



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



PROJETO

TÍTULO: Atividade antiedematogênica e antiinflamatória de um composto semissintético derivado do ácido abiético em modelos animais.

AUTOR: Sharlene Maria Oliveira Brito

RESUMO:

A síntese de compostos semissintéticos, que empregam a mistura de produtos naturais bioativos de origem vegetal, tem se apresentado com uma promissora alternativa para a produção de novos fármacos para patologias com escassas ou agressivas opções terapêuticas. Espécies de plantas ricas em terpenos demonstraram diversas atividades biológicas, como ação antibacteriana, anti-inflamatória e anticâncer. O objetivo deste estudo será avaliar a atividade antiedematogênica e antiinflamatória de um composto semissintético derivado do ácido abiético e geranial em modelos animais. O composto será sintetizado e submetido ao teste de citotoxicidade. A atividade antiinflamatória do composto será avaliada através de peritonite induzida por carragenina, com avaliações de permeabilidade vascular usando albumina, pleurisia e a medição de citocinas IL1 β e TNF α , e a avaliação inflamação crônica usando o modelo de granuloma induzido por *pellets* de algodão. Os animais (n = 6) serão divididos em grupos com concentrações distintas, a serem determinadas, do composto sintetizado, controle negativo (solução salina) e controle positivo (indometacina e prometazina). Os dados serão analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey ou ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey usando o software GraphPad Prism.

Palavras-chave: ácido abiético, inflamação, efeito antiedematogênico.

INTRODUÇÃO:

Alimentos funcionais são aqueles que contribuem para a homeostase física e mental, bem como atuam a promoção da saúde. Dentre eles, encontram-se frutas, grãos, legumes e vegetais ricos em fitoquímicos. Tais alimentos podem atuar na regulação de ações orgânicas próprias, incluindo o estímulo e fortalecimento do sistema imune e inibição de processos alérgicos. Podem, ainda, agir na prevenção de diversas doenças crônicas como diabetes, hipertensão, anemia, câncer, e patologias agudas resultantes da produção de espécies reativas de oxigênio. A fitoterapia apresenta-se, portanto, como uma importante alternativa à medicina tradicional por ser parte integrante da cultura de países em desenvolvimento e devido ao elevado custo para a importação de medicamentos sintéticos (BAILÃO et al., 2015).



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



Os fitoterápicos são componentes da variedade e complexidade de organismos vivos de um sistema ecológico, denominado de biodiversidade. Existe neles, uma variedade inestimável de compostos naturais com estruturas únicas a serem descobertas e que podem ser usadas para a formulação de novos fármacos. Nesse aspecto, partimos na vanguarda, por ser o Brasil, o país com a maior biodiversidade do mundo (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

Segundo Araújo et al. (2019), a inflamação consiste em uma resposta fisiológica e adaptativa que compreende a mobilização de vários mediadores químicos desencadeada pelo estímulo de partículas ou microrganismos nocivos. Essa resposta ativa células de defesa que, por sua vez, liberam inúmeros mediadores inflamatórios, tais como interleucina (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral (TNF- α). O processo inflamatório ativa uma cascata de eventos locais e sistêmicos que se apresentam na forma de sinais e sintomas como dor, calor, rubor e edema, sendo a avaliação do edema, um excelente parâmetro para avaliar o potencial antiinflamatório de compostos químicos, uma vez que consegue mensurar tanto a atividade tópica como sistêmica.

As drogas utilizadas, atualmente, no tratamento das injúrias inflamatórias são os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e os corticosteroides (SELVARANI; BAI, 2014), entretanto a abordagem com tais fármacos, por longos períodos, desencadeia inúmeros efeitos adversos, tais como irritação, prurido, ressecamento da pele, acne e estrias (KANAGASANTHOSH; SHANMUGAPRIYAN; KAVIRAJAN, 2015), justificando a necessidade de buscar novas alternativas medicinais a partir de compostos naturais que ofereçam menos transtornos ao usuário (KAZEMIPOOR et al, 2012).

Medicamentos são classificados, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em diversas categorias de acordo com sua origem e com relação ao seu perfil inovador, cada uma destas categorias gera um registro específico. Os medicamentos classificados como “medicamentos novos” abrangem uma categoria inovadora de componentes sintéticos ou semissintéticos com comprovada eficácia e segurança clínica (BRASIL, 2013). Os compostos semissintéticos empregam a mistura em proporções variáveis de produtos naturais bioativos modificados quimicamente para melhorar suas propriedades farmacêuticas e diminuir sua toxicidade, apresentando-se como uma alternativa promissora no tratamento de doenças complexas e com escassas opções terapêuticas (CASANOVA; COSTA, 2017).

