



Tiago Nuno da Cunha Martins Pratas Leitão

## Atividades Biológicas do *Protium heptaphyllum*

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor António Henriques Silva Paranhos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Tiago Nuno da Cunha Martins Pratas Leitão

# Atividades Biológicas do *Protium heptaphyllum*

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pelo Professor Doutor António Henriques Silva Paranhos e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Tiago Nuno da Cunha Martins Pratas Leitão, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010363, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2016.

---

(Tiago Nuno da Cunha Martins Pratas Leitão)

# Agradecimentos

---

Como em qualquer percurso, nada é concretizado sozinho, e este não foi diferente, como tal é necessário agradecer aos inúmeros apoios das diferentes pessoas que me acompanharam neste trajeto. Escusando-me desde já por não conseguir enumerar todos neste espaço aqui ficam os meus eternos agradecimentos.

*A Deus, porque como alguém um dia me ensinou “Ele ama-nos tanto que nos deixa errar para podermos fazer melhor da próxima vez”.*

*À minha família, que me ensinou a humildade para aprendermos com todos independentemente do grau académico; em particular à minha avó Maria do Céu e tias Ana e Isabel por me mostrarem desde sempre a postura que o farmacêutico deve ter na relação com a população, a importância da sua atividade na sociedade e que as recompensas não se contabilizam nos números do honorário.*

*Aos meus pais por me mostrarem a responsabilidade inerente à área e por me inculcarem que profissionais da saúde estão ao serviço da população pois “têm hora de entrar mas não há hora marcada para sair enquanto o trabalho não estiver completo”.*

*Ao professor Doutor António Henrique Silva Paranhos por ter aceiteado este tema e pela ajuda para que chegasse a bom porto.*

*Ao Eduardo Braz por me ter dado a conhecer esta planta magnífica que iniciou toda esta aventura.*

*Aos meus amigos e companheiros de aventuras, que acreditaram no meu potencial e me obrigaram a dar o melhor de mim em todas as ocasiões; em particular a todos os que me acompanharam no meu percurso de associativismo académico por me mostrarem que não há objetivos inalcançáveis.*

*Aos meus irmãos de tatami por me ensinarem que “ou se ganha ou se aprende” e “só perde quem machuca”.*

# Lista de Abreviaturas

---

**AINE** – Anti-inflamatório Não Esteróide

**ALT** – Alanina Aminotransferase

**AST** – Aspartato Aminotransferase

**COX-2** – Cicloxigenase-2

**GSH** – Glutathiona

**ICAM-1** – *Intercellular Adhesion Molecule 1*

**i.p.** – via intraperitoneal

**MPO** – Mieloperoxidase

**NAC** – *N*-acetilcisteína

**NAPQI** – *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PHP** – *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand

**p.o.** – via oral

**TBARS** – *Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*

**TNF- $\alpha$**  – *Tumour Necrosis Factor –  $\alpha$*

## Abstract

---

Embora não seja muito conhecido na Comunidade Internacional, *Protium heptaphyllum* faz parte da medicina tradicional dos índios Pataxó do Brasil há muito tempo. Visto que é usado para tratamento de dentalgias, como analgésico ou até para o tratamento de úlceras, esta planta apresenta uma variedade de possíveis aplicações futuras. A fim de realizar esta monografia foram recolhidas informações de vários estudos relativos ao perfil anti-inflamatório, gastroprotetor, hepatoprotetor e ansiolítico e antidepressivo tanto da mistura de  $\alpha$ -/ $\beta$ -amirinas presente na resina como do perfil anti-inflamatório tópico dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*, tendo os resultados indicado que de fato esta planta apresenta sucessos consideráveis em todos os parâmetros estudados.

Although it isn't a very well-known plant to the International Community, *Protium heptaphyllum* has been used in traditional medicine by the tribe of the Pataxó natives in Brazil for a long time. Seen that its use ranges from toothache and painkiller to ulcer treatment, this plant's popular use points towards a multitude of possible future applications. In order to write this monograph information was retrieved considering several studies regarding both the anti-inflammatory, gastroprotective, hepatoprotective, and anxiolytic and antidepressant abilities of the  $\alpha$  -/ $\beta$ -amyrin mixture from the resin, as well as the topical anti-inflammatory profile of the essential oils of *Protium heptaphyllum*, having the results indicated that this plant shows considerable success in all the aforementioned parameters.

<b>Índice</b>	
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Descrição Botânica</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Atividades dos triterpenos</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1 Atividade Anti-inflamatória</b> .....	<b>6</b>
<b>3.2 Atividade Gastroprotetora</b> .....	<b>6</b>
<b>3.3 Atividade Hepatoprotetora</b> .....	<b>6</b>
<b>3.4 Outras Atividades Biológicas</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Propriedades Farmacológicas de <i>Protium heptaphyllum</i></b> .....	<b>7</b>
<b>4.1 Atividade Anti-Inflamatória</b> .....	<b>7</b>
<b>A. Edema agudo induzido por carragenanos</b> .....	<b>7</b>
<b>B. Aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético</b> .....	<b>8</b>
<b>C. Granuloma induzido por pellets de algodão</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1.1 Atividade Anti-Inflamatória em Periodontite Aguda</b> .....	<b>9</b>
<b>A. Atividade da Mieloperoxidase</b> .....	<b>10</b>
<b>B. Thiobarbituric Acid-Reactive Substances</b> .....	<b>10</b>
<b>C. Concentração plasmática de TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>11</b>
<b>4.1.2 Atividade Anti-inflamatória Tópica</b> .....	<b>11</b>
<b>4.2 Atividade Gastroprotetora</b> .....	<b>13</b>
<b>A. Dano gástrico induzido por etanol e etanol acidificado (HCL/etanol)</b> ..	<b>13</b>
<b>B. Secreção gástrica após 4h da sutura do piloro</b> .....	<b>14</b>
<b>C. Pesquisa de sulfidrilo não proteico no tecido gástrico</b> .....	<b>14</b>
<b>4.3 Atividade Hepatoprotectora</b> .....	<b>14</b>
<b>A. Análise Bioquímica</b> .....	<b>16</b>
<b>B. Análise Histológica</b> .....	<b>16</b>
<b>4.4 Atividade Antidepressiva e Ansiolítica</b> .....	<b>17</b>
<b>A. Campo aberto</b> .....	<b>18</b>
<b>B. Labirinto elevado em cruz</b> .....	<b>18</b>
<b>C. Rota Rod</b> .....	<b>19</b>
<b>D. Natação forçada</b> .....	<b>20</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>21</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>23</b>

## **I. Introdução**

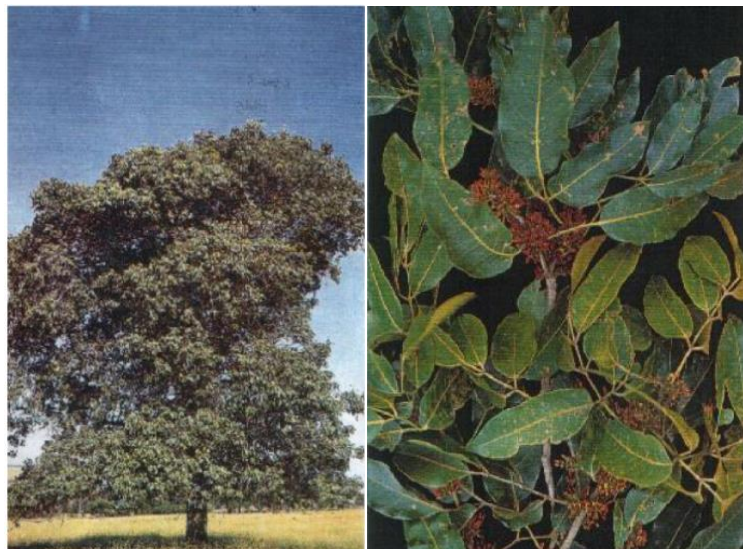
De acordo com a OMS o termo Medicina Tradicional “refere-se ao conhecimento, aptidões e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências nativas de diferentes culturas, usadas na manutenção da saúde e na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doença física ou mental” (World Health Organization). Apesar do avanço tecnológico da civilização, a terapêutica ainda depende muito daquilo que se consegue extrair da Natureza, tanto que 50% dos fármacos produzidos atualmente têm origem em produtos naturais e seus derivados; sendo que, pelo menos, 25% do total provém das plantas vasculares (Gurib-Fakim, 2006), e, de acordo com as estimativas da OMS (num total de 6 mil milhões de pessoas) 65 a 80% da população nos países em desenvolvimento recorrem principalmente a plantas medicinais nos cuidados primários de saúde (Oliveira, 2005). Considerando estes factos, o papel de destaque que a etnofarmacologia e fitoterapia assumem na procura por soluções terapêuticas eficazes com vista na contínua evolução do conhecimento científico demonstra-se incontornável.

Localizados no Sul do estado brasileiro da Bahia, a comunidade indígena Pataxó, com base nas suas crenças e conhecimentos históricos, recorre à fauna e flora para encontrar soluções terapêuticas. De entre a panóplia de materiais disponíveis o *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, vulgarmente designado por Almecegueira destaca-se, tanto pela sua importância na identidade cultural da comunidade como pelos seus usos; a resina é utilizada desde a cura de dentalgias, cefaleias (Thomas, 2001) problemas dermatológicos, úlceras e como analgésico, podendo ser ainda utilizada na calafetagem e rituais religiosos (Bandeira et al., 2007); os óleos essenciais têm sido estudados também pelo seu potencial anti-inflamatório (Susunaga et al., 2001) ou até como repelente de insetos (Marques et al., 2010).



