPONDJOU, L. A.; LONTSI, D.; SONDEGAM, B. L.; CHOI, J.; LEE, K. T.; JUNG, H. J.; PARK, H. J. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 2, p. 143-146. 2003.

TASAKA, K.; MITSUNOBU, M.; MASAHIRO, O. Intracellular calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs. **Annals of Allergy**, v. 56, p. 464-469, 1986.

TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; GARCIA, C. D. A.; DIAS FILHO, B. P.; MORGADO-DIAZ, J. A.; SOUZA W.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 176-182, 2005.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; ANDRADE, F. D. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic activity of four extracts from the barks wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1151-1155, 2002.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 450-458, 2004.

VAN DER MEERSCH, H. Review of the use of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria. **Journal de Pharmacie Belgique**, v. 60, n. 1, p. 23-29, 2005.

VAN DIEN, M.; TAKAHASHI, K.; MU, M. M.; KOIDE, N.; SUGIYAMA, T.; MORI, I.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. Protective effect of wogonin on endotoxin-induced lethal shock in D-galactosamine-sensitized mice. **Microbiology and Immunology**, v.45, n. 11, p. 751-756, 2001.

VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil.. In: JANICK., J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria, VA: ASHS Press, 1999. p. 152–159.

VILLASEÑOR, I. M.; CANLAS, A. P.; FAUSTINO, K. M.; PLANA, K. G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 53-56, 2004.

VONGTAU, H. O.; ABBAH, J.; MOSUGU, O.; CHINDO, B. A.; NGAZAL, I. E.; SALAWU, A. O.; KWANASHIE, H. O.; GAMANIEL, K. S. Antinociceptive profile of the methanolic extract of *Neorautanenia mitis* root in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2/3, p. 317-24, 2004.

WALDMANN, A.; KOSCHIZKE, J. W.; LEITZMANN, C.; HAHN, A. Dietary intakes and blood concentrations of antioxidant vitamins in German vegans. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 75, n. 1, p. 28-36, 2005.

WALKER, K. M.; URBAN, L.; MEDHURST, S. J.; PATEL, S.; PANESAR, M.; FOX, A. J.; MCINTYRE, P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 1, p. 56-62, 2003.

WALUBO, A.; BARR, S.; ABRAHAM, A. M.; COETSEE, C. The role of cytochrome-P450 inhibitors in the prevention of hepatotoxicity after paracetamol overdose in rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 49-54, 2004.

WEI, F; MA, L. Y.; JIN, W. T; MA, S. C.; HAN, G. Z; KHAN, I. A.; LIN, R. C. Antiinflammatory triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 10, p. 1246-1248, 2004.

WEIGAND, M. A.; HORNER, C.; BARDENHEUER, H. J.; BOUCHON, A. The systemic inflammatory response syndrome. **Best Practice Research. Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n.3, p. 455-475, 2004.

WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; UM, B. H.; VONTHRON-SENECHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N. J.; BASARAN, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytotherapy Research**, v.19, n. 1, p. 75-77, 2005.

WEST, S. D.; MERCER, D. W. Bombesin-induced gastroprotection. **Annals of Surgery**, v. 241, n. 2, p. 227-231, 2005.

WHITTLE, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 246-253, 1964.

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

WOOLF, C. J. In: WILLIS, W. (Ed.). **Hyperalgesia and allodynia**. New York: Raven Press, 1992. p. 221-243.

WOOLF, C. J.; CHONG, M. S. Preemptive analgesia: treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. **Anesthesia Analgesia**, v. 77, p. 362-379, 1993.

WU, M. J.; WANG, L.; DING, H. Y.; WENG, C. Y.; YEN, J. H. Glossogyne tenuifolia acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by downregulating LPS-induced NF-kappa B. **Journal of Biomedical Science**, v. 11, n. 2, p. 186-199, 2004.

XIE, J. T.; MEHENDALE, S. R.; WANG, A.; HAN, A. H.; WU, J. A.; OSINSKI, J.; YUAN, C. S. American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p. 113-117, 2004.

YADAV, N. P.; DIXIT, V. K. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 2-3, p. 197-202, 2003.

YANG, M. F.; CHIEN, C. L.; LU, K. S. Compound 48/80-induced degranulation of GnRH-like immunoreactive mast cells in the brain and mesentery of the gerbil. **Zoological Studies**, v. 41, n. 1, p. 99-110, 2002.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; YAMANOUCHI, S.; KUMAKI, K.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of Di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 10, p. 1329-1331, 1996.

YUAN, C. S.; MEHENDALE, S.; XIAO, Y.; AUNG, H. H.; XIE, J. T.; ANG-LEE, M. K. The gamma-aminobutyric acidergic effects of valerian and valerenic acid on rat brainstem neuronal activity. **Anesthesia and Analgesia**, v. 98, n. 2, p. 353-358, 2004.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; BRZOZOWSKI, T.; GZHEGOTSKY., M. R. Influence of plant-originated gastroprotective and antiulcer substances on gastric mucosal repair. **Fiziologicheskii Zhurnal**, v. 50, n. 6, p. 118-127, 2004.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; GZHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, Supl 1, p. 219-31, 2005.

ZEITZ, K. P.; GUY, N.; MALMBERG, A. B.; DIRAJLAL, S.; MARTIN, W. J.; SUN, L.; BONHAUS, D. W.; STUCKY, C. L.; JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 1010-1019, 2002.

ZHANG, W. J.; HUFNAGL, P.; BINDER, B. R.; WOJTA, J. Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. **Thrombosis and Haemostasis**, v.90, n. 5, p. 904-914, 2003.

9. ANEXO

RELAÇÃO DOS ARTIGOS PUBLICADOS A PARTIR DOS ESTUDOS REALIZADOS COM A RESINA E A MISTURA DE TRITERPENOS α - E β -AMIRINA ISOLADA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (Bursaraceae).

1. **OLIVEIRA, F. A.**; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; FLORENCIO, M. G.; LIMA JR, R. C.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p. 105-11, 2004.
2. **OLIVEIRA, FA**; VIEIRA-JUNIOR, GM; CHAVES, MH; ALMEIDA, FR; SANTOS, KA; MARTINS, FS; SILVA, RM; SANTOS, FA; RAO, VS. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v. 70, n. 8, p. 780-2, 2004.
3. **OLIVEIRA, FA**; LIMA-JUNIOR, RC; CORDEIRO, WM; VIEIRA-JUNIOR, GM; CHAVES, MH; ALMEIDA, FR; SILVA, RM; SANTOS, FA; RAO, VS. Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 719-25, 2004c.
4. **OLIVEIRA, FA**; CHAVES, MH; ALMEIDA, FR; LIMA-JUNIOR, RCP; SILVA, RM; MAIA, JL; BRITO, GAAC; SANTOS, FA; RAO, VS. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 103-8, 2005.
5. **OLIVEIRA, FA**; COSTA, CLS; CHAVES, MH; ALMEIDA, FRC; CAVALCANTE, IJM; LIMA, AF; LIMA JUNIOR, RCP; SILVA, RM; CAMPOS, AR; SANTOS, FA; RAO, VSN. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α -and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Science**, 2005. (In Press)