Dentre as variadas classes de produtos naturais, os terpenos demonstram uma diversidade muito grande de metabólitos secundários com considerável variedade de estruturas e bioatividades. O ácido abiético é um diterpeno encontrado em abundância na resina de *Pinnus eliottii* (pinheiro), com vários relatos na literatura como substância de partida para a síntese de compostos (GIACOMINI et al., 2005). Terpenos são reconhecidos por apresentar diversas atividades biológicas, como ação antibacteriana, anti-inflamatória e anticâncer (ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008). Outro terpeno de interesse farmacológico é o geranial, um dos compostos majoritários encontrados no *Cymbopogon citratus*, ou capim-limão, junto com o neral formam o citral, citado como sendo o responsável pelas atividades atribuídas ao seu óleo essencial, tais como germicidas, repelentes de insetos, aplicações na indústria de medicamentos, entre outras. (GUIMARÃES et al., 2008).



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



JUSTIFICATIVA:

O amplo uso popular, para fins medicinais, de uma variedade de plantas da Floresta Nacional do Araripe carece de estudos que fundamentem a sua aplicação, traga segurança e aprimoramento do seu uso, podendo ainda, servir de base para a descoberta de novos produtos farmacêuticos que agreguem valor à região e incrementem a economia local, além de enaltecer essa flora com vistas a gerar subsídios para seu manejo e conservação adequados.

Ainda, a possibilidade de combinar, modificar e potencializar os efeitos farmacológicos de substâncias derivadas de produtos naturais mostra-se como um campo de pesquisa substancialmente promissor, acima de tudo, devido ao seu processo de produção se mostrar mais seguro, barato e sustentável.

OBJETIVOS:

GERAL: Avaliar a Atividade antiedematogênica e antiinflamatória de um composto semissintético derivado do ácido abiético em modelos animais.

ESPECÍFICOS:

- Sintetizar um derivado híbrido formado pela junção do ácido abiético e do geranial.
- Avaliar a toxicidade do composto semissintético sintetizado.
- Avaliar a atividade antiedematogênica e antiinflamatória do derivado híbrido formulado.

METODOLOGIA/MATERIAL E MÉTODOS:

Animais

Serão usados camundongos swiss machos e fêmeas (*Mus musculus*) pesando entre 20-30 g, obtidos de a Unidade de Contenção de Animais da Universidade Regional do Cariri. Os animais serão alojados com comida e água ad libitum em uma sala com temperatura controlada de 22 a 24 C, em um ciclo claro / escuro de 12 horas. Antes dos experimentos, os animais serão mantidos no Laboratório de Farmacologia e Molecular Química da URCA por um período de 24 h para aclimatização. O estudo será realizado de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os protocolos serão submetidos à aprovação pela a Comissão de Experimentação do Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri.



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



Toxicidade

Os animais ($n = 3$) serão tratados com uma única dose oral do composto sintetizado (2000 mg / kg) ou H₂O (grupo controle). Após o tratamento, os animais serão observados nos seguintes períodos: 30 min, 60 min, 240 min, 360 min, 24 h e diariamente por 14 dias. A Dose letal média (DL₅₀) será determinada a partir do número de mortes de acordo com OECD 425 (Guideline, 2011).

Avaliação das atividades antiedematogênica e antiinflamatória

A avaliação da atividade antiinflamatória do composto a ser sintetizado será realizada usando modelos de edema de pata (induzido por diferentes agentes): peritonite induzida por carragenina, com avaliações de permeabilidade vascular usando albumina; pleurisia e a medição de citocinas IL1 β e TNF α ; e a avaliação da inflamação crônica usando o modelo de granuloma induzido por *pellets* de algodão. Os animais ($n = 6$) serão divididos em grupos com dosagens variadas, definidas pelo teste de toxicidade e um controle negativo. A histamina / prostaglandina E₂ edema da pata, peritonite, pleurisia e os testes de granuloma serão realizados com as doses que se apresentarem mais eficazes (PRÓSPERO et al., 2018).

Edema de pata induzido por administração intraplantar de carragenina/dextrana

A avaliação do edema de pata será feita de acordo com Lapa et al., 2003. Os animais ($n=6$) serão pré-tratados (v.o) com solução salina a 0,9% e as doses estabelecidas após a síntese do composto semissintético. Após 1h do tratamento, cada animal receberá 20 μ L de carragenina a 1% (v/v) ou dextrana a 1% na pata direita traseira e o mesmo volume do veículo na pata traseira esquerda. As patas traseiras direita e esquerda do animal serão registradas 1, 2, 3 e 4h após a administração do estímulo inflamatório (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

Edema de pata induzido pela administração intraplantar de histamina

Para a avaliação do processo inflamatório induzido pela histamina. Os animais ($n=6$) serão pré-tratados (v.o) com solução salina a 0,9% e, prometazina 6mg/kg e dose a ser estabelecida do composto a ser sintetizado. Após 1h do tratamento, cada animal receberá 20 μ L de histamina a 1% (v/v) na pata direita traseira e o mesmo volume do veículo na pata traseira esquerda. As patas traseiras direita e esquerda do animal serão registradas 30, 60, 90, 120 e 180min após a administração do estímulo inflamatório (MALING et al., 1974).

