



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALANE ALEXANDRA DA SILVA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE
GENÉTICA DA RESINA DE BREU-BRANCO (*Protium* spp., Burseraceae)
EXTRAÍDA POR MÉTODO VERDE**

RECIFE
2023

ALANE ALEXANDRA DA SILVA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE
GENÉTICA DA RESINA DE BREU-BRANCO (*Protium* spp., Burseraceae)
EXTRAÍDA POR MÉTODO VERDE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas. Área de
concentração: Fármacos e
Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Ribeiro de Oliveira

RECIFE

2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Kyria Macedo, CRB4 1693

O48a	Oliveira, Alane Alexandra da Silva Atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e toxicidade genética da resina de breu-branco (<i>Protium</i> spp., Burseraceae) extraída por método verde / Alane Alexandra da Silva Oliveira. – 2023. 77 f. : il., tab. Orientador: Rafael Matos Ximenes. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2023. Inclui referências. 1. Burseraceae. 2. Anti-Inflamatórios. 3. Genotoxicidade. 4. Óleos Voláteis. I. Ximenes, Rafael Matos (orientador). II. Título. 617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2024 - 152)
------	---

ALANE ALEXANDRA DA SILVA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE
GENÉTICA DA RESINA DE BREU-BRANCO (*Protium* spp., Burseraceae)
EXTRAÍDA POR MÉTODO VERDE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas. Área de
concentração: Fármacos e
Medicamentos.

Aprovada em: 30/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. André Severino da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o grande Autor de tudo. E a sagrada família pela intercessão pela minha família ao longo deste período.

Agradeço aos meus pais Adelino Roberto e Ana Lucia e minha irmã Amanda Maria, por todo suporte, educação, amor e ensinamentos que dispuseram para minha formação. Agradecimento especial ao meu esposo, Iago Lira. Amor, toda essa pesquisa foi possível porque você esteve ao meu lado, obrigada por todo seu apoio e compreensão. Agradeço também aos seus pais Zeneildo e Sandra Lira.

Minha gratidão aos professores e funcionários desta Universidade, em especial ao meu orientador, Rafael Ximenes, por todo auxílio e conhecimentos a mim repassados. Agradeço imensamente ao meu coorientador, Danilo Oliveira, por me receber e compartilhar seus ensinamentos. Estendo minha gratidão aos membros do Laboratório de Bioprospecção e Etnofarmacologia Aplicada (LABEA)-UFRJ, especial Rayane Albino, Lucas Bernardo e Emyli Brito, e aos membros do Laboratório de Genética do Centro Acadêmico de Vitória-CAV-UFPE e dos demais laboratórios que me deram assistência.

Aos meus colegas do Laboratório de Etnofarmacologia e Fitoquímica, todos, sem exceção, contribuíram com meu trabalho. Em especial a Raudiney Mendes e Felipe Santana nesta reta final. Quero ainda estender este agradecimento a Camila Alves que muito além de uma colega de laboratório foi uma amiga e sinal de Deus para minha vida, este título também é seu.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares que sempre me ajudaram, seja na vida acadêmica, profissional ou pessoal, em especial a Izabella Vasconcelos, Irthylla Muniz, Fernanda Gomes e Carla Albuquerque. A cada pessoa que me acolheu em Recife, cada carona e cada suporte que me ofereceram, principalmente minhas primas Gabriela Andrade e Jheyce Barros. A todos que contribuíram de alguma forma, minha eterna gratidão.

Agradeço ao meu filho, Bento Oliveira Lira, que ainda em meu ventre tanto me ensinou e ensina e tanto me faz forte. Filho, tudo que a mamãe fizer será para que você conheça o amor e a bondade de Deus por nós. Torno a agradecer a Ele por me dar a graça de te gerar e a nossa Senhora por sua proteção.

Agradeço a CAPES pelo apoio e financiamento no desenvolvimento deste projeto.

“ Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas.

*A ele seja a glória
para sempre! Amém.”*

Romanos, 11:36.

RESUMO

O breu-branco (*Protium* spp., Burseraceae) é um tradicional produto do extrativismo amazônico, amplamente comercializado para consumo local e para indústria cosmética. A oleorresina do breu-branco é extremamente aromática e muito utilizada pelos povos da região amazônica para dores em geral, inflamações e como cicatrizante. O óleo essencial e a mistura dos principais constituintes fixos da resina do breu-branco, alfa e beta-amirina, apresentaram efeito anti-inflamatório em diversos estudos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e a genotoxicidade do óleo essencial e de extratos apolares extraídos da resina de breu-branco. O óleo essencial foi obtido por meio de hidrodestilação, enquanto os extratos apolares foram obtidos utilizando fluido supercrítico, um método verde, sob diferentes condições de granulometria, temperatura e pressão. O extrato escolhido como melhor opção para as análises foi o BBFSE2 (extrato de breu-branco obtido por fluido supercrítico estático – 2º método), com etanol como cossolvente em sua extração, apresentando rendimento de 77,81% e altas concentrações de alfa e beta-amirina (42,58% e 21,95%, respectivamente). Não foi observada atividade antimicrobiana em nenhuma das amostras frente aos microrganismos testados (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*). O efeito do óleo essencial e do extrato BBFSE2 na viabilidade celular em macrófagos murinos foi avaliado em concentrações de 100 a 1,56 µg/mL. Ambos reduziram a viabilidade celular somente nas maiores concentrações, sendo o extrato consideravelmente mais citotóxico que o óleo essencial. Em concentrações não citotóxicas, somente o extrato foi capaz de inibir a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com LPS (5 µg/mL). O extrato foi avaliado na produção de citocinas e efeito semelhante foi observado para interleucina-6, mas não para o fator de necrose tumoral alfa. Em seguida, a atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos Swiss, machos, com 8 semanas de idade. No teste agudo houve redução de 32,2% do edema na maior dose do extrato testada (1 mg/orelha), enquanto no crônico a maior redução foi na concentração de 0,3 mg/orelha, 61%. No teste de genotoxicidade realizado através de ensaio cometa com larvas de *Drosophila melanogaster*, o solvente utilizado (água destilada, 5% Tween 80 e 5% etanol) foi genotóxico em relação ao controle negativo (água), não havendo aumento de dano quando exposto ao BBFSE2 em nenhuma das concentrações testadas (0,3; 1,0; 3,0 e 10,0 mg/mL). Esta pesquisa corrobora a atividade anti-inflamatória do extrato apolar de breu-branco, relativa aos usos tradicionais, além de constatar que não apresenta genotoxicidade nas condições testadas.

Palavras-chave: breu-branco; anti-inflamatório; oleorresina; genotoxicidade; fluido supercrítico.

ABSTRACT

Breu-branco (*Protium* spp., Burseraceae) is a traditional product of Amazonian extractivism, widely commercialized for local consumption and the cosmetic industry. The oleoresin of white copal is extremely aromatic and widely used by the peoples of the Amazon region for general pain, inflammation, and as a healing agent. The essential oil and the mixture of the main fixed constituents of the white copal resin, alpha and beta-amyrin, have shown anti-inflammatory effects in several studies. The objective of this research was to evaluate the anti-inflammatory, antimicrobial and genotoxic activity of the essential oil and apolar extracts extracted from white copal resin. The essential oil was obtained by hydrodistillation, while the apolar extracts were obtained using supercritical fluid, a green method, under different conditions of granulometry, temperature and pressure. The extract chosen as the best option for the analyses was BBFSE2 (white copal extract obtained by static supercritical fluid - 2nd method), with ethanol as a co-solvent in its extraction, presenting a yield of 77.81% and high concentrations of alpha and beta-amyrin (42.58% and 21.95%, respectively). No antimicrobial activity was observed in any of the samples against the tested microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*). The effect of the essential oil and BBFSE2 extract on cell viability in murine macrophages was evaluated at concentrations of 100 to 1.56 µg/mL. Both reduced cell viability only at the highest concentrations, with the extract being considerably more cytotoxic than the essential oil. In non-cytotoxic concentrations, only the extract was able to inhibit nitric oxide production in peritoneal macrophages stimulated with LPS (5 µg/mL). The extract was evaluated in the production of cytokines and a similar effect was observed for interleukin-6, but not for tumor necrosis factor alpha. In sequence, the anti-inflammatory activity was evaluated by the croton oil-induced ear edema model in 8-week-old male Swiss mice. In the acute test there was a 32.2% reduction in edema in the highest dose of the extract tested (1 mg/ear), while in the chronic test the greatest reduction was in the concentration of 0.3 mg/ear, 61%. In the genotoxicity test performed through the comet assay with larvae of *Drosophila melanogaster*, the solvent used (distilled water, 5% Tween 80 and 5% ethanol) was genotoxic in relation to the negative control (water), with no increase in damage when exposed to BBFSE2 in any of the concentrations tested (0.3; 1.0; 3.0 and 10.0 mg/mL). This research corroborates the anti-inflammatory activity of the apolar white copal extract, relative to traditional uses, in addition to finding that it does not present genotoxicity under the tested conditions.

Keywords: breu-branco. anti-inflammatory. oil-resin. genotoxicity. supercritical fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Apresentação do <i>Protium heptaphyllum</i> na natureza	20
Figura 2 - Resina de <i>Protium heptaphyllum</i> in natura	20
Figura 3 - Queima da resina de breu-branco	21
Figura 4 - Monoterpenos associados a atividade anti-inflamatória de <i>Protium heptaphyllum</i> : p-cimeno e α -pineno	24
Figura 5 - Estruturas das amirinas e amironas encontradas em <i>Protium</i> : α -amirina (a); β -amirina (b); α -amirona (c); β -amirona (d)	26
Figura 6 - Fluxograma do processo inflamatório agudo e crônico	29
Figura 7 - Ensaio cometa com representação da classificação dos danos	31
Figura 8 - Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	33
Figura 9 - Fluxograma de extrações	34
Figura 10 - Amostra de resina de <i>Protium</i> spp. seca e triturada	43
Figura 11 - Extrato de Breu-Branco-Oleoresina por Fluido supercrítico 3A – BBOFS3A	45
Figura 12 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido pela análise por GC-MS de BBFES2	54
Figura 13 - Gráfico de viabilidade celular dos macrófagos peritoniais tratados com óleo de Breu-branco- BBO por 24h. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)	57
Figura 14 - Gráfico de viabilidade celular dos macrófagos peritoniais tratados com extrato de Breu-branco- BBFSE2 por 24h. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)	57
Figura 15 - Gráfico da quantificação da dosagem de óxido nítrico em macrófagos tratados com BBO por 24h *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)	58
Figura 16 - Gráfico da quantificação da dosagem de óxido nítrico em macrófagos tratados com BBFSE2. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)	59
Figura 17 - Gráfico da quantificação da dosagem da citocina TNF-alfa em macrófagos tratados com BBFSE2. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)	59

Figura 18 - Gráfico da quantificação da dosagem da citocina IL-6 em macrófagos tratados com BBFSE2. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$) 60

Figura 19 - Gráfico do peso das orelhas após aplicação de óleo de cróton e tratamentos com BBFSE2 nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1, onde o grupo que só recebeu óleo funcionou como controle negativo. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$) 62

Figura 20 - Gráfico das medidas da espessura das orelhas após múltiplas aplicações de óleo de cróton e tratamentos com BBFSE2 nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$) 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de Protium encontradas no Brasil, suas origens e principais componentes	24
Tabela 2 - Condições de extração e teor de rendimento da amostra	46
Tabela 3 - Composição química do óleo essencial da oleorresina de breu branco	47
Tabela 4 - Terpenos tentativamente identificados por GC-MS em diferentes extratos de uma mesma amostra de oleorresina de breu-branco	49
Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos extratos e óleo de Breu.	56
Tabela 6 - Histomorfometria do edema de orelha agudo tratado com BBFSE2	62
Tabela 7 - Média dos níveis de dano observados em hemócitos de <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon-R dos tratamentos controle (Controle negativo: água destilada; Solvente : água destilada, 5% Tween 80 e 5% etanol; e concentrações do extrato de breu-branco Protium spp	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BBFSE1	Extrato de breu-branco por fluído supercrítico estático 1
BBFSE2	Extrato de breu-branco por fluído supercrítico estático 2
BBO	Extrato de breu-branco óleo essencial
BBOFS3A	Extrato de breu-branco óleo resina fluído supercrítico 3A
CMI	Concentração Inibitória Mínima
CMB	Concentração Bactericida Mínima
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com Detector por Ionização de Chama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
IFN	Interferom
IL-6	Interleucina-6
L-NAME	Nw-Nitro-L- arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NO	Óxido Nítrico
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	FAMÍLIA Burseraceae E O GÊNERO <i>Protium</i>	18
3.2	USOS TRADICIONAIS E PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO BREU- BRANCO	20
3.3.	CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	23
3.4	PROCESSO INFLAMATÓRIO	27
3.5	ENSAIO DE TOXICIDADE GENÉTICA.....	30
3.5.1	Ensaio com <i>Drosophila melanogaster</i>	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	34
4.2	PREPARO DA AMOSTRA E EXTRAÇÕES.....	34
4.2.1	Extração por hidrodestilação	35
4.2.2	Extração com CO ₂ supercrítico.....	35
4.3	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	36
4.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
4.5	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	37
4.5.1	Macrófagos peritoneais	37
4.5.1.1	Obtenção e isolamento dos macrófagos peritoneais.....	37
4.5.1.2	Avaliação de citotoxicidade através do ensaio com brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	38

4.5.1.3	Produção de óxido nítrico e citocinas em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS)	38
4.5.2	Edema de orelha induzido por óleo de cróton	39
4.5.2.1	Edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton	39
4.5.2.2	Edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton	39
4.5.3	Análise histológica e histomorfométrica	40
4.6	ENSAIO COMETA EM <i>Drosophila melanogaster</i>	40
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	PREPARO DAS AMOSTRAS E RENDIMENTOS	43
5.1.1	Extração do óleo essencial – BBO	43
5.1.2	Extração 1 - BBOFS3A	44
5.1.3	Extração 2 - BBFSE1	45
5.1.4	Extração 3 - BBFSE2	46
5.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	47
5.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	54
5.4	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	56
5.5	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO (LPS)	58
5.6	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA IN VIVO	61
5.6.1	Edema de orelha induzido por óleo de cróton	61
5.6.2	Edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton	62
5.7	Ensaio cometa de Genotoxicidade com <i>Drosophila melanogaster</i>	63
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A flora amazônica é rica em plantas medicinais utilizadas para tratamento e cura de doenças, além da presença cultural dos povos indígenas, ribeirinhos e caboclos que mantêm uma sensível relação com o meio ambiente através de suas crenças (Da silva pereira; Coelho-ferreira, 2017). A família Burseraceae é considerada de grande importância desde os inventários iniciais na floresta amazônica, porém há dificuldades na diferenciação das espécies pertencentes a ela. São poucos os trabalhos relacionados com a morfologia de frutos, pirênios e plântulas do gênero *Protium*, o qual possui espécies utilizadas na fabricação de cosméticos e medicamentos (Melo; Macedo; Daly, 2007; Fagundes *et al.*, 2021).

O breu-branco (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand) conhecido também como almíscar, almácega, almécega do Brasil e goma-limão produz uma resina oleosa e aromática, rica em óleos essenciais. Sendo uma das plantas mais utilizadas pelos povos da região amazônica, os quais atribuem a sua oleorresina propriedades como: antimicrobiana, antinociceptiva, antioxidante e anti-inflamatória (Vieira *et al.*, 2014; Albino *et al.*, 2017).

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa que ocorre como resposta aguda à lesão tecidual e é responsável por produzir sinais que alteram a homeostase do tecido e fluxo sanguíneo. As inflamações podem ocorrer em todo o organismo sendo uma resposta natural do sistema imunológico, na qual ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas. Este processo é necessário para a recuperação do organismo, mas quando crônico pode causar diversas doenças, incluindo as neurodegenerativas, arteriosclerose, diabetes e câncer (Marmitt *et al.*, 2015; Valadas *et al.*, 2019). Os medicamentos anti-inflamatórios apresentam efeitos colaterais que podem interferir diretamente na adesão ao tratamento e levar a restrição do seu uso, sendo a utilização de plantas medicinais uma alternativa para terapia das doenças inflamatórias (Marmitt *et al.*, 2015).

O efeito anti-inflamatório foi relatado na literatura tanto para o óleo essencial de *P. heptaphyllum*, quanto para mistura dos seus principais constituintes triterpênicos: α - e β -amirina. Os triterpenos da fração fixa da resina apresentam propriedades bioativas, como antihiperglicêmicas, hipolipidêmicas, hepatoprotetoras e antiulcerogênicas, indicando o potencial gastroprotetor e anti-inflamatório da resina. A

mistura triterpênica apresenta ainda efeito analgésico envolvendo o receptor vaniloide (TRPV-1), além de mecanismo de ação do tipo opioide (Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2015; De lima *et al.*, 2016).

Na composição do óleo essencial de *P. heptaphyllum* foram encontrados monoterpenos e fenilpropanoides, principalmente α -terpinoleno, p-cimeno, p-cimen-8-ol, limoneno e diilapiol. A presença de monoterpenos na resina oleosa do breu-branco, tais como D-limoneno, está possivelmente correlacionada com a atividade anti-inflamatória em modelos agudos e crônicos, além disso, o seu óleo essencial apresenta também propriedade sedativas, e proteção contra a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (Siani *et al.*, 1999; Amaral *et al.*, 2009, De lima *et al.*, 2016).

Para as extrações dos produtos das espécies de plantas geralmente utilizam-se solventes tóxicos, nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Para minimizar este uso são feitas pesquisas utilizando extração por fluido supercrítico e a substituição por outros solventes “verdes” como o etanol, produto de processos biotecnológicos com grande potencial para redução de impactos ambientais, como a emissão de gases de efeito estufa, considerado como solvente GRAS (*Generally Recognized as Safe*). A extração com fluido supercrítico é empregada em condições de temperatura e pressão acima do ponto crítico, o que propicia elevado poder de solvatação e coeficiente de difusão, baixa tensão superficial e viscosidade. A exemplo temos o CO₂, com pressão crítica moderada (73 atm) e temperatura crítica baixa (31°C), possibilitando a extração de compostos termicamente instáveis e sendo facilmente removido dos produtos extraídos (Hawthorne, 1990; Kluczkovski; Oliveira; Maciel, 2021).

Entretanto, há uma grande variedade de metabólitos secundários produzidas por espécies vegetais, e muitas delas podem produzir substâncias que provocam alterações metabólicas prejudiciais ao homem e aos animais. A intoxicação por espécies vegetais, seja aguda ou crônica, apresenta difícil diagnóstico, o que gera impacto na saúde pública. Além da avaliação toxicológica para produtos tópicos de uso prolongado, por exemplo, é preconizada a realização de testes genotóxicos. Com o auxílio da realização destes testes pode-se avaliar o potencial das substâncias de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas (Brasil 2013; Campos *et al.*, 2016; Da silva *et al.*, 2021).