## 2. Descrição Botânica

Pertencente ao Reino *Plantae*, Família *Bursaceae* (que se divide três tribos, todas elas endêmicas de zonas tropicais; tendo a *Bursereae* maior expressão no continente Africano e zonas adjacentes do Asiático; a *Canarieae* surgindo mais no leste asiático e Austrália; e por fim a tribo *Protieae*, encontrada maioritariamente na área equatorial do continente Sul-Americano (Swart, 1942) ), o PHP é uma planta com uma altura entre 10 a 20 m; com tronco de 40-60 cm de diâmetro, cuja madeira apresenta ma densidade de 0,77 g/cm<sup>3</sup>; planta de folha perene; heliófila, com folhas compostas pinadas, lanceoladas, peninérveas, com folíolos de dimensões variáveis (7-10 cm de comprimento e 4-5 cm de largura); angiospérmica (Oliveira, 2005).<sup>1</sup>



*Protium heptaphyllum* (à direita detalhes de partes aéreas)

As resinas do género *Protium* são extremamente ricas em terpenos, moléculas formadas, no mínimo, por 2 unidades de isopreno, seguindo a fórmula química (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub>, sendo divididos e subclasses consoante o número de unidades de isopreno.<sup>2</sup>

### Diferentes classes de terpenos e as suas estruturas químicas

Name (# isoprene units)	Examples
Hemiterpenoid (1)	 Isoprene, HO-Prenol, Isovaleric acid
Monoterpenoid (2)	 Geraniol, Limonene
Sesquiterpenoid (3)	 Farnesol
Diterpenoid (4)	 Cembrene, Retinol
Sesterterpenoid (5)	25-carbon compounds, rare
Triterpenoid (6)	 Squalene
Tetraterpenoid (8)	 Lycopene, β-Carotene
Polyterpenoid	Polyisoprene, rubber, gutta-percha

<sup>1</sup> Fonte: *Árvores Brasileiras* (Lorenzi, 1992).

<sup>2</sup> Fonte: <http://sites.sinauer.com/animalcommunication2e/chapter06.02.html> (acesso em 24 de março de 2016).

A composição da resina de PHP (e suas subespécies), bem como do óleo essencial a que dá origem já foram alvos de estudo, indicando sempre uma forte presença de terpenos principalmente triterpenos pentacíclicos na resina (Oliveira, 2005).

Table. Contents of the Principal Constituents in the Hexane Extracts of the Oleoresins of 23 Neotropical Burseraceae Species

Species	Abbreviation	Content in hexane extract [%] <sup>a)</sup>							
		Volatile compounds <sup>b)</sup>	$\alpha$ -Amyrin	$\alpha$ -Amyrenone	Breïn	$\beta$ -Amyrin	$\beta$ -Amyrenone	Maniladiol	Other triterpenes <sup>c)</sup>
<i>Dacryodes hopkinsii</i>	DHO	5.2	16.6	12.2	1.9	7.5	8.2	4.0	44.4
<i>Protium apiculatum</i>	PAP	32.6	7.9	4.0	–	4.0	4.5	–	46.9
<i>P. aracouchini</i>	PAR	4.0	61.1	4.0	0.9	18.8	2.3	1.1	7.8
<i>P. decandrum</i>	PDE	4.7	27.7	11.8	–	12.9	6.7	2.8	33.4
<i>P. divaricatum</i> ssp. <i>divaricatum</i>	PDD	0.9	58.5	2.1	–	29.8	2.5	–	6.3
<i>P. elegans</i>	PEL	8.0	51.9	3.5	1.9	13.5	3.8	1.8	15.5
<i>P. cf. ferrugineum</i>	PFE	18.3	18.3	–	–	10.9	–	–	52.4
<i>P. gallosum</i>	PGA	2.6	45.1	2.4	–	20.6	–	–	29.3
<i>P. giganteum</i> var. <i>giganteum</i>	PGG	6.0	14.6	29.0	–	11.0	13.7	–	25.7
<i>P. heptaphyllum</i> ssp. <i>ullei</i>	PHU	7.9	40.6	5.5	4.1	17.1	1.9	5.7	17.2
<i>P. cf. laxiflorum</i>	PLA	5.4	57.4	2.4	0.4	22.5	1.8	3.8	6.3
<i>P. nitidifolium</i>	PNI	15.6	6.6	4.8	–	3.7	3.5	–	65.7
<i>P. opacum</i> var. <i>opacum</i>	POO	77.2	8.7	1.2	1.0	2.4	1.4	1.4	6.7
<i>P. paniculatum</i> var. <i>modestum</i>	PPM	6.0	35.3	14.2	5.0	15.8	6.8	2.3	14.5
<i>P. paniculatum</i> var. <i>riedelianum</i>	PPR	2.8	34.4	21.0	1.3	19.1	10.8	1.4	9.3
<i>P. polybotryum</i> ssp. <i>blackii</i>	PPB	24.6	17.7	3.4	–	16.2	5.8	3.3	29.0
<i>P. cf. rubrum</i>	PRU	17.4	10.3	2.2	–	5.9	2.6	–	61.6
<i>P. spruceanum</i>	PSP	1.8	52.6	2.3	–	25.7	3.2	–	14.6
<i>P. strumosum</i>	PST	4.3	32.2	19.5	2.4	14.8	7.5	2.9	16.4
<i>P. tenuifolium</i>	PTE	56.4	6.2	3.5	–	6.4	2.1	–	25.4
<i>Tetragastris panamensis</i>	TPA	63.1	2.3	2.8	–	3.2	1.4	–	27.2
<i>Trattinnickia glaziovii</i>	TGL	3.7	55.5	1.8	3.7	22.6	0.8	5.2	6.7
<i>T. peruviana</i>	TPE	2.4	22.6	28.6	–	8.2	19.0	–	19.2

<sup>a)</sup> Contents are given as relative percentages obtained by integration of the peak areas of the GC-FID chromatograms. <sup>b)</sup> Sum of monoterpenes and sesquiterpenes. <sup>c)</sup> Triterpenes not identified in this study.

3

Table 2  
General constitution of essential oils from resin and leaves of *Protium* species (%)

Composition	PHP	PS	PG	PL	PHT
Monoterpene: hydrocarbons	41	5	5	20	12
Monoterpenes: oxygenated	20	3	1	—	4
Monoterpenes: total	61	8	6	20	16
Sesquiterpenes: hydrocarbons	10	67	72	66	52
Sesquiterpenes: oxygenated	2	25	22	12	31
Sesquiterpenes: total	12	92	94	78	83
Arylpropanoids	24	—	—	—	—
Others	3	Traces	Traces	2	1

The data shows the relative composition of monoterpenes, sesquiterpenes and arylpropanoids in the species of *Protium*, based on the CG/EM peak areas.

PHP, *P. heptaphyllum*; PS, *P. strumosum*; PG, *P. grandifolium*; PL, *P. lewellynti*; PHT, *P. hebetatum*.

4

<sup>3</sup> Fonte: Contents of the Principal Constituents in the Hexane Extracts of the Oleoresins of 23 Neotropical Burseraceae Species (Rüdiger e Veiga-Junior, 2013).

<sup>4</sup> Fonte: Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium* (Siani et al., 1999).

**Table 1** - Chemical composition of essential oil from resin of the *P. heptaphyllum* (Aubl.) March. subsp. *wei* (Swat) Daly (PHU) and *P. heptaphyllum* (Aubl.) March. subsp. *heptaphyllum* (PHH).

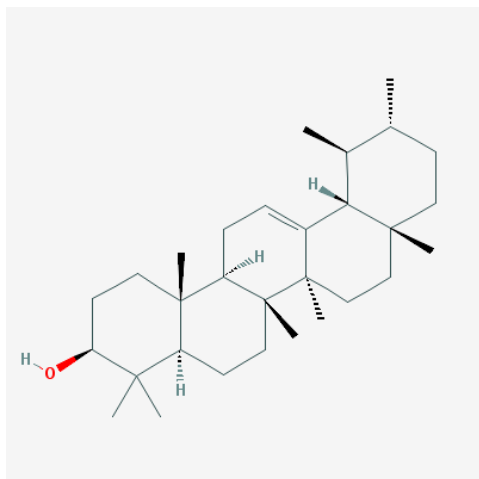
Compounds	RI	PHU (%)	PHH (%)
thujene	928	-	1.88
$\alpha$ -pinene	936	3.96	-
$\beta$ -pinene	972	3.42	0.60
<i>cis</i> -pinane	980	-	1.17
<i>p</i> -menth-3-ene	991	-	3.17
$\alpha$ -phellandrene	997	2.02	7.41
$\alpha$ -terpinene	1010	1.49	1.68
<i>p</i> -cymene	1017	4.75	39.93
pseudocumene	1020	3.06	
dihydro-4-carene	1024		11.69
1,8-cineole	1025	3.07	
limonene	1029	11.87	
$\gamma$ -terpinene	1058	2.62	
<i>p</i> -mentha-2,4(8)-diene	1082		0.85
terpinolene	1097	42.31	4.22
<i>p</i> -mentha-1,3,8-triene	1114	0.68	
<i>trans-p</i> -menthan-8-ol	1144		2.46
<i>p</i> -cymen-8-ol	1186	13.62	
$\alpha$ -terpineol	1190	1.00	
verbenone	1197	0.39	
chrysantheryl acetate	1242	0.72	
n-tridecane	1307		1.75
methyl eugenol	1401	0.76	
n-tetradecane	1405		13.38
$\beta$ -(E)-caryophyllene	1429		1.16
$\alpha$ -humulene	1460		0.43
$\gamma$ -gurjunene	1480		0.45
n-pentadecane	1502		4.49
$\beta$ -bisabolene	1509		0.44
$\alpha$ -bisabolene	1515		0.25
elemicin	1545		0.27
n-hexadecane	1594		0.85
Total (%)		95.74	98.53

RI. Retention indices

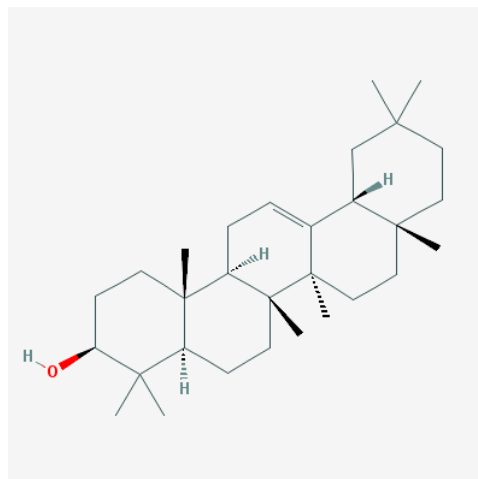
5

<sup>5</sup> Fonte: Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum* (Marques et al., 2010).