Edema de pata induzido pela administração intraplantar de prostaglandina E₂



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



Os animais (n=6) serão pré-tratados (v.o) e doses a serem estabelecidas do composto a ser sintetizado. Após 1h do tratamento, cada animal receberá 20µL de prostaglandina E2 na pata direita traseira e o mesmo volume do veículo na pata traseira esquerda. As patas traseiras direita e esquerda do animal serão registradas 15, 30, 45 e 60min após a administração do estímulo inflamatório (MALING et al., 1974).

Medição de edema

O método de pletismometria será utilizado para avaliar modelos de edema de pata induzido por agentes flogísticos (carragenina, dextrana, histamina e prostaglandina E2). Os animais terão o volume inicial (Vi) de suas patas traseiras direita e esquerda avaliados antes dos tratamentos. Então será feita a diferença entre o volume final e o volume inicial das patas em cada momento através da fórmula: Volume da pata direita ou esquerda (em µL) = Vf (volume final) – Vi (volume inicial) de acordo com Winter, Risley e Nuss (1962).

Peritonite

O modelo de indução de peritonite por carragenina será usado para avaliar o efeito do composto semissintético a ser formulado no recrutamento leucocitário, onde os grupos serão primeiro tratados com 0,9 do veículo salino e as doses do composto a serem estabelecidas. Após 1h do tratamento inicial, os animais receberão por via intraperitoneal carragenina a 1%. 4h após a indução da inflamação, os animais serão sacrificados e 3mL de heparina PBS (10 UI/mL) serão injetados na cavidade peritoneal dos animais. O fluido peritoneal será coletado usando uma pipeta de Pasteur e a contagem de células será realizada (WIRTZ et al., 2007).

Avaliação da função e migração leucocitária, e extravasamento de proteínas

Para avaliar a migração leucocitária, amostras de 1,5 mL de lavado peritoneal serão separadas para análise usando um dispositivo SDH-20 e para a produção de fatias para contagem diferencial de leucócitos será usada coloração panótica rápida, que consiste na fixação, e uma corante ácido e básico. As fatias serão avaliadas no microscópio ótico seguindo a preparação, e o restante da amostra de lavado peritoneal será centrifugado e separado para medição de albumina e mieloperoxidase (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

Para a avaliação do extravasamento de proteína, concentrações de albumina serão determinadas usando o kit Labtest, baseado no método bromocresol verde, cuja especificidade e sua observância será proporcional a concentração de proteínas analisadas na amostra. Então a amostra será lida no Bioplus. Mieloperoxidasas serão mensuradas para a avaliação da função leucocitária pela adição de 4L às amostras nos tubos de teste, seguido



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



da adição de 1960 mL do reagente molibdato de O-dianisina e água, para avaliação no espectrofotômetro. (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Pleurisia induzida por carragenina

Primeiro os animais serão tratados com as doses estabelecidas do composto a ser formulado. Após 1h, a migração leucocitária será induzida pela injeção de carragenina (%1 i.p., 0,25mL) na cavidade pleural do animal. 4h após a indução, o animal será anestesiado com ketamina e xilazina (80 e 8 mg/kg, respectivamente) e eutanasiado por deslocamento cervical para obter o lavado pleural. 1 mL de solução salina contendo EDTA será injetado e aspirado da cavidade pleural três vezes para obter uma amostra representativa do fluido pleural. O lavado pleural será centrifugado e o sobrenadante será armazenado para a mensuração de citocinas. A solução será analisada em microscópio ótico. Os resultados serão expressos pelo número total de leucócitos por cavidade (OLIVEIRA, 2012).

Mensuração de citocina

As concentrações de TNF- α e IL-1 β serão mensuradas usando kits ELISA de acordo com os protocolos de instrução.

Granuloma induzido pela implantação de pellets de algodão

Quatro pellets de algodão pesando aproximadamente 0.01g cada serão implantados nos animais (n=6) através de uma pequena incisão dorsal com anestesia prévia. Os animais serão tratados com solução salina a 0,9% e a concentração a ser determinada do composto semissintético a ser sintetizado, por dez dias consecutivos acompanhado da implantação do pellet. No décimo primeiro dia, os animais serão eutanasiados e os pellets de algodão contidos em torno do tecido fribovascular serão removidos e secos a 37°C por 24h. Os resultados serão expressos pela diferença entre o peso inicial e o peso seco final (LALITHA; SETHURAMAN, 2010).