O interesse é crescente em ensaios que podem medir com segurança a instabilidade cromossômica devido ao seu importante papel em causar defeitos de desenvolvimento, câncer e envelhecimento acelerado. Dentre os testes realizados estão: micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN) e eletroforese em gel de célula única (cometa) (Sousa, 2017; Fenech, 2020). Uma alternativa para o ensaio cometa é a utilização das larvas de *Drosophila melanogaster*. Este ensaio beneficia diferentes áreas de investigação, fornecendo características intrínsecas do DNA de células individuais e suas respostas a fatores externos como radiação, químicos e fármacos (Silva, 2012; Cruz, 2015; Brischigliaro; Fernandez-Vizarra; Viscomi, 2023).

Tendo em vista o potencial terapêutico anti-inflamatório de *P. heptaphyllum*, especialmente de sua oleorresina, através deste trabalho avaliamos os extratos obtidos por método de extração verde utilizando CO₂ supercrítico, bem como seu óleo essencial, quanto aos seus efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano e potencial genotóxico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter extratos da oleorresina de breu-branco (*Protium* spp., Burseraceae) por método verde e avaliá-los quanto aos seus efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano e potencial genotóxico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o óleo essencial e purificar a resina de breu-branco utilizando métodos verde;
- Caracterizar o óleo essencial e os extratos obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Determinar a atividade antimicrobiana das amostras;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do óleo essencial e dos extratos em macrófagos murinos;
- Determinar a atividade anti-inflamatória tópica da fração mais ativa em modelos murinos de edema de orelha agudo e crônico;

Investigar a genotoxicidade do extrato de breu-branco em larvas de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA Burseraceae E O GÊNERO *Protium*

A biodiversidade de plantas encontradas na Amazônia é considerada a maior do planeta, com cerca de 30 mil espécies endêmicas na região, as quais são responsáveis por fornecerem excelentes recursos naturais, que podem ser classificados em produtos florestais madeireiros e não madeireiros. A exemplo temos as plantas da família Burseraceae. No Brasil, ocorrem sete gêneros e cerca de 100 espécies desta família, cujo principal interesse econômico é devido ao forte aroma existente nas folhas, cascas e no exsudatos, utilizados na fabricação de cosméticos e medicamentos (Vieira; Silva; Toledo, 2005; Fagundes *et al.*, 2021).

A família Burseraceae é constituída por árvores e arbustos, perenes, terrestres, polígamo, dioicos ou monoicos, com ductos resiníferos. As folhas são geralmente, alternas e compostas, com margens inteiras ou serreadas, e folíolos com pulvino. As inflorescências ocorrem como racemos, panículas ou pseudo-espigas. As flores são unissexuadas e os frutos drupáceos. A família ocorre principalmente nos continentes Americano, Africano e sudeste Asiático, estando a maior densidade genérica de espécies no hemisfério sul. A família pertence a ordem Sapindales, classe dicotiledônea e subclasse *Rosidae*, com mais de 700 espécies divididas em 19 gêneros em três tribos: *Bursereae*, com oito gêneros; *Canarieae*, com oito gêneros, e *Protieae*, com três gêneros. (Fagundes *et al.*, 2021; Da Silva *et al.*, 2021).

De acordo com o levantamento realizado por Black *et al.* (1950) esta família é considerada de grande importância desde os inventários iniciais na floresta amazônica porém são relatadas dificuldades na diferenciação das suas espécies. *Protium* é o gênero desta família que mais se destaca, com mais de 140 espécies, poucas delas estudadas do ponto de vista químico. Entretanto, diversos constituintes de *Protium* já foram identificados, como terpenoides, esteroides, cumarinas, flavonoides e lignanas. Às espécies do gênero *Protium* são atribuídas, frequentemente, propriedades terapêuticas na medicina popular, sendo utilizadas para tratar dores, inflamações, feridas, e em distúrbios respiratórios (Melo; Macedo; Daly, 2007; Moraes *et al.*; 2009; Costa *et al.*, 2012).

Dentre as 20 espécies mais abundantes da Amazônia são encontradas árvores do gênero *Protium*, apresentando *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March uma abundância de 169 árvore/há no estudo realizado por Ter Steege *et al.* (2013). Apesar da maioria das espécies estarem distribuídas na região amazônica, outros ecossistemas brasileiros possuem registros desta família, como no Rio de Janeiro e Pernambuco, em áreas de Mata Atlântica, e em Minas Gerais, em áreas de Cerrado, onde ocorrem especialmente *P. heptaphyllum* (Fernandes, 2010).

Em Pernambuco, espécies como *P. giganteum* e *P. aracouchine* são facilmente encontradas em regiões arenosas, com solo seco e úmido, como no fragmento de floresta ombrófila densa, localizado no município de Igarassu. Na área vegetada de restinga no Rio de Janeiro, entre as espécies de Burseraceae se destaca *Protium icicariba* (Montezuma; Araújo, 2007; Moraes *et al.*, 2009). No Pará, *Protium* spp. mostrou-se predominante de acordo com o estudo realizado por Francez *et al.* (2009), tanto antes como após a exploração ambiental.

As espécies desta família possuem capacidade de exsudar resinas ricas em óleos essenciais, contendo até 30% na resina fresca, e encontrando-se vestígios resinosos na casca, como é o caso de *P. heptaphyllum*, conhecido popularmente como breu, breu-branco, almecegueira-vermelha, amescla. Plantas da espécie *P. heptaphyllum* são responsáveis por parte da diversidade de florestas úmidas e secas, suas árvores podem alcançar até 20 m de altura e 60 cm de diâmetro do tronco e são conhecidas pelo armazenamento de oleorresinas em estruturas secretoras de sua casca (Rocha *et al.*, 2022; Albino *et al.*, 2017).

O tronco desta árvore é espesso, possuindo a casca de coloração avermelhada, folhas opostas (Figura 1), imparipinadas e flores em panículas terminais (Citó *et al.*, 2006). Quando a árvore sofre intervenções físicas a resina viscosa é produzida e exsudada em forma líquida. Após este processo que funciona como mecanismo de proteção, ocorre a liberação de seus compostos voláteis, e então os exsudados se transformam em um material amarelado maleável, que em seguida se transforma em uma resina cinza e rígida (Figura 2) (Rüdiger; Siani; Veiga Junior, 2007).

Figura 1 – Apresentação do *Protium heptaphyllum* na natureza



Fonte: Paralela escola olfativa (2023)

Figura 2 - Resina de *Protium heptaphyllum* in natura



Fonte: Amazonoil (2023)

3.2 USOS TRADICIONAIS E PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO BREU-BRANCO

Nas comunidades quilombolas do município de Oriximiná, Estado do Pará, Amazônia, as oleorresinas são conhecidas como piche ou breu. Nessas comunidades, o breu é tratado como uma etnoespécie refletindo a importância dos seus exsudatos. Acredita-se que as oleorresinas de breu-preto e breu-branco diferem em qualidade,

uma vez que as de breu-branco são preferidas para usos medicinais, por exemplo, no tratamento de dor de cabeça, enquanto as de breu preto são utilizadas no conserto de canoas (Albino *et al.*, 2020).

As diferentes composições do breu são consequência dos locais onde são obtidas as amostras e dependem das condições climáticas em que se encontram, o que reflete em sua composição química e, consequentemente, em suas propriedades biológicas. A resina consiste basicamente em uma combinação de triterpenos pentacíclicos, principalmente α - e β -amirina, e uma fração volátil composta de mono e sesquiterpenos. Existem relatos na literatura de atividades biológicas como: anticoncepcionais, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes, bem como efeito gastroprotetor (Vieira *et al.*, 2014).

Em seu trabalho, Costa *et al.* (2006) destacou *P. heptaphyllum*, também conhecida como amescla, por apresentar maior diversidade de uso, dentre eles o uso em artesanatos. Indígenas da região norte da América do Sul obtêm vernizes através da resina, para utilizar em partes de peças de cerâmica recém-cozidas ou até para a produção de toda a cerâmica. Por ser aderente, a resina possui diversas aplicações, como na fabricação de corantes ou fixação e impermeabilização de embarcações de madeira. A queima da resina também é realizada como combustível no intuito de iluminar as casas na floresta, produzir fumos aromáticos que são utilizados em rituais religiosos e como repelente natural de insetos (Figura 3) (Rüdiger; Siani; Veiga Junior, 2007).

Figura 3 - Queima da resina de breu-branco



Fonte: Perlas Prill (2023)

Além disto, sua fumaça é inalada como analgésico. A resina também é usada em problemas odontológicos, e ainda como emoliente e antisséptico. A casca da raiz é considerada adstringente, além de promover depuração renal e propriedades antissifilíticas. Outras propriedades são atribuídas às demais partes das plantas, como ação: estimulante, cicatrizante, contraceptiva, laxante, hemostática, antirreumática e para tratamento de doenças pulmonares (Cunha, 2020; Albino *et al.*, 2020).

Além do uso na medicina popular, a resina é utilizada para fixação de pedras ornamentais, mármore e vidro. A indústria de papel a utiliza como aditivo para controlar a absorção de água. A fração volátil é utilizada na indústria de perfumaria e desinfecção de ambientes. Quanto ao uso pela indústria cosmética podemos citar a empresa Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda que realizou a produção de produtos com esta espécie. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em agosto de 2002, a Natura foi acionada por estar adquirindo e utilizando o conhecimento tradicional do breu-branco (*P. pallidum*), no Estado do Amapá (Bertan, 2003; Homma; Homma, 2014).

Em seu trabalho, Santos (2021) pesquisou entre povos indígenas sobre o uso de plantas no tratamento de síndromes respiratórias e aplicações na Covid-19. Dentre as espécies, foi citado o uso popular da resina, casca e folhas de *P. heptaphyllum* no tratamento de inflamações em geral e resfriados, relatando ainda ação hemostática, cicatrizante, anti-inflamatória e descongestionante nasal. Seus usos medicinais também são relatados na Comunidade Sucuri, Cuiabá – MT, na forma de xarope para tratamento de tosse (Gonçalves; Pasa, 2015).

A resina obtida da casca de espécies de *Protium* tem sido amplamente utilizada para evitar o agravamento de membros e dentes quebrados, além de outras propriedades como para o tratamento de gonorreia, doenças estomacais e pulmonares (Murthy *et al.*, 2016). Em uma pesquisa realizada por Albertasse *et al.* (2010) na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, Espírito Santo sobre as plantas medicinais foi relatado o uso da resina de *P. heptaphyllum* na forma de emplastro com indicações de propriedade cicatrizante e para inflamações como artrite e artrose.

Há relatos na etnomedicina de como os povos costumavam utilizar o breu como emplastos para forte dores, como no caso da “espinhela caída”, onde Almeida (2013) descreve em seu livro o modo de preparo:

“Terebintina meia onça, pós de breu (Resina de plantas da família das burfoiceas principalmente do breu-branco-verdadeiro - *Protium heptaphyllum*

March.), de incenso e mirra (*Commiphora myrrha* (Nees) Engl. (Burseraceae)), almécega (Resina de *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae) de cada um escrúpulo, sangue de dragão (*Dracaena draco* (L.) L. (Dracaenaceae)) meio escrúpulo, misturem-se todos muito bem e estando a terebintina no fogo, deles se irão lançando nela pouco a pouco e mexendo-os até que fique um polme brando, e não grosso, estando em cima de fogo muito brando. Depois se tirará e se estenderá em pano novo bem tapado, o qual passado pelo ar do fogo se aplicará em cima da espinhela com quentura (Almeida, 2013, p. 17)”

3.3. CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Na aromaterapia, os valores terapêuticos das plantas aromáticas se encontram em seus constituintes voláteis, como monoterpenoides, sesquiterpenoides e compostos fenólicos que produzem ações fisiológicas. Os óleos essenciais são misturas voláteis e complexas, caracterizadas por cheiros fortes e formados por metabólitos secundários, com cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações (Murthy *et al.*, 2016).

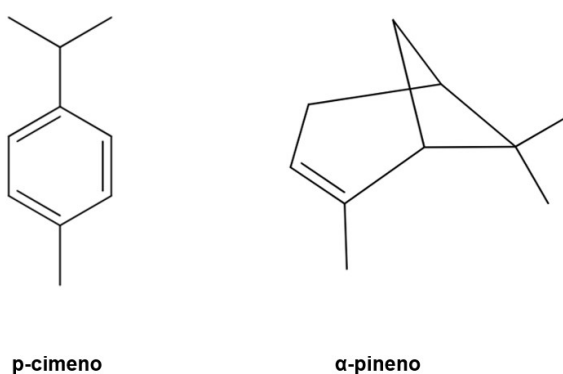
São vários os monoterpenos que apresentam atividades biológicas, podemos citar, por exemplo, α -pineno, borneol, p-cimeno e limoneno. A maioria dos monoterpenos são lipofílicos e possuem estruturas altamente voláteis. Estão associadas ao p-cimeno e ao α -pineno (Figura 4) atividades biológicas como: antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Outro monoterpeno comumente encontrado em concentrações variadas, entre algumas espécies de plantas que apresentam ações analgésica, antimicrobiana e anti-inflamatória é α -felandreno, um dos compostos da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolia* Raddi, Anacardiaceae) (Kummer, 2015; Scherer, 2017).

As oleorresinas exsudadas de espécies da família Burseraceae possuem propriedades biológicas e farmacológicas. Em seu trabalho, Murthy *et al.* (2016) elencou os componentes encontrados nos óleos essenciais dos representantes da família (Tabela 1), em especial mono e sesquiterpenos, com destaque ao gênero *Protium* descrito também por outros autores.

A oleoresina de *P. heptaphyllum* apresenta alto percentual de compostos voláteis, quando seca possui alto rendimento de óleo essencial (2,5%), que tem entre os principais componentes os monoterpenos: α -terpinoleno, dilapiol e limoneno. O limoneno é um monoterpeno encontrado nos óleos essenciais de diversas plantas, incluindo outras espécies de *Protium* como *P. icicariba*. Estudos com óleos essenciais

contendo R- (+) -limoneno como um dos compostos predominantes ou com limoneno puro demonstraram suas atividades anti-inflamatórias e eficácia quimiopreventiva em sistemas modelo pré-clínico. Dentre os monoterpenos também são encontrados: α -pineno (2,62%), mirceno (1,01%), α -felandreno (0,20%) e p-cimeno (2,41%) (Siani *et al.*, 1999; De Araújo *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2009).

Figura 4 - Monoterpenos associados a atividade anti-inflamatória de *Protium heptaphyllum*.: p-cimeno e α -pineno



Fonte: a autora (2023)

Tabela 1 - Espécies de *Protium* encontradas no Brasil, suas origens e principais componentes (continua)

Espécie	Origem (Bioma)	Método de extração	Componentes majoritários	Referência
<i>Protium altsonii</i> Sandwith	Reserva Florestal Adolfo Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil	Hidrodestilação	p-cimeno, trans-dihidro- α -terpineol	Zoghbi <i>et al.</i> , 2005.
<i>Protium gallosum</i> Daly	Reserva Florestal Adolfo Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil	Hidrodestilação em Clevenger.	terpin-4-ol	Lima <i>et al.</i> , 2022
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March	Crato-Ceará, Brasil	—	α -pineno, limoneno, α -felandreno, e terpinoleno	Bandeira <i>et al.</i> , 2001.
<i>Protium hebetatum</i> Daly	Reserva Florestal Adolfo Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil	Produção de resina induzida por solução de ácido 2-cloroetilfosfônico, hidrodestilação em sistema de Clevenger	α -pineno, o-cimeno, e limoneno	Lima <i>et al.</i> , 2016.

Tabela 1 - Espécies de *Protium* encontradas no Brasil, suas origens e principais componentes (conclusão)

Espécie	Origem (Bioma)	Método de extração	Componentes majoritários	Referência
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand subsp. <i>Heptaphyllum</i>	Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil	hidrodestilação em Clevenger.	p -cimeno	Marques <i>et al.</i> , 2010
<i>Protium heptaphyllum</i> subsp. <i>Ulei</i> (Swart) Daly	Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil	Hidrodestilação em Clevenger.	Terpinoleno	Marques <i>et al.</i> , 2010
<i>Protium icicariba</i> (DC.) Marchand	Carapebus, na mata atlântica, Rio de Janeiro, Brasil	Destilação de arraste a vapor e clevenger	p-cimeno, α -pineno, α -terpinolene and limoneno	Siani <i>et al.</i> , 2004
<i>Protium paniculatum</i> Engl.	Reserva Florestal Adolfo Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil	hidrodestilação em Clevenger.	p-cimeno e 1,8-cineol	Lima <i>et al.</i> , 2022
<i>Protium pilosum</i> e (Cuatrec.) Daly <i>Protium paniculatum</i> var. <i>riedelianum</i> (Engl.) Daly	Reserva Florestal Adolfo Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil	hidrodestilação em [^] : Clevenger.	α -pineno e 1,8-Cineol	Lima <i>et al.</i> , 2022
<i>Protium strumosum</i> Daly	Parque zoobotânico do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil.	Hidrodestilação	Limoneno	Zoghbi <i>et al.</i> , 2005
<i>Protium</i> spp.	Reserva biológica de Campina, Manaus, Amazonas, Brasil.	Hidrodestilação e separação com Na ₂ SO ₄ .	Monoterpenos e fenilpropanoides	Siani <i>et al.</i> , 1999

Fonte: adaptada de Murthy *et al.* (2016)

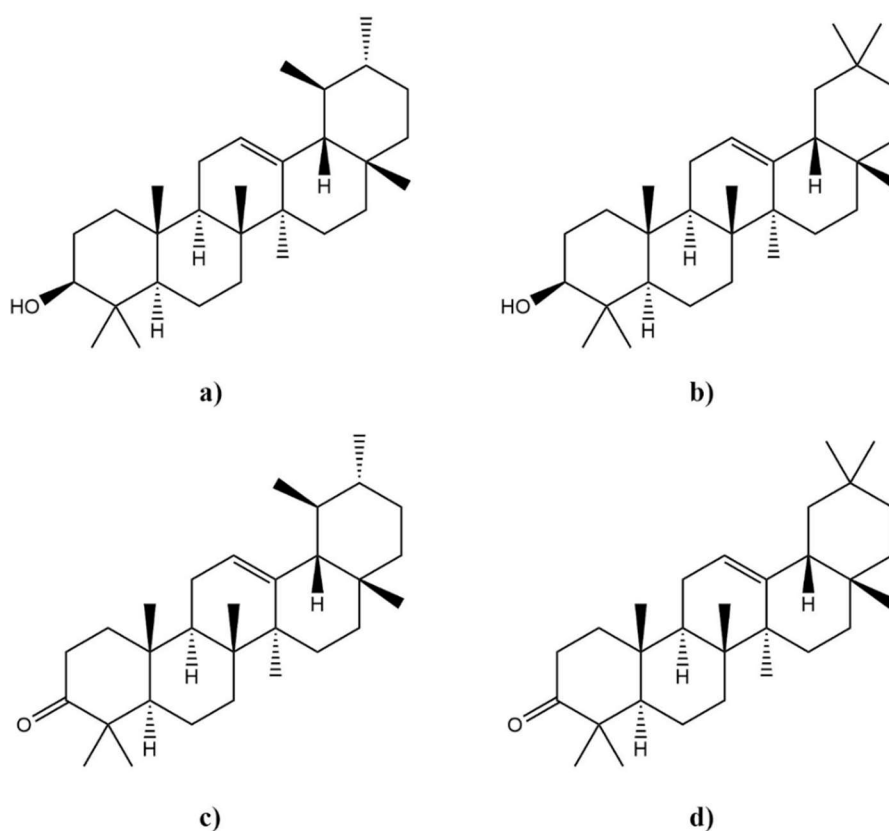
Os monoterpenos e sesquiterpenos, com estruturas terpênicas de menor massa molecular, apresentam volatilidade acentuada. Característica de importância para o aroma dos produtos naturais, particularmente de frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimento. Diterpenos, triterpenos e tetraterpenos, por sua vez, apresentam baixa volatilidade. Diterpenos e triterpenos estão entre os componentes principais de oleorresinas (Felipe; Bicas, 2017).