De acordo com os estudos apresentados é visível que os óleos essenciais obtidos a partir de resina das subespécies de PHP são maioritariamente constituídos por monoterpenos (Marques *et al.*, 2010), ao passo que a resina da subespécie *Protium heptaphyllum ulei* revela uma enorme quantidade de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirinas e pequenas quantidades de monoterpenos (Rüdiger e Veiga-Junior, 2013; Susunaga *et al.*, 2001).



**Estrutura da  $\alpha$ -amirina**



**Estrutura da  $\beta$ -amirina**

6

### **3. Atividades dos triterpenos**

Os triterpenos têm tido uma atenção crescente em parte devido ao seu largo espectro de atividades biológicas desde bactericida até anti-inflamatória, passando por analgésicas ou mesmo citotóxica e anti tumoral (Patocka, 2003).

Estudos da atividade biológica triterpenóide não são recentes (que, como já referido, abrangem um largo espectro de patologias) incidindo principalmente na sua atividade anti-inflamatória (Safayhi e Sailer, 1997).

No entanto, os triterpenos não são só estudados para efeitos terapêuticos anti-inflamatórios; como referido anteriormente as suas atividades hepatoprotetora, gastroprotetora, antidiabética, antimicrobiana são também de grande interesse para a formulação de novos medicamentos como alternativa aos já existentes.

---

<sup>6</sup> Fonte: National Center for Biotechnology Information (National Center for Biotechnology Information, 2005, 2005).

### **3.1 Atividade Anti-inflamatória**

Devido à semelhança da sua estrutura química com os esteroides os triterpenos apresentam um grande interesse na potencial capacidade anti-inflamatória sem os efeitos secundários associados aos esteroides (Geetha e Varalakshmi, 2001). Estudos revelaram que as classes oleano, ursano e lupano demonstram capacidade anti-inflamatória mas não por um mecanismo esteroide (Mañez, Recio e Giner, 1997); outros referem a capacidade de inibir seletivamente a ação das COX-2, inibir a ativação do complemento, a inibição da elastase, e mesmo a redução da produção de ICAM-1 mediada por TNF- $\alpha$  (Sun *et al.*, 2006). A frequência de doenças inflamatórias implica uma constante busca de novas opções terapêuticas que suplantem as disponíveis na relação efeito terapêutico/efeitos secundários para tratamento de processos inflamatórios e analgesia, visto que as atuais não são desprovidas de um ou mais efeitos indesejáveis; desta forma o recurso a plantas medicinais é incontornável com o objetivo de encontrar uma solução viável (Geetha e Varalakshmi, 2001).

### **3.2 Atividade Gastroprotetora**

Um dos usos mais interessantes de plantas medicinais é no tratamento de úlceras gástricas. A mucosa gástrica é exposta a diversos agentes nocivos, sejam ácidos, pepsina, alimentos, produtos bacterianos ou até fármacos; e a sua terapia continua muito na base do controlo da ação da *Helicobacter pylori*, da bomba de H<sup>+</sup>. Muitos dos fármacos utilizados não são totalmente efetivos e apresentam diversos efeitos secundários (Walber TOMA *et al.*, 2002). Também em situações de úlceras gástricas os triterpenos se evidenciaram como uma boa alternativa de proteção gástrica em modelos animais com úlceras induzidas com HCl/etanol (Sun *et al.*, 2006).

### **3.3 Atividade Hepatoprotetora**

Devido à sua atividade de metabolização de fármacos, o fígado é um órgão extremamente afetado pela formação de metabolitos tóxicos, logo há um interesse acrescido na investigação de fármacos que protejam o seu correto funcionamento. O problema do tratamento de patologias hepáticas frequentes, tal como cirrose, fígado gordo ou hepatite crónica, prende-se com os efeitos secundários e a inconsistência de efeito dos fármacos utilizados (interferão, colquicina, penicilamina e corticosteroides), fazendo com que o tratamento acabe muitas vezes por ser mais prejudicial que a própria doença. Este dilema baseado na má relação benefício/risco fez com que os investigadores se virassem para plantas usadas na medicina tradicional (Luper, 1999), obtendo bons resultados com triterpenos para inibir o aumento dos níveis séricos de ALT, diminuir o armazenamento de

gorduras no fígado bem como reduzir a degeneração de hepatócitos e necrose (Sun *et al.*, 2006).

### **3.4 Outras Atividades Biológicas**

Fora estes espectros de ação, os triterpenos já foram estudados para outras finalidades, pelo seu efeito citotóxico (Lima *et al.*, 2014), ansiolítico e antidepressivo (Aragão *et al.*, 2006); no tratamento da hiperlipidemia (Santos *et al.*, 2012) e diabetes (Sun *et al.*, 2006) ou ainda como antiparasitário (Houël *et al.*, 2015).

## **4. Propriedades Farmacológicas de *Protium heptaphyllum***

Como referido anteriormente, os triterpenos apresentam imensas potencialidades farmacológicas; tendo PHP grande fração destas moléculas na sua resina apresenta-se como uma potencial fonte de novos fármacos.

Fez-se então uma revisão de alguns estudos sobre o desempenho de PHP como agente Anti-inflamatório, Gastroprotetor, Hepatoprotector, Ansiolítico e Antidepressivo.

### **4.1 Atividade Anti-Inflamatória:**

Siani *et al.* (1999) estudaram a atividade anti-inflamatória de várias espécies do género *Protium* num estudo no qual o óleo essencial da resina de PHP reduziu a extravasão vascular de proteínas e a acumulação de eosinófilos (fase importante numa resposta imune a infeções parasitárias ou bacterianas, e alérgica) induzida por lipopolissacarídeo de *E. coli*, O óleo essencial demonstrou ainda capacidade de inibir a produção de NO em 74%.

Para estudar os efeitos anti-inflamatórios pode-se recorrer a vários modelos, tendo Oliveira *et al.* (2004) utilizado o edema agudo na pata induzido por carragenanos, o aumento da permeabilidade vascular induzida por injeção *i.p.* de ácido acético, e o granuloma induzido por *pellet* de algodão em ratos *Wistar* macho para comparar os efeitos da resina de PHP com fármacos de atividade anti-inflamatória comprovada. Estes modelos permitem avaliar diferentes aspetos do processo inflamatório. Os resultados são descritos seguidamente:

#### **A. Edema agudo induzido por carragenanos**

Foi administrado *p.o.* aos diferentes grupos de ratos, consoante o seu grupo, resina (200 e 400 mg/Kg), indometacina (10 mg/Kg), ou veículo (Tween 80 a 2%) num volume total de 10 ml/Kg, 1 hora antes da injeção de carragenano. Os volumes dos edemas, 3 horas após a injeção de carragenano, nos grupos tratados com veículo, resina a 200 mg/Kg, resina a 400 mg/Kg, e indometacina 10 mg/Kg, foram  $0.625 \pm 0.003$  ml,  $0.663 \pm 0.062$  ml,  $0.510 \pm 0.052$  ml e  $0.392$  ml, respetivamente. Nas doses testadas a resina não modificou significativamente a

resposta ao edema, ao passo que a indometacina inibiu o edema em cerca de 73% comparada ao grupo controlo (administrado com veículo).

### B. Aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético

Neste teste os vários grupos foram administrados *p.o.* com resina (200 e 400 mg/Kg), ácido acetilsalicílico (250 mg/Kg), ou veículo (Tween 80 a 3%) num volume total de 10 ml/Kg. 1 hora depois os ratos foram injetados intravenosamente com Azul de Evans (25 mg/Kg), 5

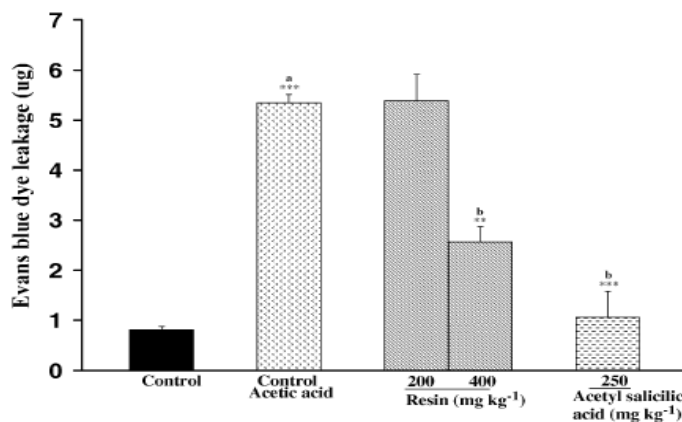


Fig. 4. Effect of resin from *Protium heptaphyllum* and acetylsalicylic acid on acetic acid-induced increase in vascular permeability. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8$ ). Asterisks indicate significant difference from corresponding control. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test).

minutos depois foi administrado ácido acético *i.p.* a 1% num volume de 10 ml/Kg. 30 minutos após administração de ácido acético os animais foram sacrificados, colhido o fluido peritoneal e medida a concentração do corante. A resina a 400 mg/Kg e o ácido acetilsalicílico inibiram significativamente (52 e 80%, respetivamente) o aumento da permeabilidade vascular ao passo que a resina na concentração de 200 mg/Kg não demonstrou influência no aumento da permeabilidade vascular; dados confirmados pela figura.