Análise Estatística

Os dados serão analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey ou ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey usando o software GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Valores serão expressos como o erro padrão médio da média (SEM) e diferenças com $p < 0,05$ sendo considerado significativo.



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

ATIVIDADES	SEMESTRE							
	21.1	21.2	22.1	22.2	23.1	23.2	24.1	24.2
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	
Elaboração do projeto e submissão ao Comitê de ética em pesquisa animal	X	X						
Testes clínicos			X	X	X	X		
Análise dos dados				X	X	X		
Elaboração e submissão de artigos científicos.					X	X	X	X
Qualificação				X				
Defesa da tese							X	

REFERENCIAS:

BAILÃO, E. F.; DEVILLA, I. A.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; BORGES, L. L. **Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits**. International journal of molecular sciences vol. 16,10 23760-83. 9, 2015.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. **Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation**. Blood, 60, 618–622. 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº. 136, de 29 de maio de 2003**. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. Diário Oficial da União 02 Jun 2003.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. **Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios**. Rev. Virtual Quim., , 9 (2), 575-595, 2017.

DE ARAÚJO, E. et al. **Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing Kalanchoe brasiliensis and Kalanchoe pinnata leaf aqueous extract**. Biomedicine & pharmacotherapy, 113, 108721, 2019.



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



DE OLIVEIRA, A.M.; CONSERVA, L.M.; DE SOUZA FERRO, J.N.; BRITO, F.; LEMOS, R.P.L.; BARRETO, E. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of octacosanol from the leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in mice.** Int. J. Mol. Sci., 13, 1598–1611. 2012.

Giacomini, R. A. et al. **Atividade Biológica de Alguns Ácidos Diterpênicos Naturais e de seus Derivados Semi-Sintéticos.** Revista Fitos Vol.1 Nº01 junho/2005.

GUIDELINE, O.O. 425: **Acute oral toxicity—Up-and-down procedure.** In **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**; OECD Publishing: Paris, France, Volume 2, pp. 12–16. 2001.

KANAGASANTHOSH K.; SHANMUGAPRIYAN S.; KAVIRAJAN V. **Evaluation of acute toxicity, anti-inflammatory activity and phytochemical screening of ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves** Int. J. Res. Dev. Pharm., 4 (5), pp. 1737-1742. 2015.

SELVARANI k.; BAI G.V.S. **Anti-arthritic activity of *Cayratia pedata* leaf extract in Freund's adjuvant induced arthritic rats** Int. J. Res. Plant Sci., 4 (2) pp. 55-59. 2014.

LALITHA, K.G.; SETHURAMAN, M.G. **Anti-inflammatory activity of roots of *Ecbolium viride* (Forsk) Merrill.** J. Ethnopharmacol., 128, 248–250, 2010.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais.** Soc. Bras. Plantas Med., 64–66, 2003.

LO, T.N.; ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. **Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin.** J. Pharmacol. Exp. Ther., 221, 261–267, 1982.

GUIMARÃES, L.G.deL. et al. **Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*cymbopogon citratus* (d.c.) STAPF)** Quim. Nova, Vol. 31, No. 6, 1476-1480, 2008.

KAZEMIPOOR, M.; RADZI C.W.; CORDELL G.A.; YAZE I. **Safety, efficacy and metabolism of traditional medicinal plants in the management of obesity: a review** Int. J. Chem. Eng. Appl., 3 (4), pp. 288-292, 2012.



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR-SECITECE
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB



MALING, H.M.; WEBSTER, M.E.; WILLIAMS, M.A.; SAUL, W.; ANDERSON, W. **Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: Antagonists and mechanisms of action.** J. Pharmacol. Exp. Ther., 191, 300–310, 1974.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. **Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol** Food Chemistry Volume 110, Issue 1, 1 September, Pages 76-82, 2008.

PRÓSPERO, D.F.A. et al. **Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway.** Chem. Biol. Interact., 293, 55–60, 2018.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. **Mechanisms of the inflammatory response.** Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol., 18, 385–405, 2004.

VALLI, M., RUSSO, H. M., & BOLZANI, V. S. **The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy.** Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 90(1 Suppl 1), 763–778, 2018.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. **Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs.** Exp. Biol. Med., 111, 544–547, 1962.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M.F. **Chemically induced mouse models of intestinal inflammation.** Nat. Protoc., 2, 541–546, 2007.