Espécies do gênero *Protium* apresentam diferentes tipos de terpenos, com mais de 100 monoterpenos e sesquiterpenos caracterizados. Enquanto a fração volátil

é composta predominantemente por monoterpenos, a fração não volátil de oleorresinas é rica em triterpenoides, principalmente α - e β -amirina (Figura 5a e b). Outros constituintes citados com frequência são suas respectivas cetonas: α -amirona e β -amirona (Figura 5c e d). Uma análise da quimiodiversidade das oleorresinas de 23 espécies amazônicas de Burseraceae forneceu um perfil dos principais constituintes: os triterpenos do tipo ursano, α -amirina, α -amirona e breína, e os triterpenos do tipo oleanano β -amirina, β -amirona e maniladiol (Rüdiger, 2012; Rüdiger; Veiga Junior, 2013; Albino *et al.*, 2017).

Os isômeros triterpenoides pentacíclicos α -amirina e β -amirina, que correspondem a 40-50% da constituição química total da fração não-volátil, diferem entre si pela posição das metilas no anel E: a β -amirina possui duas metilas geminais na posição C-20, enquanto α -amirina apresenta duas metilas vicinais em C-19 e C-20 (Neves, 2018).

Figura 5 - Estruturas das amirinas e amironas encontradas em Protium: α -amirina (a); β -amirina (b); α -amirona (c); β -amirona (d)



Fonte: a autora (2023)

Alfa e β -amirina apresentam amplo espectro de propriedades biológicas e farmacológicas incluindo anti-inflamatória, como em doenças intestinais, antinociceptiva, gastroprotetora, hepatoprotetora, anti-hiperglicêmica e efeitos hipolipidêmicas. Ambos os ácidos ursólico e oleanólico, estruturalmente relacionados com α - e β -amirina, mostraram inibir a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 e a adipogênese (Vitor *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2019).

A literatura registra ainda a presença de duas cumarinas em *Protium*, sendo estas, escopoletina e propapicina. Ambas apresentam atividades farmacológicas anti-inflamatória, espasmolítica, broncodilatadora, além de ter ação contra o desenvolvimento de tumores. A escopoletina também atua na regulação da pressão arterial e possui atividade bactericida contra várias espécies, incluindo *Escherichia coli* (Costa *et al.*, 2012).

Ainda há pesquisas do uso do breu como antimicrobiano, entretanto alguns ensaios já foram realizados como no trabalho de De Lima *et al.* (2016) com o óleo essencial de *P. heptaphyllum* que não apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados. Bem como em testes utilizando outras partes da planta, como o extrato das folhas, frente a *S. mutans*, *Lactobacillus casei* e *S. aureus* também não foi observada atividade antimicrobiana (Alves; Moreira, 2010). Já o óleo essencial da espécie *P. hebetatum* Daly mostrou atividade frente às bactérias Gram-negativas: *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Da Silva *et al.*, 2021)

Conforme visto, são descritos na literatura diversos efeitos relacionados às atividades farmacológicas do breu-branco, como: tônico, antiulcerogênica, anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico e expectorante, atividade gastroprotetora, possivelmente, pelo aumento da expressão de COX-2 e EGF e devido a sua possível propriedade antioxidante. Apesar da sua ampla gama de uso medicinal, a descrição do uso de resina bruta de *P. heptaphyllum* como agente anti-inflamatório ainda não foi bem estabelecida (Bernadi *et al.*, 2015).

3.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório (Figura 6) é uma resposta natural do organismo a uma lesão tecidual no qual ocorre o aumento do fluxo sanguíneo e migração de componentes do sistema imune para o local da lesão, como os leucócitos, macrófagos

e os mastócitos, estes responsáveis por liberar mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas. A inflamação em algumas ocasiões pode ser fisiologicamente necessária para a recuperação do organismo (Valadas *et al.*, 2019). Esse processo tem como suas principais características: calor, rubor, dor, edema e perda de função de tecidos e órgãos sendo resultado de uma injúria tecidual, a produção de mediadores citados provoca: alterações bioquímicas, celulares e vasculares a fim de restaurar a homeostase (De Menezes *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2019).

De acordo com Perretti (2015), mediadores de resolução compartilham propriedades fundamentais para a recuperação da homeostase e retorno ao funcionamento fisiológico normal, seriam estas: inibição do tráfico de granulócitos; migração de monócitos, promoção do apoptose dos granulócitos; aumento de fagocitose e esferocitose; controle do fenótipo da célula residente (como a troca de macrófagos M1 para M2).

Em geral, as respostas inflamatórias são positivas em situações como a inativação de toxinas biológicas e químicas, sequestro de microrganismos, material estranho, tecido necrótico e células neoplásicas, fornecendo o necessário à cicatrização de feridas, estimulando a restrição de movimento de membros fazendo com que haja tempo para cicatrização e do reparo, e a elevação da temperatura para indução de vasodilatação e inibição da replicação de alguns agentes microbianos (Zachary, 2012). Em caso de situações prolongadas de estresse onde há alta produção de cortisol pode ocorrer inflamações crônicas e acarretar diversos problemas de saúde como síndrome metabólica, obesidade, câncer, distúrbios de saúde mental e cardiovasculares, além do aumento da suscetibilidade a infecções (Russell; Lightman, 2019).

Figura 6 - Fluxograma do processo inflamatório agudo e crônico



Fonte: Adaptado de Active Pharmaceutica (2022)

As respostas imunes e proliferativas são mediadas por citocinas, que agem regulando a inflamação local e sistêmica. Estas são divididas em: fatores de necrose tumoral (TNFs), interleucinas (IL), interferons (IFNs) e fatores estimuladores de colônias (CSFs). As citocinas podem se classificar como anti ou pró-inflamatórias, isto é, encontradas em concentrações elevadas podem indicar inflamação e progressão de doenças. (Silva, 2018).

As citocinas estão envolvidas no desencadeamento de diversas patologias, como no caso de doenças circulatórias, induzindo febre, neutrofilia, aumentando a adesividade entre neutrófilos e miócitos e/ou endotélio, estimulando a produção de IL-6, IL-8 monócitos e leucócitos. Na isquemia intestinal, ocasiona a produção de IL-6, IFN- γ , IL-1 no epitélio intestinal. Cérebro e fígado também podem ser afetados

principalmente por meio de IL-8 e IL-13. A regulação da inflamação depende do equilíbrio entre citocinas pró- (manifestam-se localmente ou são quase inexistentes) e anti-inflamatórias (detectáveis no indivíduo normal) (Moura; Pomerantzeff; Gomes, 2001, DeCS, 2022). As principais classes de fármacos anti-inflamatórios são: anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e os glicocorticoides, ou anti-inflamatórios esteroides (AIES). Em geral os mecanismos de ação anti-inflamatórios são: inibição enzimática, bloqueio de receptores ou antagonismo de ligantes específicos (Freitas *et al.*, 2019).

Segundo Do Vale e Garcia (2018) nas últimas décadas há o questionamento da segurança da utilização dos AINES em relação principalmente a pacientes hipertensos e com risco de doenças cardiovasculares. Esta classe representa uma das mais empregada na prática clínica em todo o mundo, o que possibilita desenvolver ou agravar riscos ao seu uso irracional. Além do grande número de ocorrência de efeitos adversos o que estimula pesquisas pelo desenvolvimento de novos anti-inflamatórios que reduzam os efeitos maléficos dos processos inflamatórios e suas patologias associadas de maneira segura e eficaz (Silva *et al.* 2014; De Menezes *et al.*, 2019).

3.5 ENSAIO DE TOXICIDADE GENÉTICA

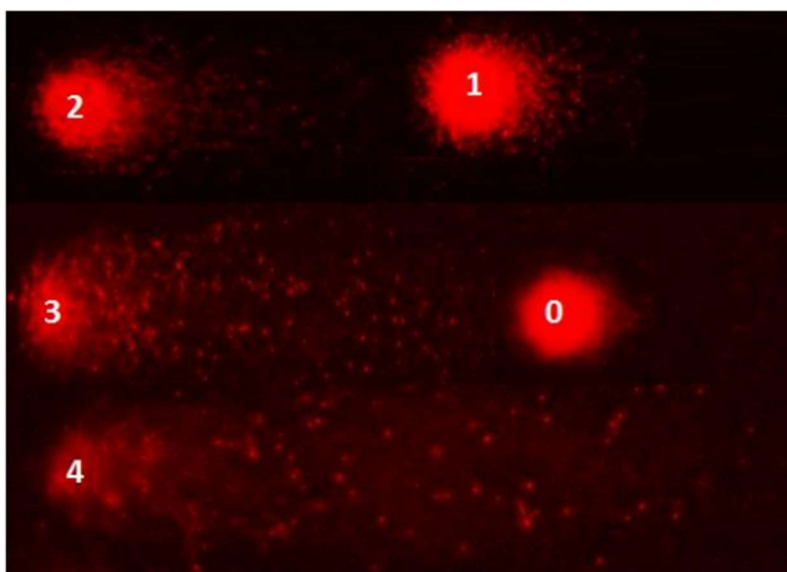
A toxicidade de uma espécie vegetal pode estar associada à planta, ao modo a qual foi exposta, a questões ambientais e também ao indivíduo em quem se manifestou. A intoxicação por plantas, seja ela aguda ou crônica, possui um difícil diagnóstico, possuindo impacto expressivo na saúde pública (Campos *et al.*, 2016). No Brasil, foram registrados 821 casos de intoxicação por plantas em 2017, representando 1,8% de todas as intoxicações com diferentes agentes, sendo o ranking liderado por intoxicação medicamentosa (27,11%) de acordo com os dados do SINITOX (2023).

Toxicidade aguda é aquela produzida por uma substância administrada durante um período de 24 horas, nesses testes é possível evidenciar risco de intoxicações agudas, para melhor escolha das doses para os demais testes de toxicidade, avaliação de segurança do uso desta substância, como drogas vegetais e fitoterápicas. Em testes mais prolongados é possível identificar órgãos alvos e

alterações fisiológicas evidenciadas por parâmetros: bioquímicos, hematológicos, anatômicos e histopatológicos. Já testes de genotoxicidade são utilizados para a detecção de substâncias que induzem dano genético, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo de DNA (Brasil, 2013; Da Silva *et al.*, 2021).

O ensaio cometa é um dos testes de genotoxicidade mais aplicados graças ao seu baixo custo, alta sensibilidade e rapidez, servindo para a investigação e monitorização de danos ao material genético. Também conhecido como eletroforese em gel de células individuais (*single cell gel electrophoresis*) apresenta uma variedade de aplicações em toxicogenômica, detecta danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes e pode ser realizado em plantas ou animais. Visto ao microscópio, os nucleoides de DNA sem danos são redondos, já nos lesionados observa-se a migração do material formando uma espécie de cauda, quanto maior o dano, maior a cauda (Figura 7) (Da Silva *et al.*, 2021; Cruz, 2015).

Figura 7 - Ensaio cometa com representação da classificação dos danos



Fonte: Silva (2012)

3.5.1 Ensaio com *Drosophila melanogaster*

A família Drosophilidae composta por uma série de organismos é utilizada como modelo em diferentes áreas da Ciência, como na Genética. Os drosofilídeos estão distribuídos pelo mundo todo e utilizam diferentes recursos ou hospedeiros. A

exemplo temos a representante *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera) que tem sido utilizada como um organismo modelo para genética quantitativa, com numerosos dados já reunidos. Diversas investigações vêm sendo realizadas com experimentos de seleção e localização de genes com efeitos importantes (Moreira, 2020; Capy; David, 1994).

A área de distribuição original de *D. melanogaster* é a África tropical, mas hoje é global. No Brasil as primeiras publicações sobre genética com *Drosophila* datam por volta de 1943 e desde então este grupo tem sido muito estudado especialmente nesta área, sendo a espécie *D. melanogaster*, conhecida popularmente como mosca-da-banana ou mosca-do-vinagre, a mais utilizada. Moscas da família Drosophilidae são excelentes para estudos biológicos por possuírem características genéticas conhecidas que possibilitam o estudo de mutações pontuais, deleções, translocações, perda cromossômica e não disjunção (Wipfler *et al.*, 2013; Amorim, 2016).

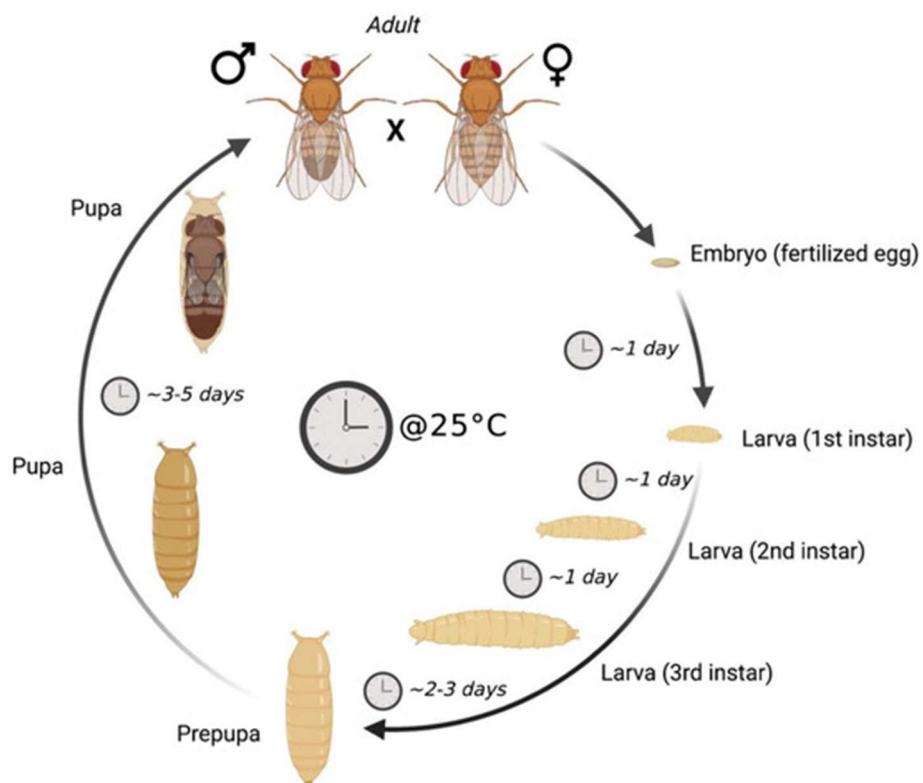
D. melanogaster é uma das cerca de 3.500 espécies conhecidas da bem-sucedida família Drosophilidae, que pertence aos Ephydroidea. Estas moscas são pequenas e seu comprimento variam entre 1 e 7 mm. Muitas espécies são atraídas por materiais vegetais em decomposição, como folhas ou frutas onde depositam seus ovos. As larvas incubadas se alimentam de leveduras e bactérias, que estão envolvidas no processo de decomposição. As fêmeas põem cerca de 300 ovos de aproximadamente 0,5 mm de comprimento (Wipfler *et al.*, 2013).

Após o acasalamento entre moscas fêmeas e machos adultos, os ovos fertilizados são depositados e o embrião se desenvolve em uma larva de primeiro estágio em ~ 24 h. Posteriormente, as larvas crescem e passam por dois estágios larvais adicionais, cada um com duração aproximada de 24 horas. Durante os estágios larvais, apresenta alto fluxo glicolítico, produção de lactato e alta taxa de síntese de glicogênio e acúmulo de triglicerídeos (TAG), necessários para a metamorfose (Figura 8). No final do terceiro instar (2-3 dias), as larvas se transformam em pupas. Durante o estágio de pupa, ocorre a metamorfose (3 a 5 dias) e os tecidos da mosca adulta se formam. No final da metamorfose, ocorre a eclosão do pupário e as moscas adultas tornam-se férteis após ~ 24 h. As moscas vivem de 60 a 90 dias, dependendo das condições de criação como por exemplo a temperatura e composição da dieta (Brischigliaro; Fernandez-Vizarra; Viscomi, 2023).

Um dos ensaios realizados com a mosca-da-banana em seu estágio larval é o ensaio cometa, que fornece características do DNA. Os nucleídeos dos cometas são

classificados de acordo com o comprimento e quantidade de DNA na sua cauda e vão de 0 a 4 (Silva, 2012).