### C. Granuloma induzido por pellets de algodão

Cada rato teve 2 implantes subcutâneos de *pellets* de algodão esterilizado (50 mg cada) introduzidos no dorso sob o efeito de anestesia com éter e separados em 4 grupos, aos quais foi administrado *p.o.* com resina (200 e 400 mg/Kg), ibuprofeno (300 mg/Kg) ou veículo, 1 vez por dia durante 7 dias; ao 8º dia os ratos foram sacrificados e retirados os *pellets* e tecido granuloso; após isso foram registados os pesos a húmido e seco (após secagem a 60 °C durante 24 horas). Os resultados estão referidos na figura seguinte:

<sup>7</sup> Fonte: Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats (Oliveira *et al.*, 2004).

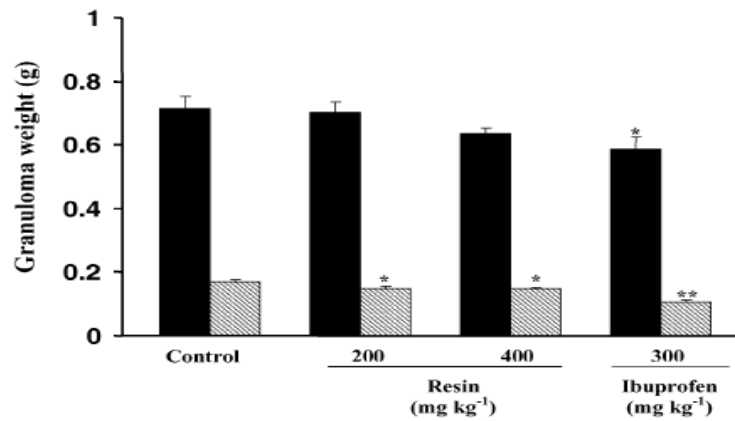


Fig. 3. Effect of resin from *Protium heptaphyllum* and ibuprofen on cotton pellet-induced granuloma wet (filled bars) and dry (hatched bars) weights in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8$ ). Asterisks indicate significant difference from corresponding control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test).

8

#### 4.1.1 Atividade Anti-Inflamatória em Periodontite Aguda

Com vista na aplicação a uma situação mais específica, Holanda Pinto et al. (2008) estudaram os efeitos anti-inflamatórios da resina de PHP em modelos de periodontite aguda. A periodontite é uma doença inflamatória caracterizada por acumulação de placa que pode iniciar uma resposta inflamatória local; a persistência de placa a longo prazo provoca inflamação crónica dos tecidos periodontais levando a reabsorção do osso e perda de dentes (Pihlstrom, Michalowicz e Johnson, 2005); a sua prevenção e tratamento incidem no controlo do biofilme bacteriano, inflamação e perda óssea. A inflamação inicial envolve formação de edema, infiltração de leucócitos, e libertação de mediadores inflamatórios provocando gengivite, que se estende aos tecidos adjacentes; desta forma apesar da inflamação aguda ser facilmente tratável (inibidores seletivos da COX-2 são fármacos de 1ª linha face ao uso de esteroides que contribuem para a perda óssea) a evolução para doença crónica apresenta um aumento exponencial das complicações patológicas.

Para testar o potencial anti-inflamatório da resina na fase aguda de periodontite, induziram a patologia em ratos *Wistar* e analisaram a atividade da MPO (índice de influxo de neutrófilos); a formação de TBARS, teste comum para medir a atividade de radicais livres e assim torna-se um bom índice da destruição oxidativa de lípidos nos tecidos gengivais; e o aumento após 6 horas dos níveis de TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória. Em todos os testes foram comparada a ação da mistura de  $\alpha$ - / $\beta$ -amirinas administrada *p.o.* nas doses de 5 e 10 mg/Kg com um grupo controlo sem qualquer tipo de tratamento (designado *Sham*); um grupo ao qual foi administrado apenas veículo (Tween 80 a 3% num volume de 10 ml/kg); um

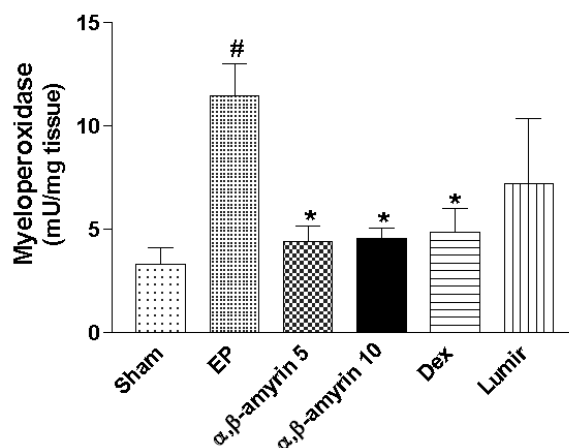
<sup>8</sup> Fonte: Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats (Oliveira et al., 2004).



grupo injetado *i.p.* com 1 mg/Kg de dexametasona; e um grupo ao qual foi administrado *p.o.* lumiracoxib na dose de 20 mg/Kg. Os resultados são apresentados nos pontos seguintes:

### A. Atividade da Mieloperoxidase

A atividade da MPO no tecido gengival aumentou significativamente quando comparada com o grupo *Sham*, devido ao maior influxo de neutrófilos inflamatórios. Os grupos tratados com  $\alpha$ - $\beta$ -amirinas em ambas as doses apresentam um valor de MPO mais baixo que o grupo tratado com veículo mas semelhante ao valor do grupo *Sham*. O Lumiracoxib demonstrou alguma inibição da atividade da MPO mas o seu efeito não foi estatisticamente significativo. A atividade da COX-2 é induzida após ativação celular induzida por citocinas e a sua inibição pode ser útil no controlo da produção gengival de fibroblastos, logo o uso de inibidores seletivos retarda o avanço da patologia.<sup>9</sup>

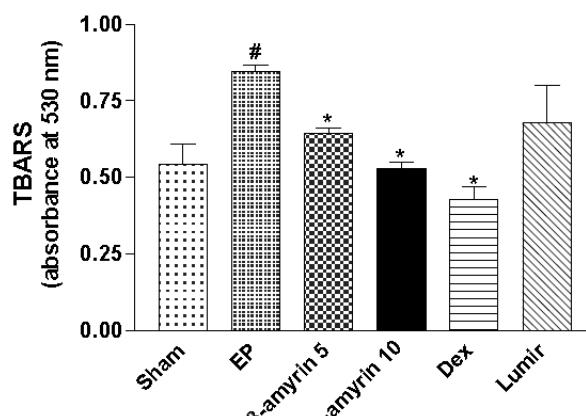


Efeitos de  $\alpha$ - $\beta$ -amirinas, dexametasona e lumiracoxib na atividade da MPO em ratos com periodontite aguda induzida.

Uma inibição significativa da atividade da MPO por parte da mistura  $\alpha$ - $\beta$ -amirinas pode ser benéfica na inibição da progressão da periodontite.

### B. Thiobarbituric Acid-Reactive Substances

Os indivíduos com periodontite apresentam níveis mais elevados de TBARS comparados aos saudáveis, e a sua medição pode ser uma ferramenta preciosa na monitorização e progressão da periodontite. Neste estudo tanto a dexametasona como a  $\alpha$ - $\beta$ -amirinas (dose de 10 mg/Kg) baixaram os valores de TBARS associados à periodontite.<sup>10</sup>



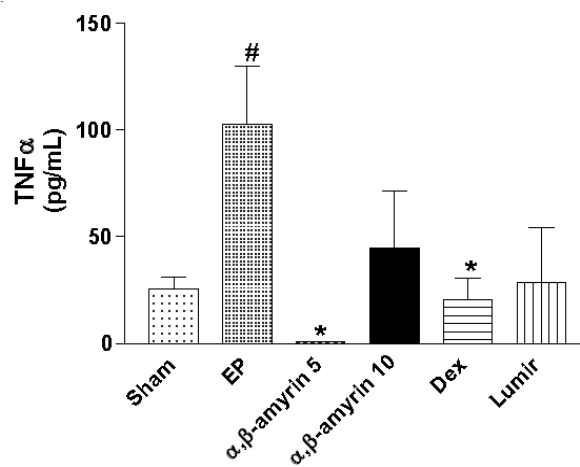
Efeitos de  $\alpha$ - $\beta$ -amirinas, dexametasona e lumiracoxib na atividade de TBARS em ratos com periodontite aguda induzida.

<sup>9</sup> Fonte: Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis (Holanda Pinto *et al.*, 2008).

<sup>10</sup> *Ibidem.*

### C. Concentração plasmática de TNF- $\alpha$

Os sujeitos tratados apenas com veículo demonstram um aumento significativo dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  comparados ao grupo controlo; nos grupos experimentais administrados com  $\alpha$ -/ $\beta$ -amirinas (5 mg/Kg), dexametasona e lumiracoxib apresentam reduções significativas dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ . Os triterpenos usados neste estudo encontram-se numa mistura isomérica, o que pode provocar uma ação limitada pela dose, motivo apontado pelos autores para que as resina na concentração de 5 mg/Kg obtenha efeito inibitório e a dose de 10 mg/Kg não. <sup>11</sup>



Efeitos de  $\alpha$ -/ $\beta$ -amirinas, dexametasona e lumiracoxib na atividade da TNF- $\alpha$  e em ratos com periodontite aguda induzida.

#### 4.1.2 Atividade Anti-inflamatória Tópica

Não só a sua aplicação sistêmica, mas também a aplicação tópica foi estudada, tendo Bernadi *et al.* (2015) avaliado os “aspectos clínicos e histopatológicos da aplicação tópica do óleo da resina de *Protium heptaphyllum* no processo de cicatrização de feridas cutâneas induzidas experimentalmente em *Rattus norvegicus*”. O processo de cura pode ocorrer por sutura ou por cura espontânea (sem recurso a intervenção cirúrgica).

A cura espontânea de uma lesão cutânea tem 3 fases:

- 1<sup>a</sup>- Inflamatória, caracterizada pelo recrutamento de leucócitos para o local.
- 2<sup>a</sup>- Proliferativa, onde ocorre re-epitelização e formação de tecido granuloso (migração e proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais).
- 3<sup>a</sup>- Fase de Maturação, na qual enzimas proteolíticas degradam as fibras de colagénio, promovendo a reparação do tecido lesado.

Para este estudo procedeu-se à realização de uma incisão de 1.5x1.5 cm no dorso de todos os ratos que incluiu pele e tecido subcutâneo, tendo sido administrado 300  $\mu$ L de NaCl 0.9% aos animais do grupo controlo e 300  $\mu$ L do óleo numa concentração de 0.5% aos restantes animais 24 horas após o procedimento. Nos dias 3, 7, 14 e 21 foram feitas

<sup>11</sup> Fonte: Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis (Holanda Pinto *et al.*, 2008).

medições sobre a evolução das lesões, na tabela seguinte apresenta-se as médias referentes ao grupo controlo (CG) e ao grupo tratado com óleo (GO):

**Table 1:** Mean values and standard deviations of the areas of wound healing between the control group (CG) and essential oil of almesca resin group (GO), both experimentally induced in rats

	Day 0	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21
GO	7.07 ± 0.00 <sup>aA</sup>	7.18 ± 1.45 <sup>aA</sup>	2.41 ± 0.46 <sup>bA</sup>	0.51 ± 0.29 <sup>bcA</sup>	0.37 ± 0.22 <sup>dA</sup>
CG	7.07 ± 0.00 <sup>aA</sup>	9.86 ± 2.70 <sup>bB</sup>	4.23 ± 1.37 <sup>cB</sup>	0.84 ± 0.20 <sup>cdB</sup>	0.43 ± 0.19 <sup>dA</sup>

<sup>a</sup>Different lowercase letters on the same line denote significant differences ( $p < .05$ ) on Tukey test. Different uppercase letters in the same column denote significant difference ( $p < .05$ ) on t-test.

12

No 3º dia houve aumento do tamanho em ambos os grupos, com infiltração de células polimorfonucleares correspondente à fase inflamatória. Análises mostraram inflamação multifocal e presença de crosta com infiltração de células polimorfonucleares no grupo controlo, ao passo que no grupo experimental esta reação foi mais moderada sugerindo um fase inflamatória menos intensa (benéfica para o processo de cura).

Ao 7º dia o grupo experimental apresentava o início de epitelização nos limites da lesão e uma disposição paralela das fibras de colagénio (coincidente com a fase proliferativa), enquanto no grupo de controlo entre o 3º e 7º dia a única diferença foi apenas a proliferação de fibroblastos.

No 14º dia de avaliação havia uma inflamação mais suave no grupo de controlo ao passo que no grupo experimental já havia uma re-epitelização intensa nos limites da lesão, caracterizada por uma reação inflamatória e presença de novos capilares sanguíneos e fibroblastos perpendiculares entre si.

Ao 21º dia a avaliação macroscópica confirmou o avanço no processo de cura das lesões no grupo experimental; a análise histopatológica mostrou contração das fibras de colagénio e presença de miofibroblastos. Quanto ao grupo de controlo observou-se a presença da deposição da matriz de colagénio.

Devido à menor intensidade do processo inflamatório e à observação de hiperplasia focal nos limites da lesão em estados mais precoces pode-se afirmar que a aplicação tópica do óleo essencial da resina de PHP numa concentração de 0.5% ajuda o processo de cicatrização.

<sup>12</sup> Fonte: Effects of topical application of essential oil from resin of almesca ( *Protium heptaphyllum* ( Aubl . ) Marchand ) in experimentally induced skin wounds in rats (Bernadi *et al.*, 2015)

## 4.2 Atividade Gastroprotetora

Para além das propriedades anti-inflamatórias Oliveira et al. (2004) também estudaram a atividade gastroprotetora da resina de PHP, tendo para isso recorrido a 4 testes diferentes, dano gástrico induzido por etanol; dano gástrico induzido por etanol acidificado (HCl/etanol); secreção gástrica após 4h da sutura do piloro e pesquisa de sulfidrilo não proteicos no tecido gástrico.

Em todos os testes, exceto no teste da secreção gástrica, os ratos *Wistar* foram mantidos em jejum durante 24 horas, e posteriormente divididos em grupos aos quais foi administrado, resina *p.o.* (200 e 400 mg/Kg), NAC *i.p.* (750 mg/Kg) ou veículo (Tween 80 a 3% num volume total de 10 mg/Kg. Os restantes passos diferem entre cada teste.

### A. Dano gástrico induzido por etanol e etanol acidificado (HCL/etanol)

1 hora após a administração do pré-tratamento aos respetivos grupos, foi administrado *p.o.* a todos os indivíduos 0.2 ml de etanol a 96% ou 0.2 ml da mistura de etanol e HCl (0.3 M HCl/60% etanol) e foram sacrificados 30 minutos depois.

Indivíduos tratados apenas com veículo apresentaram lesões extensivas nas mucosas em ambos os testes, enquanto a resina nas duas doses (200 e 400 mg/Kg) diminuiu as lesões respetivamente em 68 e 89% no teste de etanol, e no teste de etanol acidificado em 45 e 66% respetivamente. A NAC também inibiu a progressão das lesões em cerca de 49 e 69% respetivamente nos testes de etanol e etanol acidificado. Os valores absolutos da extensão das lesões são apresentados na figura.

Table 1

Protective effect of resin from *Protium heptaphyllum* against gastric lesions induced by ethanol or acidified ethanol (0.3 M HCl/60% ethanol) in mice

Treatment	Dosage (mg/kg, p.o.)	Gastric lesions in mice treated with	
		Ethanol (lesion area) (mm <sup>2</sup> )	0.3 M HCl/60% ethanol (lesion area) (mm <sup>2</sup> )
Control	–	23.15 ± 1.82	16.14 ± 1.95
Resin	200	7.38 ± 0.61***	8.91 ± 0.96**
	400	2.50 ± 0.26***	6.53 ± 1.15**
<i>N</i> -Acetyl-L-cysteine	750	11.78 ± 1.59***	4.89 ± 0.05***

The results are expressed as mean ± S.E.M. (*n* = 8). Asterisks indicate significance from corresponding control. \*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* < 0.001 (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test).

<sup>13</sup> Fonte: Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats (Oliveira et al., 2004).

## B. Secreção gástrica após 4h da sutura do piloro

Após jejum de 24 h apenas com acesso a água e glucose (5%), o piloro dos animais foi suturado e foi administrado imediatamente ao respetivo grupo, resina (200 e 400 mg/Kg) e cimetidina (100 mg/Kg) por via duodenal, 4 horas depois os animais foram sacrificados e o volume e acidez total do conteúdo gástrico foram medidos. A aplicação da resina em ambas as doses (200 e 400 mg/Kg)

não afetou o volume das secreções mas inibiu significativamente a acidez (70 e 75% respetivamente) numa proporção próxima à cimetidina (88%).<sup>14</sup>

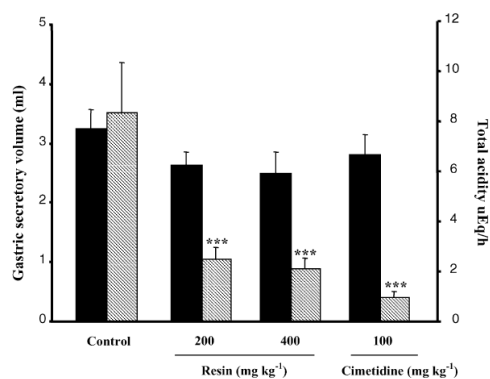


Fig. 1. Effect of resin from *Protium heptaphyllum* and cimetidine on gastric secretory volume (filled bars) and total acidity (hatched bars) in 4-h pylorus-ligated rats. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ). Asterisks indicate significant difference from corresponding control. \*\*\*  $P < 0.001$  (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test).

## C. Pesquisa de sulfidrilos não proteicos no tecido gástrico

Recolheram-se amostras dos diferentes grupos experimentais para estimar a quantidade gástrica de GSH como sulfidrilos não proteicos.

Comparado com o grupo controlo o grupo tratado com veículo (controlo de etanol) apresentou níveis muito baixos de GSH; a resina em ambas as doses recuperou parte dos níveis de GSH mas não os retornou ao nível normal, como foi verificado no grupo tratado com NAC. Os resultados estão apresentados na figura<sup>15</sup>

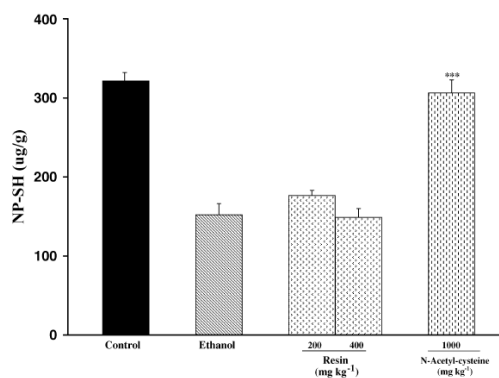


Fig. 2. Effect of resin from *Protium heptaphyllum* and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) on non-protein sulphhydryl (NP-SH) content of gastric tissue in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8$ ). Asterisks indicate significant difference from corresponding control. \*\*\*  $P < 0.001$  (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test).

## 4.3 Atividade Hepatoprotectora

O acetaminofeno (paracetamol) é um dos analgésicos e antipiréticos mais vendidos na prática farmacêutica; a sua sobredosagem ou uso concomitante em situações de alcoolismo crónico provoca falência hepática fulminante e contribui significativamente para o número de internamentos em unidades de cuidados intensivos. A hepatotoxicidade do

<sup>14</sup> Fonte: Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats (Oliveira et al., 2004).