Figura 8 - Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*



Fonte: Brischigliaro; Fernandez-Vizarraviscomi (2023)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

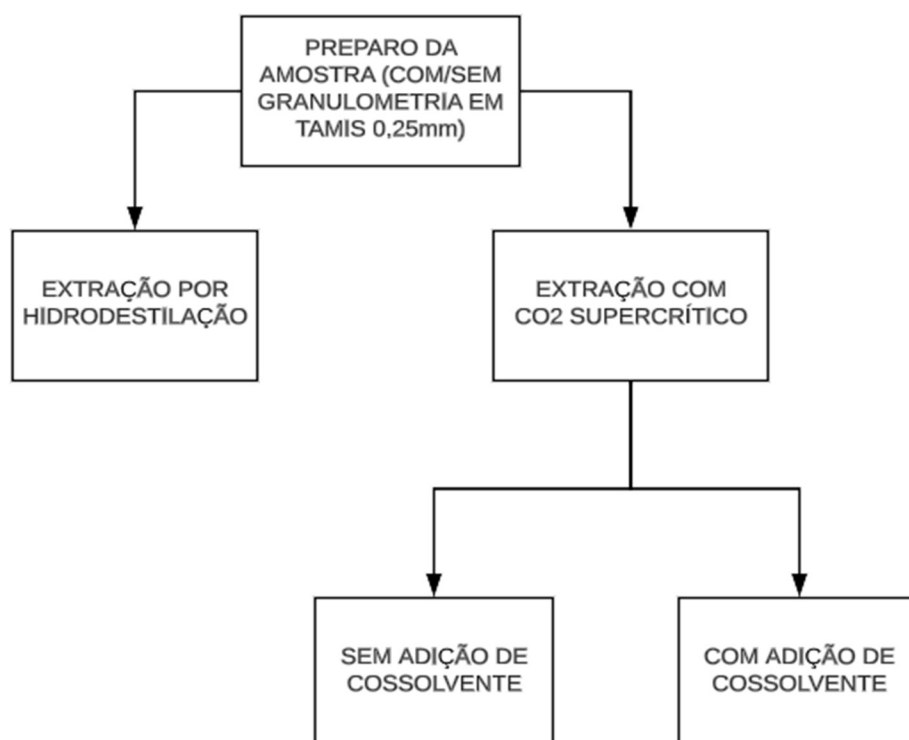
4.1 MATERIAL VEGETAL

A amostra de breu-branco, espécie indeterminada, geralmente composta por *Protium heptaphyllum* ou mistura de espécies da família Burseraceae (Albino *et al.*, 2020), foi obtida comercialmente no mercado Casa Alves (Santarém/PA, Brasil), em setembro de 2015, sendo armazenada em freezer.

4.2 PREPARO DA AMOSTRA E EXTRAÇÕES

Inicialmente, as oleorresinas foram selecionadas e trituradas em gral com pistilo. Para uma maior homogeneização, o pó obtido foi transferido para um liquidificador de aço comercial (Waring, EUA) e triturado novamente. Posteriormente, esse pó resultante foi passado em um tamis de 0,25mm (Figura 9), com objetivo de obter partículas menores e mais homogêneas, com exceção da última extração, em que se utilizou amostra não tamisada.

Figura 9 - Fluxograma de extrações



Fonte: a autora (2023)

4.2.1 Extração por hidrodestilação

A amostra foi pulverizada (115,50g) e submetida a hidrodestilação para obtenção do óleo essencial, fração volátil da resina, em aparelho de Clevenger modificado por 90 minutos (Albino *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados no Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ.

4.2.2 Extração com CO₂ supercrítico

As extrações foram realizadas na unidade de extração supercrítica (Forno extrator France Etuves- modelo XU032) com bomba para dióxido de carbono líquido, cilindro de CO₂ (99% de pureza), rotâmetro e uma célula de extração de 100 mL.

Dividimos uma amostra inicial de oleorresina triturada conforme mencionado no item 4.2 e tamisada com tamis de 0,25 mm em duas porções. Inicialmente foi feita uma extração prévia para melhor adequar a metodologia a ser utilizada e as condições ideais, misturando a amostra com celite, material inerte, para completar a célula de extração. A célula ficou no forno do extrator por fluido supercrítico por 1 hora até estabilizar na temperatura necessária de 40 °C, pressão de 80 bar e a vazão de 35 g/min. O processo iniciou com a saída do CO₂ em direção a bomba. O solvente fluido percorreu a amostra extraindo os compostos solúveis. Estes, no solvente fluido precipitam no vaso coletor (Greenlab) e o solvente na fase gasosa passa pelo rotâmetro (Barreto; Padilha; Machado, 2014).

Posteriormente, foram realizadas extrações com diferentes condições, inicialmente foram utilizadas: Temperatura de 40 °C, Pressão de 80 bar, vazão de saída de CO₂ de 35,1 g/min, durante 1 h, sem a presença de cossolvente, bem como com e sem tamisação. E as demais extrações foram feitas utilizando o etanol como cossolvente iniciando com a saída de CO₂ por 20 min nas condições de 55° C, Pressão 483 bar e vazão de 35,1 g/min.

Esses experimentos foram realizados através da parceria com o Laboratório de Análise Fitoquímica da UFRJ.

4.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os métodos Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e Cromatografia em fase gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-MS e GC-FID) foram utilizados para a análise do óleo essencial. O método de GC-MS teve como foco a cobertura de triterpenos “neutros” (isto é, triterpenos monoxigenados e dioxigenados não ácidos). As análises foram feitas em um cromatógrafo a gás Shimadzu equipado com um espectrômetro de massas Shimadzu (QP2020 NX), usando hélio como gás carreador e uma coluna capilar DB-5 da Agilent (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O injetor e o detector foram mantidos a 260 e 280 °C, respectivamente. A temperatura foi programada para subir de 60 a 200 °C a 3 °C/min, com tempo de espera (*hold time*) de 5 min; de 200 a 290 °C a 5 °C/min; e de 290 a 300 °C a 2 °C/min, com tempo de espera (*hold time*) de 10 min. Alíquotas de 1 µL de cada solução de amostra (3 mg/mL, em diclorometano) foram injetadas em modo de injeção com divisão de fluxo (split de 1:20). O detector de massas foi operado em modo de ionização por elétrons (70 eV) e modo *scan* (faixa de aquisição: 40-650 m/z). A aquisição e o processamento dos dados foram feitos utilizando o software GCMS Postrun Analysis da Shimadzu. As substâncias separadas foram tentativamente identificadas através da comparação de seus espectros de massas obtidos por EI com banco de dados comercial (NIST Mass Spectral Library 11B), e com dados da literatura.

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram realizados os testes de determinação da concentração inibitória mínima (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB), os micro-organismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Klebsiella pneumoniae* (396) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39) da Coleção do Departamento de Antibióticos – UFPE.

A atividade antimicrobiana dos compostos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 poços (CLSI, 2018).

Para isso foram utilizadas soluções estoque de 1024 µg/mL em 1% DMSO das substâncias. Foram transferidos 20 µL desta solução para as microplacas, que já continham 70 µL de caldo Mueller-Hinton, iniciando o processo de diluição seriada.

Para completar o volume final de 100 μ L, foram adicionados 10 μ L de inóculo ($1,5 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias (UFC /mL), de acordo com a escala turbidimétrica padrão de McFarland) e as placas foram incubadas a 35 °C por 24h.

Os mesmos testes foram realizados simultaneamente com o controle positivo (CMH + microrganismo) e o controle negativo (CMH + compostos). Ao término deste período, foram adicionados 10 μ L de resazurina a 0,1% em todos os poços e após duas horas a CMI foi determinada visualmente com base nas colorações observadas, sendo cor azul para inibição e rosa para crescimento microbiano.

Para a determinação da CMB, realizou-se o subcultivo em meio ágar Mueller Hinton daqueles poços que apresentaram a CMI e dos anteriores. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. A CMB é definida como a menor concentração que apresenta subcultivo negativo.

Os testes foram realizados em triplicata.

4.5 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados camundongos Swiss machos (35-40 g) com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram obtidos do Biotério de criação do Departamento de Antibióticos da UFPE, sob condições controladas de temperatura e luminosidade. Os animais foram mantidos sob livre acesso a água e ração. Os procedimentos experimentais realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE (Protocolo nº 0033/2022).

4.5.1 Macrófagos peritoneais

4.5.1.1 Obtenção e isolamento dos macrófagos peritoneais

Para obtenção dos macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos Swiss machos, os quais receberam 1 mL de uma solução de tioglicolato (i.p.) 3,8% por via intraperitoneal. Após 72 h, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ para evitar a contaminação do líquido intraperitoneal com sangue e a influência do isoflurano na função dos macrófagos. Em seguida foi realizada a assepsia de todo o animal com álcool 70% e a retirada a pele abdominal com auxílio de pinça e tesoura

estéreis. Foram injetados 10 mL de PBS gelado (pH 7,4) no peritônio do camundongo. Uma pequena incisão foi realizada para retirada do lavado. As células foram centrifugadas por 5min a 1200 r.p.m, lavadas duas vezes em PBS e, em seguida, ressuspensas em meio DMEM suplementado com SFB a 10% e 1% de antibióticos. Sendo incubadas a 37 °C a 5% de CO₂ e plaqueadas na concentração de 3 x 10⁵ células/mL em placas de 96 poços (Montoya *et al.*, 2019).

4.5.1.2 Avaliação de citotoxicidade através do ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT)

A citotoxicidade dos extratos nas células foi determinada pelo método do MTT. Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços e após 24 h tratadas com o extrato da resina de breu-branco (100-1,56 µg/mL) e incubadas por 24 h. Após cada período, 25 µL (5 mg/mL) de solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e incubado durante 3 h, a 37 °C, numa atmosfera de CO₂ a 5% umidificada. Posteriormente, removeu-se 100 µL do sobrenadante e adicionou-se 100 µL de DMSO a cada poço e incubou-se durante mais 10 min, a 37 °C, numa atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Após a homogeneização dos cristais de formazan, a absorbância foi mensurada em 560 nm em um leitor de placas ELISA. A porcentagem de proliferação / viabilidade celular foi calculada e comparada ao controle (100% da viabilidade). Os testes foram realizados em triplicata.

4.5.1.3 Produção de óxido nítrico e citocinas em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS)

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados na concentração de 3 x 10⁵ células/mL, em placa de 96 poços com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico e incubados a 37 °C, por 24 h, para aderência. Decorridas as 24 h, as células foram estimuladas com LPS (*Escherichia coli* 055: B5; Sigma, St. Louis, MO, USA), por 1 h (5 µg/mL) e em seguida, tratadas com os extratos e óleo por 24 h, nas concentrações de 1,56, 6,25 e 12,5 µl (concentrações estabelecidas através do ensaio de citotoxicidade com MTT) em triplicata de poços. Decorrida as 24 h, recolheu-se 100 µl de sobrenadante celular para dosagem da concentração de nitrito (indicativa

da produção de óxido nítrico) pelo reagente de Griess, e 100 µl para a quantificação das citocinas IL-6 e TNF- α .

Foi adicionado o mesmo volume de sobrenadante ao reagente de Griess (100 µl) (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1% de diidrocloreto de naftiletilenodiamina em água; 1:1, Sigma) em uma placa de poços a parte, foram incubados durante 10 min ao escuro. A concentração de nitrito foi calculada com referência a uma curva padrão obtida usando nitrito de sódio (NaNO₂), utilizando-se uma diluição seriada 100 – 0 µL da solução padrão de nitrito de sódio preparada em DMEM. A absorbância foi medida em 540 nm utilizando um leitor de placas de Elisa SpectraSoftmax, segundo CAO *et al.* (1999).

Após o teste de produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS, os níveis das citocinas TNF- α e IL-6 foram quantificadas no sobrenadante seguindo as instruções dos fabricantes (Diacclone, França).

4.5.2 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

4.5.2.1 Edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton

Foram separados 6 grupos de animais. Um grupo recebeu apenas 20 µL de óleo de cróton em acetona sendo aplicado nas superfícies de ambas as orelhas dos animais e funcionou como controle negativo. Um segundo grupo não recebeu nenhuma aplicação e funcionou como grupo Sham. Em seguida os demais grupos receberam o tratamento (0,1; 0,3 e 1 mg/orelha) e o fármaco-padrão (clobetasol) diluídos no mesmo volume de acetona, além do óleo de cróton 2%. A resposta inflamatória foi avaliada após seis horas, após eutanásia dos animais, uma amostra de 6 mm de diâmetro foi retirada de cada orelha com auxílio de um *punch* de biópsia. As amostras foram pesadas e o edema calculado pela diferença entre o peso das amostras tratadas e o grupo negativo.

4.5.2.2 Edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton

O edema de orelha crônico foi induzido pela aplicação de 20 µL de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona, em dias alternados, durante 9 dias, em camundongos

Swiss (n = 46). A resina/fração mais ativa em 3 concentrações: 0,1; 0,3 e 1 mg/orelha e clobetasol 0,5% 20 µL/orelha foi aplicado por via tópica durante 4 dias. A espessura das orelhas foi mensurada diariamente com um paquímetro digital. No 10º dia de experimento, os animais foram eutanasiados e amostras de 6 mm de diâmetro de tecido das orelhas foram coletadas com auxílio de um *punch* de biópsia e pesadas para avaliação do edema. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para análise histológica.

4.5.3 Análise histológica e histomorfométrica

Para análise histológica, as orelhas foram fixadas em formalina 10% tamponada (pH 7,4) por 24 h, desidratadas, diafanizadas e emblocadas em parafina. Foram realizados 8 cortes perpendiculares de 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina eosina, observados em microscópio óptico Nikon Eclipse E-200 e fotografados para medição da espessura da epiderme e da derme utilizando o software Image J versão 1.52r. Para análise histomorfométrica, foram analisadas pelo menos 3 de cortes de cada animal, foram feitas cerca de 10 medições/cortes utilizando a escala de 100,00 µm.

4.6 ENSAIO COMETA EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Para realização do ensaio cometa foi seguida a metodologia seguindo a metodologia de Verçosa *et al.* (2017) onde foram utilizadas larvas em terceiro instar de cada réplica. As lavas foram expostas por um período de 24h aos seguintes tratamentos: Controle negativo: água destilada; Solvente 1: água destilada, 5% Tween 80, 5% etanol; resina nas concentrações de 10, 3, 1, 0,3 e 0,1 mg/mL diluídas no Solvente 1. Primeiramente, as larvas foram resfriadas a 4°C por 1 min para redução da atividade metabólica e transferidas para uma placa de kline contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, uma pinça de relojoeiro nº 5 e um bisturi, foi realizado um corte nas larvas para extração da hemolinfa, constituindo um pool celular. O material foi coletado e transferido com o auxílio de uma micropipeta para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, que foi centrifugado por 3 vezes a 3.000 rpm por 3 min. As etapas subsequentes da metodologia se realizaram na ausência de luz, por se

tratarem de procedimentos fotossensíveis. Desse modo, um total de 60 µL do material biológico foi homogeneizado em 100 µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*) [0,5% de agarose LM diluída em 100 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS)] e montado em lâminas histológicas previamente lixadas, lavadas e banhadas em agarose padrão [1,5% de agarose padrão diluída em 100 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS)]. Por fim, uma lamínula (24 mm x 60 mm) foi adicionada sobre o material. As lâminas contendo o material celular foram colocadas no refrigerador a 4 °C por 10 min para a solidificação da agarose. E em seguida, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma cubeta contendo solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 1% Tris pH 10; 1% Triton X-100 e 10% DMSO), sendo assim mantidas a 4 °C por 72 horas.

Posteriormente, as lâminas foram alinhadas com direção para o polo positivo em uma cuba de eletroforese de 40 cm, sendo cobertas com solução de tampão de eletroforese (1 M NaOH; 200 mM EDTA pH 13) por 20 min, para estabilização. Logo depois foi aplicada uma corrente elétrica (40 V e 300 mA) por 20 min. Em seguida as lâminas foram transferidas para uma cubeta com solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, depois para etanol absoluto para fixação por 5 min. Após serem secas ao ar, as lâminas foram armazenadas em laminário e mantidas 4 °C até o momento da análise microscópica.

Para a análise microscópica, as lâminas foram coradas com 50 µL de GelRed (Biotium), diluído em água purificada (1:500) e observadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, equipado com o filtro Alexa-Fluor 546 e aumento de 400x. Os cometas observados foram classificados de acordo com a integridade da cabeça e comprimento da cauda em 5 níveis que variam de 0 (ausência de dano) a 4 (maior nível de dano).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

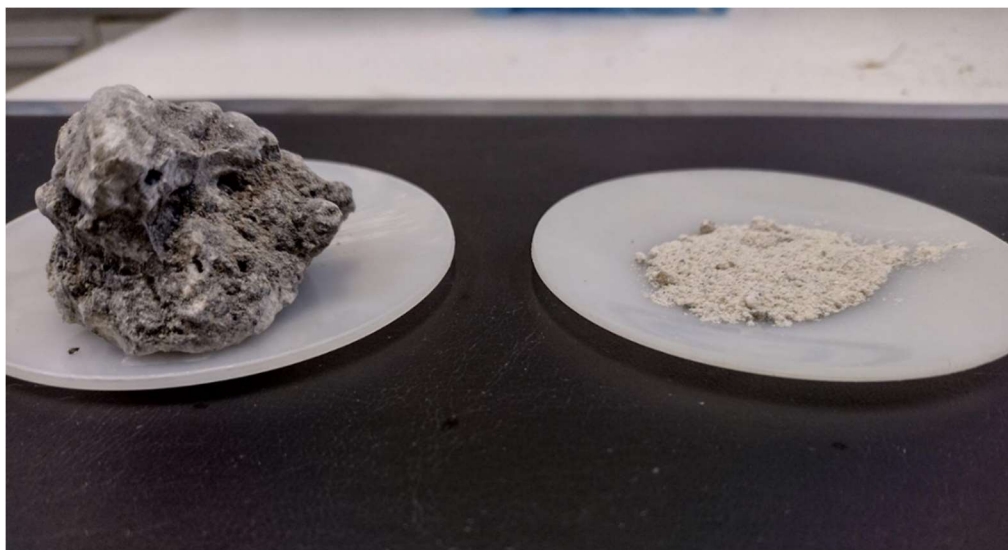
Os dados foram analisados utilizando o ANOVA, seguido com pós-teste de Bonferroni. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados com software GraphPad Prisma (7.0 San Diego, CA, EUA), que considerou o média de dois ensaios realizados em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS E RENDIMENTOS

Uma amostra de breu-branco comercial seca e íntegra foi triturada (Figura 10) e tamisada para uma melhor homogeneização do pó e obtenção de subamostras mais uniformes. Em estudo realizado por Vasconcelos *et al.* (2005) onde foi avaliado os parâmetros durante o processo extrativo como: método de extração, solvente e granulometria do material vegetal foi visto que a granulometria, independentemente do método, é o fator mais importante na eficiência do processo.

Figura 10 - Amostra de resina de *Protium* spp. seca e triturada



Fonte: A autora (2022).

5.1.1 Extração do óleo essencial – BBO

A hidrodestilação foi realizada para obtenção do óleo essencial, fração volátil da resina, em aparato de Clevenger modificado por 90 minutos. Foram utilizados 115,5 g de amostra tamisada, obtendo um rendimento de 1,21%.