<sup>15</sup> *Ibidem*.

acetaminofeno é devida à formação de um metabolito tóxico, NAPQI, pelo citocromo CYP450E1, provocando uma redução dos níveis intracelulares de GSH e perturbações da homeostase do cálcio dependentes da dose. O tratamento assenta na utilização de NAC, visto que esta eleva os níveis de GSH no citosol e mitocôndrias hepáticos, para combater os efeitos tóxicos da NAPQI.

As amirinas presentes na resina de PHP têm esqueleto oleano e ursano, que apresentam semelhanças químicas entre si, possuem capacidade hepatoprotetoras. Desta forma Oliveira *et al.* (2004) testaram o potencial hepatoprotetor da resina de PHP em modelos animais de lesão hepática induzida por acetaminofeno. Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* macho, separados em grupos, aos quais foi administrado *i.p.*, consoante o respetivo grupo, salino (10 mg/Kg); Tween 80 a 30% em salino (10 mg/Kg); resina nas doses 50 e 100 mg/Kg; e NAC (750 mg/Kg); 48, 24 e 2 horas antes da administração *p.o.* de acetaminofeno (500 mg/Kg). 24h após a administração de acetaminofeno os animais foram sacrificados e amostras sanguíneas e de tecido hepático foram colhidas (animais que pereceram antes do período de 24 horas não foram alvo de análises bioquímicas e histopatológicas) e analisadas para conhecer os valores da atividade de ALT; AST e GSH.

Para averiguar a possível influência da mistura de  $\alpha$ -/ $\beta$ -amirinas presente na resina no CYP450, testou-se o efeito da resina na duração do sono induzido por pentobarbital, para isso separaram-se 3 grupos, aos quais foi administrado *i.p.*, respetivamente, veículo (10 ml/Kg), e resina (50 e 100 mg/Kg), 48, 24 e 2 horas antes da injeção *i.p.* de pentobarbital (50 mg/Kg). Os resultados são apresentados seguidamente:

Effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin mixture on pentobarbitone (50 mg/kg, *i.p.*)-induced sleeping time in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	Sleeping time (mean $\pm$ S.E.M.) (min)
Control (vehicle)	–	<i>i.p.</i>	60.55 $\pm$ 4.71
$\alpha$ - and $\beta$ -amyrin	50	<i>i.p.</i>	86.25 $\pm$ 7.89
	100	<i>i.p.</i>	105.25 $\pm$ 5.29 ***

Data as mean  $\pm$  S.E.M.; *n* = 10 per group.

\*\*\* *p* < 0.001 vs. Control (ANOVA followed by Tukey's test).

16

<sup>16</sup> Fonte: Protective effect of  $\alpha$ - And  $\beta$ -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice (Oliveira *et al.*, 2005)

Estes resultados são também confirmados por Aragão *et al.* (2006) num estudo direcionado para as atividades antidepressivas e ansiolíticas da mistura de amirinas, no qual ratos *Wistars* foram injetados *i.p.* com pentobarbital 40 mg/Kg, e divididos em diferentes grupos aos quais foi administrado, *p.o.* ou *i.p.*, a mistura de amirinas nas doses de 10 e 25 mg/Kg. <sup>17</sup>

Table 3

Effects of alpha- and beta-amyrin (AMY) from *Protium heptaphyllum*, on the barbiturate-induced sleeping time test, in mice

Group	Sleeping time (min)	Increase (%)
Control, <i>p.o.</i> (13)	48.5 ± 4.1	–
AMY 10 mg/kg, <i>p.o.</i> (12)	87.5 ± 3.5*	80.4
AMY 25 mg/kg, <i>p.o.</i> (12)	77.8 ± 6.4*	60.4
Control, <i>i.p.</i> (10)	54.0 ± 4.5	–
AMY 10 mg/kg, <i>i.p.</i> (12)	78.5 ± 3.5*	45.4
AMY 25 mg/kg, <i>i.p.</i> (10)	73.5 ± 4.8*	36.1

Experiments performed as described in Materials and methods. Values are means ± S.E.M. of the sleeping time, measured after the pentobarbital injection. In parenthesis is the number of animals per group. \**p* < 0.05 as compared to controls (ANOVA and Tukey as the *post hoc* test).

### A. Análise Bioquímica

O acetaminofeno provocou um aumento significativo nas atividades de ALT e AST, enquanto reduziu bastante a concentração de GSH, enquanto o pré-tratamento com a resina em ambas as doses demonstrou capacidade inibitória dos efeitos provocados pela sobredosagem de acetaminofeno, numa extensão similar à NAC. Os resultados são apresentados na figura seguinte:

Protective effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin and *N*-acetylcysteine (NAC) against hepatotoxicity induced by acetaminophen (AAP) in mice

Group	Dose (mg/Kg)	Serum ALT (IU/dl)	Serum AST (IU/dl)	GSH ( $\mu$ g/g liver)	Liver damage (histological scores)
Control-normal	–	61.98 ± 11.27	43.17 ± 7.34	655.17 ± 24.10	0.0 ± 0.0
Control-AAP	–	134.35 ± 19.76 <sup>a</sup>	107.28 ± 16.02 <sup>a</sup>	432.17 ± 32.37 <sup>a</sup>	4.83 ± 0.17 <sup>a</sup>
$\alpha$ - and $\beta$ -amyrin + AAP	50	61.28 ± 12.49 <sup>b</sup>	32.53 ± 6.98 <sup>b</sup>	612.54 ± 32.78 <sup>b</sup>	2.17 ± 0.48 <sup>b</sup>
$\alpha$ - and $\beta$ -amyrin + AAP	100	44.15 ± 6.65 <sup>b</sup>	28.57 ± 4.42 <sup>b</sup>	642.01 ± 28.59 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.22 <sup>b</sup>
<i>N</i> -acetylcysteine	750	41.46 ± 5.34 <sup>b</sup>	29.96 ± 6.46 <sup>b</sup>	611.83 ± 32.29 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.22 <sup>b</sup>

Mice received intraperitoneal injections of *N*-acetylcysteine (NAC) or  $\alpha$ -,  $\beta$ -amyrin mixture thrice (48, 24, and 2 h) before the oral administration of acetaminophen (AAP, 500 mg/kg). Twenty-four hours latter, hepatotoxicity was determined by quantifying the serum activities of aspartate amino transferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) and from histopathological analysis. Each value represents means ± S.E.M. (*n* = 10–20).

<sup>a</sup> *P* < 0.05 vs. control-normal.

<sup>b</sup> *P* < 0.05 vs. controle-AAP (one-way ANOVA and Student *t*-test or Kruskal–Wallis test).

18

### B. Análise Histológica

Secções histológicas do grupo administrado apenas com salino apresentaram necrose centrilobular extensa, acumulação e alterações degenerativas adiposas com infiltração de células inflamatórias. Nos grupos administrados com resina as lesões hepáticas foram significativamente menores, tal como no grupo de NAC.

<sup>17</sup> Fonte: A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (Aragão *et al.*, 2006).

<sup>18</sup> Fonte: Protective effect of  $\alpha$ - And  $\beta$ -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice (Oliveira *et al.*, 2005).

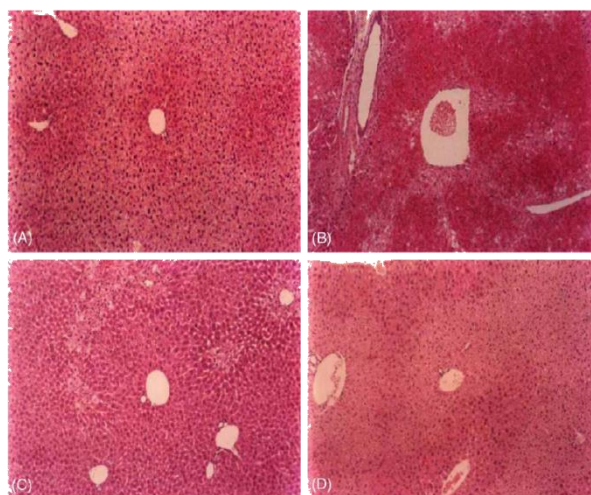


Fig. 2. The representative microphotographs of H&E ( $\times 100$ )-stained histological sections of liver from (A) mice treated with saline showing normal architecture; (B) mice treated with acetaminophen (500 mg/kg, p.o.) and the vehicle used for  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin (10 ml/kg, i.p.) showing centrilobular necrosis, congestion and an extensive area of inflammatory cell infiltration; (C) mice treated with acetaminophen (500 mg/kg, p.o.) +  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin (100 mg/kg, i.p.) showing well preserved hepatocytes as well as the architecture with small areas of necrosis and inflammatory cell infiltration; and (D) mice treated with acetaminophen (500 mg/kg, p.o.) + *N*-acetyl cysteine (750 mg/kg, i.p.) showing partially preserved hepatocytes and architecture with small areas of necrosis and inflammatory cell infiltration.

#### 4.4 Atividade Antidepressiva e Ansiolítica

Estudos anteriores realizados com  $\beta$ -amirina isolada de *Labelia inflata* demonstraram as capacidades sedativas e antidepressivas desta molécula; o que suscitou o interesse para a realização do estudo das propriedades antidepressivas e ansiolíticas das amirinas de PHP; para isso Aragão *et al.* (2006) avaliaram o efeito sedativo e antidepressivo da administração da mistura de  $\alpha$ -/ $\beta$ -amirinas proveniente de PHP bem como tentaram clarificar o seu mecanismo de ação.

Para este estudo foram utilizados ratos *Swiss* macho nos diferentes testes, *rota rod*; campo aberto; labirinto em cruz elevado; tempo de sono induzido por pentobarbital; e natação forçada. De forma a elaborar uma hipótese de mecanismo de ação ansiolítico e sedativo das amirinas, estas foram testadas isoladamente, em concomitância com diazepam (0,5 mg/kg) e/ou de flumazenilo (2,5 mg/Kg) um antagonista das benzodiazepinas para os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Os animais foram administrados com a mistura (10 e 25 mg/Kg *p.o.* e *i.p.*, e 50 mg/Kg exclusivamente *p.o.*) 30 (*i.p.*) e 60 (*p.o.*) minutos antes de ser realizado o teste do labirinto em cruz elevado, a este seguiram-se os testes de campo aberto e *rota rod*. Os resultados apresentam-se de seguida:

<sup>19</sup> Fonte: Protective effect of  $\alpha$ - And  $\beta$ -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice (Oliveira *et al.*, 2005).



## A. Campo aberto

Os animais injetados com a mistura de amirinas em ambas as doses passaram menos tempo em comportamentos de limpeza, menor número de retrocessos e de zonas percorridas do campo, num efeito semelhante ao obtido com diazepam; na presença de flumazenilo o comportamento foi semelhante ao do grupo controlo. Nos grupos

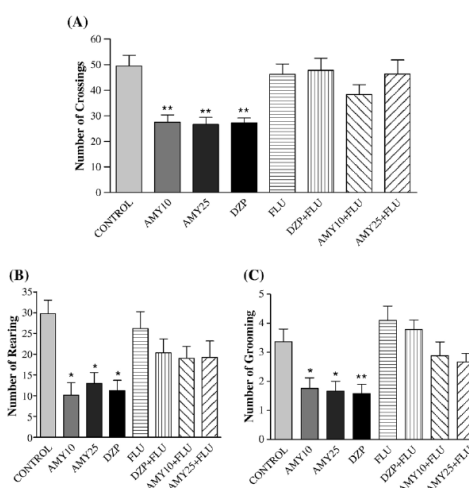


Fig. 2. Effects of alpha- and beta-amyrin (AMY) from *P. heptaphyllum* in the open field test, in mice. A—number of crossings; B—number of rearing and C—number of grooming. Control—Tween 0.5%; AMY, 10 and 25 mg/kg, i.p.; DZP—diazepam, 1 mg/kg, i.p.; FLU—flumazenil, 2.5 mg/kg, i.p. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM, from 6 to 13 animals per group. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  as compared to controls (ANOVA and Tukey as the *post-hoc* test).

administrados com resina (ambas as doses) e flumazenilo, bem como no administrado com diazepam e flumazenilo, o comportamento foi semelhante ao do grupo controlo. A administração *p.o.* da resina (ambas as doses) e diazepam também obteve resultados ansiolíticos, embora numa extensão menor.

Table 1

Effects of alpha- and beta-amyrin (AMY) from *Protium heptaphyllum*, after oral administration to mice, in the open field test

Group	NC/20 min	Number of grooming	Number of rearing
Control (8)	51.88 $\pm$ 1.95	4.33 $\pm$ 0.60	34.11 $\pm$ 2.34
DZP (8)	41.63 $\pm$ 2.75*	1.50 $\pm$ 0.42**	12.25 $\pm$ 2.89**
AMY 10 (8)	46.75 $\pm$ 1.83	1.38 $\pm$ 0.42*	24.75 $\pm$ 2.77
AMY 25 (8)	43.75 $\pm$ 2.53**	1.13 $\pm$ 0.23**	26.50 $\pm$ 2.80
AMY 50 (8)	37.25 $\pm$ 1.94*	1.13 $\pm$ 0.35**	20.25 $\pm$ 3.05**

Experiments were performed as described in Materials and methods. Values are mean  $\pm$  SEM of the number of animals shown in parenthesis. NC=number of crossings. DZP=diazepam used as a positive control. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.001$ , as compared to controls (ANOVA and Tukey as the *post-hoc* test).

20

## B. Labirinto elevado em cruz

Os grupos administrados com resina *i.p.* entraram mais vezes e permaneceram mais tempo nos braços abertos, e, entraram menos vezes e permaneceram menos tempo nos braços fechados, tal como o grupo do diazepam. O flumazenilo inibiu o efeito de ambas as substâncias, tendo o grupo sujeito tido resultados semelhantes ao grupo controlo. A administração oral da resina (ambas as doses) e diazepam obteve resultados semelhantes, embora numa extensão menor. Os resultados apresentam-se nas figuras seguintes:

<sup>20</sup> Fonte: A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (Aragão et al., 2006).

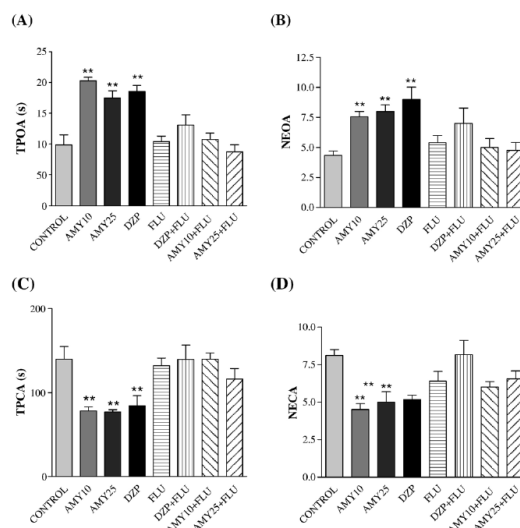


Fig. 3. Effects of alpha- and beta-amyrin (AMY) from *P. heptaphyllum* in the elevated plus maze test, in mice. A- time of permanence in the open arms (TPOA); B- number of entrances in the open arms (NEOA); C- time of permanence in the closed arms (TPCA); and D- number of entrances in the closed arms (NECA). Control- Tween 0.3%; AMY, 10 and 25 mg/kg, i.p.; DZP- diazepam, 0.5 mg/kg, i.p.; FLU- flumazenil, 2.5 mg/kg, i.p. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM, from 6 to 12 animals per group. \*\* $p$ <0.01 as compared to controls (ANOVA and Tukey as the *post hoc* test).

Table 4  
Effect of alpha- and beta-amyrin (AMY) orally administered to mice, in the elevated-plus-maze test

Group	NEOA	NECA	TPOA	TPCA
Control (10)	154.6 $\pm$ 10.92	8.75 $\pm$ 0.88	154.6 $\pm$ 10.92	102.2 $\pm$ 7.91
DZP (10)	217.2 $\pm$ 14.44**	4.13 $\pm$ 1.19**	219.9 $\pm$ 16.81**	59.7 $\pm$ 11.07**
AMY (10) 10 mg/kg	198.4 $\pm$ 9.39 *	6.11 $\pm$ 0.754*	198.4 $\pm$ 9.39**	73.3 $\pm$ 9.06*
AMY (9) 25 mg/kg	208.3 $\pm$ 10.70**	4.67 $\pm$ 0.62**	216.5 $\pm$ 7.84**	55.9 $\pm$ 6.17**
AMY (10) 50 mg/kg	209.1 $\pm$ 11.80**	4.33 $\pm$ 0.69**	17.0 $\pm$ 9.80**	52.6 $\pm$ 5.27**

Experiments performed as described in Materials and methods. Values are mean $\pm$ S.E.M of the number of animals in parenthesis. DZP=diazepam; NEOA=number of entrances into the open arms; NECA=number of entrances into the closed arms; TPOA=time of permanence in the open arms; TPCA=time of permanence in the 21 closed arms. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 as compared to controls (ANOVA and Tukey as the *post hoc* test).

### C. Rota Rod

Os grupos administrados com a resina não apresentaram diferenças significativas relativamente ao grupo controle.

Table 2  
Effects of alpha- and beta-amyrin (AMY) from *Protium heptaphyllum*, on the rota rod test, in mice

Group	TP	NF
Control, i.p. (8)	48.38 $\pm$ 6.43	2.5 $\pm$ 0.19
AMY 10 mg/kg, i.p. (8)	49.63 $\pm$ 4.71	2.12 $\pm$ 0.29
AMY 25 mg/kg, i.p. (8)	55.25 $\pm$ 3.63	1.12 $\pm$ 0.35

Experiments performed as described in Materials and methods. Values are means $\pm$ SEM of the number of animals specified in parentheses. TP=time of permanence; NF=number of falls.

22

<sup>21</sup> Fonte: A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (Aragão *et al.*, 2006).

<sup>22</sup> *Ibidem.*

## D. Natação forçada

Neste teste foi utilizado um grupo diferente de animais ao qual foi administrado a mistura de amirinas nas doses de 1, 2,5 e 5 mg/Kg tanto *p.o.* como *i.p.* (visto que em doses de 10 e 25 mg/Kg os efeitos ansiolíticos mascaram os efeitos antidepressivos) sendo comparada, tanto sozinha como em combinação, com os efeitos da imipramina (10 e 30 mg/Kg) e paroxetina (4 e 16 mg/Kg) e, bem como a sua ação na presença de reserpina (2 mg/Kg). Os resultados apresentam-se seguidamente:

Os animais injetados com a resina nas doses 2,5 e 5 mg/Kg tiveram uma redução na ordem dos 28 e 55%, respetivamente, de tempo de imobilidade, enquanto aqueles injetados com a dose de 1 mg/Kg não apresentaram resultados significativamente diferentes do grupo controlo. A associação de imipramina com a resina nas doses mais baixas (1 e 2,5 mg/Kg) apresentou resultados com tempos de imobilidade menores aos grupos injetados apenas com resina; ao contrário a administração concomitante de resina com paroxetina não alterou os tempos relativamente aos grupos injetados apenas com resina ou paroxetina; os grupos injetados com resina e reserpina simultaneamente apresentam resultados estatisticamente semelhantes aos do grupo controlo. O estudo de administração *p.o.* demonstrou que os animais administrados com resina na dose de 2,5 mg/Kg tiveram menos tempo de imobilidade comparados aos do grupo controlo.