5.1.2 Extração 1 - BBOFS3A

Para chegar nas condições ideais de extração foi feito um teste inicial, separado em 2 ciclos: um para voláteis e outro para os não-voláteis, onde rendimento e tempo do processo foram insatisfatórios. A amostra inicial de 29,77 g foi dividida em duas porções, porção 1 com 15,00 g e porção 2 pesando 14,77 g, para extração foram misturadas com 20 g de celite. No ciclo 1 as condições foram de 40 °C e 80 bar, e vazão de 35 g/min. O ciclo 2, para não-voláteis, as condições foram alteradas para uma temperatura mais elevada (55 °C) e uma pressão maior (484 bar). Este foi realizado de forma pausada extraindo a amostra a cada 5 min. Foi obtido um rendimento de 2,3% de fração volátil e 3,2% de resíduo triterpênico no processo.

Em estudo realizado por Marquina-Chidsey *et al.* (2013) testaram-se diferentes condições, alternando temperatura entre 40- 60 °C e obteve-se um extrato com rendimento de 1,4% (5 g de amostra). Na temperatura de 43 °C e tempo 36,63 min, numa pressão de 106,8 bar observou-se que quanto maior pressão, maior o rendimento e foi possível estipular as condições ótimas em seu trabalho, aumentando o rendimento para 1,7%. Em seu trabalho posterior, Marquina-Chidsey *et al.* (2017) constataram que a temperatura e a interação pressão-tempo estáticas foram estatisticamente significativos para o rendimento. Já para a qualidade, pressão e temperatura foram ambos significativos, sendo a mais alta qualidade alcançada com pressão mais alta e temperatura mais baixa.

De acordo com Klein *et al.*, (2018), para extração dos triterpenos amirínicos de interesse em folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambes, Myrtaceae), quanto mais alta pressão e temperatura maior rendimento (200 bar e 60 °C = 1,69%), já a mais alta pureza da mistura de α -amirina e β -amirina foi nas condições de 100 bar e 60 °C.

Tendo em vista as considerações e as condições utilizadas pelos membros do laboratório com experiência para extração de flavanoides, as condições foram definidas para 55 °C e pressão de 484 bar e realizou-se uma terceira extração para testar as condições escolhidas. Para isso, utilizou-se a porção 2 do lote (14,77 g) obtend um extrato com 6,43% de rendimento, nomeado de BBOFS3A - Extrato de Breu-Branco-Oleoresina por Fluido supercrítico 3A (Figura 11).

Figura 11 - Extrato de Breu-Branco-Oleoresina por Fluido supercrítico 3A – BBOFS3A



Fonte: a autora (2022)

5.1.3 Extração 2 - BBFSE1

Nesta extração, foi utilizado 50 mL de etanol como um cossolvente e optou-se por um método de extração estática, ou seja, apenas uma única extração sem intervalos de tempo. Em alguns trabalhos foi visto que a adição de cossolventes favorece o processo, resultando em menores custos de produção estimados pela análise econômica da extração com fluido supercrítico. Para as condições estudadas, em um trabalho de otimização tecno-econômica, o menor custo (US\$ 622,9/kg de extrato) foi encontrado no processo utilizando CO₂ com 5% de etanol como cossolvente, pressão de 200 bar, temperatura de 60 °C e S/F de 9,54 usando a escala de 2 x 100 L para extração dos principais compostos do extrato das folhas de uvaia, os triterpenóides α -amirina e β -amirina. (Rodrigues, *et al.* 2021; Klein *et al.*, 2021).

Para a extração foi utilizado 16,50 g de amostra e 14,56 g de celite. Extração ocorreu em 20 min, observando-se após isso um efeito platô. Após a extração, foi obtido uma amostra mais pastosa do que as obtidas nas extrações anteriores, logo utilizamos o evaporador rotativo remoção do etanol, obtendo-se um rendimento de 96,16%. Após a extração, foi feita uma purificação do resíduo em sistema fechado (em aparato de Soxhlet) com diclorometano para em seguida calcular o rendimento do resíduo que ficou na célula, que foi de 3,19%.

Deste modo, a extração estática foi escolhida extraindo toda a amostra sem intervalos de tempo. Obtivemos um rendimento muito mais alto que nos métodos sem utilizar o cossolvente. Nosso objetivo inicial era se possível não utilizar solventes, porém conforme visto em literatura e comparando os resultados consideramos que a utilização e performance do etanol satisfatória visto ainda que se trata de um solvente de baixo impacto ambiental.

5.1.4 Extração 3 - BBFSE2

Para última extração com fluido supercrítico, usamos 16,01 g de uma amostra não tamisada e 16 g de celite. Foi observado que partículas menores geraram pós muito finos e que além da demora para sua obtenção, geravam uma perda grande de material não tamisável. Também utilizamos o etanol como cossolvente sob as mesmas condições, obtendo rendimento de 74,04% do extrato e 3,74% de resíduo, resultando num rendimento total de 77,81%. Nessa extração, optou-se por não fazer a tamisação da amostra pois era algo que demandava um longo período de tempo, superando o tempo da própria extração, logo extraiu-se ela somente triturada à mão e no liquidificador. O rendimento obtido foi menor devido a diferença de granulometria, mas mesmo assim foi maior que o resultado obtido nas primeiras extrações, nas quais não utilizamos etanol como cossolvente (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições de extração e teor de rendimento da amostra

Extrações	Condições - Supercrítico (granulometria, pressão, temperatura, tempo, cossolvente)	Tipo de Produto	Teor %	Sigla
1	1º ciclo (FV): 0,25; 80 bar; 40°C; 1h; sem cossolvente	FVbreu	2,30%	-
	2º ciclo (RT): 0,25mm; 484 bar; 55°C; 20 min.; sem cossolvente	RTbreu	3,20%	-
	0,25mm; 484 bar; 55°C; 20 min.; sem cossolvente	EAbreu	6,43%	BBOFS3A
2	0,25mm; 484 bar; 55°C; 20min.; Etanol	EAbreu	96,20%	BBFSE1
3	90 – 630µm ;55°C; 484 bar; 20 min.; Etanol	EAbreu	77,80%	BBFSE2

Fonte: a autora (2022).

Nota:

FV- Fração volátil
RT- resíduo triterpenico
EA- Extrato apolar

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O óleo essencial de *P. heptaphyllum* é rico em monoterpênos, de acordo com a análise feita por Amaral *et al.* (2009) do óleo obtido por hidrodestilação foram identificados 14 compostos, que representavam 100% dos compostos presentes no óleo de 2,21% de rendimento. Os constituintes majoritários em sua análise foram os monoterpênos limoneno (49,96%), trans- β -ocimeno (11,81%), eucaliptol (10,92%), p-cimeno (10,78%), α -felandreno (9,98%) e α -terpineol (1,82%). Em nosso estudo, conforme visto na literatura, foram encontrados em maiores concentrações os monoterpênos α -pineno (16,97%), α -felandreno (49,06%) p-cimeno (9,75%) e limoneno (4,4%) (Tabela 3), aos quais são atribuídas propriedades farmacológicas da planta (Siani *et al.*, 1999; De Araújo *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Composição química do óleo essencial da oleorresina de breu branco (continua)

Substâncias	IRL (lit)	IRL*	Quantidade (%)
α -Pineno	932	930	16,97
α -Fencheno	945	942	0,28
Canfeno	946	944	0,30
Sabineno	969	969	0,12
β -Pineno	974	973	4,09
3- <i>p</i> -Menteno	984	975	0,61
Mirceno	988	989	0,21
δ -2-Careno	1001	1003	6,91
α -Felandreno	1002	1009	49,06
δ -3-Careno	1008	1013	0,75
α -Terpineno	1014	1018	0,17
<i>p</i> -Cimeno	1022	1021	9,75
Limoneno	1024	1025	4,44
Silvestreno	1025	1027	0,66
γ -Terpineno	1054	1054	0,12
Terpinoleno	1086	1084	0,39
Cânfora	1141	1140	0,53
<i>p</i> -Menta-1,5- dien-8-ol	1166	1163	0,17
Terpinen-4-ol	1174	1173	0,10

Tabela 3 - Composição química do óleo essencial da oleorresina de breu branco (conclusão)

Substâncias	IRL (lit)	IRL*	Quantidade (%)
<i>p</i> -Cimen-8-ol	1179	1179	0,23
α -Terpineol	1186	1187	1,05
4-Metileno- isoforeno	1216	1218	0,21
α -Gurjuneno	1409	1413	0,11
β - Duprezianeno	1421	1430	0,16
<i>cis</i> -Muurola- 4(14),5-dieno	1465	1475	0,16
Monoterpenos hidrocarbonetos (%)			95,16
Monoterpenos oxigenados (%)			2,29
Monoterpenos alifáticos (%)			96,39
Monoterpenos aromáticos (%)			0,40
Sesquiterpenos hidrocarbonetos (%)			0,44
Sesquiterpenes oxigenados (%)			nd
Todas as substâncias identificadas (%)			97,88

Fonte: a autora (2022)

Nota: IRL (lit.), índice de retenção linear da literatura; IRL*, índice de retenção linear experimental; nd, não detectado.

As frações não-voláteis das resinas de Burseraceae são caracterizadas pela presença de triterpenoides principalmente com esqueletos penta e tetracíclicos. Cromatografia gasosa acoplada com espectro de massa com ionização por impacto de elétrons (GC-EI-MS) é contemplado como o padrão ouro para análises de triterpenoides, estes não são compostos facilmente ionizáveis, razão pela qual um método de ionização comumente associado ao GC é o indicado (Albino *et al.*, 2020).

Os compostos encontrados em maior concentração após análise foram aqueles aos quais são atribuídos seu efeito anti-inflamatório (Carvalho *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2020), os triterpenos α - e β -amirina, e suas respectivas cetonas, α - β -amirona (Tabela 4). Em alguns estudos é possível notar a relação estrutura química/atividade biológica

de triterpenos, onde modificações estruturais são obtidas objetivando a potencialização da ação farmacológica do triterpeno inicial, com a mistura alfa- e beta-amirina, isolada em grande quantidade da resina de *P.heptaphyllum* foi realizado uma série de ensaios biológicos, dando ênfase a atividade anti-inflamatória (Bandeira *et al.*, 2007)

Tabela 4 - Terpenos tentativamente identificados por GC-MS em diferentes extratos de uma mesma amostra de oleoresina de breu-branco (continua)

TR (min)	Identificação tentativa	IRL*	BBFSE1 (%)	BBFSE2 (%)	BBOFS3A (%)	Íons observados em EI-MS (70 eV), m/z
5,685	α -pineno	933	0,16	0,16	0,91	-
7,632	α -felandreno	1005	0,48	0,58	0,05	-
7,828	δ -3-careno	1010	0,94	1,25	nd	-
8,260	<i>p</i> -cimeno	1022	0,81	1,10	3,63	-
8,432	β -felandreno	1027	0,28	0,45	1,54	-
14,197	<i>m</i> -cimen-8-ol	1178	0,11	0,17	0,28	-
14,335	<i>p</i> -cimen-8-ol	1182	0,09	0,13	9,39	-
14,597	α -terpineol	1188	0,10	0,13	0,36	-
15,063	Monoterpeno não identificado	1200	0,18	0,25	nd	-
19,613	(Z)-patchenol	1306	0,10	0,16	3,08	-
19,868	Sesquiterpeno não identificado	1313	0,33	0,55	0,18	-
20,662	Sesquiterpeno não identificado	1331	0,17	0,26	0,55	-
23,067	Sesquiterpeno não identificado	1389	0,20	0,30	1,00	-
24,026	Sesquiterpeno não identificado	1412	0,14	0,18	2,20	-

Tabela 4 - Terpenos tentativamente identificados por GC-MS em diferentes extratos de uma mesma amostra de oleorresina de breu-branco (continuação)

TR (min)	Identificação tentativa	IRL*	BBFSE1 (%)	BBFSE2 (%)	BBOFS3A (%)	Íons observados em EI-MS (70 eV), m/z
38,419	Sesquiterpeno não identificado	1793	0,91	1,22	nd	-
61,993	Aldeído de longifoleno	-	nd	nd	0,21	95 (100), 81, 67, 205
68,305	Triterpeno não identificado	-	nd	0,06	1,36	43 (100), 95, 81, 67
68,644	Triterpeno não identificado	-	nd	nd	0,59	43 (100), 95, 81, 107, 67
72,761	Triterpeno não identificado	-	nd	nd	0,15	69 (100), 95, 255, 424 (M ⁺)
73,428	Triterpeno não identificado	-	nd	nd	0,25	109 (100), 95, 69, 41
73,530	Lanosterol	-	nd	nd	0,22	69 (100), 411, 393, 41, 426 (M ⁺)
73,620	Triterpeno não identificado do tipo damarano	-	0,33	0,36	0,46	109 (100), 205, 95, 424 (M ⁺)
73,722	β-amirona	-	2,37	2,54	3,29	218 (100), 203, 95, 189, 424 (M ⁺)
73,852	Olean-18-en-3-ona	-	1,33	1,44	4,72	177 (100), 95, 189, 204, 424 (M ⁺)
74,001	Taraxerol	-	1,51	1,52	1,12	109 (100), 95, 205, 189, 426 (M ⁺)

Tabela 4 - Terpenos tentativamente identificados por GC-MS em diferentes extratos de uma mesma amostra de oleorresina de breu-branco (continuação)

TR (min)	Identificação tentativa	IRL*	BBFSE1 (%)	BBFSE2 (%)	BBOFS3A (%)	Íons observados em EI-MS (70 eV), m/z
74,146	β -amirina	-	22,98	21,95	9,68	218 (100), 203, 189, 95, 426 (M ⁺)
74,241	Triterpeno não identificado	-	4,89	4,66	2,60	189 (100), 95, 204, 177, 426 (M ⁺)
74,468	α -amirina	-	5,11	5,18	6,86	218(100), 95, 122, 203, 424, (M ⁺)
74,648	Triterpeno não identificado	-	0,65	0,72	0,41	135 (100), 287, 121, 302, 426 (M ⁺)
74,922	α -amirina	-	45,47	42,58	17,65	218 (100), 203, 189, 122, 426 (M ⁺)
75,050	Glutinol	-	0,06	0,12	1,10	259 (100), 95, 274, 134, 426 (M ⁺)
75,719	Triterpeno não identificado	-	nd	nd	nd	95 (100), 109, 69, 81
76,031	Glutinol (isômero)	-	nd	nd	nd	259 (100), 95, 274, 109, 134
76,175	Triterpeno não identificado	-	nd	nd	nd	247 (100), 95, 82, 229, 82

Tabela 4 - Terpenos tentativamente identificados por GC-MS em diferentes extratos de uma mesma amostra de oleorresina de breu-branco (continuação)

TR (min)	Identificação tentativa	IRL*	BBFSE1 (%)	BBFSE2 (%)	BBOFS3A (%)	Íons observados em EI-MS (70 eV), m/z
76,276	3-oxo-23/24-hidróxi-ursa/olean-12-eno	-	nd	nd	0,35	218 (100), 203, 95, 109
76,031	3-oxo-23/24-hidróxi-ursa/olean-12-eno	-	nd	nd	0,44	218 (100), 189, 122, 203
76,423	Lupeol	-	0,50	0,47	0,12	189 (100), 95, 207, 121, 426 (M+)
77,180	Triterpeno não identificado do tipo damarano	-	0,52	0,55	0,92	143 (100), 125, 107, 81
77,320	Friedelina	-	1,67	1,70	2,93	69 (100), 95, 123, 81, 426 (M+)
77,447	Triterpeno não identificado	-	1,61	1,23	0,71	109 (100), 69, 43, 95, 424 (M+)
77,495	Triterpeno não identificado	-	nd	0,61	1,06	43 (100), 109, 69, 95, 133

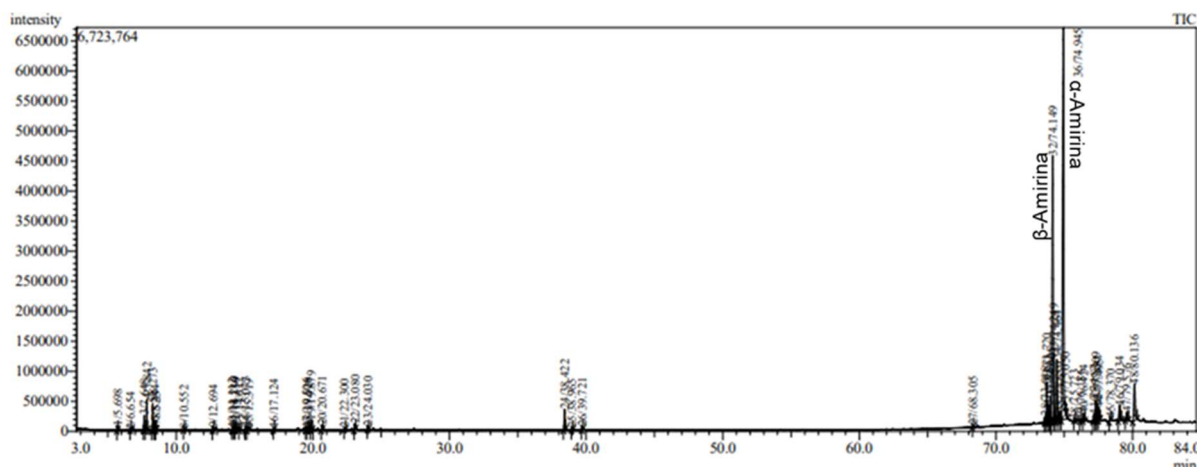
Tabela 4 - Terpenos tentativamente identificados por GC-MS em diferentes extratos de uma mesma amostra de oleorresina de breu-branco (conclusão)

TR (min)	Identificação tentativa	IRL*	BBFSE1 (%)	BBFSE2 (%)	BBOFS3A (%)	Íons observados em EI-MS (70 eV), m/z
78,012	Triterpeno não identificado	-	nd	nd	0,38	135 (100), 232, 273, 95, 438 (M+?)
78,370	3-hidróxi-olean-12-en-28-al	-	nd	0,16	nd	203 (100), 189, 232
78,744	11-Oxo- β -amirina	-	nd	nd	0,05	135 (100), 232, 175, 273
78,885	11-oxo α -amirina	-	nd	nd	0,19	135 (100), 273, 218, 232
79,038	Breína	-	1,48	1,44	nd	234 (100), 201, 216, 69, 442 (M+)
79,593	3-hidróxi-ursa-12-en-28-al	-	0,69	0,85	nd	203 (100), 133, 95, 119, 440 (M+)
80,142	Triterpeno não identificado	-	3,83	3,75	0,27	110 (100), 234, 151, 219, 442 (M+)

Fonte: a autora (2022)

Nota: TR (min) = tempo de retenção (minutos); IRL*, índice de retenção linear experimental; nd, não detectado; M+, íon molecular.