Table 5  
Antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin (AMY, *i.p.*) from *Protium heptaphyllum* in the forced swimming test, in mice, and the possible involvement of noradrenergic and/or serotonergic systems

Group	Time of immobility (s)	% Change
Control (21)	203.5±7.8	–
AMY 1 mg/kg (6)	162.2±17.7	–20
AMY 2.5 mg/kg (9)	145.9±13.2*	–28
AMY 5 mg/kg (10)	91.3±7.8**	–55
IMI 10 mg/kg (6)	145.7±12.6*	–28
IMI 30 mg/kg (8)	73.9±13.3**	–64
PAROX 4 mg/kg (20)	75.6±17.9	Ns
PAROX 16 mg/kg (18)	145.9±6.9**	–28
AMY 1+IMI 10 (09)	114.9±14.6**	–44
AMY 2.5+IMI 10 (07)	102.4±8.5**	–50
AMY 2.5+PAROX 4(14)	150.4±14.0*	–26
RESERP 2 mg/kg (7)	246.6±9.8	+2
RESERP2+AMY2.5(06)	197.0±13.3	Ns

Experiments performed as described in Materials and methods. AMI was administered intraperitoneally. Values are mean±S.E.M. of the immobility time. In parenthesis is the number of animals per group. IMI= imipramine; PAROX= paroxetine; RESERP= reserpine. Drugs were administered 10 min before AMY and the test performed 30 min later. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  as compared to controls (ANOVA and Tukey as the *post hoc* test).

Table 6  
Effect of alpha- and beta-amyrin (AMY) orally administered to mice, in the forced swimming test

Group	Immobility time (s)
Control (8)	190.0±5.51
AMY 1 mg/kg (8)	166.4± 12.12
AMY 2.5 mg/kg (8)	117.1±20.46 *
AMY 5 mg/kg (8)	105.3±16.10 *
IMI 30 mg/kg (8)	85.1±13.72 **

Experiments performed as described in Materials and methods. Values are mean ±SEM of the immobility time. In parentheses is the number of animals per group. IMI= imipramine as a positive standard. \* $p < 0.01$  as compared to controls; \*\* $p < 0.001$  as compared to controls (ANOVA and Tukey as the *post-hoc*).

<sup>23</sup> Fonte: A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (Aragão et al., 2006).

## 5. Conclusão

Os resultados dos diferentes estudos apontam a sua capacidade de reduzir a produção de citocinas, responsáveis pelo aumento da migração de células pró-inflamatórias e o aumento da permeabilidade vascular, como o seu principal mecanismo de ação anti-inflamatório. Apesar das boas indicações, todos os autores concordam que são precisos mais estudos para clarificar o mecanismo de ação e avaliar os seus efeitos em situações inflamatórias crônicas, visto que os modelos aplicados apenas se focam na fase aguda.

Além da sua atividade anti-inflamatória, PHP também apresenta uma ação gastroprotetora, sendo que Oliveira *et al.* (2004) atribuem esta atividade à capacidade de reduzir a acidez total do conteúdo gástrico. Este efeito é uma clara vantagem que a resina de PHP possui comparativamente aos AINE's.

Outra atividade que suscita interesse no PHP é a sua ação hepatoprotetora; esta foi testada em situações de sobredosagem de acetaminofeno por Oliveira *et al.* (2005) e demonstrou resultados promissores, comparáveis a medicamentos de referência como a NAC. Após os resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2005) e Aragão *et al.* (2006) nas alterações produzidas por PHP no tempo de sono induzido por pentobarbital, fármaco metabolizado no CYP450 tal como acetaminofeno, o mecanismo de ação proposto para este efeito hepatoprotetor baseia-se na inibição do citocromo referido, impedindo a formação do metabolito tóxico NAPQI. No entanto a capacidade da mistura de amirinas de inibir algumas isoformas específicas do CYP450 requer investigações mais específicas.

Também para efeitos ansiolíticos PHP demonstra potencial, sendo visível a alteração de ação dos indivíduos nos diferentes testes. Com resultados comparáveis a benzodiazepinas, a mistura de amirinas da resina de PHP, no entanto, não apresenta os efeitos secundários atribuídos a esta classe de fármacos, como sedação exacerbada, dependência e risco de abuso, o que coloca a planta numa posição de destaque em comparação aos medicamentos mais frequentemente utilizados atualmente.

PHP é uma matéria-prima relativamente desconhecida da indústria farmacêutica, no entanto apresenta um grande potencial terapêutico em diversas patologias, apresentando mesmo resultados comparáveis a fármacos de referência, que o colocam numa posição de elevado interesse para desenvolvimento de novos medicamentos, com a vantagem de não apresentar os efeitos secundários associados às classes tradicionalmente prescritas; uma das principais vantagens apresentadas nos diversos estudos é a ausência de

toxicidade associada, tendo Oliveira *et al.* (2004) sido incapazes determinar a  $DL_{50}$  para a administração oral.

Desta forma resta esperar que mais estudos sejam conduzidos de maneira a confirmar a sua aplicabilidade.

## 6. Referências Bibliográficas

- ARAGÃO, G. F. *et al.* - A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. . ISSN 00913057. 85:4 (2006) 827–834. doi: 10.1016/j.pbb.2006.11.019.
- BANDEIRA, Paulo N. *et al.* - Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 17:2 (2007) 204–208.
- BERNADI, Wherrick A. *et al.* - Effects of topical application of essential oil from resin of almescar (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand) in experimentally induced skin wounds in rats. 2015) 10–15.
- GARDNER, C. R. *et al.* - Exaggerated hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking tumor necrosis factor receptor-1: Potential role of inflammatory mediators. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 192:2003) 119–130.
- GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. - Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. 76:2001) 77–80.
- GURIB-FAKIM, Ameenah - Review: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. 27:1 (2006). doi: 10.1016/j.mam.2005.07.008.
- HOLANDA PINTO, S. A. *et al.* - Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**. . ISSN 0925-4692. 16:1 (2008) 48–52. doi: 10.1007/s10787-007-1609-x.
- HOUËL, Emeline *et al.* - Therapeutic switching: from antidermatophytic essential oils to new leishmanicidal products. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. . ISSN 0074-0276. 110:1 (2015) 106–113. doi: 10.1590/0074-02760140332.
- LIMA, Ewelyne M. *et al.* - Triterpenes from the *Protium heptaphyllum* resin – chemical composition and cytotoxicity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. . ISSN 0102695X. 24:4 (2014) 399–407. doi: 10.1016/j.bjp.2014.06.003.
- LORENZI, H. - *Árvores Brasileiras*. Piracicaba. 1992).
- LUPER, Scott - A Review of Plants Used in the Treatment of Liver Disease : Part Two Liver Herbs – Part Two. 4:3 (1999) 178–188.
- MAÑEZ, Salvador; RECIO, M. Carmen; GINER, Rosa M. - Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. 1997) 103–105.
- MARQUES, Delcio Dias *et al.* - Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica**. . ISSN 0044-5967. 40:1 (2010) 227–230. doi: 10.1590/S0044-59672010000100029.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - **alpha-Amyrin** | **C30H50O** [Em linha], atual. 2005. [Consult. 5 jul. 2016]. Disponível em WWW:<URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Amyrin#section=Top>.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - **Beta-Amyrin** | **C30H50O** [Em linha], atual. 2005. [Consult. 5 jul. 2016]. Disponível em WWW:<URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Amyrin#section=Top>.
- OLIVEIRA, Francisco A. *et al.* - Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**. . ISSN 10436618. 49:2 (2004) 105–111. doi: 10.1016/j.phrs.2003.09.001.
- OLIVEIRA, Francisco A. *et al.* - Protective effect of  $\alpha$ - And  $\beta$ -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 98:1-2 (2005) 103–108. doi: 10.1016/j.jep.2005.01.036.
- OLIVEIRA, Francisco De Assis - **ESTUDO DAS PROPRIEDADES**

**FARMACOLÓGICAS DA RESINA DE protium Heptaphyllum (Aubl.) March. E DE SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES, MISTURA DE  $\alpha$  - E  $\beta$  -AMIRINA.** [S.l.]

: Universidade Federal do Ceará, 2005

PATOCKA, Jiri - Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of applied biomedicine**. January (2003).

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. - Periodontal diseases. **Lancet**. 366 (2005) 1809–20.

RÜDIGER, André L.; VEIGA-JUNIOR, Valdir F. - Chemodiversity of ursane- and oleanane-type triterpenes in amazonian burseraceae oleoresins. **Chemistry and Biodiversity**. . ISSN 16121872. 10:6 (2013) 1142–1153. doi: 10.1002/cbdv.201200315.

SAFAYHI, H.; SAILER, E. - Anti-Inflammatory Actions of Pentacyclic Triterpenes. 63:1997) 487–493.

SANTOS, Flávia *et al.* - Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from Protium heptaphyllum in mice. **Lipids in Health and Disease**. . ISSN 1476-511X. 11:1 (2012) 98. doi: 10.1186/1476-511X-11-98.

SIANI, A. C. *et al.* - Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 66:1999) 57–69. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00148-2.

SUN, Hua *et al.* - Structure-activity relationships of oleanane- and ursane- type triterpenoids. **Botanical Studies**. 47:2006) 339–368.

SUSUNAGA, G. S. *et al.* - Triterpenes from the resin of Protium heptaphyllum. **Fitoterapia**. . ISSN 0367326X. 72:6 (2001) 709–711. doi: 10.1016/S0367-326X(01)00289-1.

SWART, J. J. - **A monograph of the genus Protium and some allied genera ( Burseraceae )**. [S.l.] : Utrecht, 1942

THOMAS, Michael B. - **AN ANALYSIS OF THE PATAXÓ PHARMACOPOEIA OF BAHIA, BRAZIL, USING AN OBJECT ORIENTED DATABASE MODEL** By. [S.l.] : University of Florida, 2001

WALBER TOMA *et al.* - Antiulcerogenic Activity of Four Extracts Obtained from the Bark Wood of Quassia amara L. ( Simaroubaceae ). 25:September (2002) 1151–1155.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Traditional medicine** [Em linha] [Consult. 1 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.who.int/topics/traditional\_medicine/en/>.

Foto de capa retirada de <https://www.flickr.com/photos/starcisoleao5700871029> e <http://www.refloresta-bahia.org/en/amargosa/protium-heptaphyllum> (acessos a 18 de agosto)