Figura 12 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido pela análise por GC-MS de BBFSE2



Fonte: a autora (2022)

Levando em consideração as metodologias propostas na literatura (Rodrigues, *et al.* 2021; Klein *et al.*, 2021) e a comparação da diferença no rendimento entre os extratos em que o etanol foi utilizado como cossolvente BBFSE1 (com tamisação) e BBFSE2 (sem tamisação), respectivamente com os resultados para: β -amirina: 22,98% e 21,95%, β -amirona: 2,37 % e 2,54%; α -amirina: 45,47% e 42,58%, α -amirona: 5,11% e 5,18, escolhemos o extrato BBFSE2 como a melhor opção tendo em vista o tempo de preparo, custo, qualidade e concentração dos compostos de interesse (Figura 12), para realização dos demais testes, bem como o óleo essencial.

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para os ensaios de atividade antimicrobiana também foram testados os extratos BBOFS3A e BBFSE1 para que houvesse uma comparação de resultado entre os diferentes métodos. Nos testes realizados com os extratos e óleo essencial de breu-branco não foi observada nenhuma inibição frente aos organismos testados (*S. aureus* UFPEDA 39, *P. aeruginosa* UFPEDA 01 e *K. pneumoneae* UFPEDA 396) utilizando ciprofloxacino como controle (Tabela 5). Atividades antimicrobianas também não foram observadas para o óleo essencial de *P. heptaphyllum*, em material coletado no Espírito Santo, no estudo de De Lima *et al.* (2016) (concentração inibitória mínima $\geq 0,5$ mg/mL) frente a *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e *Streptococcus mutans*.

Em ensaios realizados por Marques (2010) frente aos microrganismos *Bacillus*

subtilis, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumonia* e *Nycobacterium phlei*, com o óleo essencial e a resina de *P. hebetatum*, *P. heptaphyllum* subsp. *ulei* e do *P. heptaphyllum* subsp. *heptaphyllum*, somente os óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana. Cazelli (2014) em seu trabalho analisou o óleo essencial de *P. heptaphyllum* e suas frações apresentando como principais componente: p-cimeno-8-ol, terpinoleno e o p-cimeno, em seus testes houve morte ou inativação dos microrganismos *S. aureus* e *E.coli*, de acordo com os resultados obtidos as frações apresentaram um menor valor de CIM que o óleo do *P. heptaphyllum*, sendo mais eficaz na inibição bacteriana.

O óleo essencial obtido da folha de *P. heptaphyllum* por Furtado (2018), apresentando em sua composição α -felandreno (33,41%), isoterpinoleno (25,08%), (E)-cariofileno (7,88%), β -felandreno (6,12%) e α -tujeno (5,32%) como componentes majoritários, não mostrou atividade quando utilizado sozinho frente aos microrganismos testados (*S. aureus* metilicina resistente, *S. aureus* metilicina sensível, *P. aeruginosa* e *E. coli*). Entretanto, atuou de forma sinérgica com gentamicina frente a *E. coli*. Em um estudo feito no estado do Piauí, os compostos do breu-branco, encontrados no extrato da folha, também não apresentaram atividade diante dos microrganismos testados: *S. mutans*, *Lactobacillus casei* e *S. aureus*. Já para *K. pneumoniae*, alguns trabalhos com outras espécies do gênero *Protium* demonstraram halo de inibição (Alves; Moreira, 2010). Os resultados obtidos por da Silva, K. et al., (2021) foram considerados de efeito moderado de inibição, quando comparados ao controle positivo (cloranfenicol a 30 mg mL⁻¹) *K. pneumoniae* 17,66 $\pm$ 0,58 mm.

Amparo et al., (2018) realizaram uma pesquisa onde testou a atividade antimicrobiana de amirinas e não houve atividade na maior dose testada, obtendo os resultados: para α -amirina *S. aureus* (> 100 μ g/mL), *E. coli* (> 100 μ g/mL) e para β -amirina: *S. aureus* (> 200 μ g/mL), *S. enteritidis* (> 200 μ g/mL), *E. coli* (> 200 μ g/mL) e *E. faecalis* (> 200 μ g/mL). Constataram a dificuldade de comparação entre os resultados com outros estudos devido, muitas vezes, a falta de padronização nos métodos (concentração de inóculo, forma de solubilização das amostras, meio de cultura e cepas utilizadas), salientando que diferentes estudos podem obter resultados contraditórios.

Tabela 5 – Atividade antimicrobiana dos extratos e óleo de Breu.

	CIPROFLOXACINO	BBOFS3A	BBFSE1	BBFSE2	BBO
<i>S. aureus</i>	8 µg	>1024µg	>1024µg	>1024µg	>1024µg
<i>P. aeruginosa</i>	>1024µg	>1024µg	>1024µg	>1024µg	>1024µg
<i>K. pneumoniae</i>	>1024µg	>1024µg	>1024µg	>1024µg	>1024µg

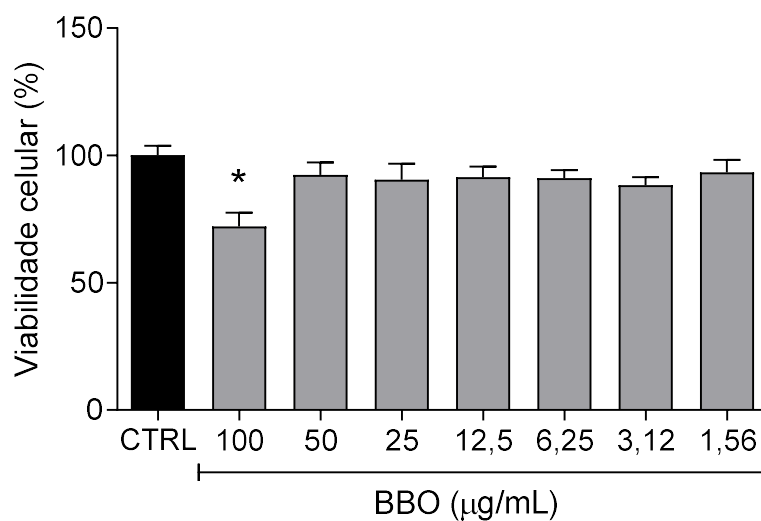
Fonte: a autora (2023)

5.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada em macrófagos murinos. Os compostos escolhidos (BBFSE2 e BBO) foram avaliados em concentrações de 1,56 a 100 µg/mL em 24 h (Figuras 13 e 14), através do ensaio de MTT. Este método é bastante utilizado em experimentos com culturas de célula, quando incubado, o MTT tem seu substrato quebrado por enzimas transformando o composto amarelo em azul, esta produção dos cristais de formazan funciona indicativo do estado funcional da cadeia respiratória celular (Mosmann, 1983; Peres, *et al.*, 2008).

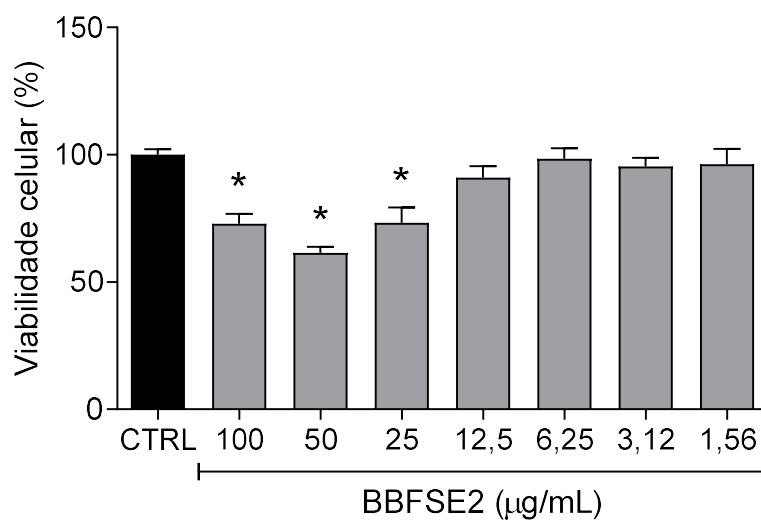
Em nossos ensaios tanto o óleo de breu-branco quanto o extrato não foram considerados citotóxicos nas concentrações mais baixas e apresentaram boa viabilidade celular, sendo o óleo levemente tóxico apenas na concentração de 100 µg/mL (72,15% de viabilidade celular) e o BBFSE2 mais tóxico que o óleo apresentando baixa citotoxicidade nas concentrações mais elevadas: 25, 50 e 100 µg/mL, sendo o resultado mais significativo na concentração de 50 µg/mL (61,42%). Resultados semelhantes foram encontrados em ensaios com MTT realizados por Melo (2017) que mostraram que a mistura triterpênica de α,β -amirina não causa redução da viabilidade celular nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL sobre as células indiferenciadas, Já sobre as células diferenciadas, na concentração de 100µg/mL causou a redução na viabilidade celular em 21,9,7%. Em ensaios de citotoxicidade realizados por. Já em ensaios de citotoxicidade por resíduo da extração do OE de *Protium* apresentou viabilidade celular de 93% em 24h, com redução significativa em 48h e em 72h, sendo altamente tóxico para fibroblastos (MRC5) (Alencar, 2023).

Figura 13 - Gráfico de viabilidade celular dos macrófagos peritoneais tratados com óleo de Breu-branco- BBO por 24h. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)



Fonte: a autora (2023)

Figura 14 - Gráfico de viabilidade celular dos macrófagos peritoneais tratados com extrato de Breu-branco- BBFSE2 por 24h. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)



Fonte: a autora (2023)

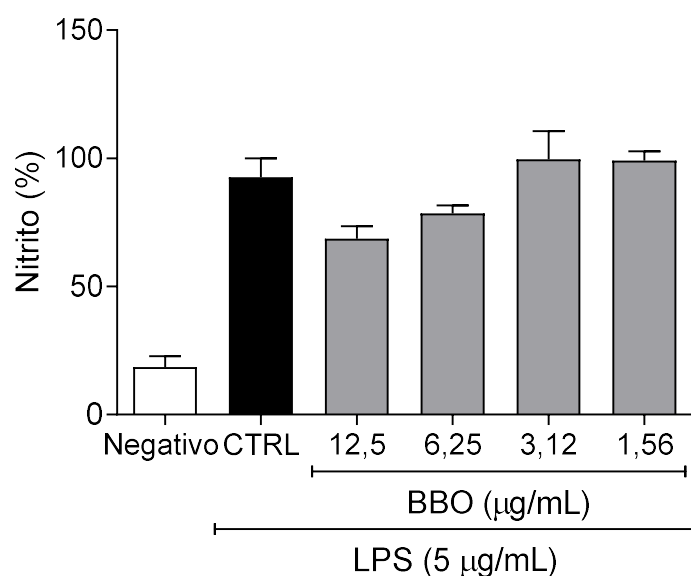
5.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO (LPS)

Para a dosagem da produção de óxido nítrico (NO) foram escolhidas as concentrações de 1,56, 3,12, 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ por não apresentarem citotoxicidade no ensaio com MTT tanto no óleo quanto no extrato.

No tratamento com BBO não houve redução nas concentrações de NO após estímulo com LPS em nenhuma das concentrações testadas (Figura 15), resultado verificado também por Santana (2019) onde avaliou os compostos 1,8-cineol, α -pineno e p-cimeno presentes no óleo essencial do gênero *Protium* também constatou que o tratamento de macrófagos estimulados ou não com LPS, não modulam a produção de NO pelos macrófagos.

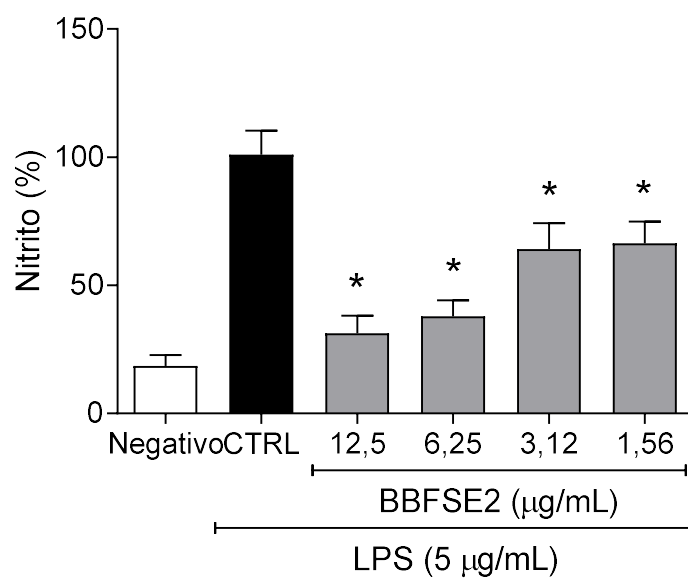
Já no tratamento com BBFSE2 houve redução em todas as concentrações, com maior na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (68,6%) afirmando a ação anti-inflamatória esperada pelo alto teor de seus componentes majoritários (Figura 16). Tendo em vista o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória do óleo essencial e que não apresentou bom desempenho no teste de NO optamos por dar continuidade nos testes em animais e nas citocinas apenas com o extrato de BBFSE2.

Figura 15 - Gráfico da quantificação da dosagem de óxido nítrico em macrófagos tratados com BBO por 24h *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)



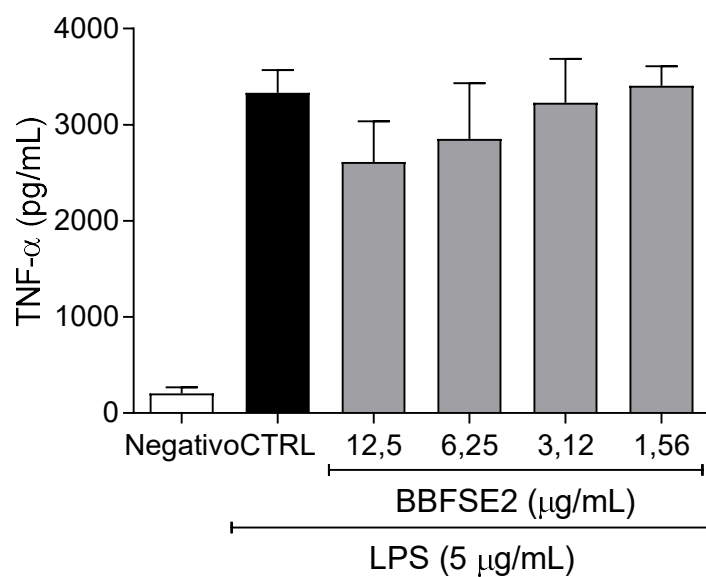
Fonte: a autora (2023)

Figura 16 - Gráfico da quantificação da dosagem de óxido nítrico em macrófagos tratados com BBFSE2. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)



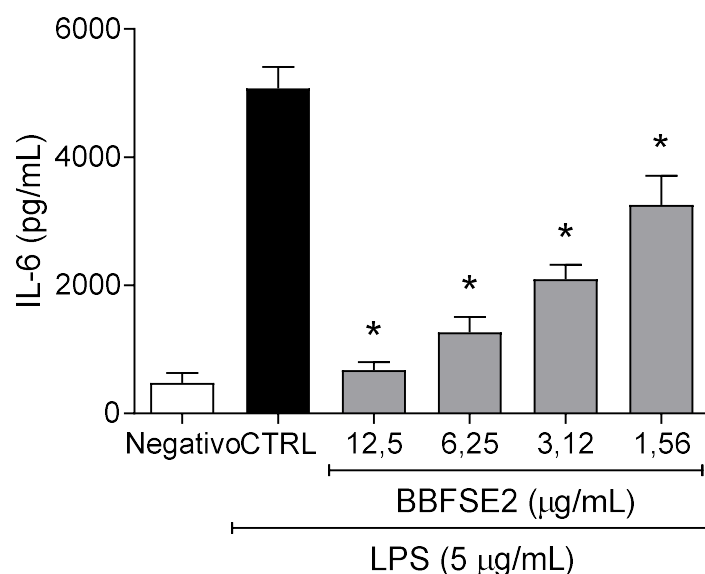
Fonte: a autora (2023)

Figura 17 - Gráfico da quantificação da dosagem da citocina TNF-alfa em macrófagos tratados com BBFSE2. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)



Fonte: a autora (2023)

Figura 18 - Gráfico da quantificação da dosagem da citocina IL-6 em macrófagos tratados com BBFSE2. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)



Fonte: a autora (2023)

Citocinas são moléculas proteicas que enviam sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico e possuem três funções: autócrina- agindo na própria célula produtora; parácrina- atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância. Citocinas como TNF-alfa, IL-1 e IL-6 possuem ação local como ativação endotelial e sistêmica como febre e anormalidades metabólicas. Entre as alterações endoteliais do TNF-alfa podemos citar: a perda da função de diminuição de coagulação, a atividade quimiotática e estímulo ao metabolismo oxidativo de fagócitos. A produção é estimulada por IFN-gama, IL-1, IL-2, GM-CSF, substância P, bradicinina, imunocomplexos, inibidores da cicloxigenase e PAF. A IL-6 é uma citocina influencia respostas imune antígeno específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos e tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (Kumar, Abbas, Aster, 2013; Varela, Forte, 2001).

Em nosso estudo não foi verificada a inibição por TNF-alfa sugerindo que o BBFSE2 não foi capaz de realizar inibição significativa nas concentrações testadas (Figura 17), sendo o resultado na concentração mais alta (12,5) de 2614,14 pg/mL

enquanto o grupo controle era de 3334,74 pg/mL (21,6% de inibição). Isto pode ser justificado pelo fato do TNF-alfa ser pré-formado na célula. Em contrapartida, a IL-6 importante mediador da fase aguda apresentou resultado satisfatório de inibição (Figura 18).

De acordo com Carvalho *et al.*, 2017 a mistura dos componentes majoritários, os triterpeno α -amirina e β -amirina isolado de *Protium heptaphyllum* demonstrou efeito anti-inflamatório em seus ensaios, reduzindo os níveis plasmáticos de resistina e de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-6) e proteína quimiotática de monócitos em animais alimentados com dieta hipercalórica. Em estudo de De Almeida *et al.* (2015) com compostos triterpênicos isolados de óleo-resina de *Protium paniculatum* α -amirina e β -amirina foram capaz de inibir a produção de TNF-alfa ($52,03 \pm 2,4\%$) e demais compostos inibiram a produção de IL-6 em macrófagos J774 murinos estimulados por LPS corroborando com nosso resultado.

5.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA IN VIVO

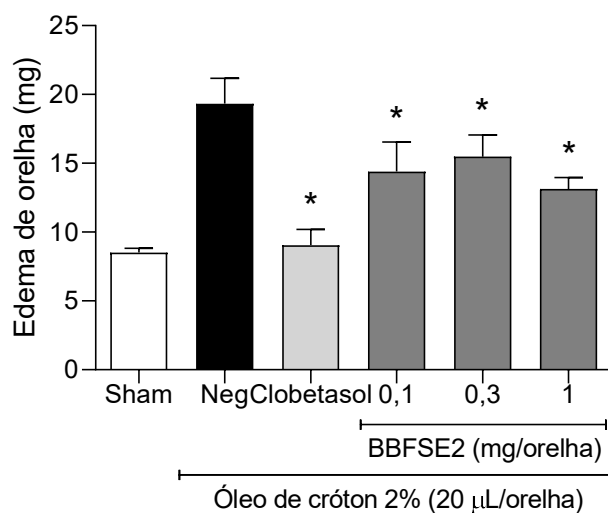
5.6.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Após o tratamento com o extrato de BBFSE2 foi possível observar redução de edema agudo em todas as concentrações testadas (0,1; 0,3 e 1 mg/orelha). De acordo com o peso das orelhas houve redução de 32,2% de inflamação na maior concentração (Figura 19), seguida de uma redução de 20% na concentração de 0,3 mg/mL e redução de 25,6% na concentração de 0,1 mg/orelha. O controle utilizado foi o medicamento clobetasol que reduziu a inflamação em 53,3%. Também corroborando com o estudo de de Almeida (2015) onde a mistura triterpênia de α -amirina e β -amirina inibiu a expressão de COX-2 e a formação de edema de pata ou orelha em ratos e camundongos, tendo um efeito rápido e imediato. Em outro estudo com a mistura dos isolados de *Protium kleinii*, foi possível observar uma inibição dose-relacionada do edema induzido por TPA em orelha de ratos, equivalente à resposta obtida com dexametasona (Otuki *et al.*, 2005).

O efeito anti-inflamatório atribuído a planta conforme mencionado no Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas (Corrêa, 1984); e demonstrado em diversos estudos na literatura (Siani *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2004) foi confirmado na análise histomorfométrica, com redução na espessura das orelhas nos grupos tratados com BBFSE2, bem como no grupo tratado com clobetasol

(Tabela 6). O grupo negativo tinha apresentado uma média de 456,39 μm , enquanto o grupo tratado com a maior concentração do extrato 336,05 μm .

Figura 19 - Gráfico do peso das orelhas após aplicação de óleo de cróton e tratamentos com BBFSE2 nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1, onde o grupo que só recebeu óleo funcionou como controle negativo. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)



Fonte: a autora (2023)

Tabela 6 - Histomorfometria do edema de orelha agudo tratado com BBFSE2

GRUPO	SHAM	ÓLEO DE CROTON	CLOBETASOL	0,1 mg/orelha	0,3 mg/orelha	1 mg/orelha
MÉDIA ± EPM	274,92 ± 34,23	456,39 ± 66,24	247,53 ± 12,96	344,22 ± 21,44	422,87 ± 30,17	336,05 ± 26,41

Fonte: a autora (2023)

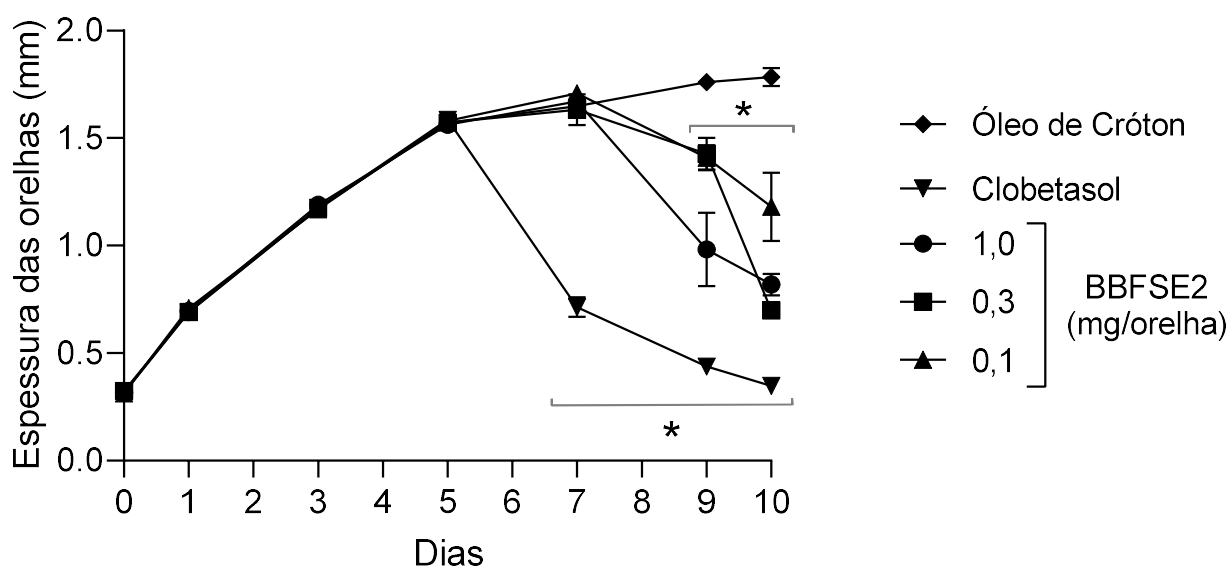
EPM- Erro padrão da média

5.6.2 Edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton.

O teste de indução de edema crônico foi realizado durante 10 dias, com aplicação do óleo de cróton em dias intercalados. O tratamento com BBFSE2, apresentando resultados superiores ao ensaio agudo (Figura 20). O tratamento com extrato na concentração de 1 mg/orelha foi capaz de reduzir em 54% o edema de orelha, as concentrações de 0,3 e 0,1 mg/orelha reduziu 61% e 34%, respectivamente. Utilizou-se novamente clobetasol como droga controle e ele apresentou uma redução de 81%.

A α -amirina oriunda de *P. hepatphyllum*, demonstrou atividade anti-inflamatória, sobretudo tópica quando testada no modelo de inflamação epitelial induzida por acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) em ratos Wistar em estudo realizado por Medeiros *et al.* (2007) observando redução de inflamações indica o indicando o potencial da mistura de amirinas, no desenvolvimento de possíveis agentes terapêuticos.

Figura 20 - Gráfico das medidas da espessura das orelhas após múltiplas aplicações de óleo de cróton e tratamentos com BBFSE2 nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1. *Diferença significativa por análise de Bonferroni ($p < 0,05$)



Fonte: a autora (2023)

5.7 ENSAIO COMETA DE GENOTOXIDADE COM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Após análise da contagem dos danos (0 a 4) foi constatado que o extrato BBFSE2 não possui potencial genotóxico sobre as células de *Drosophila melanogaster* nas condições experimentais testadas. Foi constatado que o solvente utilizado (água, 5% de tween e 5% de etanol) mostrou mais toxicidade, com uma maior frequência de dano ($60,33 \pm 12,06$) que o próprio extrato, inclusive na maior concentração de 10% ($43,67 \pm 12,74$) não se observou nenhuma diferença significativa entre o seu efeito quando comparado ao controle negativo utilizado (água). O que indica que o BBFSE2 não possui efeito genotóxico nestas condições.

Este solvente foi escolhido pelo fato do extrato da oleorresina se tratar de uma substância de baixa polaridade e difícil dissolução em água (Tabela 7).

A genética toxicológica tem suas investigações centradas no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais e mutações cromossômicas de vários compostos. Estimativas da significância do potencial genotóxico de um composto devem envolver métodos estatísticos de avaliação, identificando ao máximo possível as variáveis e parâmetros utilizados (Lima, 2014).

Tabela 7 - Média dos níveis de dano observados em hemócitos de *Drosophila melanogaster* Oregon-R dos tratamentos controle (Controle negativo: água destilada; Solvente : água destilada, 5% Tween 80 e 5% etanol; e concentrações do extrato de breu-branco *Protium* spp

Tratamentos	Níveis de Dano $\pm$ Dp					ID $\pm$ Dp	FD% $\pm$ Dp
	0	1	2	3	4		
Cont. negativo (H ₂ O)	94,00 $\pm$ 1,73	3,67 $\pm$ 0,58	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	0,33 $\pm$ 0,58	10,00 $\pm$ 5,20	6,00 $\pm$ 1,73
Solvente (H ₂ O, 5% tween e 5% etanol)	39,67 $\pm$ 12,06	43,67 $\pm$ 11,93	9,67 $\pm$ 2,08	5,33 $\pm$ 1,53	1,67 $\pm$ 1,53	85,67 $\pm$ 14,01	60,33 $\pm$ 12,06
<i>Protium</i> spp.							
0,3 %	54,67 $\pm$ 7,09	25,33 $\pm$ 5,51	15,00 $\pm$ 1,00	3,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 1,73	72,33 $\pm$ 11,06	45,33 $\pm$ 7,09
1,0 %	56,00 $\pm$ 8,54	17,33 $\pm$ 4,16	17,33 $\pm$ 4,04	7,00 $\pm$ 2,65	2,33 $\pm$ 0,58	82,33 $\pm$ 15,18	44,00 $\pm$ 8,54
3,0 %	68,33 $\pm$ 3,79	16,00 $\pm$ 4,00	10,67 $\pm$ 5,03	4,00 $\pm$ 1,73	1,00 $\pm$ 1,00	53,33 $\pm$ 14,43	31,67* $\pm$ 3,79
10,0 %	56,33 $\pm$ 12,74	21,67 $\pm$ 6,66	11,67 $\pm$ 3,21	9,00 $\pm$ 3,61	1,33 $\pm$ 0,58	77,33 $\pm$ 21,36	43,67 $\pm$ 12,74

Fonte: a autora (2023)

Nível de dano: zero (0) representa ausência de dano genético e 1 a 4 são os níveis crescentes de dano genético. ID (Índice de Dano). FD% (Frequência de Dano). Dp (Desvio padrão).

* Indica diferenças significativas na análise *post hoc* de Bonferroni ($P \leq 0,05$) na comparação com o grupo tratado apenas com o Solvente .

Em seu trabalho sobre genotoxicidade, De Lima *et al.*, 2016, extraiu e testou o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* (Aubl.) March que apresentou predominância de compostos monoterpenos como terpinoleno, p-cimeno-8-ol e p-cimeno e mostrou

proteção contra a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida, e o índice de citotoxicidade da razão eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos nos animais tratados com óleo em todas as doses ($1,34 \pm 0,33$; $1,15 \pm 0,1$; $1,11 \pm 0,13$) não diferiu do controle negativo animal ($1,31 \pm 0,33$), mas do grupo ciclofosfamida ($0,61 \pm 0,12$).

No trabalho realizado por Rego *et al.*, 2021 para obtenção perfil citogenético da mistura de α , β -amirina da resina de *P. heptaphyllum* com o teste do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea; foi visto o composto é uma alternativa para tratamentos por apresentar baixa toxicidade e alto potencial antigenotóxico que no sangue periférico, a administração dos compostos não causou genotoxicidade em 24 h e 48 h, mas antigenotoxicidade foi observada para as concentrações 1; 3 e 10mg/kg, respectivamente 10%; 12%; 67% em 24h e 9%; 15%; 73% em 48h, indicando baixa toxicidade e alto potencial antigênico.

6 CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível estabelecer um método extrativo verde por meio de extração por fluido supercrítico, garantido altas concentrações dos compostos majoritários (α - e β -amirina) e obtendo um bom rendimento. O extrato apolar obtido apresenta baixa citotoxicidade e possui atividade anti-inflamatória *in vitro* em macrófagos peritoneais estimulados por LPS. A atividade anti-inflamatória *in vivo* foi confirmada em modelos de edema de orelha agudo e crônico. O extrato não foi considerado genotóxico no ensaio cometa realizado com *Drosophila melanogaster*, apesar do diluente utilizado ter sido genotóxico, nas condições testadas. De modo geral, o extrato obtido por método verde pode ser um bom candidato para o desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios.

REFERÊNCIAS

- Você sabia que a inflamação pode levar ao desenvolvimento de doenças? **ACTIVE PHARMACEUTICA, CALDIC**. Pedra Branca - Palhoça/SC, 16 de julho de 2020. Blog. Disponível em: <https://activepharmaceutica.com.br/blog/voce-sabia-que-a-inflamacao-pode-levar-ao-desenvolvimento-de-doencas>. Acesso em: 10 de dezembro de 2022.
- ALBERTASSE, P. D.; THOMAZ, L. D.; ANDRADE, M. A. Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Maringá, v. 12, n. 3, p. 250-260, set. 2010.
- ALBINO, R. C.; OLIVEIRA, P. C.; PROSDOCIMI, F.; SILVA, O. F.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; OLIVEIRA, D. R. Oxidation of monoterpenes in *Protium heptaphyllum* oleoresins. **Phytochemistry**, Nova York, v. 136, n. 1, p. 141-146, abr. 2017.
- ALBINO, R. C.; SIMAS, R. C.; MARTINS, K. S.; BIZZO, H. R.; SILVA, E. R.; DALLASSO, M. A.; OLIVEIRA, D. R. Differentiation of black and white pitch (Burseraceae) oleoresins: a mass spectrometry-based chemoethnotaxonomic study. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 259, n. 1, p. 112968-112978, set. 2020.
- ALENCAR, Suzane Leão Oliveira. **Perfil químico e potencial biotecnológico de resíduos de indústrias de oleorresinas Amazônicas**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 2023.
- ALMEIDA, A. V. D. **Espinhela caída**: referências históricas e práticas de cura populares. Recife: EDUFRPE, 2013, (36 p.).
- ALVES, A.; PIGOSO, A.; MOREIRA, S. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato das folhas de *Protium heptaphyllum* L. Marchand. In: CONGRESSO CIENTÍFICO UNIARARAS, 2010, Araras. **Anais do CONGRESSO CIENTÍFICO UNIARARAS, 5; CONGRESSO INTERNACIONAL, 2; CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC – CNPQ, 4: desafios de viver bem no século XXI**. Araras: Fundação Hermínio Ometto, 2010, p. 49-52.
- AMARAL, M. P.; BRAGA, F. A.; PASSOS, F. F.; ALMEIDA, F. R.; OLIVEIRA, R. C.; CARVALHO, A. A.; OLIVEIRA, F. A. Additional evidence for the anti-inflammatory properties of the essential oil of *Protium heptaphyllum* resin in mice and rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 5, p. 775-782, jul. 2009.
- AMAZON OIL – The Rainforest Company. **Resina de Breu-branco - *Protium heptaphyllum***. Produtos da floresta, Óleos. Disponível em: <https://www.amazonoil.com.br/produtos-da-floresta/resina-de-breus-branco-protium-heptaphyllum/>. Acesso em: 15 de janeiro de 2023.
- AMORIM, É. M. **Estudo da mutagenicidade de metabólitos secundários liquênicos, utilizando o teste smart e ensaio cometa em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2016. Dissertação (Mestrado Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, 2016.

AMPARO, T. R., BRAGA, V. C. D. C., SEIBERT, J. B., SOUZA, G. H. B. D., & Teixeira, L. F. D. M. (2018). Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma – Ciências Farmacêuticas**, v.30, n.1, p 50-59, 2018.

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**, Inglaterra, v. 13, n. 1, p. 33-34, dez. 2001.

BANDEIRA, Paulo N. *et al.* Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica alfa-e beta-amirina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 204-208, 2007.

BARRETO, G.A.; PADILHA, F.F.; MACHADO, B.A.S. Caracterização físico-química e biológica de extratos de própolis verde e vermelha obtidos por extração com fluido supercrítico e extração etanólica. In: WORKSHOP DE PESQUISA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO - PTI, 4., 2014, Salvador. **Anais WORKSHOP DE PESQUISA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO – PTI: Desafios e oportunidades para o desenvolvimento industrial no estado da Bahia**, 4. Salvador: SENAI/CIMATEC, 2014. p. 368-377.

BERNADI, W. A.; ZANOTELLI, J. D. C.; LIMA, E. M.; SOUZA, T. D.; EDRINGER, D. C.; SOUZA, V. R. C. Effects of topical application of essential oil from resin of almeskar (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand) in experimentally induced skin wounds in rats. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 10-15, jan. 2015.

BERTAN, Larissa Canhadas. **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. 2003. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2003.

BLACK, G.A.; DOBZHANSKY, T.H.; PAVAN, C. 1950. Some attempts to estimate species diversity and population density of trees in Amazonian forests. **Botanical Gazette** 3(4): 413-425.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - **Guia para a Condução de Estudos Não clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Brasília-DF, 2013. 48p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/manuais-eguias/guia-para-a-conducao-de-estudos-nao-clinicos-de-toxicologia-e-seguranca-farmacologica-necessarios-ao-desenvolvimento-de-medicamentos-versao2.pdf/vie>. Acesso em: 15 de janeiro de 2023.

BRISCHIGLIARO, M.; FERNANDEZ-VIZARRA, E.; VISCOMI, C. Mitochondrial Neurodegeneration: Lessons from *Drosophila melanogaster* Models. **Biomolecules**, Basel, v. 13, n. 2, p. 378-400, fev. 2023.

CAMPOS, S. C., Silva, C. G., Campana, P. R. V., & Almeida, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.18, n.1, p.373-382, jan. 2016.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples. Total antioxidant activity. **Methods in enzymology**, vol. 299, 1999.

CARVALHO, K. M. M. B.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MELO, T. S.; ARAÚJO, A. J.; QUETZ, J. D. S.; CUNHA, M. D. P. S. S.; SANTOS, F. A. The resin from *protium heptaphyllum* prevents high-fat diet-induced obesity in mice: scientific evidence and potential mechanisms. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Londres, v.2015, n. 1, p. 1-13, jan. 2015.

CARVALHO, K.M.; DE MELO, T. S.; QUINDERÉ, A.I.; DE OILVEIRA, F.T.; VIANA, A. F.; NUNES, P. I.; QUETZ, J. D.; VIANA, D. A.; DA SILVA, A. A.; HAVT, A.; FONSECA, S. G.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Amyrins from *Protium heptaphyllum* reduce high-fat diet-induced obesity in mice via modulation of enzymatic, hormonal and inflammatory responses. **Planta Medica**, v.83, n.285, 2017.

CAZELLI, D. S. P. **Atividade antimicrobiana de constituintes do óleo essencial de Protium heptaphyllum (Aubl.) March e derivados do eugenol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Vila Velha, Espírito Santo, 2014.

CITÓ, A. M. G. L.; COSTA, F. B.; LOPES, J. A. D.; OLIVEIRA, V. M. M.; CHAVES, M. H. Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Maringá, v. 8, n. 4, p. 4-7, out. 2006.

CORRÊA, Manoel Pio. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**: HL. (Vol. 4). Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

COSTA, L. C.; ROCHA, E. A.; SILVA, L. A. M.; JARDIM, J. G.; SILVA, D. C.; OLIVEIRA GAIÃO, L.; MOREIRA, R. D. C. T. Levantamento preliminar das espécies vegetais com potencial econômico no Parque Municipal da Boa Esperança, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta farmacêutica bonaerense**, Buenos Aires, v. 25, n. 2, p. 184-91, nov. 2006.

COSTA, T. D. O. G.; ALMEIDA, R. A. D.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A. D.; PINTO, A. C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 42, n. 4, p. 557-560, dez. 2012.

CRUZ, M. S. M. **Investigação da toxicidade genética de produtos naturais através de bioensaios de curta duração**. 2015. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

CUNHA, V. R. **Produção e caracterização de impermeabilizante a base da resina de breu-branco da Amazônia: prospecção da resina de breu-branco da Amazônia como impermeabilizante de fibras naturais em compósitos**. 2020.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

DA SILVA, Kennedy Lima *et al.* Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial da resina de *Protium hebetatum* Daly (Burseraceae). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 2, p. 245-253, 2021.

DA SILVA, M. G., FURTADO, M. M., OSÓRIO, A. T., DA SILVA MORAIS, I. C. P., DO AMARAL, M. P. M., COELHO, A. G., & ARCANJO, D. D. R. A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. **Research, Society and Development**, Piauí, v.10, n.12, p.e538101220137, set. 2021.

DE ALMEIDA, Patrícia do *et al.* Research Article Anti-Inflammatory Activity of Triterpenes Isolated from *Protium paniculatum* Oil-Resins. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2015.1 (2015): 293768.

DE ARAÚJO, V. F.; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; PASTORE JR, F. **Plantas da Amazônia para produção Cosmética**. Brasília/DF (Brasil): Universidade de Brasília - Laboratório de Tecnologia Química (LATEC), Organização Internacional de Madeiras Tropicais (OIMT) e Fundação de Estudo e Pesquisas em Administração e Desenvolvimento (FEPAD), 2007.

DE LIMA, E. M., CAZELLI, D. S. P., PINTO, F. E., MAZUCO, R. A., KALIL, I. C., LENZ, D.; ENDRINGER, D. C. (2016). Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity. **Pharmacognosy Magazine**, 12 (Supl 1), S42.

Descritores em Ciências da Saúde: DeCS. **Interleucina-6 (IL-6)**. *In*: Descritores em Ciências da Saúde. Edição 2022. São Paulo: BIREME/ OPAS/OMS. Disponível em: https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=29472&filter=ths_termall&q=interleucina%20IL-6. Acesso em: 05 de junho de 2023.

Descritores em Ciências da Saúde: DeCS. **Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-ALFA)**. *In*: Descritores em Ciências da Saúde. Edição 2022. São Paulo: BIREME/ OPAS/OMS. Disponível em: https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=29591&filter=ths_exact_term&q=TNF-ALFA. Acesso em: 05 de junho de 2023.

FAGUNDES, S. T. S.; SCCOTI, M. S. V.; BRITO JUNIOR, J. F. Dinâmica de espécies da família Burseraceae em área de exploração florestal, Flona do Jamari, RO. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, Rondônia, v. 10, n. 2, p. 1-11, dez. 2021.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. **Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais**. Química Nova na Escola, 39(2), p. 120-130, 2017.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. **Genes**, Londres, v. 11, n. 10, p. 1203-1216, out. 2020.

FERNANDES, S. P. C. **Insetos galhadores associados à família Burseraceae da reserva florestal Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia – INPA, Manaus, Amazonas, 2010.

FRANCEZ, L. M. D. B.; CARVALHO, J. O. P. D.; JARDIM, F. C. D. S.; QUANZ, B.; PINHEIRO, K. A. O. Efeito de duas intensidades de colheita de madeira na estrutura de uma floresta natural na região de Paragominas, Pará. **Acta Amazonica**, Rondônia, v. 39, n. 4, p. 851-863, mar. 2009.

FREIRE, I. C. M.; PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; MARIZ, B. A. L. A.; ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Maringá, v. 16, n. 2, p. 372-377, jan. 2014.

FREITAS, P. R.; MENDES, J. W. D. S.; DIAS, K. J. D. O.; CARVALHO FILHO, M. A. N. D.; ARAÚJO, A. C. J. D.; RIBEIRO FILHO, J. Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias: uma revisão. **Revista Interfaces**, Guarapuava, v. 7, n. 2, p. 318-324, ago. 2019.

FURTADO, F. B. **Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica***. Tese (Doutorado em Biologia geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

GONÇALVES, K. G.; PASA, M. C. A ETNOCATEGORIA MEDICINAL E A ETNOFARMACOLOGIA NA COMUNIDADE SUCURI EM CUIABÁ-MATO GROSSO. **FLOVET-Boletim do Grupo de Pesquisa da Flora, Vegetação e Etnobotânica**, Cuiabá, v. 1, n. 7, dez. 2015.

HAWTHORNE, S. B. Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction. **Analytical Chemistry**, 62 (11): 633-42, 1990.

HOMMA, A. K. O.; HOMMA, A. K. O. **Extrativismo vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação**. Brasília, DF: Embrapa, 2014, (467 p.).

KLEIN, E. J.; CARVALHO, P. I. N.; NATHIA-NEVES, G.; VARDANEGA, R.; MEIRELES, M. A. A.; SILVA, E. A.; VIEIRA, M. G. A. Techno-economical optimization of uvaia (*Eugenia pyriformis*) extraction using supercritical fluid technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, Virgínia, v. 174, n. 1, p. 105239-105249, ago. 2021.

KLEIN, E. J.; SANTOS, K. A.; PALU, F.; VIEIRA, M. G. A.; SILVA, E. A. Use of supercritical CO₂ and ultrasound-assisted extractions to obtain α/β -amyrin-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis* Cambess.). **The Journal of Supercritical Fluids**, Virgínia, v. 137, n. 1, p. 1-8, jul. 2018.

KLUCZKOVSKI, A. M.; OLIVEIRA, L. B.; MACIEL, B. J. Caracterização e extração do óleo de castanha-do-Brasil: revisão. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Guarujá, v. 3, n.1, p. 391-402, jan. 2021.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. **Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KUMMER, R. **Efeitos do p-cimeno e do alfa-pineno sobre a resposta inflamatória aguda**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2015.

LIMA, A. **Potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de folhas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) e breu-branco (*Protium heptaphyllum*) em fitopatógenos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, Mato Grosso, 2016.

LIMA, C. D. D. S. **Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação do potencial genotóxico do metabólito secundário de *Serratia marcescens*, a Prodigiosina**. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; OTUKI, M. F.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F. Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 16, p. 578-582, jun. 2005.

LIMA, T. A. A. C., RIBEIRO, J. E. L. D. S., MARQUES, M. O. M., FACANALI, R., & LIMA, M. D. P. (2016). Estimulo para produção de resina em *Protium hebetatum* Daly e avaliação dos constituintes químicos voláteis. *Volume 5, Pags. 21-24*.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; COUTO, A. Plantas medicinais da RENISUS com potencial anti-inflamatório: revisão sistemática em três bases de dados científicas. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 129-144, out. 2015.

MARQUES, D. D. **Contribuição ao conhecimento químico da flora acreana: *Protium hebetatum* Daly, *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *ulei* (Swat) Daly e *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *heptaphyllum***. 2010. 249 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MARQUINA-CHIDSEY, G.; MONRO, B.; PÉREZ, E.; VELÁZQUEZ, I.; VARGAS, M. EVALUATION OF THE EXTRACTION OF TACAMAHACO (*PROTIUM HEPTAPHYLLUM*) RESIN'S ESSENTIAL OIL USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE. In: III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Prosciba 2013, Cartagena de Indias, Colombia. **Anais**. Disponível em: <http://www.nupeg.ufrn.br/prosciba/prosciba2013/Papers/T2-73.pdf>.

MARQUINA-CHIDSEY, G.; MONRO, B.; VELÁZQUEZ, I.; ARIAS, D.; PÉREZ, E.; SANTOS, D. T.; VARGAS, M. Evaluation of supercritical fluid extraction of tacamahaco

(*Protium heptaphyllum*) resin. **Journal of Essential oil Research**, 29, no. 6 (2017): 443-450.

MEDEIROS, R., OTUKI, M. F., AVELLAR, M. C. W., & CALIXTO, J. B. (2007). Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, 559(2-3), p.227–235, 2007.

MELO, K. M. **Efeito da mistura de triterpenos alfa e beta-amirina, isolada de *Protium heptaphyllum*, sobre a adipogênese in vitro**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

MELO, K. M.; OLIVEIRA, F. T. B.; SILVA, R. A. C.; QUINDERÉ, A. L. G.; MARINHO FILHO, J. D. B.; ARAÚJO, A. J.; SANTOS, F. A. α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p. 1860-1866, jan. 2019.

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

MENEZES, S. A.; PORTELA, B. Y. M.; LIMA, L. B.; VANDESMET, L. C. S. Levantamento etnobotânico de espécies medicinais do Nordeste Brasileiro com potencial anti-inflamatório. **Brazilian Journal of Development**, Paraná, v. 5, n. 10, p. 18238-18249, out. 2019.

MONTEZUMA, Rita de Cássia Martins; ARAUJO, D. S. D. Estrutura da vegetação de uma restinga arbustiva inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro. **Pesquisas, Botânica**, v. 58, p. 157-176, 2007.

MONTOYA, T.; CASTEJÓN, M. L.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; GONZÁLEZ-BENJUMEA, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. G.; ALARCÓN DE-LA-LASTRA, C. Oleocanthal modulates LPS-induced murine peritoneal macrophages activation via regulation of inflammasome, Nrf-2/HO-1, and MAPKs signaling pathways. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 67, n. 19, p. 5552-5559, mai. 2019.

MORAES, M. M.; BOTELHO, P. S.; NEVE, I. A.; NEVES, R. C. S.; RIBEIRO, N. C.; BORN, F. S.; CAMARA, C. A. G. Composição química do óleo essencial das folhas de duas espécies do gênero *Protium* (Burseraceae). In: Proceedings of the 9 Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão do Centro de Ensino de Graduação. **Anais da IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**. Recife: UFPE, 2009, p. 1-3.

MOREIRA, H. D. R. **História evolutiva de espécies do grupo flavopilosa de *Drosophila* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE): uma abordagem filogenética, filogeográfica e taxonômica**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2020.

MOSMANN, T. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, Salt Lake, v. 65, n. 1, p. 55-61, set. 1983.

MOURA, H. V. D.; POMERANTZEFF, P.; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 376-387, dez. 2001.

MURTHY, K. S. R.; REDDY, M. C.; RANI, S. S.; PULLAIAH, T. Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, Reino Unido, v. 5, n. 2, p. 247-258, fev. 2016.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; CAVALCANTE, Í. J.; LIMA, A. F.; RAO, V. S. 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 Sciences**, São Paulo, v. 77, n. 23, p. 2942-2952, out. 2005.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA JR, R. C.; RAO, V. S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, Nova York, v. 49, n. 2, p. 105-111, fev. 2004.

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 α -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, n. 1-3, p. 253-259, 2005.

Uma preciosidade chamada Breu: descubra para que serve! **Paralela Escola Alfativa**, São Paulo, [s.d.]. Disponível em: <https://paralelaescolaolfativa.com.br/recentes/breu-para-que-serve/>. Acesso em: 15 de janeiro de 2023.

PEREIRA, M. G. S.; COELHO-FERREIRA, M. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental, Abaetetuba, Pará. **Biota Amazônia**, Amapá, v. 7, n. 3, p. 57-68, set. 2017.

PERES, L. A. B.; DELFINO, V. D. A.; MOCELIN, A. J.; AKARI, L.; TUTIDA, M. E. F.; MATUSO, T. (2008). Padronização do teste do MTT em modelo de preservação a frio como instrumento de avaliação da viabilidade celular renal. **J Bras Nefrol**, 30(1), 48-53.

PERLAS PRILL. **Breuzinho**. Disponível em: <https://www.perlas-prill.com.br/produto/breuzinho>. Acesso em: 16 de janeiro de 2023.

PERRETTI, M.; LEROY, X.; BLAND, E. J.; MONTERO-MELENDEZ, T. Resolution pharmacology: opportunities for therapeutic innovation in inflammation. **Trends in pharmacological sciences**, Reino Unido, v. 36, n. 11, p. 737-755, nov. 2015.

REGO, L. R. do; VALE, E. P.; PUREZA, D. D. N.; NETO, M. de A. B. M.; Medeiros, F. A. de; MARTINS, R. (2021). Cytogenetic evaluation of α , β -amirina obtained in resin

of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand in polychromatics erythrocytes of mice swiss. **International Journal for Innovation Education and Research**, 9(4), 10-21. <https://doi.org/10.31686/ijer.vol9.iss4.3007>.

ROCHA, T. S.; SANTANA, A. L. C. M.; MÜLLER, T. S.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, G. L. Variabilidade química de óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 11, n. 10, p. e288111032835-e288111032835, jul. 2022.

RODRIGUES, V. H.; MELO, M. M.; PORTUGAL, I.; SILVA, C. M. Extraction of added-value triterpenoids from *Acacia dealbata* leaves using supercritical fluid extraction. **Processes**, Londres, v. 9, n. 7, p. 1159-1174, jul. 2021.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; JUNIOR, V. V. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacognosy reviews**, Bangalore, v. 1, n. 1, p. 93-104, jan. 2007.

RÜDIGER, A. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemodiversity of Ursane-and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins. **Chemistry & Biodiversity**, Suíça, v. 10, n. 6, p. 1142-1153, jun. 2013.

RÜDIGER, André Luis. **Estudo fitoquímico e citotóxico de Oleorresinas de Burseraceae**. 2012. 244 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

RUSSELL, G.; LIGHTMAN, S. The human stress response. **Nature reviews endocrinology**, Nova York, v. 15, n. 9, p. 525-534, jun. 2019.

SANTANA, Raissa Couto. **Avaliação do potencial microbicida dos compostos 1, 8-cineol, alfa-pineno e p-cimeno presentes em óleos essenciais do gênero Protium sobre Leishmania amazonensis in vitro**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, 2019.

SANTOS, L. M. D. **Uso de plantas medicinais para tratamento der síndromes respiratórias e suas aplicações por povos indígenas na pandemia da Covid-19**. 2021. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2021.

SCHERER, M. M. C. **Atividades antioxidante e anti-inflamatória in vitro dos monoterpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Vila Velha, Vila Velha, Espírito Santo, 2017.

SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; MONTEIRO, S. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, Holanda, v. 32, n. 5, p. 477-489, mai. 2004.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. D. S.; MENEZES-DE-LIMA JR, O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O. A.; HENRIQUES, M. D. G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57-69, ago. 1999.

SILVA, C. J. A. **Avaliação da resposta anti-inflamatória e cicatrizante in vitro promovida pelos floroglucinóis isolados de *Harpalyce brasiliana* Benth.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SILVA, E.J. **Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar.** 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, F. C. O.; FERREIRA, M. K. A.; SILVA, A. W.; MATOS, M. G. C.; MAGALHÃES, F.; SILVA, P. T.; SANTOS, H. S. (2020). Bioatividades de Triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão. **Rev. Virtual Quim**, 12(1).

SILVA, J. M.; MENDONÇA, P. P.; PARTATA, A. K. Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v. 7, n. 4, p. 5-12, out. 2014.

SILVA, K. L.; CEZAROTTO, G.; SOUZA, R. R.; CARVALHO, C. E. G.; OLIVEIRA, J. P. R.; CARVALHO, C. M.; MARQUES, D. D. Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial da resina de *Protium hebetatum* Daly (Burseraceae). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, Rio Branco, v. 8, n. 2, p. 245-253, jan. 2021.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas) [online]. **Registros de Intoxicações/dados nacionais/2012.** Disponível em <https://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais>. Acesso em 15 de maio de 2023.

SOUSA, A. F. G. **Avaliação da genotoxicidade e do potencial osteogênico de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.** 2017. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2017.

TER STEEGE, H.; PITMAN, N. C.; SABATIER, D.; BARALOTO, C.; SALOMÃO, R. P.; GUEVARA, J. E.; SILMAN, M. R. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. **Science**, São Paulo, v. 342, n. 6156, p. 1243092, out. 2013.

VALADAS, J.; FOIGT, V.; DE AGUIAR RAUPP, W.; DE FREITAS, T. A. B.; ROTTA, L. Correlação entre os resultados de proteína c-reativa e velocidade de hemossedimentação. **Revista de Atenção à Saúde**, v.17, n.60, p. 5-10, abr./jun., 2019.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. 2001; 24:146–54.

VASCONCELOS, Eilika Andréia Feitosa *et al.* Influência do processo extrativo, solvente e tamanho da partícula do material vegetal no teor de sólidos totais da solução extrativa da *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v. 1, n. 1, p. 74-79, jun. 2005.

VERÇOSA, C.J. *et al.* Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 141:148-153, 2017.

VIEIRA, I.C.G.; SILVA, J. M. C. D; TOLEDO, P. D. Estratégias para evitar a perda de biodiversidade na Amazônia. **Estudos Avançados**, v. 19, p. 153-164, ago. 2005.

VIEIRA, R. K.; VIEIRA, A. K.; KIM, J. T.; NETRAVALI, A. N. Characterization of Amazonic WhitePitch (*Protium heptaphyllum*) for potential use as 'green' adhesive. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v.28, n.10, p.963–974, Jan. 2014.

VITOR, C. E.; FIGUEIREDO, Claudia Pinto; HARA, D. B.; BENTO, A. F.; MAZZUCO, Tânia L.; CALIXTO, João B. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, α - and β -amyrin, in a mouse model of colitis. **British Journal of Pharmacology** 157, no. 6 (2009): 1034-1044.

WIPFLER, B.; SCHNEEBERG, K.; LÖFFLER, A.; HÜNEFELD, F.; MEIER, R.; BEUTEL, R. G. (2013). The skeletomuscular system of the larva of *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae, Diptera)—a contribution to the morphology of a model organism. **Arthropod structure & development** 42(1), 47-68.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. Donald; MCGAVIN, M. Donald. **Bases da patologia em veterinária**. São Paulo: Elsevier Health Sciences Brazil, 2012, (1048 p.).

ZOGHBI, M. D. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; LIMA, M. D. P.; SILVA, T. M. D.; DALY, D. C. The essential oils of five species of *Protium* growing in the North of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Ontário, v. 8, n. 3, p. 312-317, mar. 2005.